



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

GABRIELA STUDART GALDINO

**SCORE PREDITOR DE MORTALIDADE E
BIOMARCADORES DE GRAVIDADE NA LEPTOSPIROSE**

FORTALEZA-CE

2023

GABRIELA STUDART GALDINO

**ESCORE PREDITOR DE MORTALIDADE E
BIOMARCADORES DE GRAVIDADE NA LEPTOSPIROSE**

Tese apresentada a banca examinadora do Curso de Doutorado em Ciências Médicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências médicas da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Linha de pesquisa: Nefrologia Tropical

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth De Francesco Daher.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tainá Veras de Sandes Freitas.

.

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G149e Galdino, Gabriela Studart.

Escore Preditor de Mortalidade e Biomarcadores de Gravidade na Leptospirose /
Gabriela Studart Galdino. – 2023.

90 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Elizabeth de Francesco Daher.

Coorientação: Prof. Dr. Tainá Veras de Sandes Freitas.

1. Leptospirose. 2. Biomarcadores. 3. Machine Learning. 4. Mortalidade. I. Título.

CDD 610

GABRIELA STUDART GALDINO

**ESCORE PREDITOR DE MORTALIDADE E
BIOMARCADORES DE GRAVIDADE NA LEPTOSPIROSE**

Tese apresentada a banca examinadora do Curso de Doutorado em Ciências Médicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências médicas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Linha de Pesquisa: Nefrologia Tropical

Aprovada em: _04__/_10__/_2023__.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lúcia Andrade
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Geraldo Bezerra
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Janaína Ramalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos pacientes, meu estímulo diário.

AGRADECIMENTOS

A pesquisa científica requer trabalho coletivo, portanto tenho muito e muitos a agradecer.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de ter ingressado neste Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas onde tive a oportunidade de aprender que a ciência embasada em boas perguntas e em busca de novas perspectivas é capaz de contribuir com soluções práticas e eficazes para transformar diferentes cenários.

À Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (Ebserh) pelo incentivo e compreensão da importância e necessidade da dedicação à pesquisa.

Ao Hospital Universitário Walter Cantídio, Hospital Geral de Fortaleza e Hospital São José por terem acolhido nossa pesquisa. Aqui destaco os funcionários do núcleo de epidemiologia, laboratório e setores da emergência e enfermarias que contribuíram sinalizando a admissão dos pacientes além do auxílio e apoio na coleta das amostras.

Ao Centro Universitário Unichristus, aos colegas professores e coordenadores pelo estímulo e apoio, todos representados pela Prof^a. Dra. Cláudia Oliveira, membro da banca de qualificação, com relevantes observações e comentários construtivos.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Elizabeth Daher por ser inspiração desde a faculdade, indo além da clareza admirável no raciocínio e das ricas considerações nos estudos desenvolvidos como também pelo exemplo em ações e palavras nas diversas esferas da vida.

À minha coorientadora Prof^a. Dra. Tainá Veras pelos ensinamentos metodológicos fundamentais para aperfeiçoar o meu entendimento e construção da minha escrita científica.

Aos professores Prof. Dr. Gustavo Modelli e Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante pela crucial ajuda na parte estatística do projeto bem como suporte e paciência para o esclarecimento dos meus questionamentos.

Ao Prof. Geraldo Bezerra pelo apoio e disponibilidade desde a época do mestrado, sábios ensinamentos e contribuições significativas nos artigos científicos.

Aos alunos de iniciação científica pela disposição e auxílio na coleta de dados.

À secretaria do programa de pós-graduação, representada pela querida Ivone Mary Fontenele, por seu constante interesse em ajudar e solucionar as questões burocráticas sempre com leveza e tranquilidade.

Por fim, mas não menos importante, sou muito abençoada e grata, pois tenho amizades verdadeiras, de longa data, nutridas desde o colégio e a faculdade, presentes até hoje e, em especial, como alicerce da minha vida, tenho uma família sensacional!

Meus avós, tios e tias que sempre estão na torcida; minha mãe, Júlia, e meu pai, Olímpio Neto, opostos complementares, base de tudo, onde os extremos tornam-se equilíbrio; minha irmã, Camila, e meu irmão, Olímpio, presenças perenes e essenciais na minha vida, pessoas completamente diferentes e ambos admiráveis; meu marido, Lucas Silvestre, meu oposto complementar, juntos construímos a nossa melhor versão e, com minha filha, Bia, e meu filho, Di, descobri o indescritível, imensurável, meus corações que batem fora de mim. Assim, aprendi, sentindo e vivenciando, a importância do amor e do amar, entendendo que os diferentes pontos de vista nos permitem ampliar horizontes e somar durante a nossa existência.

Penso, logo existo.
René Descartes

Ciente disto,

Como sou pouco e sei pouco,
faço o pouco que me cabe, me dando por inteiro.
Ariano Suassuna

RESUMO

A leptospirose é uma doença negligenciada que, apesar de avanços na identificação e manejo, persiste com taxas relevantes de morbimortalidade. A detecção precoce dos fatores de gravidade nesses pacientes é crucial para direcionar os cuidados necessários. Os objetivos principais deste trabalho foram desenvolver um escore admissional preditor de óbito na leptospirose grave e investigar a correlação com os novos biomarcadores de dano renal e endotelial. **Método:** Para construção do escore preditor de mortalidade intra-hospitalar, dados de 295 pacientes internados por leptospirose foram analisados retrospectivamente e, com o uso do *machine learning*, foram criados modelos em uma coorte de derivação. Para avaliação dos biomarcadores e correlação com o novo escore, o estudo foi prospectivo e avaliou casos consecutivos de leptospirose admitidos nos três hospitais terciários de Fortaleza de fevereiro de 2017 a abril de 2023. Amostras de sangue e urina foram coletadas na admissão hospitalar para quantificar os biomarcadores de lesão, renais (MCP-1, NGAL sérico e urinário e FGF-23) e endoteliais (ICAM-1, VCAM-1, Angiopietina-1, Angiopietina-2, Sindecin-1 e vWF-A2). **Resultados:** Para construção do escore, a ferramenta Lasso foi selecionada para análise de regressão, pois demonstrou melhor precisão para prever mortalidade na amostra [área sob a curva (AUC-ROC) = 0,776]. Um escore de previsão baseado na equação do modelo Lasso foi realizado e nomeado LeptoScore. Então, para simplificar o modelo preditor inicial, um novo escore foi construído atribuindo pontos aos parâmetros com maiores coeficientes de importância. O escore simplificado, denominado QuickLepto, possui cinco variáveis (idade > 40 anos; letargia; alterações pulmonares; pressão arterial média < 80 mmHg e hematócrito < 30%) e mostrou bom valor preditivo (AUC-ROC = 0,788). Na amostra prospectiva, 44 pacientes foram incluídos, 81,8% eram homens, a média de idade foi de $40,8 \pm 16,9$ anos e 9,1% evoluíram para óbito. Na avaliação das correlações entre o novo escore, QuickLepto, e os biomarcadores de gravidade dosados na admissão hospitalar, todo o perfil endotelial estudado com VCAM-1 ($r= 0,507$, $p < 0,001$), ICAM-1 ($r= 0,311$, $p=0,040$), sindecin-1 ($r= 0,331$, $p= 0,028$) e Ang-2 ($r= 0,442$, $p= 0,003$) mostrou correlação significativa e positiva, exceto a Ang-1. Na análise dos parâmetros relacionados a coagulação, o biomarcador endotelial vWF-A2 foi o único que evidenciou correlação significativa com o escore preditor ($r= 0,417$, $p=0,005$). As plaquetas, TAP e TTPA não apresentaram associação significativa. No perfil renal, o NGAL sérico, também apresentou correlação positiva com significância estatística ($r= 0,388$, $p=0,009$). Não foi observada associação com creatinina, FGF-23 sérico bem como NGAL urinário e MCP-1. **Conclusão:** O novo sistema de pontuação, QuickLepto, é uma ferramenta simples e prática para predizer mortalidade em pacientes com leptospirose na admissão hospitalar. O biomarcador renal NGAL sérico e os endoteliais ICAM-1, VCAM-1, sindecin-1, Ang-2 e vWF-A2 podem ser úteis na predição de óbito relacionado a leptospirose grave bem como no direcionamento das intervenções clínicas precoces, visando reduzir este desfecho.

Palavras-chave: Leptospirose. Biomarcadores. *Machine Learning*. Mortalidade.

ABSTRACT

Leptospirosis is a neglected disease that persists with relevant morbidity and mortality rates despite advances in identification and management. Early detection of severity factors in these patients is crucial to point out the necessary care. The main objectives of this work were to develop a predictor score of death in severe leptospirosis and to investigate the correlations between this and the new biomarkers of renal and endothelial damage. **Method:** Data from 295 hospitalized patients for leptospirosis were retrospectively analyzed to build the mortality predictor score which was eventually created in a derivation cohort by using machine learning models. For the study of biomarkers and its associations with the new score, the study was prospective and evaluated consecutive cases of leptospirosis admitted to the 3 tertiary hospitals in Fortaleza from February 2017 to April 2023. Blood and urine samples were collected upon hospital admission to quantify the biomarkers of severity, renal (MCP-1, serum and urinary NGAL and FGF-23) and endothelial (ICAM-1, VCAM-1, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Syndecan-1 and vWF-A2). **Results:** To construct the score, Lasso was selected for regression analysis, as it demonstrated better accuracy in predicting mortality in the sample [area under the curve (AUC-ROC) = 0.776]. A prediction score based on the Lasso coefficients was performed and named LeptoScore. To simplify the initial predictive model, a new score was constructed by assigning points to the parameters with greater values of importance. The simplified score, called QuickLepto, has five variables (age > 40 years; lethargy; pulmonary alterations; mean arterial pressure < 80 mmHg and hematocrit < 30%) and showed good predictive value (AUC-ROC = 0.788). In the prospective sample, 44 patients were included, 81.8% were men, the mean age was 40.8 ± 16.9 years and 9.1% died. The correlations between the new QuickLepto score and the severity biomarkers measured at hospital admission have shown that the entire endothelial profile studied with VCAM-1 ($r= 0.507$, $p < 0.001$), ICAM-1 ($r= 0.311$, $p= 0.040$), syndecan-1 ($r= 0.331$, $p= 0.028$) and Ang-2 ($r= 0.442$, $p= 0.003$) showed significant and positive correlation, except for Ang-1. In the analysis of coagulation-related parameters, the vWF-A2 biomarker was the only one that showed a significant correlation with the predictor score ($r= 0.417$, $p=0.005$). Platelets, TAP and APTT showed no significant association. In the renal profile, serum NGAL also showed a positive correlation with statistical significance ($r= 0.388$, $p=0.009$). No association was observed with creatinine, serum FGF-23 and MCP-1 and urinary

NGAL. **Conclusion:** The new scoring system, QuickLepto, is a simple and useful tool to predict mortality in patients with leptospirosis at hospital admission. The serum NGAL renal biomarker and the endothelial biomarkers ICAM-1, VCAM-1, syndecan-1, Ang-2 and vWF-A2 may be helpful to predict death related to severe leptospirosis as well as to guide early clinical interventions aimed at reducing this outcome.

Keywords: Leptospirosis. Biomarkers. Machine Learning. Mortality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fisiopatologia na Leptospirose: Resposta Imune.....	22
Quadro 1 –	Adaptada da proposta da nova definição de Injúria Renal Aguda.....	24
Figura 2 –	Fisiopatologia da IRA na leptospirose.....	28
Quadro 2 –	Biomarcadores de gravidade na leptospirose.....	32
Figura 3 –	Coleta e processamento das amostras de urina e sangue.....	42
Figura 4 -	Coeficientes de importância pelo modelo Lasso das variáveis associadas a óbito em pacientes com leptospirose (LeptoScore).....	50
Quadro 3 -	QuickLepto: uma escala de seis pontos.....	50
Figura 5 –	Curvas AUC-ROC do QuickLepto na coorte de validação.....	51
Figura 6 –	Distribuição dos valores do QuickLepto conforme mortalidade.....	54
Figura 7 –	Correlação entre SPIRO e qSOFA com o escore QuickLepto.	54
Figura 8 –	Correlação entre biomarcadores endoteliais e o escore QuickLepto.....	55
Figura 9 –	Correlação entre biomarcadores vWF e sNGAL com o escore QuickLepto.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características admissionais dos pacientes com leptospirose.....	45
Tabela 2 –	Métricas de desempenho de modelos de mortalidade por leptospirose nas coortes de derivação e validação.....	48
Tabela 3 –	Métricas de performance do LeptoScore e QuickLepto na coorte de validação.....	50
Tabela 4 –	Comparação das métricas de precisão com os modelos preditores prévios.....	52
Tabela 5 –	Características gerais.....	54
Tabela 6 –	Correlação entre escores clínicos e biomarcadores admissionais com o QuickLepto.....	56

LISTA DE ABREVIações E DE SIGLAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADQI	<i>Acute Disease Quality Initiative</i>
ALT	Alanina aminotransferase
Ang-1	Angiopietina-1
Ang-2	Angiopietina-2
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CAM	Moléculas solúveis de adesão celular
CART	Classificação e regressão para aprendizado de máquina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CK	Creatina fosfoquinase
Cl_{cr}	<i>Clearence</i> de creatinina
FGF-23	<i>Fibroblast growth factor</i>
Hb	Hemoglobina
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IgM	Anticorpos imunoglobulina M
iNOS	Óxido de nítrico induzido
IRA	Injúria Renal Aguda
IRB	Institucional Local Comitês de Revisão
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
KNN	k-vizinhos mais próximos
LBFBFC	Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Antígenos lipopolissacarídeos
MAT	Título de soroaglutinação microscópica
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>

NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
NIA	Nefrite túbulo-intersticial aguda
OMPS	<i>Outer Membrane Proteins</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAM	Pressão Arterial Média
P_{Ca++}	Cálcio plasmática
P_{Cl-}	Cloro plasmática
P_{Cr}	Creatinina plasmática
P_{K+}	Potássio plasmática
P_{Mg+}	Magnésio plasmática
P_{Na+}	Sódio plasmática
P_{PO4-}	Fósforo plasmática
qSOFA	<i>Quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
sCD62E	Níveis de E-selectina solúvel
SDMA	Dimetilarginina simétrica
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular solúvel 1
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
SMOTE	<i>Synthetic Minority Over-sampling Technique</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TRS	Terapia Renal Substitutiva
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WBC	Contagem de glóbulos brancos
vWF	Fator de <i>von Willebrand</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Etiologia	19
2.2	Patogenia.....	19
2.3	Repercussão Clínica.....	21
2.4	Preditores de Gravidade.....	22
2.5	Biomarcadores endoteliais e renais.....	22
2.6	Biomarcadores renais.....	23
2.7	Biomarcadores endoteliais.....	25
2.8	Biomarcadores endoteliais e renais e associação com leptospirose.....	26
2.8.1	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL).....	26
2.8.2	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) e Kidney injury molecule (KIM-1).....	27
2.8.3	Fibroblast growth factor (FGF-23).....	28
2.8.4	Angiopietina-1 (Ang-1) e Angiopietina-2 (Ang-2).....	28
2.8.5	Vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) e Syndecan-1.....	29
2.8.6	Fator de von Willebrand (vWF).....	30
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MÉTODO.....	36
4.1	Para desenvolvimento do escore preditor de mortalidade.....	36
4.1.1	Desenho do estudo, população e ética.....	36
4.1.2	Parâmetros avaliados.....	36
4.1.3	Desfecho.....	37
4.1.4	Análise estatística.....	37
4.1.5	Modelo Preditivo.....	38
4.1.5.1	<i>Etapa de pré-processamento.....</i>	<i>38</i>
4.1.5.2	<i>Ajuste de pontuação e visualização do modelo.....</i>	<i>38</i>
4.1.5.3	<i>Métricas de precisão para modelos publicados anteriormente.....</i>	<i>39</i>

4.2	Para análise dos novos biomarcadores renais e endoteliais.....	40
4.2.1	Desenho e local do estudo.....	40
4.2.2	População do estudo.....	41
4.2.3	Aspectos éticos.....	41
4.2.4	Coleta e processamento das amostras biológicas.....	41
4.2.5	Parâmetros estudados.....	42
4.2.6	Avaliação laboratorial geral.....	42
4.2.7	Avaliação da função renal e diagnóstico de IRA.....	43
4.2.8	Avaliação dos novos biomarcadores renais e endoteliais.....	43
4.2.9	Apresentação e análise dos resultados.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Desenvolvimento do escore preditor de mortalidade na leptospirose.....	45
5.1.1	Características dos pacientes com leptospirose na admissão hospitalar.....	45
5.1.2	Modelo preditor.....	47
5.1.3	Fazendo uma previsão baseada em pontuação.....	49
5.1.4	Pontuação rápida e simplificada (QuickLepto).....	49
5.1.5	Comparação de métricas de precisão com modelos anteriores.....	51
5.2	Correlações entre o novo escore preditor de óbito com os escores preditores existentes e os biomarcadores de gravidade.....	52
6	DISCUSSÃO.....	57
6.1	Desenvolvimento do escore preditor de mortalidade na leptospirose.....	57
6.2	Correlações entre o novo escore de óbito com os escores preditores existentes e os biomarcadores de gravidade	59
6.3	Perspectivas futuras.....	61
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICES.....	73
	ANEXOS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das principais zoonoses com distribuição global, entretanto permanece dentre as doenças negligenciadas e, comumente, os dados de morbimortalidade são subestimados (COSTA *et al.*, 2015). Tradicionalmente, a doença é endêmica nos países tropicais onde as condições climáticas e socioeconômicas favorecem a exposição humana ao contato com urina e água contaminada por ratos, que são os principais vetores, pois abrigam nos túbulos renais os reservatórios para propagação da *Leptospira* (PAPAS *et al.*, 2008).

Estima-se que a leptospirose seja causa de mais de 1 milhão de casos e aproximadamente 50000 mortes por ano (COSTA *et al.*, 2015). No Brasil, conforme o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) atualizado em março de 2023, foram notificados, em 2022, 3.084 casos e 310 óbitos. No Ceará, no mesmo período, foram registrados 98 casos e 9 óbitos, portanto, a taxa de letalidade encontra-se em torno de 10% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

O quadro clínico é variável, muitas vezes, os sintomas iniciais são inespecíficos o que contribui para baixa suspeição clínica e subnotificação destes casos. A apresentação é marcada por uma síndrome febril com amplo espectro de sintomas associados desde casos leves com a mialgia e cefaleia até quadros graves caracterizados, principalmente, por acometimento renal, pulmonar, icterícia e sangramentos com necessidade de internação hospitalar e podendo culminar com óbito (DAHER *et al.*, 2017).

Diante das alterações multissistêmicas e relevante morbimortalidade, a doença adquire um caráter muito semelhante a sepse, portanto, com necessidade de identificação e intervenção precoces. Ferramentas preditoras são extremamente úteis para estratificar o risco e otimizar o cuidado. Atualmente, já existem escores preditores de mortalidade para pacientes sépticos, entretanto a leptospirose, muitas vezes, apresenta um envolvimento orgânico peculiar que pode gerar impactos distintos no desfecho. Um estudo recente realizado em pacientes com leptospirose em unidades de terapia intensiva mostrou que o *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS) apresentou pior desempenho em relação à mortalidade. A mortalidade dos pacientes com leptospirose foi menor do que a prevista pelo escore SAPS (DELMAS *et al.*, 2018). Em 2019, foi criado um escore preditor específico para avaliar gravidade em pacientes com leptospirose, denominado SPIRO, entretanto o desfecho analisado foi

múltiplo composto por hemorragia pulmonar, intubação, admissão em unidade de terapia intensiva (UTI), necessidade de diálise ou droga vasoativa (SMITH *et al.*, 2019). Assim, percebemos a necessidade de um escore com foco específico na predição da mortalidade destes pacientes.

Em paralelo, é fundamental esclarecer o mecanismo fisiopatológico que embasa tamanha repercussão clínica e gravidade na leptospirose. No campo pré-clínico e de investigação das bases moleculares e celulares, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de investigar quais os mecanismos envolvidos neste processo (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Avanços importantes apontam que o dano recorrente na camada endotelial presente nos pequenos vasos é considerado o principal fenômeno patológico da leptospirose, entretanto o mecanismo exato ainda não está totalmente elucidado (SAMROT *et al.*, 2021).

Os novos biomarcadores têm sido estudados em diferentes contextos e têm evidenciado novas descobertas de mecanismos fisiopatológicos, além de importante ferramenta para prever complicações clínicas, estimulando adequações no cuidado e diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes (MÅRTENSSON; MARTLING; BELL, 2012; RONCO *et al.*, 2017).

O presente estudo propôs-se a desenvolver, com técnicas de *machine learning*, um novo escore para prever óbito em pacientes com leptospirose grave, utilizando parâmetros admissionais rotineiros. Além disso, investigar a correlação entre a repercussão clínica, utilizando o escore desenvolvido, com os avanços laboratoriais, pesquisando o papel dos biomarcadores endoteliais e renais para compreender o envolvimento destes na evolução e desfecho nos pacientes com leptospirose grave.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Etiologia

A leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1886, por Weil, em Heidelberg, Alemanha, em pacientes com quadro de icterícia, insuficiência renal e fenômenos hemorrágicos (LOMAR *et al.*, 2002).

O agente etiológico é a bactéria espiroqueta *Leptospira*, descrita na primeira década o século XX (LEVETT, 2001). Desde então, os conhecimentos fisiopatológicos envolvidos têm crescido de forma exponencial.

O gênero *Leptospira* tem cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6–20 µm de comprimento dividido em duas espécies com diferentes propriedades metabólicas: *L. interrogans* que inclui cepas patogênicas e *L. biflexa* incluindo cepas saprófitas isoladas do ambiente (FAINE; ADLER; BOLIN, 1999; LEVETT; 2001).

Com base na expressão distinta de epítomos de seus antígenos lipopolissacarídeos (LPS) superfície expostos na superfície em um mosaico, estas duas espécies são divididas em sorovares definidos por técnicas de aglutinação na presença de antígeno homólogo (aproximadamente 60 sorovares para *L. biflexa*, mais de 225 para *L. interrogans*). Assim, atualmente, os métodos sorológicos identificam mais de 300 sorovares, dos quais mais de 200 são considerados patogênicos (BHARTI *et al.*, 2003; MOHAMMED *et al.* 2011).

2.2 Patogenia

A *Leptospira* é uma bactéria altamente invasiva capaz de empregar diversas estratégias para subverter a imunidade do hospedeiro, estabelecendo a infecção e invadindo órgãos-alvo (CHIN *et al.*, 2020).

O resultado da infecção pela *Leptospira* depende, em grande parte, de alguns determinantes, como o tamanho do inóculo (GANOZA *et al.* 2006), imunidade do hospedeiro (CHIN *et al.* 2018) e a virulência, expressos pela *Leptospira* patogênica (THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2007; CHIN *et al.*, 2020).

Vários antígenos têm sido relatados como potenciais fatores de virulência da *Leptospira*, incluindo as várias proteínas da membrana externa (OMPs), LPS, moléculas de adesão e hemolisinas. Embora as leptospiros adotem uma estrutura

bastante linear de transmissão, adesão e entrada celular nas células hospedeiras, a fisiopatologia molecular exata pertencente à leptospirose ainda é um enigma (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

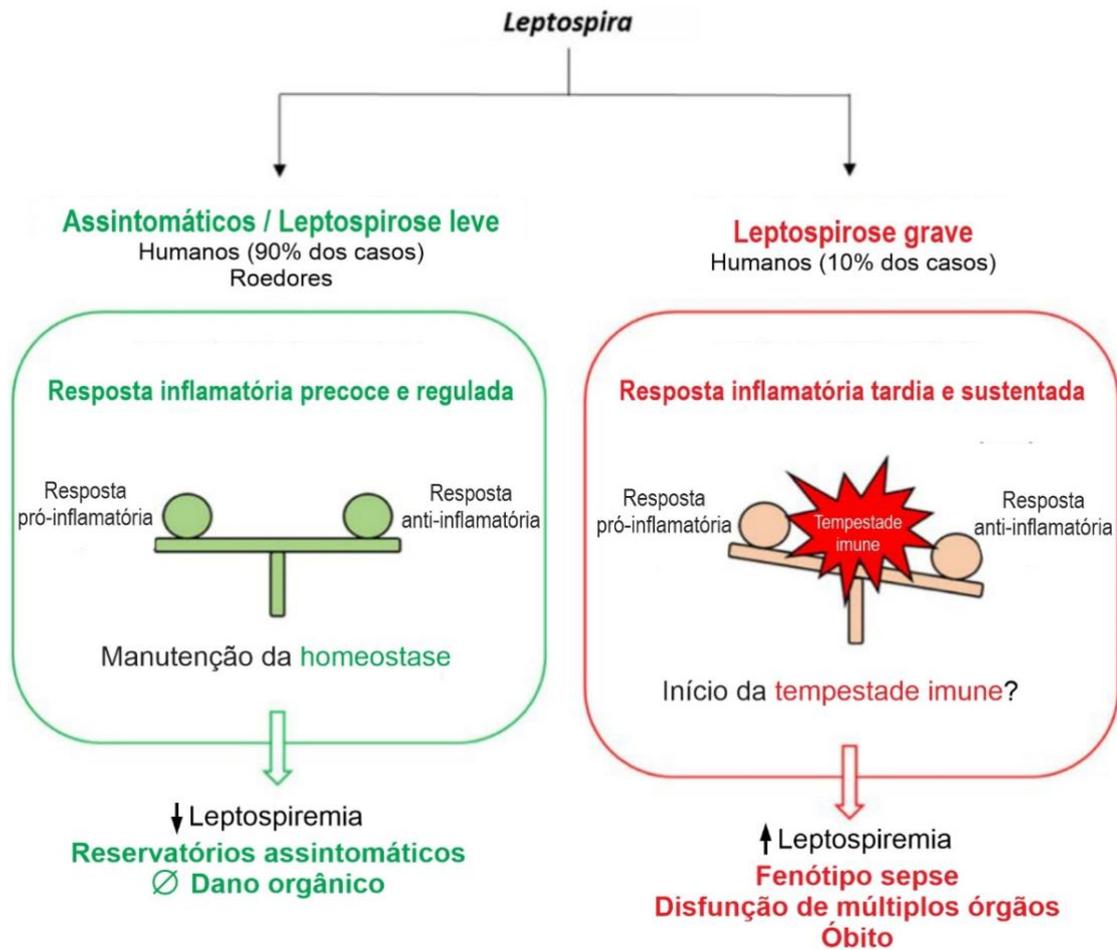
No estágio inicial da infecção, os pacientes com leptospirose e hospedeiros animais infectados geralmente apresentam estado de bacteremia o que permite que as espiroquetas se propagem até os rins. Portanto, a migração de espécies patogênicas de *Leptospira* através de pequenos vasos sanguíneos e túbulos renais é importante para o agravamento destes pacientes e transmissão das espiroquetas dos animais aos humanos pela propagação na urina. (SUN; LIU; YAN, 2020).

Embora sejam geralmente considerados patógenos extracelulares, principalmente existentes na corrente sanguínea do hospedeiro (BULACH; ADLER, 2014), Barocchi *et al.* (2002) conseguiram inferir que as leptospirosas têm a capacidade de translocação entre as células por meio de monocamadas polarizadas, mas incapazes de fazê-lo por meio de junções celulares (SAMROT *et al.*, 2021).

A VE-caderina é um receptor bastante importante previamente identificado para leptospirosas patogênicas. A ligação da bactéria à VE-caderina é mediada por adesinas, proteínas e lipoproteínas, que foram identificadas no soro de pacientes com leptospirose (CHIRATHAWORN *et al.*, 2016). Evidências recentes que a célula endotelial é lesada na leptospirose e isso inclui não apenas a principal lesão na junção aderente como também alterações da membrana celular, levando a permeabilidade alterada (BRITO; SILVA; ABREU, 2018).

Em adição, teoriza-se que a doença ocorre como resultado da resposta imune do hospedeiro aos organismos (SATIYA; GUPTA; PARIKH, 2020; SAMROT *et al.*, 2021). Os pacientes com leptospirose que apresentam forte reação inflamatória podem apresentar lesão tecidual extensa e falência de múltiplos órgãos conforme ilustrado na figura 1 (YILMAZ *et al.*, 2015; CAGLIERO; VILLANUEVA; MATSUI, 2018).

Figura 1 - Fisiopatologia na Leptospirose: Resposta Imune



Fonte: Adaptada de CAGLIERO, VILLANUEVA, MATSUI. 2018

2.3 Repercussão Clínica

O período de incubação até o aparecimento dos sintomas varia de cinco a 14 dias, com média de dez dias (BHARTI *et al.*, 2003). O quadro clínico da leptospirose é variável apresentando-se como doença febril oligossintomática até formas graves com acometimento em diferentes sistemas (HAAKE; LEVETT, 2015).

A maioria dos pacientes manifesta uma doença assintomática ou leve com febre, calafrios, cefaleia e mialgia. Dez por cento dos indivíduos afetados podem desenvolver uma condição ameaçadora à vida caracterizada por disfunção hepática com icterícia rubínica e injúria renal aguda (IRA), conhecida como síndrome de *Weil*, além de hemorragia pulmonar, sintomas gastrointestinais, coagulopatia, distúrbios eletrolíticos e miocardite, bem como insuficiência hepática e sintomas neurológicos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; HAAKE; LEVETT, 2015).

Logo, a leptospirose grave tem sido considerada uma Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) devido à tempestade de citocinas nos pacientes (YILMAZ *et al.*, 2015; ; CHIRATHAWORN *et al.*, 2016; CAGLIERO; VILLANUEVA; MATSUI, 2018).

2.4 Preditores de Gravidade

Em decorrência das alterações multissistêmicas, a doença adquire um caráter muito semelhante a sepse. Assim, diante de relevante morbimortalidade, ferramentas preditoras são necessárias para que os pacientes com maior gravidade e risco de óbito sejam identificados de forma precoce, pois, apesar da queda nas últimas décadas atribuída aos avanços e intervenções terapêuticas, a mortalidade permanece alta (DAHER *et al.*, 2017).

No cenário clínico, já existem escores preditores de mortalidade para pacientes sépticos (SEYMOUR *et al.*, 2016), entretanto a repercussão da leptospirose, muitas vezes, apresenta um envolvimento orgânico peculiar que pode gerar impactos distintos no desfecho. Conforme já postulado por Vicent e cols o ponto prioritário no manejo de um paciente com sepse é identificar qualquer foco de infecção invasiva (VINCENT *et al.*, 2013).

Estudo realizado em pacientes com leptospirose em unidades de terapia intensiva mostrou que o escore SAPS apresentou pior desempenho em relação à mortalidade neste grupo (DELMAS *et al.*, 2018). Em 2019, o escore, SPIRO, foi criado para prever gravidade em pacientes com leptospirose. Este estudo foi retrospectivo com dados de pacientes diagnosticados e confirmados entre janeiro de 1998 a maio 2016 em um centro terciário na Austrália. Do total de 402 pacientes analisados, 50 evoluíram graves e apenas 2 foram a óbito. O desfecho analisado foi amplo, pois avaliou gravidade que foi definida por hemorragia pulmonar, internação em UTI, necessidade de diálise ou drogas vasoativas ou intubação (SMITH *et al.*, 2019).

2.5 Biomarcadores endoteliais e renais

O termo “biomarcador” ou marcador biológico inclui qualquer entidade que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos

normais, patogênicos ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (KATZ, 2004; MURRAY *et al.*, 2014).

Estudos com novos biomarcadores em diferentes contextos clínicos têm oferecido novas descobertas de mecanismos fisiopatológicos e atuado como ferramenta para prever complicações clínicas, estimulando mudanças no cuidado e diminuição da morbidade e mortalidade de pacientes (MÅRTENSSON; MARTLING; BELL, 2012; RONCO *et al.*, 2017).

2.6 Biomarcadores renais

Tradicionalmente, na prática clínica, os biomarcadores utilizados para definir Injúria Renal Aguda (IRA) são funcionais, isto é, creatinina sérica (sCr) e débito urinário (KELLUM; LAMEIRE; KDIGO AKI GUIDELINE WORK GROUP, 2013), entretanto esses parâmetros possuem diversas limitações. A produção de urina tem uma especificidade baixa porque este parâmetro pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo hipovolemia e uso de diuréticos. Já o nível de creatinina sérica tem baixa sensibilidade em rins previamente saudáveis, pois a elevação da sCr ocorre somente se pelo menos 50% da função néfrons são perdidos (KELLUM *et al.*, 2021).

No 23º Congresso da *Acute Disease Quality Initiative* (ADQI), em 2020, foi estabelecida a sugestão do acréscimo dos biomarcadores de dano à última definição de IRA (quadro 1). A combinação dos biomarcadores funcionais e de dano, juntamente com informações clínicas, deve ser usada para melhorar a acurácia diagnóstica da IRA, além de reconhecer os diferentes processos fisiopatológicos implicados, discriminar a etiologia e avaliar a gravidade (OSTERMANN *et al.*, 2020).

Quadro 1 – Adaptada da proposta da nova definição de Injúria Renal Aguda

Estágio	Critérios Funcionais	Critérios de Dano (Biomarcadores)
1 S	Sem alteração na sCr ou aumento <0,3 mg/dL e sem alteração no débito urinário	Biomarcador positivo

1 A	sCr \geq 0,3 mg/dL por \leq 48 h ou \geq 150% for \leq 7 dias e/ou débito urinário $<$ 0,5 mL/kg/h por $>$ 6 h	Biomarcador negativo
1 B		Biomarcador positivo
2 A	sCr $>$ 200% e/ou débito urinário $<$ 0,5 mL/kg/h por $>$ 12 h	Biomarcador negativo
2 B		Biomarcador positivo
3 A	sCr level $>$ 300% (\geq 4,0 mg/dL com agudo de \geq 0,5mg/dL) e/ou débito urinário $<$ 0,3 mL/kg/h por $>$ 24 h ou anúria por $>$ 12 h e/ou início de terapia substitutiva renal	Biomarcador negativo
3 B		Biomarcador positivo

sCr - Creatinina sérica

Fonte: OSTERMANN *et al.*, 2020.

A IRA é uma manifestação comum da leptospirose. O envolvimento renal na leptospirose varia de anormalidades urinárias assintomáticas até lesão renal grave que requer suporte dialítico. Os achados histopatológicos mais frequentes são a nefrite túbulo-intersticial aguda (NIA) e os laboratoriais são valores de potássio e sódio séricos baixos. Dessa forma, a IRA causada pela leptospirose geralmente não é oligúrica e a hipocalcemia está presente em 45 a 50% dos casos de IRA (SEGURO; LOMAR; ROCHA, 1990).

É importante destacar que a fisiopatologia da IRA é complexa e multifatorial, incluindo o efeito direto da bactéria nos tecidos renais, hipovolemia, hipotensão, rabdomiólise, hiperbilirrubinemia e lesão do glicocálce endotelial (BURDMANN; JHA, 2017; GALDINO; SILVA JUNIOR; DAHER, 2019).

Um papel importante na lesão e disfunção endotelial microvascular foi demonstrado durante a IRA (POWELL *et al.*, 2014). Assim, os biomarcadores endoteliais podem ser úteis para identificar a natureza, magnitude e local da injúria renal baseado em sua especificidade (MURRAY *et al.*, 2014).

No intuito de esclarecer de forma mais específica os mecanismos envolvidos, novos biomarcadores têm sido investigados na leptospirose.

2.7 Biomarcadores endoteliais

As células endoteliais cobrem a superfície dos vasos sanguíneos, elas estão em contato estreito com órgãos sólidos; assim, a ativação e o dano endotelial estão intimamente relacionados com a disfunção orgânica. O endotélio também é um mediador de múltiplas funções biológicas e, portanto, é um elo entre as respostas imunes locais e sistêmicas; sendo considerado uma fonte e um alvo para a inflamação (HACK; ZEERLEDER, 2001).

O endotélio que era considerado uma camada celular relativamente inerte, é, atualmente, reconhecido como um importante regulador de inúmeras funções fisiológicas, como coagulação, fibrinólise, atividade plaquetária, tônus arterial e crescimento vascular. Assim, a integridade funcional e estrutural do endotélio é fundamental para regular funções hemostáticas essenciais (DAIBER *et al.*, 2017).

As células endoteliais desempenham dois papéis importantes: amplificar a resposta imune e ativar o sistema de coagulação. Em resposta a vários patógenos, o endotélio é capaz de expressar fator tecidual, fator de von Willebrand e uma grande variedade de citocinas (WAGENAAR *et al.*, 2007). A ativação local do endotélio é crucial para impedir a infecção, enquanto a ativação sistêmica pode gerar aumento da permeabilidade capilar, hipotensão, trombose microvascular com hipóxia tecidual resultante e, finalmente, disfunção orgânica e morte (REINHART *et al.*, 2002).

A ativação das células endoteliais e a subsequente quebra da barreira vascular surgiram como um mecanismo patogênico crítico no dano de órgãos (ROBINSON-COHEN *et al.*, 2016).

Estudo recente com revisão sistemática e metaanálise evidenciou que a alteração nos biomarcadores do glicocálice endotelial (sindecán-1 e endocan) em pacientes sépticos está associada a maior risco de óbito, disfunção de múltiplos órgãos e insuficiência respiratória (SARMIENTO *et al.*, 2022).

2.8 Biomarcadores endoteliais e renais e associação com leptospirose

2.8.1 *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL)

A lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) é uma proteína de 25-kD, originalmente caracterizada em neutrófilos, que é ligada a gelatinase. Várias isoformas de NGAL são liberadas pelo rim e por células imunes (CAI *et al.*, 2010). Na urina de indivíduos saudáveis, a concentração de NGAL é muito baixa. Após um insulto, os níveis plasmáticos e urinários de NGAL aumentam consideravelmente, sugerindo um papel de NGAL para os rins análogo ao da troponina para o coração (DEVARAJAN, 2010). Inicialmente, NGAL demonstrou ter sensibilidade e especificidade muito altas para prever IRA em crianças submetidas a cirurgia cardíaca congênita (MISHRA *et al.*, 2018). No entanto, outros estudos em pacientes com diferentes comorbidades encontraram um desempenho preditivo limitado de NGAL, possivelmente porque NGAL derivado de células imunes pode não implicar necessariamente IRA (KELLUM *et al.*, 2021).

Um estudo multicêntrico na Tailândia avaliou o papel da NGAL como marcador precoce e preditor de IRA associada à leptospirose. Dos 113 casos com diagnóstico confirmado de leptospirose, cerca de um terço (37,2%) desenvolveu IRA. Os pacientes com IRA apresentaram níveis significativamente mais elevados de NGAL na urina e no plasma do que os pacientes sem IRA. No entanto, ambos não mostraram o papel potencial de ser preditor de recuperação renal (SRISAWAT *et al.*, 2015).

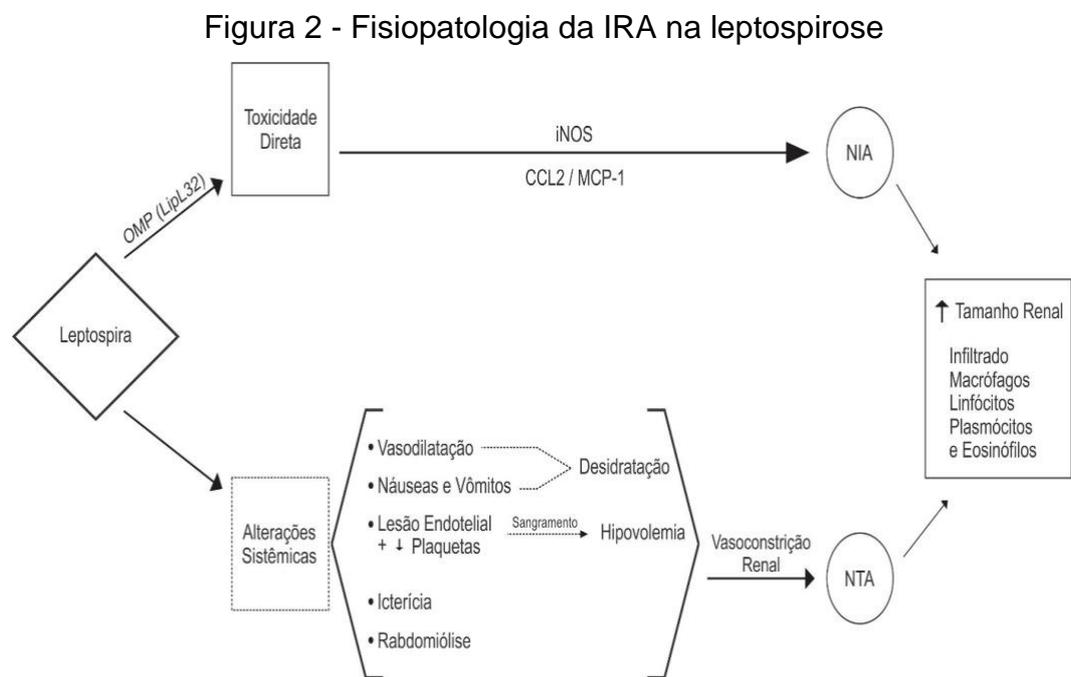
2.8.2 *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e *kidney injury molecule-1* (KIM-1)

MCP-1 é uma quimiocina (peso molecular de 8 a 10 kDa) pertencente à família das C-X-C responsável pela quimiotaxia e adesão firme dos monócitos na camada íntima. As proteínas quimiotáticas monocíticas (MCP-1, -2, -3 e -4) também são potentes atrativos de linfócitos T, *natural killer* e células dendríticas (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 2007).

MCP-1 é produzida por células endoteliais após exposição a citocinas (IL-1b, TNF-a) e lipoproteínas oxidadas. Além de desempenhar um papel importante na migração e ativação de monócitos e células T e, além disso, regula a proliferação de

células musculares lisas vasculares (BAGGIOLINI, 1998; IKEDA *et al.*, 1995; PAPAYIANNI *et al.*, 2002).

Estudos moleculares em leptospirose evidenciaram que a resposta inflamatória precoce ocorre pela estimulação de receptores *Toll-like 2* do sistema imune inato para gerar aumento na expressão de óxido de nítrico induzido (iNOS) e MCP-1 causado por *outer membrane proteins* (OMPs) das leptospiros patogênicas, em particular LipL32, nas células tubulares proximais renais (YANG *et al.*, 2006) conforme ilustrado na figura 2.



Fonte: GALDINO; SILVA JUNIOR; DAHER, 2019

O KIM-1 está envolvido na regeneração de células epiteliais e fagocitose de células mortas no lúmen tubular. (BONVENTRE, 2009).

Um grupo do Sri-Lanka avaliou a importância de KIM-1 e MCP-1 na determinação da IRA associada à leptospirose e evidenciou que os níveis de biomarcadores associados à IRA por leptospirose tiveram AUC-ROC de 0,8565, 0,7292, 0,7024 e 0,7282 para KIM-1 no soro e urina e MCP-1 soro e urina, respectivamente. Assim, concluiu que KIM-1 sérico mostrou-se como um marcador promissor para estes pacientes (NISANSALA *et al.*, 2021).

2.8.3 Fibroblast growth factor (FGF-23)

A quimiotaxia das células endoteliais é impulsionada por fatores de crescimento, como *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (RAJENDRAN *et al.*, 2013). O fator de crescimento de fibroblastos derivado de osteócitos 23 (FGF-23) emergiu como um poderoso biomarcador de doença cardiovascular e morte em pacientes com doença renal crônica (GINSBERG *et al.*, 2018).

Leaf *et al.*, (2017) evidenciaram que níveis urinários e plasmáticos de FGF23 medidos dentro de 24 horas após a admissão na UTI estão independentemente associados com IRA e óbito em pacientes críticos.

Em busca de esclarecimentos entre a associação entre FGF-23 e IRA grave, Neves *et al.*, (2019) evidenciaram que este processo é mediado por biomarcadores relacionados ao endotélio, principalmente VCAM-1, Ang-2 e sindecan-1. Os modelos estatísticos utilizados no estudo apontaram para o sindecan-1, biomarcador da disfunção do glicocálice endotelial, como provável mediador inicial do mecanismo.

Estudo recente em pacientes com leptospirose grave evidenciou níveis elevados de FGF-23 naqueles que necessitaram dialisar. Na análise como fator preditor de hemodiálise, a dosagem dos níveis de FGF-23 combinados com os biomarcadores (sindecan-1, angiopoietina-2) apresentou o melhor desempenho com significância estatística, portanto os resultados sugerem aplicabilidade promissora desse biomarcador com intuito de identificar necessidade de hemodiálise (MENESES *et al.*, 2022).

2.8.4 Angiopoietina-1 (Ang-1) e Angiopoietina-2 (Ang-2)

As angiopoietinas (Ang) são fatores de crescimento dos vasos (angiogênicos) essenciais para inflamação bem como no desenvolvimento e maturação vasculares.

A angiopoietina-2, uma glicoproteína de aproximadamente 70 kDa, é um regulador chave da quiescência vascular que atua na remodelação e ativação vascular, incluindo processos patológicos envolvendo as paredes dos vasos como inflamação durante infecções e insultos prolongados (AUGUSTIN *et al.*, 2009).

A liberação maciça de Ang-2 dos corpos endoteliais de *Weibel-Palade* interfere na sinalização constitutiva de Ang-1 ao receptor de tirosina quinase Tie2 nas células endoteliais, levando assim à quebra da barreira vascular seguida de transmigração de leucócitos e vazamento capilar que acontece nos pacientes críticos (LUKASZ *et al.*, 2008).

Em pacientes com leptospirose, Lukasz *et al.*, (2008) evidenciaram que altos níveis de angiopoietina-2 foram estatisticamente associados a um curso clínico complicado com ocorrência de IRA e necessidade de tratamento em unidade de terapia intensiva. Apesar da pequena amostra do estudo (13 pacientes), a conclusão aponta que esses marcadores endoteliais podem servir como ferramentas adicionais para a estratificação de risco nesses pacientes.

2.8.5 *Vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) e Sindecan-1*

O Sindecan-1 é um dos quatro proteoglicanos da família dos sindecans e é regulado positivamente e envolvido nas respostas de reparo tecidual em diferentes órgãos, como a pele ou os rins (KOCH *et al.*, 2019). É um dos principais constituintes do glicocálix que cobre o endotélio, logo níveis séricos aumentados deste biomarcador apontam para injúria do glicocálice endotelial (REITSMA *et al.*, 2007).

Após a exposição a condições de estresse, os efeitos inflamatórios e pró-coagulantes das células endoteliais são mediados pela sinalização NF- κ B [90], com *upregulation* dos genes alvo de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina) e quimiocinas como MCP-1 (THEOFILIS *et al.*, 2021).

Diante do provável papel da ativação endotelial na patogênese da leptospirose, Libório *et al.*, (2015) realizaram um estudo de coorte em um surto de leptospirose entre militares para avaliar a associação entre a presença e a gravidade das lesões renais com biomarcadores representativos do glicocálice e lesão endotelial (molécula de adesão intercelular-1 [ICAM-1] e sindecan-1). A leptospirose foi associada a níveis mais elevados de ICAM-1 e sindecan-1. Pacientes com IRA associada à leptospirose apresentaram níveis aumentados de sindecan-1 e ICAM-1 em comparação com pacientes com leptospirose sem IRA.

Raffray *et al.*, (2017) evidenciaram que E-selectina e s-ICAM1, moléculas de adesão, são liberadas como formas solúveis e estão elevadas durante a fase aguda

da leptospirose. Essas moléculas podem interferir no processo de recrutamento de células imunes para eliminar a *Leptospira* nos níveis teciduais. Os níveis de E-selectina solúvel (sCD62E) e molécula de adesão intercelular solúvel-1 (sICAM-1, sCD53) aumentaram significativamente em pacientes com leptospirose em comparação com controles.

Em estudo recente, diversos biomarcadores vasculares e endoteliais foram avaliados em busca de associação com necessidade de hemodiálise na leptospirose grave. Os níveis elevados de biomarcadores de lesão vascular angiopoietina-2 e sindecan-1 na admissão hospitalar foram associados a necessidade de hemodiálise durante a internação hospitalar e a angiopoietina-2 apresentou correlação com maior número de sessões de hemodiálise. Em contrapartida, não foi identificada associação significativa dos níveis séricos de VCAM-1 e ICAM-1 com o desfecho estudado (MENESES *et al.*, 2022).

2.8.6 Fator de von Willebrand (vWF)

O vWF é uma glicoproteína multimérica que se origina predominantemente do endotélio bem como nos grânulos plaquetários. Sua principal função é o recrutamento de plaquetas para locais de lesão vascular, ligando-se a glicoproteínas específicas da membrana plaquetária e constituintes do tecido conjuntivo exposto. Em condições normais, a maior parte do vWF circula na forma não ligada às plaquetas (REINHART *et al.*, 2002; TUNJUNGPUTRI *et al.*, 2017). O vWF pode, no entanto, sofrer uma alteração conformacional para uma forma mais ativa de ligação plaquetária, facilitando a agregação plaquetária (LENTING *et al.*, 2010). Além disso, o vWF também é uma proteína transportadora para o fator VIII de coagulação do sangue (REINHART *et al.*, 2002). Portanto, vWF é um fator chave na coagulação do sangue humano (FANG *et al.*, 2018).

Um aumento no vWF "ativo" foi descrito em várias doenças infecciosas e não infecciosas (HULSTEIN *et al.*, 2006; MAST *et al.*, 2009; DJAMIATUN *et al.*, 2012)

Níveis elevados de vWF foram observados em vários estados inflamatórios, incluindo sepse e choque séptico. No entanto, os dados que correlacionam os níveis plasmáticos de vWF com a gravidade da doença e o resultado do paciente são inconsistentes (REINHART *et al.*, 2002).

Estudo *in vitro* com *Leptospira virulenta* viável evidenciou que a movimentação intracelular do patógeno causou um aumento na expressão de vWF na superfície celular das células endoteliais (GOEIJENBIER *et al.*, 2015).

Estudo clínico em 33 pacientes com leptospirose provável, Tunjungputri *et al.*, em 2017, utilizando citometria de fluxo, observaram maior concentração plasmática de vWF nos casos que apresentaram sangramento. O fator de ativação do vWF foi cerca de duas vezes maior nos pacientes com leptospirose tanto naqueles com quanto sem sangramento do que em controles saudáveis, indicando que uma quantidade maior do vWF circulante estava em uma conformação de ligação plaquetária ativa. Como conclusão, os autores sugeriram que as complicações hemorrágicas nestes casos estão predominantemente associadas à disfunção plaquetária mais do que a contagem absoluta de plaquetas.

Pesquisas envolvendo biomarcadores de injúria renal e endotelial apresentam crescimento importante nos últimos anos, entretanto os resultados ainda não estão totalmente delineados, principalmente, em doenças negligenciadas como a leptospirose (quadro 2). A busca pela correlação específica entre essas moléculas e os processos fisiopatológicos implicados poderá contribuir para detecção precoce e estratificação de risco da doença. Logo, a investigação de novos biomarcadores é ponto chave para o desenvolvimento de terapias direcionadas para redução da morbimortalidade na leptospirose grave.

Quadro 2 – Biomarcadores de gravidade na leptospirose

Biomarcadores	Composição e Mecanismo de atuação	Resultados dos trabalhos em leptospirose	Autores
<i>Mediadores da função endotelial</i>			
Ang-1 (ng/mL)	Ang-1 e, seu antagonista a depender do contexto, Ang-2, são fatores de crescimento endoteliais secretados que se	Níveis séricos de Ang-2, dimetilarginina assimétrica e simétrica (ADMA e SDMA) mostraram níveis significativamente elevados em casos de	LUKASZ <i>et al.</i> , (2008)

Ang-2 (ng/mL)	<p>ligam ao domínio extracelular do receptor de tirosina quinase Tie2 que é predominantemente expresso em células endoteliais.</p> <p>A Ang-1 pode ser protetora com um papel na estabilização do endotélio, enquanto a Ang-2 promove vazamento vascular.</p>	<p>leptospirose com IRA do que em casos de leptospirose sem IRA.</p> <p>Ang-2 e sindecán-1 na admissão hospitalar foram associados à necessidade de hemodiálise durante a internação. A Ang-2 apresentou correlação com maior número de sessões de hemodiálise.</p>	MENESES <i>et al.</i> , (2022)
<i>Moléculas de adesão</i>			
ICAM-1 (ng/mL)	Molécula de adesão intercelular -1	<p>Pacientes com IRA associada à leptospirose apresentaram níveis aumentados de sindecán-1 e ICAM-1 em comparação com pacientes com leptospirose sem IRA.</p> <p>Os níveis de E-selectina e ICAM-1 solúveis aumentaram significativamente em pacientes com leptospirose em comparação com controles sadios.</p>	LIBORIO <i>et al.</i> , (2015)
VCAM-1 (ng/mL)	Molécula de adesão vascular-1		
Sindecán-1 (ng/mL)	<p>Um dos quatro proteoglicanos da família dos sindecán e é regulado positivamente e envolvido nas respostas de reparo tecidual em diferentes órgãos e um dos principais constituintes do glicocálix endotelial.</p>		
<i>Componentes da via da coagulação</i>			
vWF (ng/mL)	Glicoproteína multimérica que se origina predominantemente do endotélio bem como nos grânulos	Em pacientes com leptospirose provável, houve maior concentração plasmática de vWF nos casos que	TUNJUNGPUTRI <i>et al.</i> , (2017)

	<p>plaquetários. Sua principal função é o recrutamento de plaquetas para locais de lesão vascular</p>	<p>apresentaram sangramento. O fator de ativação do vWF foi cerca de duas vezes maior nos pacientes com leptospirose tanto naqueles com quanto sem sangramento do que em controles saudáveis, indicando que uma quantidade maior do vWF circulante estava em uma conformação de ligação plaquetária ativa.</p> <p>Estudos <i>in vitro</i> com o leptospira virulenta evidenciou que a movimentação intracelular do patógeno causou um aumento na expressão de VWF na superfície celular das células endoteliais.</p>	<p>GOEIJENBIER Et al., (2015)</p>
<i>Injúria Renal</i>			
<p>NGAL urinário (ng/mL)</p>	<p>Pelo menos 3 tipos diferentes: (1) glicoproteína monomérica de 25 kDa produzida por neutrófilos e tecidos epiteliais, incluindo células tubulares;</p>	<p>Os pacientes com IRA por leptospirose apresentaram níveis significativamente mais elevados de NGAL na urina e no plasma do que os pacientes sem IRA. No entanto, ambos não mostraram o papel potencial de ser preditor de recuperação renal.</p>	<p>SRISAWAT <i>et al.</i>, (2015)</p>
<p>NGAL sérico (ng/mL)</p>	<p>(2) proteína homodimérica de 45 kDa produzida por neutrófilos; (3) proteína heterodimérica de 135 kDa produzida por células tubulares.</p>		

MCP-1 (ng/mL)	Peptídeo expresso em células epiteliais tubulares, células mesangiais renais e podócitos; liberado na urina é uma citocina quimiotática (peso molecular de 8 a 10 kDa) produzida por células endoteliais após exposição a citocinas.	Avaliação da importância de KIM-1 e MCP-1 na determinação da IRA associada à leptospirose e concluiu que o KIM-1 sérico mostrou-se como um marcador promissor nestes pacientes.	NISANSALA <i>et al.</i> , (2021)
KIM-1 (ng/mL)	Molécula envolvida na regeneração de células epiteliais e fagocitose de células mortas no lúmen tubular.		
FGF-23 (pg/mL)	O fator de crescimento de fibroblastos derivado de osteócitos 23 (FGF-23); mecanismo não está bem estabelecido.	Na análise como fator preditor de hemodiálise em pacientes com leptospirose, a dosagem dos níveis de FGF-23 combinados com os biomarcadores (sindecan-1, ang-2) apresentou o melhor desempenho com significância estatística.	MENESES <i>et al.</i> , (2022)

Ang-1 – angiopoietina-1, Ang-2 – angiopoietina-2, vWF – fator de von Willebrand, NGAL - *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein-1*, KIM-1 - *kidney injury molecule*, IRA – injuria renal aguda
 Fonte elaborada própria, 2023.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um escore de fácil aplicabilidade para prever mortalidade intra-hospitalar em pacientes com leptospirose grave baseado nos parâmetros admissionais disponíveis na prática clínica rotineira e sua correlação com os biomarcadores de gravidade (renais e endoteliais).

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os fatores de risco para mortalidade intra-hospitalar na leptospirose grave;
- Comparar a acurácia do novo modelo preditor com os escores existentes SPIRO, preditor de gravidade em pacientes com leptospirose, e qSOFA, preditor de mortalidade intra-hospitalar em pacientes sépticos;
- Avaliar em um grupo prospectivo a associação do novo escore preditor de óbito e os biomarcadores de gravidade (renais e endoteliais).

4 MÉTODO

4.1 Para desenvolvimento do escore preditor de mortalidade

4.1.1 Desenho do estudo, definição da população e ética

Estudo de coorte multicêntrico retrospectivo realizado de janeiro de 2005 a dezembro de 2019, incluindo todos os pacientes com leptospirose internados consecutivamente em três hospitais terciários de referência em Fortaleza, Ceará, Brasil.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de leptospirose e necessidade de internamento hospitalar. Critérios para o diagnóstico da leptospirose incluíram a presença de resultado de sorologia positiva com título de soroaglutinação microscópica (MAT) superior a 1:800 ou ensaio ELISA para a detecção de anticorpos imunoglobulina M (IgM) associados a um diagnóstico epidemiológico e história clínica compatível com leptospirose. Pacientes com dados insuficientes para o diagnóstico e aqueles com doenças infecciosas agudas concomitantes (por exemplo, hepatite A, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), dengue, febre tifóide) foram excluídos.

O protocolo do estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki e com a resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos no Brasil. Os comitês de ética e pesquisa (CEP) dos hospitais participantes (Hospital São José de Doenças Infecciosas, Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral Fortaleza) aprovaram este estudo, número do parecer 1.985.754 (anexo A). Devido à natureza observacional e retrospectiva do estudo, usando dados não identificados, os CEPs dispensaram obtenção de consentimento informado.

4.1.2 Parâmetros avaliados

Os dados foram coletados dos prontuários médicos e os pacientes foram acompanhados de internação até o óbito ou alta hospitalar, o que tiver ocorrido primeiro. Características demográficas e da hospitalização como idade, sexo, tempo entre o início dos sintomas e a internação bem como o tempo de internação foram

registradas. A investigação clínica incluiu o registro dos sinais e sintomas clínicos apresentados à admissão hospitalar, sinais vitais à admissão (pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e respiratória), desenvolvimento de injúria renal aguda (IRA) e necessidade de diálise durante a internação. Dados laboratoriais coletados dentro de 24 horas da admissão hospitalar incluíram ureia, creatinina, sódio, potássio, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), creatina fosfoquinase (CK), hemoglobina, hematócrito, contagem de glóbulos brancos (WBC), contagem de plaquetas e gasometria arterial.

Injúria renal aguda foi definida de acordo com os critérios do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (KELLUM; LAMEIRE; AKI GUIDELINE WORK GROUP, 2013).

Taquipnéia foi definida como uma frequência respiratória superior a 22 respirações por minuto. Oligúria foi definida como produção de urina < 400 mL/dia após 24 horas de hidratação efetiva. Hipotensão foi definida como pressão arterial média (PAM) < 60 mmHg, e terapia com drogas vasoativas foi iniciada quando a PAM permaneceu menor que 60 mmHg apesar da administração de fluidos parenterais. Os sintomas de envolvimento pulmonar foram definidos pela ocorrência de tosse, crepitações ou hemoptise. Os sintomas de letargia foram definidos pela presença de alterações de sensório, incluindo desorientação, rebaixamento e agitação.

4.1.3 Desfecho

O principal desfecho avaliado foi óbito intra-hospitalar.

4.1.4 Análise estatística

Análise exploratória de dados.

Todas as variáveis de interesse foram comparadas entre os pacientes que sobreviveram e os que faleceram durante a internação. As comparações foram realizadas pelo teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Para variáveis contínuas foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados normais foram comparados pelo teste t de Student e os dados não normais pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram

apresentadas como frequências absolutas e em percentuais. A apresentação das contínuas com distribuição normal foi relatada como média \pm desvio padrão, enquanto as variáveis não normais foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil.

4.1.5 Modelo preditivo

4.1.5.1 Etapa de pré-processamento

Retiramos as variáveis com mais de 30% de valores faltantes (14% dos preditores) e imputados os outros (informações de suporte -Tabela 1). O algoritmo k-vizinhos mais próximos (KNN) foi usado para o método de imputação para contabilizar os valores ausentes. Todas as variáveis preditoras foram usadas para calcular a distância de Gower e os cinco vizinhos mais próximos no modelo de imputação KNN. Uma vez que os mais próximos vizinhos são determinados, o modelo é usado para imputar variáveis nominais e a média é usada para dados numéricos. As variáveis contínuas foram padronizadas subtraindo seus valores da média (centro) e dividindo pelo desvio padrão (escala). As variáveis contínuas foram transformadas usando a transformação *Box-Cox*. Variáveis com variância zero ou quase zero foram removidas do modelo. Na engenharia de recursos no processo de regressão Lasso, splines naturais com quatro graus de liberdade para a idade foram escolhidos para contabilizar a não linearidade. Para o ajuste do desbalanceamento de classe, foi utilizada a *Synthetic Minority Over-sampling Technique* (SMOTE) para criar classes sintéticas no conjunto de treinamento. O algoritmo SMOTE gerou novos exemplos da minoria usando os vizinhos mais próximos desses casos. Essa abordagem foi usada para equilibrar a classe-alvo. Esta etapa de pré-processamento foi executada no conjunto de treinamento.

a) Seleção de variáveis.

Usamos o algoritmo de Boruta para selecionar os preditores mais importantes. O algoritmo de Boruta é um método de seleção de recursos que classifica quais recursos são importantes e quais não são. Este algoritmo utiliza pontuações de importância de recursos que são fornecidas por floresta aleatória. A medida de importância de um atributo é obtida como a perda de precisão de classificação causada pela permutação aleatória de valores de atributo entre objetos. É calculado

separadamente para todas as árvores da floresta que usam um determinado atributo para classificação. Em seguida, são computados a média e o desvio padrão da perda de precisão (PONCE *et al.*, 2021). O método executa um *top-down* para procurar características relevantes comparando a importância dos atributos originais e eliminando progressivamente características irrelevantes (KURSA; RUDNICKI, 2010).

Os recursos considerados não importantes pelo algoritmo Boruta foram removidos (Apêndice D - informações Suplementares – S1 -Tabela 1). Aplicamos a seleção de recursos no conjunto de treinamento.

b) Treinamento do modelo.

Dividimos os dados em conjuntos de dados de derivação (treino) e validação (teste). Para criar o conjunto de dados, uma divisão aleatória foi usada, estratificada pelo alvo em conjunto de treinamento (80%) e teste (20%). No treinamento conjunto (coorte de derivação), a reamostragem *bootstrap* foi usada para selecionar os hiperparâmetros dos modelos e para reduzir o viés.

Utilizamos as árvores de decisão de aumento de gradiente (*xgBoost*) e a regressão Lasso para desenvolver as equações candidatas. Finalmente, os melhores hiperparâmetros foram selecionados usando abordagens de *machine learning* por reamostragem *bootstrap* em um conjunto de treinamento destinado a maximizar a área sob a curva (AUC) - *receiver operating characteristic* (ROC).

c) Avaliação da precisão.

A precisão do modelo da coorte de derivação foi testada nos dados da validação coorte. A AUC-ROC foi utilizada para discriminar a capacidade dos modelos nos conjuntos de treinamento e teste. O intervalo de confiança de 95% (95% CI) da AUC-ROC foi estimado por reamostragem *bootstrap* (2.000 amostras) para reduzir o viés de *overfit*. Além disso, a acurácia, sensibilidade e especificidade foram avaliadas. Estimamos o melhor ponto de corte para a curva ROC usando o método de maximizar a função métrica e o J-Index usando 1000 reamostragens *bootstrap*.

4.1.5.2 Ajuste de pontuação e visualização do modelo

O modelo com maior AUC-ROC na coorte de validação associado com melhores valores de acurácia balanceada foi usado para construir o novo escore chamada LeptoScore. Posteriormente, um escore simplificado, QuickLepto, foi

desenvolvido usando os valores de importância dos coeficientes mais altos da regressão Lasso.

Para o desenvolvimento do QuickLepto os preditores numéricos foram categorizados usando o *cutoff* derivado de uma árvore de classificação e regressão para aprendizado de máquina (CART).

4.1.5.3 Métricas de precisão para modelos publicados anteriormente

Os modelos finais (LeptoScore e QuickLepto) foram comparados com os escores clínicos, SPIRO e *Quick Sequential Organ Failure Assessment* (qSOFA). SPIRO prediz, em pacientes com leptospirose, gravidade definida por: hemorragia pulmonar, internação em unidade de terapia intensiva (UTI) ou necessidade de terapia renal substitutiva (TRS), ou intubação, ou necessidade de drogas vasoativas e é baseado nas seguintes variáveis: oligúria (débito urinário ≤ 500 mL/24 h), achados auscultatórios anormais no exame respiratório e hipotensão (pressão sistólica ≤ 100 mmHg) (SMITH *et al.*, 2019). O qSOFA é um escore de três pontos amplamente utilizado para identificar pacientes de alto risco para mortalidade intra-hospitalar com suspeita de infecção fora da UTI. Estado mental alterado (coma escore de Glasgow < 15), frequência respiratória ≥ 22 respirações por minuto e PA sistólica ≤ 100 mmHg são os preditores desse escore (SINGER *et al.*, 2016).

Considerando a relevância dessas pontuações, nós as aplicamos (SPIRO e qSOFA) em nosso conjunto de dados para comparar a previsão valores com os novos modelos LeptoScore e QuickLepto.

O *software R*, versão 4.0.2 e os pacotes *alignmodels*, e o pacote R software estatístico “glmnet” (R *Foundation*) foram usados para realizar a regressão Lasso.

4.2 Para análise dos novos biomarcadores renais e endoteliais

4.2.1 Desenho e local do estudo

Coorte prospectivo realizado de fevereiro de 2017 a abril de 2023 em três hospitais públicos, situados na cidade de Fortaleza, Ceará: Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) - Universidade Federal do Ceará (UFC); Hospital Geral de

Fortaleza (HGF) e no Hospital São José de Doenças Infecciosas, Fortaleza, Ceará em pacientes internados por leptospirose grave.

4.2.2 Definição da população do estudo

Os pacientes com leptospirose foram avaliados na admissão hospitalar.

Critérios de Inclusão: pacientes de ambos os sexos, idade a partir de 18 anos, diagnóstico confirmado de leptospirose e assinatura do termo de consentimento informado após esclarecimento adequado em relação aos testes de função renal a serem realizados (anexo C).

Critérios de Exclusão: pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, nefrolitíase, doença renal crônica prévia, lúpus eritematoso sistêmico e outras colagenoses; pacientes com HIV/AIDS, hepatite e outras doenças infecciosas e uso de drogas nefrotóxicas, exceto aquelas usadas no tratamento específico da doença.

4.2.3 Aspectos éticos

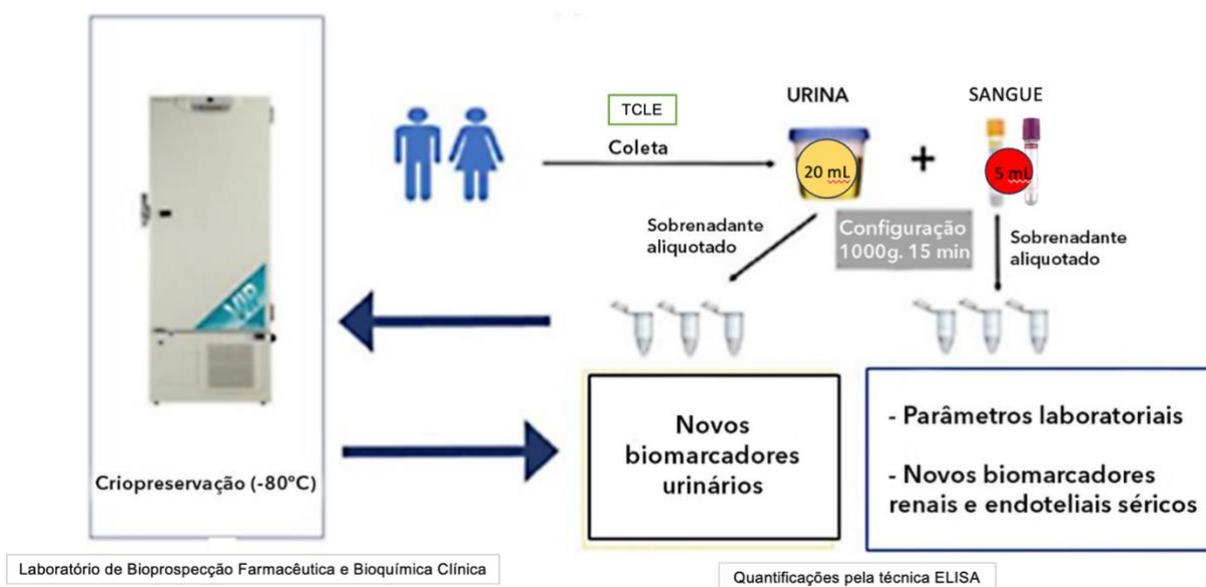
O protocolo do estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki e com a resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos no Brasil. O Institucional Local Comitês de Revisão (IRB) dos três hospitais participantes (Hospital São José de Doenças Infecciosas, Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral Fortaleza) aprovaram este estudo, número do parecer 4.831.593 (anexo B).

4.2.4 Coleta e processamento das amostras biológicas

Foram coletadas amostras com cerca de 5mL de sangue e 20mL de urina no dia da admissão do paciente. A urina foi centrifugada a 1000g por 15 minutos a temperatura ambiente para remover o sedimento urinário como células e outros fragmentos e depois foi alíquotada para avaliação de biomarcadores urinários. As amostras de sangue venoso foram coletadas e após 15 minutos centrifugadas para a obtenção do soro. Após alíquotadas, as amostras foram congeladas a -20°C, para então serem transferidas, acondicionadas em isopor com baterias de gelo, ao

Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), onde foram armazenadas a -80°C até a abertura dos kits para realização das dosagens dos biomarcadores. O laboratório fica localizado na rua Pastor Samuel Munguba, 1210, na Faculdade de Farmácia – UFC e é coordenado pela Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Figura 3).

Figura 3 - Coleta e processamento de amostras de urina e soro para o estudo dos novos biomarcadores



Fonte: Adaptada de MOTA, 2022.

4.2.5 Parâmetros estudados

Características demográficas e clínicas: idade, sexo, cor, profissão, escolaridade, naturalidade, procedência; diagnóstico; tempo de doença – tempo decorrido entre o primeiro sintoma e o diagnóstico; medicações em uso; tempo de internação hospitalar.

Avaliação dos sintomas presentes na admissão hospitalar.

Avaliação dos sinais vitais admissionais: pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e respiratória.

Desfecho clínico na internação: recuperado, seqüela ou óbito.

4.2.6 Avaliação laboratorial geral

Hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, glicemia de jejum, uréia, creatinina, sódio (P_{Na^+}), potássio (P_{K^+}), cloro (P_{Cl^-}), cálcio ($P_{Ca^{++}}$), fósforo ($P_{PO_4^-}$) e magnésio ($P_{Mg^{++}}$) plasmáticos, gasometria venosa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas totais e frações, ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulinas, fosfatase alcalina e sumário de urina.

4.2.7 Avaliação da função renal e diagnóstico de IRA

Para avaliação clínica da função glomerular, a creatinina plasmática (P_{Cr}) foi quantificada e a taxa de filtração glomerular foi estimada utilizando CKD-EPI (LEVEY *et al.*, 2009). O diagnóstico de IRA foi baseado nos critérios do KDIGO (KELLUM; LAMEIRE; KDIGO AKI GUIDELINE WORK GROUP, 2013).

4.2.8 Avaliação dos novos biomarcadores renais e endoteliais

Os novos biomarcadores renais (MCP-1, NGAL sérico e urinário, FGF-23) e endoteliais (ICAM-1, VCAM-1, Sindecin-1, Angiopietina-1, Angiopietina-2, vWF-A2) foram quantificados de alíquotas específicas das amostras separadas no dia da coleta. A depender do biomarcador, o material da amostra analisada foi soro e/ou urina. Para essas quantificações, a técnica do ELISA, um ensaio imunoenzimático de alta sensibilidade e especificidade, foi utilizada. Foram adquiridos kits comerciais de ELISA com reagentes suficientes para 5 a 15 placas com 96 testes para cada marcador a ser quantificado, obtendo dessa forma um melhor custo-benefício para o presente estudo. Os procedimentos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante para angipopietina-1 (DY923, R&D Systems®), angipopietina-2 (DY623, R&D Systems®), sindecin-1 (ab47352, Abcam®), VCAM-1 (ab47355, Abcam®), ICAM-1 (ab47349, Abcam®), vWF-A2 (DY2764-05, R&D Systems®), FGF-23 (DY2604, R&D Systems®), MCP-1 (CCL2/MCP-1 humano, P170213, R&D Systems®) e NGAL (lipocalin-2/NGAL humano, P195996, R&D Systems®)

4.2.9 Apresentação e análise dos resultados

As variáveis categóricas foram apresentadas como contagens e as frequências relativas em porcentagens. A associação entre variáveis categóricas foi avaliada por meio do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para variáveis contínuas, a normalidade foi verificada usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, bem como gráficos Q-Q, histogramas e medidas de dispersão. As variáveis contínuas com distribuição normal foram relatadas como média \pm desvio padrão, enquanto as variáveis não normais foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil. As correlações não paramétricas de Spearman foram examinadas entre os parâmetros laboratoriais e os biomarcadores, sendo o coeficiente de correlação representado por rho e os valores de significância estatística. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A análise de dados foi realizada usando o software IBM SPSS Statistics para Macintosh (Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp).

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento do escore preditor de mortalidade na leptospirose

5.1.1 Características dos pacientes com leptospirose na admissão hospitalar

Um total de 295 pacientes com leptospirose foram incluídos. O desfecho óbito foi observado em 32 casos (11%). A população era principalmente de adultos jovens com uma média de idade de 36 anos (25-49) e 84% eram homens. O tempo médio desde o início dos sintomas até admissão hospitalar foi de 7 (5–8) dias. Febre e calafrios foram os sintomas mais frequentes (93%), seguidos de mialgia (78%). A análise univariada é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Características admissionais dos pacientes com leptospirose

Características	N= 295
Idade (anos)	36 (25, 49)
Gênero	
Masculino (%)	248 (84%)
Feminino (%)	47 (16%)
Ocupação	
Agricultor	29 (12%)
Outros	204 (88%)
<i>Missing</i>	62
Tempo entre o início dos sintomas e hospitalização (dias)	7 (5, 8)
<i>Missing</i>	45
Sinais e Sintomas	
Letargia	30 (11%)
<i>Missing</i>	12
Febre ou Calafrios	263 (93%)
<i>Missing</i>	12
Vômitos	160 (57%)
<i>Missing</i>	12
Síndrome Colestática (Icterícia ou Colúrica)	185 (65%)
<i>Missing</i>	12
Mialgia	220 (78%)
<i>Missing</i>	12
Rash	45 (16%)
<i>Missing</i>	12
Sangramentos menores (Epistaxe ou gengivorragia)	13 (4.6%)

<i>Missing</i>	12
Tontura	67 (24%)
<i>Missing</i>	12
Hepatomegalia	43 (15%)
<i>Missing</i>	12
Cefaleia	168 (59%)
<i>Missing</i>	12
Acometimento Pulmonar (Tosse, Hemoptise ou crepitações)	130 (46%)
<i>Missing</i>	12
Desidratação	59 (21%)
<i>Missing</i>	12
Diarreia	106 (37%)
<i>Missing</i>	12
Dor abdominal	118 (42%)
<i>Missing</i>	12
Dor nas Panturrilhas	137 (55%)
<i>Missing</i>	48
Derrames Cavitários	40 (14%)
<i>Missing</i>	12
Hematomas	4 (1,4%)
<i>Missing</i>	12
Hematêmese	16 (5,7%)
<i>Missing</i>	13
Melena	10 (3,5%)
<i>Missing</i>	12
Metrorragia	3 (1,1%)
<i>Missing</i>	12
Hematúria	22 (7,8%)
<i>Missing</i>	12
Hipotensão	32 (11%)
<i>Missing</i>	12
Infecção Secundária	15 (5,3%)
<i>Missing</i>	12
Insônia	7 (2,5%)
<i>Missing</i>	12
Diurese Reduzida	79 (28%)
<i>Missing</i>	13
Palidez	53 (19%)
<i>Missing</i>	12
Petequias	11 (3,9%)
<i>Missing</i>	12
Hemorragia Conjuntival	37 (13%)
<i>Missing</i>	12

Sinais Vitais na Admissão

Pressão Sistólica (mmHg)	114 (100, 130)
<i>Missing</i>	37
Pressão Diastólica (mmHg)	70 (60, 80)
<i>Missing</i>	41
PAM (mmHg)	87 (75, 97)
<i>Missing</i>	47
Frequência Cardíaca (/min)	96 (81, 108)
<i>Missing</i>	52
Frequência Respiratória (/min)	22 (20, 28)
<i>Missing</i>	76

Exames Laboratoriais

Ureia (mg/dl)	83 (42, 132)
<i>Missing</i>	36
Creatinina (mg/dl)	2,44 (1,20, 4,30)
<i>Missing</i>	18
Sódio (mEq/l)	135,0 (131,0, 138,0)
<i>Missing</i>	57
Potássio (mEq/l)	3,80 (3,30, 4,30)
<i>Missing</i>	40
Bilirrubina Direta (mg/dl)	3,7 (0,7, 10,0)
<i>Missing</i>	86
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	1,1 (0,5, 3,2)
<i>Missing</i>	87
TGO (UI/l)	88 (47, 186)
<i>Missing</i>	53
TGP (UI/l)	68 (38, 114)
<i>Missing</i>	55
Hematócrito (%)	34 (30, 38)
<i>Missing</i>	12
Hemoglobina (g/dl)	11,60 (10,07, 12,70)
<i>Missing</i>	23
Leucócitos (10 ⁹ /l)	11400 (7990, 15615)
<i>Missing</i>	11
Plaquetas (10 ⁹ /l)	78000 (43000, 157000)
<i>Missing</i>	11

as variáveis numéricas estão apresentadas em mediana e percentis 25 e 75 entre parênteses.

Fonte: Elaboração própria, 2023.

5.1.2 Modelo preditor

Os pacientes foram agrupados aleatoriamente em duas coortes: a coorte de derivação ou conjunto de treinamento (n = 235, 80%) e a coorte de validação interna (conjunto de teste) (n = 60, 20%). Houve um total de 63 preditores e nove foram

removidos devido a valores ausentes (*missing*) maiores que 30% (taquipneia, palpitação, convulsões, flapping, pancreatite, poliúria, ureia pós dialise, bicarbonato e pH).

Como havia um grande número de preditores, a seleção de variáveis foi usada, resultando em 14 possíveis candidatos preditores. Depois disso, três preditores colineares (informações suplementares – S2 - Tabela 2) foram removidos. A pressão sistólica e diastólica admissionais foram removidas, porque derivamos a pressão arterial média (PAM) e a hemoglobina também foi removida por associação com o hematócrito. A partir daí, os modelos preditivos foram ajustados usando os preditores finais (n = 11 preditores).

Vários modelos foram ajustados com reamostragem *bootstrap* e o desempenho desses modelos foi analisado ao longo da AUC-ROC na coorte de derivação. A AUC-ROC foi de 0,738 e 0,772 nos modelos *xgBoost* e Lasso, respectivamente. Como uma segunda etapa, o desempenho desses modelos foi testado na coorte de validação interna. A AUC-ROC foi de 0,703 (0,414–0,987) e 0,776 (0,601–0,951) para os modelos *xgBoost* e Lasso, respectivamente (Tabela 2). O modelo Lasso apresentou maiores valores de precisão e especificidade balanceada quando comparado ao *xgBoost* (Tabela 2). Além disso, traçamos uma matriz de confusão de mortalidade na coorte derivada, conforme mostrado em informações suplementares – S3 - Figura 1.

Tabela 2 – Métricas de desempenho de modelos de mortalidade por leptospirose nas coortes de derivação e validação

	Treino (n=235)		Teste (n=60)			
	AUC-ROC	AUC-ROC *	Acurácia	Acurácia Balanceada	Sensibilidade	Especificidade
xgBoost	0,738	0,703 (0,414-0,987)	0,883	0,686	0,943	0,428
Lasso	0,772	0,776 (0,601-0,951)	0,783	0,691	0,811	0,571

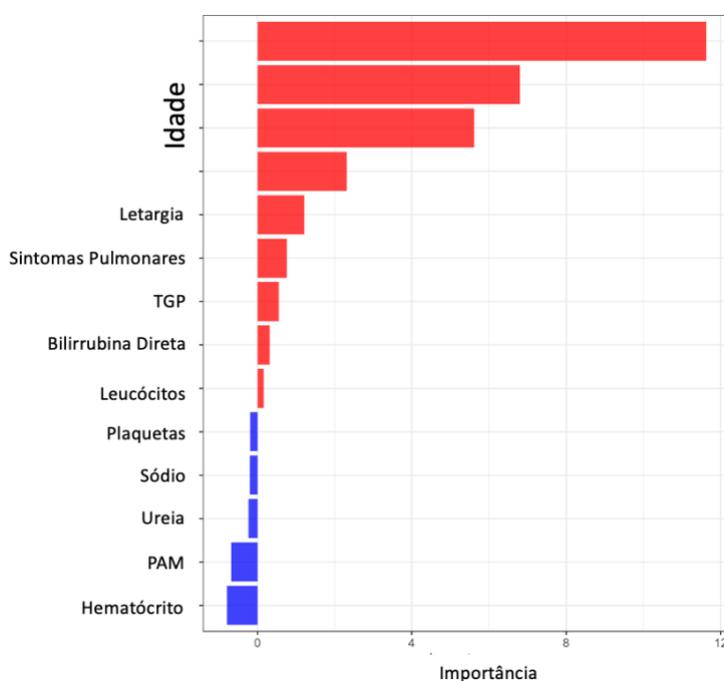
*[95% Intervalo de Confiança] baseado em 2000 *bootstrap* amostras.

Fonte: Elaboração própria, 2023.

5.1.3 Fazendo uma previsão baseada em pontuação

Os resultados da regressão do modelo Lasso mostraram que a idade acima de 40 anos, letargia, envolvimento pulmonar, valores mais altos de transaminase pirúvica (TGP), valores diretos de bilirrubina e níveis mais altos de leucócitos foram relacionados à morte. Em contraste, um nível de hematócrito mais elevado, pressão arterial média mais alta, valores mais altos de ureia, sódio e contagem de plaquetas foram relacionados à sobrevivência. Os coeficientes de importância do modelo Lasso foram usados para construir o LeptoScore (Figura 4).

Figura 4 – Coeficientes de importância pelo modelo Lasso das variáveis associadas a óbito em pacientes com leptospirose (LeptoScore)



5.1.4 Pontuação rápida e simplificada (QuickLepto)

Para criar o QuickLepto, as variáveis contínuas foram definidas com base em uma árvore CART – Classificação e regressão para aprendizado de máquina (Informações suplementares – S4 - Figura 2). Em seguida, usamos os coeficientes da regressão Lasso e mapeamos em números redondos, considerando seus valores absolutos. Para variáveis cujos coeficientes de regressão Lasso foram acima de 2, atribuiu-se 2 pontos (idade acima de 40 anos); para aquelas variáveis cujos coeficientes Lasso variaram entre 0,5 e 2, recebeu 1 ponto (envolvimento pulmonar, letargia, hematócrito e PAM). Excluímos do escore QuickLepto aqueles abaixo de 0,5

(ureia sérica, sódio, bilirrubina, ALT, leucócitos, plaquetas) (Informações suplementares — S5 -Tabela 3).

O QuickLepto usa 5 preditores (Figura 3):

1. Idade acima de 40 anos: 2 pontos
2. Presença do sintoma de letargia: 1 ponto
3. Presença do sintoma pulmonar: 1 ponto
4. Pressão Arterial Média < 80 mmHg: 1 ponto
5. Hematócrito < 30%: 1 ponto

A AUC-ROC para QuickLepto foi de 0,788 [95% CI 0,693–0,883]. Acurácia, acurácia balanceada, sensibilidade e os valores de especificidade usando um ponto de corte de três ou mais pontos, são mostrados na Tabela 3, Quadro 3. O melhor ponto de corte para AUC-ROC foi de 0,778 (Figura 5).

Tabela 3 – Métricas de performance do LeptoScore e QuickLepto na coorte de validação

	Test Set (n=60)				
	AUC-ROC*	Acurácia	Acurácia Balanceada	Sensibilidade	Especificidade
LeptoScore	0,776 (0,601-0,951)	0,783	0,691	0,811	0,571
QuickLepto	0,788 (0,693-0,883)	0,700	0,644	0,716	0,571

*[95% Intervalo de Confiança] baseado em 2000 amostras bootstrap. Fonte: Elaboração própria, 2023.

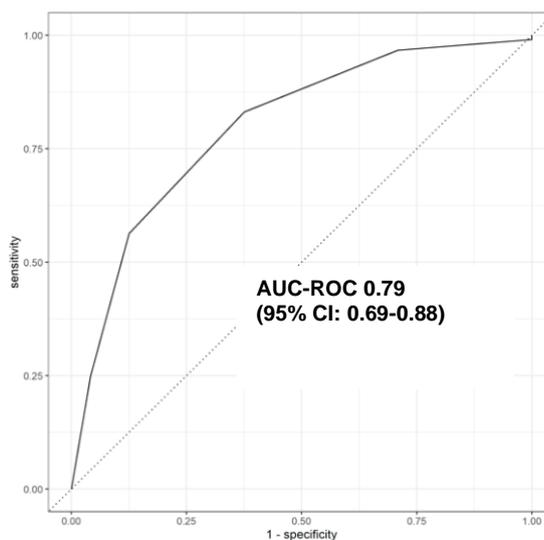
Quadro 3 – QuickLepto: uma escala de seis pontos.

QuickLepto	Pontos
Idade acima de 40 anos	2
Presença de letargia+	1
Presença de sintomas pulmonares*	1

Pressão Arterial Média abaixo de 80 mmHg	1
Hematocrito abaixo de 30%	1

+Letargia definida por presença de alterações de sensório, incluindo desorientação, letargia e agitação; *Sintomas pulmonares foram definidos por ocorrência de tosse, crepitações ou hemoptise.

Figura 5 – Curva AUC-ROC do QuickLepto na coorte de validação.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

5.1.5 Comparação de métricas de precisão com modelos anteriores

As performances do LeptoScore e do QuickLepto foram comparadas com dois outros modelos, um derivado de uma população com leptospirose e outro modelo utilizado em pacientes sépticos. Os resultados são mostrados na Tabela 4. A precisão, precisão balanceada, sensibilidade e os valores de especificidade foram, respectivamente: 0,50, 0,76, 0,43 e 1,00 para o escore SPIRO e 0,78, 0,56, 0,84 e 0,28 para o modelo derivado do qSOFA. Portanto, todos eles resultaram em baixa especificidade e/ou menor sensibilidade para pacientes com leptospirose, apresentando desempenho inferior ao LeptoScore e QuickLepto. Por isso, os escores LeptoScore e QuickLepto apresentaram melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade.

Tabela 4 – Comparação das métricas de precisão com os modelos preditores prévios

Modelo	Acurácia	Acurácia Balanceada	Sensibilidade	Especificidade
SPIRO	0,500	0,761	0,433	1,00
qSOFA	0,782	0,567	0,849	0,285
LeptoScore (modelo atual)	0,783	0,691	0,811	0,571
QuickLepto (modelo atual)	0,700	0,644	0,716	0,571

Fonte: Elaboração própria, 2023.

5.2 Correlações entre o novo escore de óbito com escores preditores existentes e com os biomarcadores de gravidade

Um total de 49 indivíduos foram admitidos por suspeita de leptospirose, cinco destes não obtiveram confirmação sorológica, portanto foram incluídos 44 pacientes no estudo. A morte foi observada em 4 casos (9,1%). A população era principalmente de adultos jovens, com uma média de idade de $40,8 \pm 16,9$ anos e 81,8% eram homens. A alteração hemodinâmica evidenciada pela PAM < 80 mmHg foi evidenciada em 15 casos (34,1%), anormalidades respiratórias em 56,8% e repercussão no sensorio em 27,3%. A redução no volume urinário esteve presente em 11 pacientes.

Na avaliação da gravidade dos pacientes desta amostra, os escores de gravidade SPIRO e qSOFA foram calculados. Nenhum paciente obteve pontuação máxima do SPIRO. Apenas 5 pacientes (11,4%) pontuaram 2 pontos. No qSOFA, 2 (4,5%) pacientes tiveram as 3 características para pontuação de todos os critérios do escore. A análise univariada é mostrada em Tabela 5.

Tabela 5 – Características gerais

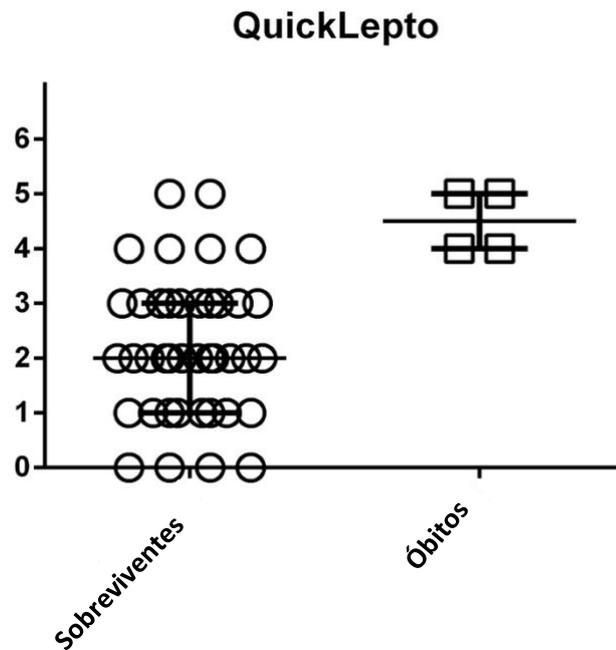
	Total (n=44)
Gênero Masculino (%)	36 (81,8)
Idade, anos	$40,8 \pm 16,9$

Frequência Respiratória (irpm)	22 ± 8,2
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	120,2 ± 21,1
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	71,7 ± 14,9
PAM (mmHg)	87,9 ± 16,4
PAM < 80 (%)	15 (34,1)
Sintomas	
Agitação (%)	6 (13,6)
Desorientação (%)	5 (11,4)
Letargia (%)	5 (11,4)
Alterações no sensório – agitação, desorientação e/ou letargia (%)	12 (27,3)
Tosse (%)	16 (36,4)
Dispneia (%)	13 (29,5)
Taquipneia (%)	7 (15,9)
Crepitações (%)	3 (6,8)
Hemoptise (%)	4 (9,1)
Alterações pulmonares - tosse, dispneia, taquipneia, crepitações e/ou hemoptise (%)	25 (56,8)
Oligúria/anúria (%)	11 (25)
Glasgow < 15 (%)	9 (20,5)
SPIRO	
0 (%)	25 (56,8)
1 (%)	14 (31,8)
2 (%)	5 (11,4)
qSOFA	
0 (%)	26 (59,1)
1 (%)	12 (27,3)
2 (%)	4 (9,1)
3 (%)	2 (4,5)
Óbito (%)	4 (9,1)

Irpm – incursões respiratórias por minuto, PAM – pressão arterial média
 Fonte: Elaboração própria, 2023.

Baseado nos parâmetros e características à admissão hospitalar, o cálculo do escore do QuickLepto de cada paciente foi realizado e a Figura 6 mostra a distribuição conforme a mortalidade.

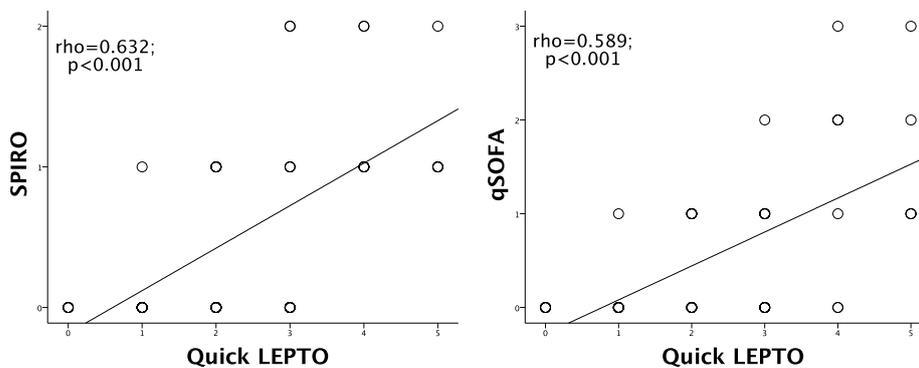
Figura 6 – Distribuição dos valores do QuickLepto conforme mortalidade



Fonte: Elaboração própria, 2023.

A avaliação das correlações entre o QuickLepto e os escores SPIRO e qSOFA foi significativa e positiva ($r=0,632$ e $r=0,589$, respectivamente e $p<0,001$ em ambos), vide figura 7 e tabela 6.

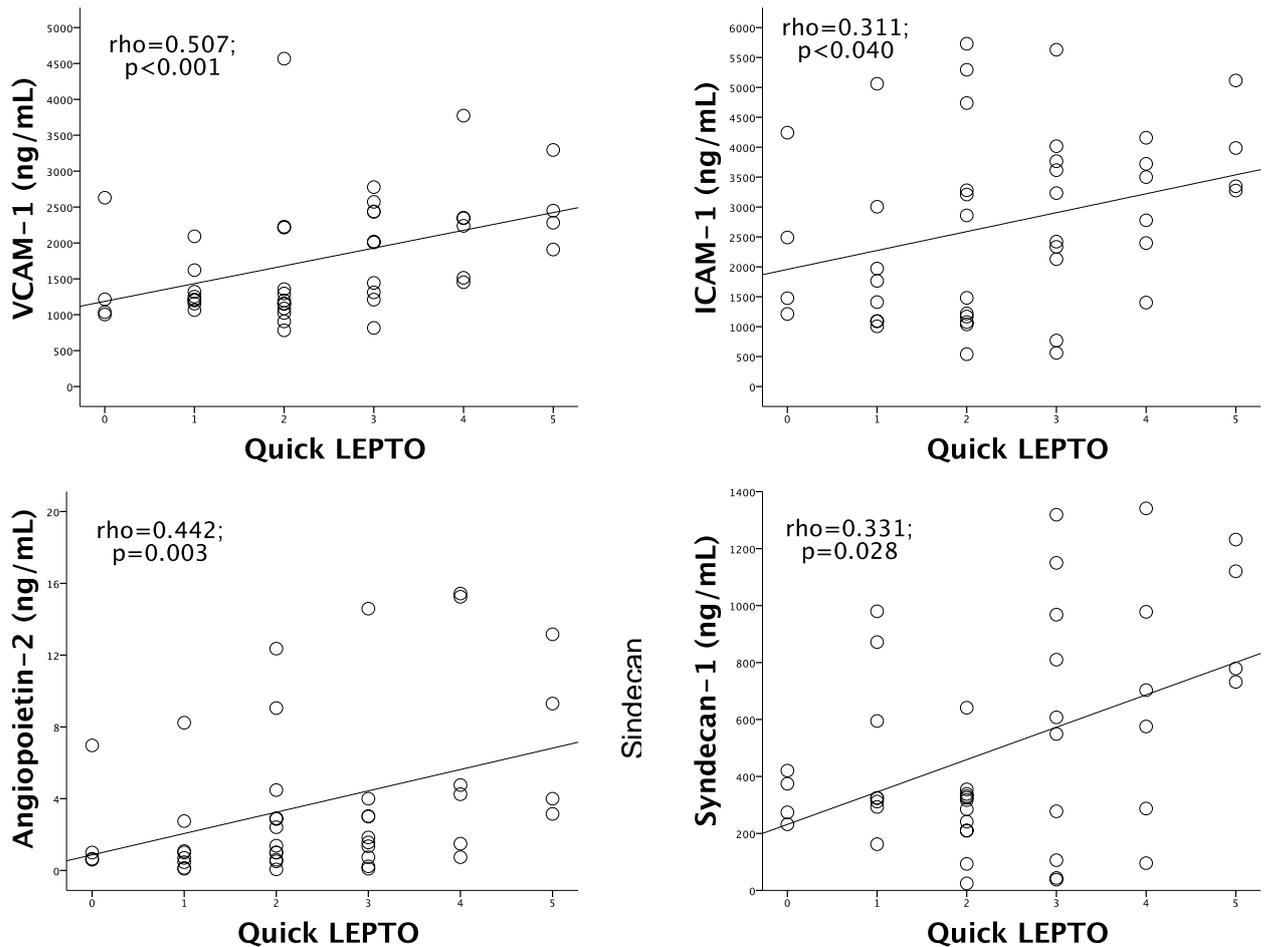
Figura 7 - Correlação entre SPIRO e qSOFA com o escore QuickLepto



Fonte: Elaboração própria, 2023.

No tocante aos biomarcadores de gravidade dosados na admissão hospitalar, todo o perfil endotelial estudado com VCAM-1 ($r= 0,507$, $p < 0,001$), ICAM-1 ($r= 0,311$, $p=0,040$), sindecan-1 ($r= 0,331$, $p= 0,028$) e Ang-2 ($r= 0,442$, $p= 0,003$) mostrou correlação significativa e positiva com QuickLepto, exceto a Ang-1 (Figura 8 e tabela 6).

Figura 8 – Correlação entre biomarcadores endoteliais e o escore QuickLepto

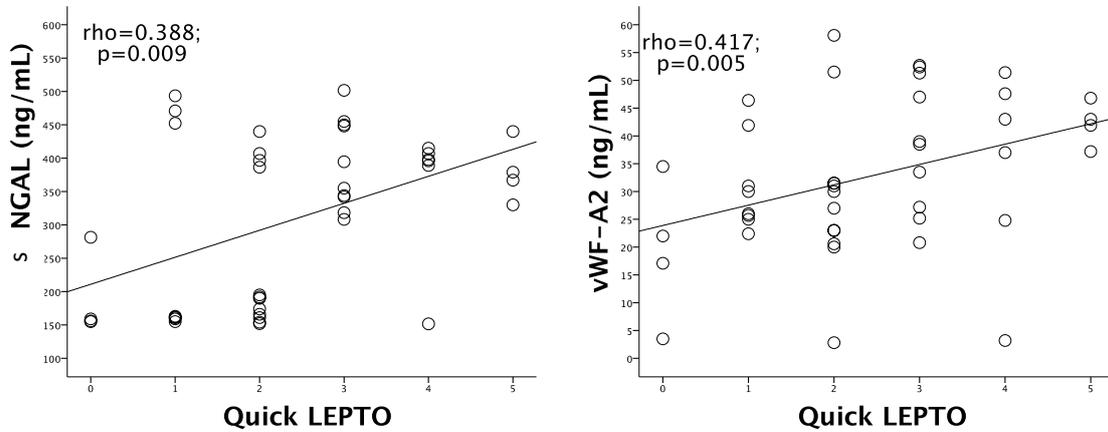


Fonte: Elaboração própria, 2023.

Na análise dos parâmetros relacionados à coagulação, o biomarcador vWF-A2 foi o único que evidenciou correlação com o escore preditor ($r= 0,417$, $p=0,005$). Os indicadores laboratoriais usuais, plaquetas bem como TAP e TTPA, não apresentaram correlacionados (Figura 9 e tabela 6).

No perfil renal, o NGAL sérico, apresentou correlação positiva com significância estatística $r= 0,388$, $p=0,009$. Não foi observada associação com creatinina, MCP-1, FGF-23 séricos e NGAL urinário (Figura 9 e tabela 6).

Figura 9 – Correlação entre biomarcadores vWF e sNGAL com o escore QuickLepto



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Tabela 6 – Correlação entre escores clínicos e biomarcadores admissionais com o QuickLepto

	QuickLepto	
	rho	p
SPIRO	0,632	<0,001
qSOFA	0,589	<0,001
Biomarcadores endoteliais		
VCAM-1	0,507	<0,001
ICAM-1	0,311	0,040
Sindecan-1	0,331	0,028
Ang-2	0,442	0,003
Ang-1	-0,018	0,910
Biomarcadores de coagulação		
Plaquetas	-0,279	0,078
TAP	0,086	0,710
TTPA	0,015	0,952
vWF-A2	0,417	0,005
Biomarcadores renais		
Creatinina sérica	-0,099	0,548
MCP-1	-0,061	0,696
FGF-23	0,263	0,084
NGAL urinário	-0,014	0,927
NGAL sérico	0,388	0,009

Fonte: Elaboração própria, 2023.

6 DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento do escore preditor de mortalidade na leptospirose

Este é o primeiro estudo a prever a mortalidade em leptospirose humana por meio de um modelo de aprendizado de máquina em uma área de alta prevalência da doença. O novo escore foi denominado Lepto Score. Além disso, foi desenvolvida uma pontuação rápida (QuickLepto), que pode ser facilmente aplicada e obteve um desempenho semelhante ao do modelo completo. Utilizando a idade, dois sintomas clínicos, a medida da pressão arterial média e os valores do hematócrito (escala de seis pontos), é possível prever o óbito na admissão hospitalar com alto poder discriminatório. Embora muitos estudos (DAHER *et al.*, 2017; GOSWAMI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2020), incluindo uma revisão sistemática (AL HARIRI *et al.*, 2019) tenham encontrado alguns preditores independentes de mortalidade, este é o primeiro estudo que estabeleceu uma ferramenta de admissão hospitalar fácil de usar e com o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade para prever morte na leptospirose humana.

Modelos preditivos anteriores em leptospirose mostraram alto desempenho, mas usaram dados combinados obtidos na admissão e outros momentos durante a internação. Por exemplo, o escore SPIRO prediz a gravidade da leptospirose usando oligúria (débito urinário ≤ 500 mL/24 horas), achados auscultatórios anormais no exame respiratório e hipotensão (pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg) (SMITH *et al.*, 2019). A presença de oligúria deve ser avaliada 24h após e não prontamente na admissão hospitalar. Em contrapartida, no presente estudo, o LeptoScore utilizou preditores disponíveis apenas na admissão hospitalar e o desfecho avaliado foi o pior possível (óbito).

O presente estudo teve 11% (32/295) de mortalidade, registro semelhante ao observado naqueles pacientes com falência renal 12.1% (0-25.0%) conforme revisão sistemática (TAYLOR, PARIS, NEWTON, 2015). Fatores de risco independentes para óbito nos casos de IRA associada à leptospirose relatados em uma revisão sistemática foram oligúria, icterícia, arritmia, crepitações, nível elevado de bilirrubina direta, tempo de protrombina ativada elevado, hiperbilirrubinemia e leucocitose (DAHER *et al.*, 2019). Encontramos preditores de mortalidade semelhantes na presente coorte, não relacionados exclusivamente à presença de IRA.

Um estudo realizado em pacientes com leptospirose em unidades de terapia intensiva mostrou que o *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS) apresentou pior desempenho em relação à mortalidade. A mortalidade dos pacientes com leptospirose foi menor do que a prevista pelo escore SAPS (DELMAS *et al.*, 2018). Isso sugere a necessidade de um modelo preditivo específico para pacientes com leptospirose. Confirmando esses achados, o qSOFA, que é um escore geral para pacientes sépticos, apresentou desempenho inferior ao LeptoScore.

Três dos cinco preditores incluídos no QuickLepto são semelhantes aos parâmetros usados no qSOFA, mas anemia (hematócrito < 30) e idade acima de 40 anos, as variáveis mais importantes, não estão incluídas.

Em concordância com estudos anteriores, nossos resultados mostraram que a anemia em pacientes com leptospirose foi associada a resultados ruins. Em um estudo observacional prospectivo, níveis de hemoglobina (Hb) inferiores a 11g/dL foram associados a formas graves da doença (70% versus 14,8%; OR = 16,2 [IC 95%: 3,9–66,9]) (BISCORNET *et al.*, 2020). Outro estudo mostrou que pacientes com leptospirose em UTI apresentaram níveis de hemoglobina mais baixos do que aqueles tratados em enfermarias (10,2 ± 2,4 vs. 11,6 ± 1,9 g/dL, $p < 0,0001$) (DAHER *et al.*, 2016).

Daher *et al.* (2019) mostraram anteriormente que a idade é um preditor crucial. Pacientes idosos com leptospirose apresentaram maior incidência de IRA (OR 2,049, IC 95% 1,207–3,477) e maior frequência de óbito (OR 3,520, IC 95% 1,940–6,386) durante a internação do que pacientes mais jovens.

Este estudo apresenta algumas limitações que se devem principalmente ao seu desenho retrospectivo e ao fato dos dados terem sido recolhidos ao longo de 14 anos. Embora seja um período longo, as principais diretrizes de tratamento permanecem as mesmas. O artigo anterior publicado por nosso grupo mostrou que a taxa de mortalidade caiu a cada década desde 1985, o que provavelmente reflete o diagnóstico precoce e a oferta de tratamento adequado (DAHER *et al.*, 2017). O QuickLepto não teve uma validação de coorte externa. Embora tenhamos realizado as métricas de validação em um grupo de teste independente, os resultados do QuickLepto precisam de uma coorte de validação externa adicional. Esse achado foi especialmente verdadeiro para os pacientes que marcaram mais de 3 pontos, pois o número de pacientes que classificaram de 4 a 5 pontos foi menor no presente conjunto de dados.

Por outro lado, como pontos fortes a serem destacados, foram incluídos apenas dados básicos de internação hospitalar, os modelos estatísticos utilizados no estudo são muito sofisticados e é uma das maiores amostras já estudadas.

O próximo passo é a validação desse novo escore em uma amostra prospectiva, especialmente em diferentes populações, para avaliar adequação geral e demonstrar sua utilidade significativa em ambientes com recursos limitados onde há maior prevalência de leptospirose.

6.2 Correlações entre o novo escore de óbito com os escores preditores existentes e com os biomarcadores de gravidade

Na busca por identificar quais os biomarcadores admissionais podem estar associados a evolução para o óbito na leptospirose grave, uma coorte prospectiva com 44 pacientes foi realizada. Ficou evidente que, apesar de todos os avanços nas últimas décadas, a mortalidade persiste considerável. Tivemos 9,1% de mortalidade na presente coorte (4/44), achado semelhante aos 10,05% (intervalo 0-33,3%) evidenciado em revisão sistemática (AL HARIRI *et al.*, 2019).

É crucial, portanto, elucidar quais os mecanismos e marcadores, idealmente, admissionais, são associados à evolução para o óbito para que a equipe clínica possa atuar e instituir condutas que visem evitar o desfecho previsto. Com este intuito, aplicamos o escore QuickLepto na amostra prospectiva, evidenciando associação entre modelos anteriores (SPIRO e qSOFA) projetados para prever gravidade e morte. A correlação positiva e significativa entre os escores já era esperada, pois alguns dos parâmetros utilizados na construção do novo escore coincidem com os presentes nos escores já estabelecidos. Dessa forma, enfatizando a importância destes sinais e sintomas clínicos que se sobrepõem nos escores, com a mortalidade em pacientes com leptospirose grave, desfecho específico analisado pelo QuickLepto.

Além disso, os biomarcadores de gravidade, endoteliais (ICAM-1, VCAM-1, Sindecan-1, Angiopietina-1, Angiopietina-2, vWF-A2) e renais (MCP-1, NGAL sérico e urinário, FGF-23) foram analisados na coorte.

No perfil endotelial, cinco das seis moléculas analisadas apresentaram correlação significativa e positiva com QuickLepto. Esta evidência de associação corrobora com os achados em diversos estudos que apontam o endotélio como parte

essencial e atuante para mediação de diversas funções como coagulação, fibrinólise, atividade plaquetária, tônus arterial e crescimento vascular (DAIBER *et al.*, 2017). Assim como sua ativação e quebra da barreira ditam o mecanismo patogênico crítico do dano de órgãos (ROBINSON-COHEN *et al.*, 2016).

Dentre os biomarcadores endoteliais estudados, a Ang-1 foi a única a não demonstrar associação significativa com o QuickLepto. A Ang-1 atua como protetor do endotélio, antagonizando a Ang-2. Nos pacientes críticos, a liberação maciça de Ang-2 interfere na sinalização constitutiva de Ang-1 ao receptor de tirosina quinase Tie2 nas células endoteliais, levando assim à quebra da barreira vascular seguida de transmigração de leucócitos e vazamento capilar (LUKASZ *et al.*, 2008). Em estudos clínicos, foi evidenciado que suas concentrações se correlacionam de forma negativa com a gravidade da doença o que pode refletir sinalização de manutenção prejudicada pelos pericitos do endotélio (LUKASZ *et al.*, 2008; RICCIUTO, *et al.*, 2011).

Na leptospirose, níveis aumentados de sindecan-1 e ICAM-1 foram evidenciados na comparação entre pacientes com e sem IRA (LIBÓRIO *et al.*, 2015). Em estudo recente que avaliou necessidade de hemodiálise em pacientes leptospirose grave evidenciou que, na admissão hospitalar, os níveis elevados de biomarcadores de lesão Ang-2 e sindecan-1 foram associados a necessidade adicional de hemodiálise durante a internação hospitalar e maior número de sessões de hemodiálise. Em contrapartida, não foi identificada associação significativa dos níveis séricos de VCAM-1 e ICAM-1 com o desfecho (MENESES *et al.*, 2022).

É importante ressaltar, em especial, a correlação encontrada com o vWF-A2, biomarcador endotelial associado prioritariamente a coagulação, pois os sangramentos estão entre as manifestações cardinais da leptospirose grave juntamente com icterícia e IRA. A trombocitopenia é frequentemente observada nestes pacientes e já foi associada à admissão em UTI (DAHER *et al.*, 2016; PRABHU; S; RAMESH, 2016; SUN; LIU; YAN, 2020; AJJIMARUNGS; BHURAYANONTACHAI; CHUSRI, 2020). *In vitro*, a leptospira virulenta evidenciou que a movimentação intracelular do patógeno causou um aumento na expressão de VWF na superfície celular das células endoteliais (GOEIJENBIER *et al.*, 2015). Em um grupo de pacientes com provável leptospirose, o fator de ativação do vWF foi cerca de duas vezes maior nos pacientes com suspeita de leptospirose, independente da presença de sangramento, do que nos controles saudáveis. Assim, uma quantidade maior do vWF circulante estava em uma conformação de ligação plaquetária ativa o

que aponta para importância predominante da disfunção plaquetária sobre a contagem absoluta de plaquetas (TUNJUNGPUTRI *et al.*, 2017).

No tocante a análise dos biomarcadores renal com o novo escore, apenas o NGAL sérico apresentou correlação positiva com significância estatística. Achado que reforça a importância deste biomarcador em cenários clínicos. Um estudo multicêntrico demonstrou que os níveis de uNGAL e pNGAL associados à IRA tiveram AUC-ROC de 0,91 e 0,92, respectivamente, em pacientes com leptospirose (SRISAWAT *et al.*, 2015). Recentemente, um estudo molecular evidenciou que a secreção de NGAL na lesão renal aguda associada à leptospirose é regulada na via de transdução do sinal NF- κ B, mediador da inflamação (HSU *et al.*, 2021).

Nosso estudo teve algumas limitações, principalmente pelo pequeno número de pacientes com o desfecho estudado, óbito, o que dificulta a realização de análises de regressão e curva ROC. Apesar disso, efeitos interessantes foram observados com significância estatística, porém os resultados devem ser vistos com cautela. É válido ressaltar que, em comparação com estudos semelhantes, a amostra total tem um bom tamanho.

Diante das correlações entre o novo escore preditor de óbito, QuickLepto, e os biomarcadores estudados, é possível concluir que a lesão endotelial atua como determinante chave da gravidade da doença e assim, em última escala, está associada ao óbito. Mais estudos são necessários para ampliar a compreensão de sua aplicação na prática clínica e, conseqüente, melhor abordagem e intervenção terapêutica

6.3 Perspectivas Futuras

Os escores preditores têm se mostrado úteis para direcionamento e adequação do manejo dos pacientes na prática clínica, portanto validar o recém-desenvolvido modelo preditor de óbito na leptospirose grave, QuickLepto, em nova coorte é de extrema importância para avaliação deste escore em diferentes populações.

A investigação e busca pela correlação específica entre desfechos clínicos na leptospirose, como gravidade e óbito, com o campo molecular através da pesquisa de diferentes biomarcadores é promissora. Logo, estudos com esta temática poderão

contribuir para esclarecimento dos processos fisiopatológicos envolvidos bem como na detecção precoce e estratificação de risco da doença.

7 CONCLUSÃO

- O QuickLepto, escore admissional desenvolvido para prever mortalidade intra-hospitalar em pacientes com leptospirose grave, é simples e de fácil aplicabilidade na prática clínica rotineira.
- O QuickLepto apresenta boa acurácia (AUC-ROC = 0,788) na predição de mortalidade nestes pacientes.
- Idade acima de 40 anos, acometimento pulmonar, presença de letargia, hematócrito abaixo de 30% e pressão arterial média abaixo de 80 mmHg são fatores preditores para óbito na leptospirose grave.
- Em comparação com os escores SPIRO e qSOFA, o LeptoScore e o QuickLepto tiveram melhor precisão para prever mortalidade em pacientes com leptospirose grave.
- O QuickLepto apresenta correlação positiva e significativa com os escores preditores previamente existentes, SPIRO e qSOFA.
- O QuickLepto apresenta correlação positiva e significativa com os biomarcadores de gravidade (endoteliais: ICAM-1, VCAM-1, sindecán-1, Ang-2 e vWF-A2 e o renal: NGAL sérico), apontando para importância como preditores de óbito na leptospirose grave.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol.**; v. 140, n. 3-4, p:287-96, 2010. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>. Access on: 30 Jan. 2023
- AJJIMARUNGSI, A.; BHURAYANONTACHAI, R.; CHUSRI, S. Clinical characteristics, outcomes, and predictors of leptospirosis in patients admitted to the medical intensive care unit: A retrospective analysis. **J Infect Public Health.**; v. 13, n. 12, p :2055-2061, 2020. Available from: 10.1016/j.jiph.2020.10.004. Access on: 30 Jan. 2023
- AL HARIRI, Y. K. *et al.* Mortality of leptospirosis associated acute kidney injury (LAKI) & predictors for its development in adults: A systematic review. **J. Infect. Public Health**, v. 12, n. 6, p: 751–759, 2019. Available from: 10.1016/j.jiph.2019.06.014. Access on: 30 Jan. 2023
- AUGUSTIN, H.G. *et al.* Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 10, n. 3, p. 165–177, 2009. Available from: 10.1038/nrm2639. Access on: 30 Jan. 2023
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature.**; v. 392, n. 6676, p:565-8, 1998. Available from: 10.1038/33340. Access on: 30 Jan. 2023
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol.**; v.15, p:675-705, 1997. Available from: 10.1146/annurev.immunol. Access on: 30 Jan. 2023
- BAROCCHI, M.A. *et al.* Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. **Infect. Immun.**; v. 70, n. 12, p: 6926–6932, 2002. Available from: 10.1128/IAI.70.12.6926-6932.2002. Access on: 30 Jan. 2023
- BHARTI, A.R. *et al.* Leptospirosis: zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p: 757–771, 2003. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2). Access on: 30 Jan. 2023
- BISCORNET, L. *et al.* An observational study of human leptospirosis in Seychelles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 103, 999–1008, 2020.
- BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more, **Oxford University Press**, 2009.
- BRITO, T.; A. M. G.; ABREU, P. A.E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, v. 60, p:e23, 2018. Available from: 10.1590/s1678-9946201860023. Access on: 30 Jan. 2023
- BULACH, D.; ADLER, B. **Leptospiral genomics and pathogenesis**. In: Adler, B. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018, pp. 189–214.

BURDMANN, E. A.; JHA, V. Acute kidney injury due to tropical infectious diseases and animal venoms: a tale of 2 continents. **Kidney Int.**; v. 91, n. 5, p:1033-1046, 2017. Available from: [10.1016/j.kint.2016.09.051](https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.051). Access on: 30 Jan. 2023

CAI, L. *et al.* The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 12, p: 2229–2235, 2010. Available from: [10.2215/CJN.00980110](https://doi.org/10.2215/CJN.00980110). Access on: 30 Jan. 2023

CAGLIERO, J.; VILLANUEVA, S.; MATSUI, M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. **Front Cell Infect Microbiol.**; v. 8 p:204, 2018. Available from: [10.3389/fcimb.2018.00204](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00204). Access on: 30 Jan. 2023

CHIN, V. K. *et al.* Pathology and Host Immune Evasion During Human Leptospirosis: a Review. **Int Microbiol.**; v. 23, p. 127–136, 2020. Access on: 30 Jan. 2023

CHIN, V. K. *et al.* Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses. **Microbiol. Res.**; v. 207, p: 108-115, 2018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.015>. Access on: 30 Jan. 2023

CHIRATHAWORN, C. *et al.* Cytokine levels as biomarkers for leptospirosis patients. **Cytokine.**; v. 85, p:80-2, 2016. Available from: [10.1016/j.cyto.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.007). Access on: 30 Jan. 2023

COSTA, F. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**; v. 9, n. (9), p:e0003898, 2015. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>. Access on: 30 Jan. 2023

DAHER, E. F *et al.* Risk factors for intensive care unit admission in patients with severe leptospirosis: A comparative study according to patients' severity. **BMC Infect. Dis.** v.16,p: 1–7 (2016).

DAHER, E. F. *et al.* Changing patterns in leptospirosis: a three-decade study in Brazil. **Int. J. Infect. Dis**; v. 60, p: 4-10, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.04.023>. Access on: 30 Jan. 2023

DAHER, E. D. F. *et al.* Leptospirosis in the elderly: The role of age as a predictor of poor outcomes in hospitalized patients. **Pathog. Glob. Health.**, v. 113, n. 3, p: 117–123, 2019. Available from: [10.1080/20477724.2019.1621729](https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1621729). Access on: 30 Jan. 2023

DAIBER, A. *et al.* Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **Br J Pharmacol.**; v. 174, n.12, p:1591-1619, 2017. Available from: [10.1111/bph.13517](https://doi.org/10.1111/bph.13517). Access on: 30 Jan. 2023

DELMAS, B. *et al.* Leptospirosis in ICU: A retrospective study of 134 consecutive admissions. **Crit. Care Med.**; v. 46, n. 1, p: 93–99, 2018. Available from: [10.1097/CCM.0000000000002825](https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002825). Access on: 30 Jan. 2023

DEVARAJAN, P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. **Nephrology**, v. 15, n. 4, p:419–428, 2010. Available from: 10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x. Access on: 30 Jan. 2023

DJAMIATUN, K. *et al.* Severe Dengue Is Associated with Consumption of von Willebrand Factor and Its Cleaving Enzyme ADAMTS-13. **PLoS Negl Trop Dis.**; v. 6, n. 5, p:e1628, 2012. Available from: 10.1371/journal.pntd.0001628. Access on: 30 Jan. 2023

EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**; v. 5, n. 9, p: 1413–1425, 2010. Available from: 10.2217/fmb.10.102. Access on: 30 Jan. 2023

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd Edition. Medisci Press: Melbourne, Australia, 1999p.

FANG, J. Q. *et al.* vWA proteins of *Leptospira interrogans* induce hemorrhage in leptospirosis by competitive inhibition of vWF/GPIIb-mediated platelet aggregation. **EBioMedicine**.; v. 37, p :428-441, 2018. Available from: 10.1016/j.ebiom.2018.10.033. Access on: 30 Jan. 2023

GALDINO, G.; SILVA JUNIOR, G.; DAHER, E. Leptospirose e a Síndrome de Weil. In: GALDINO, G.; SILVA JUNIOR, G.; DAHER, E. **Nefrologia Tropical**. p: 265–280, 2019.

GANOZA, C. A. *et al.* Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. **PLoS Med.**; v. 3, n. 8, p:e308, 2006. Available from: 10.1371/journal.pmed.0030308. Access on: 30 Jan. 2023

GINSBERG, C. *et al.* PTH, FGF23, and Intensive Blood Pressure Lowering in Chronic Kidney Disease Participants in SPRINT. **Clin J Am Soc Nephrol.**; v. 13, n. 12, p: 1816-1824, 2018. Available from: 10.2215/CJN.05390518. Access on: 30 Jan. 2023

GOEIJENBIER, M. *et al.* Markers of endothelial cell activation and immune activation are increased in patients with severe leptospirosis and associated with disease severity. **J Infect.** ; v. 71, n. 4, p: 437-446, 2015. Available from: 10.1016/j.jinf.2015.05.016. Access on: 30 Jan. 2023

GOSWAMI, R. P. *et al.* Predictors of mortality in leptospirosis: An observational study from two hospitals in Kolkata, eastern India. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 108, n.12, p: 791–796, 2014. Available from: 10.1093/trstmh/tru144. Access on: 30 Jan. 2023

HAAKE, D. A.; LEVETT, P.N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol.**; v. 387, p :65-97, 2015. Available from: 10.1007/978-3-662-45059-8_5. Access on: 30 Jan. 2023

HACK, C.E.; ZEERLEDER, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. **Crit Care Med.**; v. 29, suppl. 7, p :S21-7, 2001. Available from: 10.1097/00003246-200107001-00011. Access on: 30 Jan. 2023

HULSTEIN, J.J. *et al.* Acute activation of the endothelium results in increased levels of active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. **J Thromb Haemost.**; v. 4, n. 12, p :2569–75, 2006. Available from: 10.1111/j.1538-7836.2006.02205.x. Access on: 30 Jan. 2023

HSU, S. H. *et al.* Crosstalk between E-Cadherin/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathways: The Regulation of Host-Pathogen Interaction during Leptospirosis. **Int J Mol Sci.**; v. 22, n. 23, p:13132, 2021. Available from: 10.3390/ijms222313132. Access on: 30 Jan. 2023

IKEDA, U. *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol.**; v. 268, n. 3, p:H1021-6, 1995. Available from: 10.1152/ajpheart.1995.268.3.H1021. Access on: 30 Jan. 2023

KATZ, R. Biomarkers and Surrogate Markers: An FDA Perspective. **NeuroRX**, v. 1, n. 2, p. 189-195, 2004.

KELLUM, J. A. *et al.* Acute kidney injury. **Nat Rev Dis Primers.**; v. 7, n. 1, p :52, 2021. Available from: 10.1038/s41572-021-00284-z. Access on: 30 Jan. 2023

KELLUM, J. A.; LAMEIRE, N.; KDIGO AKI GUIDELINE WORK GROUP. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). **Crit care**, v. 17, n. 1, p. 204, 2013. Available from: 10.1186/cc11454. Access on: 30 Jan. 2023

KOCH, J. *et al.* Plasma syndecan-1 in hemodialysis patients associates with survival and lower markers of volume status. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 316, n. 1, p. F121-F127, 2019. Available from: 10.1152/ajprenal.00252.2018. Access on: 30 Jan.

KURSA, M. B.; RUDNICKI, W. R. Feature selection with the Boruta package. **J. Stat. Softw.**; v. 36, p: 1–13, 2010. Available from: <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i11>. Access on: 30 Jan. 2023

LEAF, D. E. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 Levels Associate with AKI and Death in Critical Illness. **J Am Soc Nephrol.**; v. 28, n. 6, p:1877-1885, 2017. Available from: 10.1681/ASN.2016080836. Access on: 30 Jan. 2023

LENTING, P. J. *et al.* Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions. **Thromb Haemost.**; v. 104, n. 3, p :449, 2010. Available from: 10.1160/TH09-11-0777. Access on: 30 Jan. 2023

LEVEY, A.S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med.**, v. 150, n. 9, p:604-12. Available from: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006. Erratum in: v. 155, n. 6, p :408, 2011. Access on: 30 Jan. 2023

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev.**; v. 14, n. 2, p: 296-326, 2001. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.14.2.296-326.2001>. Access on: 30 Jan. 2023

LIBÓRIO, A. B. *et al.* Endothelial glycocalyx damage is associated with leptospirosis acute kidney injury. **Am J Trop Med Hyg.** ; v. 92, n. 3, p :611-6, 2015. Available from: 10.4269/ajtmh.14-0232. Access on: 30 Jan. 2023

LOMAR, A.V. *et al.* **Leptospiroses**. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia, 2 ed. São Paulo, Atheneu, 2002, p:1007–1023.

LUKASZ, A. *et al.* Circulating angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in critically ill patients: development and clinical application of two new immunoassays. **Crit Care.**; v. 12, n. 4, p:R94, 2008. Available from: 10.1186/cc6966. Access on: 30 Jan. 2023

MÅRTENSSON, J.; MARTLING, C.-R.; BELL, M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability. **Br J Anaesth.**; v. 109, n. 6, p :843-50, 2012. Available from: 10.1093/bja/aes357. Access on: 30 Jan. 2023

MAST, Q. *et al.* ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 80, n. 3, p:492–498, 2009. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270304/>. Access on: 30 Jan. 2023

MENESES, G.C. *et al.* Endothelial biomarkers as predictors for haemodialysis need in severe leptospirosis patients (Weil's disease). **Trop Med Int Health.**; v. 27, n. 8, p:727-734, 2022. Available from: 10.1111/tmi.13796. Access on: 30 Jan. 2023

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Emergências em Saúde Pública. Coordenação-Geral do Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde. **Alerta Epidemiológico Leptospirose e Inundações**. Última Atualização: 13/03/2023. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/lepto/alerta_epidemiologicoms_lepto_inundacoes.pdf. Acesso em: 30 Jun. 2023

MISHRA, P. K. *et al.* Long-term quality of life postacute kidney injury in cardiac surgery patients. **Ann. Card. Anaesth.**; v. 21, n. 1, p:41-45, 2018. Available from: 10.4103/aca.ACA_104_17. Access on: 30 Jan. 2023

MOHAMMED, H. *et al.* Leptospira: Morphology, Classification and Pathogenesis. **J. Bacteriol. Parasitol.** v. 2, n. 6, p:1000120:1-1000120:4, 2011. Available from: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/leptospira-morphology-classification-and-pathogenesis-2155-9597.1000120.pdf>. Access on: 30 Jan. 2023

MOTA, S. M. B. Biomarcadores endoteliais e renais e o diagnóstico precoce da injúria renal aguda no envenenamento humano por serpentes *Bothrops erythromela*. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/67549>.

MURRAY, P.T. *et al.* Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. **Kidney Int.**; v. 85, n. 3, p:513-21, 2014. Available from: 10.1038/ki.2013.374. Access on: 30 Jan. 2023

NEVES, F.M.O. *et al.* Fibroblast growth factor 23, endothelium biomarkers and acute kidney injury in critically-ill patients. **J Transl Med.**; v. 17, n. 121, p: 1-8, 2019. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1875-6>. Access on: 30 Jan. 2023

NISANSALA, T. *et al.* Importance of KIM-1 and MCP-1 in Determining the Leptospirosis-Associated AKI: A Sri Lankan Study. **Biomed Res Int.**; p :1752904, 2021. Available from: 10.1155/2021/1752904. Access on: 30 Jan. 2023

OSTERMANN, M. *et al.* Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement. **JAMA Netw Open.**; v. 3, n. 10, p:e2019209, 2020. Available from: 10.1001/jamanetworkopen.2020.19209. Access on: 30 Jan. 2023

PAPAYIANNI, A. *et al.* Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. **Nephrol Dial Transplant.**; v. 17, n. 3, p :435-41, 2002. Available from: 10.1093/ndt/17.3.435. Access on: 30 Jan. 2023

PAPPAS, G. *et al.* The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int J Infect Dis.**; v. 12, n. 4, p:351-7, 2008. Available from: 10.1016/j.ijid.2007.09.011. Access on: 30 Jan. 2023

PONCE, D. *et al.* Development of a prediction score for in-hospital mortality in COVID-19 patients with acute kidney injury: a machine learning approach. **Sci Rep.**; v. 11, n. 1, p :24439, 2021. Available from: 10.1038/s41598-021-03894-5. Access on: 30 Jan. 2023

POWELL, T.C. *et al.* Association of inflammatory and endothelial cell activation biomarkers with acute kidney injury after sepsis. **Springerplus**; v. 3, p :207.,2014. Available from: 10.1186/2193-1801-3-207. Access on: 30 Jan. 2023

PRABHU, M. V.; S, A.; RAMESH, V. Fever, thrombocytopenia, and AKI-A profile of malaria, dengue, and leptospirosis with renal failure in a South Indian tertiary-care hospital. **Clin Nephrol.**; v. 86, n. 13, p :128-130, 2016. Available from: 10.5414/CNP86S118. . Access on: 30 Jan. 2023

RAFFRAY, L. *et al.* Increased levels of soluble forms of E-selectin and ICAM-1 adhesion molecules during human leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p: e0180474, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180474>. Access on: 30 Jan. 2023

RAJENDRAN, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. **Int J Biol Sci.**; v. 9, n. 10, p:1057-69, 2013. Available from: 10.7150/ijbs.7502. Access on: 30 Jan. 2023

REINHART, K. *et al.* Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. **Crit Care Med.**; v. 30, suppl. 5, p :S302-12, 2002. Available from: 10.1097/00003246-200205001-00021. Access on: 30 Jan. 2023

REITSMA, S. *et al.* The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. **Pflugers Arch.**; v. 454, n. 3, p :345-59. 2007. Available from: 10.1007/s00424-007-0212-8. Access on: 30 Jan. 2023

RICCIUTO, D. R. *et al.* Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. **Crit Care Med.**; v. 39, n. 4, p:702-10, 2011. Available from: 10.1097/CCM.0b013e318206d285. Access on: 30 Jan. 2023

ROBINSON-COHEN, C. *et al.* Association of markers of endothelial dysregulation Ang1 and Ang2 with acute kidney injury in critically ill patients. **Crit Care.**; v. 20, n. 1, p :207, 2016. Available from: 10.1186/s13054-016-1385-3. Access on: 30 Jan. 2023

RONCO, C. *et al.* Pro: Prevention of acute kidney injury: time for teamwork and new biomarkers. **Nephrol Dial Transplant.**; v. 32, n. 3, p:408-413, 2017. Available from: 10.1093/ndt/gfx016. Access on: 30 Jan. 2023

SAMROT, A. V. *et al.* Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis-A Review. **Pathogens**; v. 10, n. 2, p. 145, 2021. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>. Access on: 30 Jan. 2023

SARMIENTO, F. *et al.* PP441 [Infections » Sepsis]: Endothelial glycocalyx damage biomarkers in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Pediatr Crit Care Med.** v. 23, Suppl. 1, p: 1, 2022. Available from: 10.1097/01.pcc.0000901452.32473.31. Access on: 30 Jan. 2023

SATIYA, J.; GUPTA, N. M.; PARIKH, M. P. Weil's Disease: A Rare Cause of Jaundice. **Cureus.**, v. 12, n. 6, p:e8428, 2020. Available from:10.7759/cureus.8428. Access on: 30 Jan. 2023

SEGURO, A.C.; LOMAR, A.V.; ROCHA, A.S. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. **Nephron.**; v. 55, n. 2, p:146-51, 1990. Available from: 10.1159/000185943. Access on: 30 Jan. 2023

SEYMOUR, C. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA.**; v. 315, n. 8, p :762–774, 2016. Available from: 10.1001/jama.2016.0288. Access on: 30 Jan. 2023

SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA.**; v. 315, n. 8, p :801-10, 2016. Available from: 10.1001/jama.2016.0287. Access on: 30 Jan. 2023

SMITH, S. *et al.* A simple score to predict severe leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**; v. 13, n. 2, p: 1–13, 2019. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007205>. Access on: 30 Jan. 2023

SRISAWAT, N. *et al.* Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) in Leptospirosis Acute Kidney Injury: A Multicenter Study in Thailand. **PLoS One.**; v.10, n. 12, p :e0143367, 2015. Available from: [10.1371/journal.pone.0143367](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143367). Access on: 30 Jan. 2023

SUN, A. H.; LIU, X. X.; YAN, J. Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease. **Biomed. J.**, v. 43, n. 1, p: 24-31, 2020. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.12.002>. Access on: 30 Jan. 2023

TAYLOR A.J, PARIS D.H, NEWTON P.N (2015) A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis** 9(6): e0003866. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.6003866>

THEOFILIS, P. *et al.* Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. **Biomedicines.**; v. 9, n. 7, p: 781, 2021. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>. Access on: 30 Jan. 2023

THAIPADUNGPANIT, J. *et al.* A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. **PLoS Negl Trop Dis.**; v. 1, n.1, p: e56, 2007. Available from: [10.1371/journal.pntd.0000056](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056). Access on: 30 Jan. 2023

TUNJUNGPUTRI, R. N. *et al.* Platelet dysfunction contributes to bleeding complications in patients with probable leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis.**; v. 11, n. 9, p: e0005915, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005915>. Access on: 30 Jan. 2023

URIBE-RESTREPO, P.; MUNOZ-ZANZI, C.; AGUDELO-FLÓREZ, P. Kidney Injury Biomarkers in Leptospirosis. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v. 56, p :e0260-2022, 2023. Available from: [10.1590/0037-8682-0260-2022](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0260-2022). Access on: 30 Jan. 2023

VINCENT, J. L. *et al.* Sepsis definitions: time for change. **Lancet.**, v. 38, n. 9868, p :774-5, 2013. Available from: [10.1016/S0140-6736\(12\)61815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61815-7). Access on: 30 Jan. 2023

WAGENAAR, J. F. *et al.* What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? **Trop Med Int Health.**; v. 12, n. 1, p:111-22, 2007. Available from: [10.1111/j.1365-3156.2006.01792.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01792.x). Access on: 30 Jan. 2023

WANG, H.K. *et al.* Factors associated with severity and mortality in patients with confirmed leptospirosis at a regional hospital in northern Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 53, n. 2, p: 307–314, 2020. Available from: [10.1016/j.jmii.2018.05.005](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.05.005). Access on: 30 Jan. 2023

YANG, C.W. *et al.* Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.**, v. 69, n. 5, p: 815–822, 2006. Available from: [10.1038/sj.ki.5000119](https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000119). Access on: 30 Jan. 2023

YILMAZ, H. *et al.* Characteristics of leptospirosis with systemic inflammatory response syndrome: a multicenter study. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**; v. 14, p :54e8, 2015. Available from: 10.1186/s12941-015-0117-x. Access on: 30 Jan. 2023

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo 1 - ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO QUALIS A1
(MEDICINA I)

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN **Development and validation
of a simple machine learning tool
to predict mortality in leptospirosis**Gabriela Studart Galdino^{1,2,✉}, Tainá Veras de Sandes-Freitas^{1,2,3},
Luis Gustavo Modelli de Andrade⁴, Caio Manuel Caetano Adamian²,
Gdayllon Cavalcante Meneses¹, Geraldo Bezerra da Silva Junior^{1,2,5} &
Elizabeth de Francesco Daher¹

Predicting risk factors for death in leptospirosis is challenging, and identifying high-risk patients is crucial as it might expedite the start of life-saving supportive care. Admission data of 295 leptospirosis patients were enrolled, and a machine-learning approach was used to fit models in a derivation cohort. The comparison of accuracy metrics was performed with two previous models—SPIRO score and quick SOFA score. A Lasso regression analysis was the selected model, demonstrating the best accuracy to predict mortality in leptospirosis [area under the curve (AUC-ROC) = 0.776]. A score-based prediction was carried out with the coefficients of this model and named LeptoScore. Then, to simplify the predictive tool, a new score was built by attributing points to the predictors with importance values higher than 1. The simplified score, named QuickLepto, has five variables (age > 40 years; lethargy; pulmonary symptom; mean arterial pressure < 80 mmHg and hematocrit < 30%) and good predictive accuracy (AUC-ROC = 0.788). LeptoScore and QuickLepto had better accuracy to predict mortality in patients with leptospirosis when compared to SPIRO score (AUC-ROC = 0.500) and quick SOFA score (AUC-ROC = 0.782). The main result is a new scoring system, the QuickLepto, that is a simple and useful tool to predict death in leptospirosis patients at hospital admission.

Leptospirosis is a worldwide neglected zoonotic disease caused by pathogenic spirochetes from the genus *Leptospira*, mainly *L. interrogans*, with higher prevalence in tropical countries¹. It is a waterborne disease transmitted through rat urine, and its outbreaks occur during rainy seasons². The disease mainly affects low-income populations and individuals exposed to contaminated animals and environments, such as farmers, veterinarians, sewage workers, meat inspectors, rodent control workers, and military personnel².

Leptospirosis is a major concern for public health due to its high morbidity and mortality rates. It is estimated that 1.03 million new cases occur worldwide annually, along with 58,900 or even more deaths, mostly among young adult males³. Many cases of leptospirosis are undiagnosed or misdiagnosed as other tropical febrile illnesses, concealing its actual burden⁴. Therefore, the World Health Organization (WHO) considers leptospirosis an important neglected tropical zoonosis due to its underestimated incidence and high mortality⁵. The median mortality in a recent review was 10.05% [(range 0–33.3%)]⁶.

Most patients manifest an asymptomatic or mild disease with fever, chills, headache, and myalgia. Ocular and cutaneous manifestations have also been described^{7,8}.

However, 10% of affected individuals may develop a life-threatening condition, characterized by hepatic dysfunction with rubinic jaundice and acute kidney injury (AKI), known as Weil's syndrome, in addition to pulmonary hemorrhage, gastrointestinal symptoms, coagulopathy, electrolyte disturbances and myocarditis, as well as liver failure and neurological symptoms^{4,9}.

The diagnosis of leptospirosis is challenging and cumbersome due to unspecific initial presentation that mimics other bacterial and viral infections, hampering early recognition, and the lack of a standard testing technique to check infection at all stages. Additionally, some endemic areas are unprovided of adequate laboratory resources and infrastructure as well as well trained staff¹⁰.

¹Medical Sciences Postgraduate Program, Federal University of Ceará, Rua Silva Jatahy 1000 ap 600, Fortaleza, Ceará 60165-070, Brazil. ²Hospital Universitário Walter Cantídio, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. ³Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, Ceara, Brazil. ⁴Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil. ⁵School of Medicine, Medical Sciences and Public Health Postgraduate Programs, University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil. [✉]email: studartgabriela@gmail.com.br

APÊNDICE B – Artigo 2 ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO QUALIS A1 (MEDICINA I)

DOI: 10.1111/tmi.13796

RESEARCH ARTICLE

Endothelial biomarkers as predictors for haemodialysis need in severe leptospirosis patients (Weil's disease)

Gdayllon Cavalcante Meneses¹ | Pedro Eduardo Andrade de Carvalho Gomes¹ |
Gabriela Studart Galdino¹ | Gabriela Freire Bezerra² | Ranieri Sales de Souza Santos² |
Alice Maria Costa Martins² | Geraldo Bezerra da Silva Junior³ | Alexandre Braga Libório⁴ |
Roberto da Justa Pires Neto^{5,6} | Elizabeth De Francesco Daher¹

¹Medical Sciences Post-Graduate Program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

²Pharmacology Post-Graduate Program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

³Public Health and Medical Sciences Graduate Programs, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil

⁴Post-Graduate Program, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil

⁵Public Health Post-Graduate Program, Department of Community Health, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁶Sao Jose Hospital of Infectious Diseases, Fortaleza, Brazil

Correspondence

Gdayllon Cavalcante Meneses, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Aluisio Azevedo 374, Fortaleza, Ceará 60510-072, Brazil. Email: gdayllon@yahoo.com.br

Funding information

The National Council for Scientific and Technological Development, Grant/Award Numbers: 301174/2017-2, 405963/2016-5; Brazilian Coordination of Post-Graduation—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 88882.306447/2018-01

Abstract

Objective: To investigate the prediction ability of vascular injury biomarkers for haemodialysis requirement in patients with severe leptospirosis.

Methods: Prospective study with severe leptospirosis patients hospitalised in Fortaleza, Brazil. Blood samples were collected hospital admission to quantify vascular injury biomarkers: syndecan-1, ICAM-1, VCAM-1, angiopoietin-2 and FGF-23. Two groups were evaluated according to haemodialysis requirement during hospital stay.

Results: Twenty-seven patients were included, with a mean age of 39 ± 18 years. 88.9% were males. 53.8% needed haemodialysis and presented higher levels on hospital admission of syndecan-1 (572 [300–811] vs. 263 [106–421] ng/ml; $p = 0.03$), angiopoietin-2 (1.52 [0.72–2.72] vs. 0.63 [0.4–1.38] ng/ml; $p = 0.01$), and FGF-23 (291 [56–2031] vs. 10 [10–806] pg/ml; $p = 0.021$). Syndecan-1 showed significant correlation with creatinine ($r = 0.546$; $p = 0.05$) and total bilirubin levels ($r = 0.534$; $p = 0.013$) on hospital admission. Angiopoietin-2 showed significant correlation with creatinine levels ($r = 0.513$; $p = 0.009$) on hospital admission and with number of haemodialysis sessions ($r = 0.406$; $p = 0.049$). No significant correlation was found with FGF-23. Regarding prognostic performance, combined syndecan-1 and angiopoietin-2 levels had a better ability to predict haemodialysis need in patients with severe leptospirosis (AUC-ROC = 0.744 [95% CI: 0.545–0.943] $p = 0.035$).

Conclusion: Syndecan-1 and angiopoietin-2 were associated with haemodialysis need in patients with severe leptospirosis and may be useful to improve therapeutic approach and reduce mortality.

KEYWORDS

haemodialysis, leptospirosis, vascular biomarkers, Weil disease

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Many individuals are asymptomatic, although a small number of patients develop manifestations which range from a self-limiting febrile illness to a severe form, known as Weil disease. In the latter condition, acute kidney injury (AKI) is common and may be associated with fatal outcomes [1–3].

AKI development may occur due to direct action of the etiologic agent, dehydration, rhabdomyolysis, and haemodynamic alterations [3]. Pathogenic spirochetes with genus

Leptospira cause a multisystemic vasculitis. Endothelial activation and systemic inflammation play an important role in the development of leptospirosis and its complications, although the exact mechanisms remain unclear [3–5]. Renal involvement and need for haemodialysis are frequent complications in the severe form of leptospirosis and have been associated with poor prognosis and death [2, 6]. Its scenario is alarming, since AKI occurs in 20%–85% of the patients with severe leptospirosis, and up to 31.6% of them require dialysis [7, 8].

In this context, prompt identification of severity may help improve therapeutic approach among patients with

APÊNDICE C – CAPÍTULO DE LIVRO

(Tópicos interdisciplinares da saúde humana: perspectivas translacionais)

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS ATUAIS DE NOVOS BIOMARCADORES PARA INJÚRIA RENAL AGUDA NAS FORMAS GRAVES DA LEPTOSPIROSE

DOI: 10.51859/AMPLA.TIS270.2123-6

Gabriela Studart Galdino ¹
Gislei Frota Aragão ²
Elizabeth de Francesco Daher ³

¹ Médica, pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

² Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Universidade Federal do Ceará.

³ Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial. As manifestações clínicas apresentam amplo espectro desde sintomas leves até óbito. Os fatores associados à maior gravidade são idade avançada, icterícia e/ou injúria renal aguda (IRA). O diagnóstico precoce da lesão renal continua sendo um desafio, pois a creatinina sérica é um marcador tardio. Pesquisas recentes com moléculas que possam ser utilizadas nesse contexto clínico têm oferecido crescentes informações dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo. Este estudo constitui uma mini-revisão na qual os principais trabalhos publicados nos últimos anos sobre o tema foram compilados. Apesar dos resultados sugerirem aplicabilidade promissora, o papel dos novos biomarcadores na leptospirose ainda não está definido. A avaliação de biomarcadores renais e endoteliais apresenta grande potencial para melhorar o gerenciamento de risco dos pacientes com leptospirose, podendo contribuir para redução dos índices de mortalidade. Logo, essa temática necessita de mais dados para comprovação de quais moléculas têm maior relevância e, conseqüentemente, devem ser incorporadas na prática clínica.

Palavras-chave: Leptospirose, Injúria Renal Aguda, Biomarcadores.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide importance. Clinical manifestations present a broad spectrum, with advanced age, jaundice and/or acute kidney injury (AKI) being the factors associated with greater severity. Early diagnosis of acute kidney injury remains a challenge, as serum creatinine is a late marker. Recent research with biomarkers that can be used in this clinical context has provided increasing information on the pathophysiological treatments involved in this process and may soon be an important tool for clinical pre-complications. This study constitutes a mini-review in which the main works published in recent years on the subject were compiled. Despite the results suggesting promising applicability, the role of new biomarkers in leptospirosis is still not defined. Therefore, the evaluation of renal and endothelial biomarkers has great potential to improve the risk management of patients with leptospirosis, and may contribute to the reduction of mortality rates from leptospirosis. Therefore, this theme needs more data to prove which are the most significant flags and, consequently, should be incorporated into clinical practice.

Keywords: Leptospirosis, Acute Kidney Injury, Biomarkers.

**APÊNDICE D - INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES:
ESTATÍSTICA PARA DESENVOLVIMENTO DO ESCORE PREDITOR DE MORTALIDADE**

S1 - Tabela 1 – Dados faltosos (*missing data*)

Variável	Tipo de variável	N	N <i>missing</i>	<i>Missing</i> Percentual
idade	Preditor	295	0	0.0
gênero	Preditor	295	0	0.0
profissão	Preditor	233	62	21.0
tempo_sintomas_admissao	Preditor	250	45	15.3
sintomas_letargia	Preditor	283	12	4.1
sintomas_febre_calafrios	Preditor	283	12	4.1
sintomas_vomito	Preditor	283	12	4.1
sintomas_palpitação	Preditor	196	99	33.6
sintomas_colestatica_sindrome	Preditor	283	12	4.1
sintomas_taquipneia	Preditor	108	187	63.4
sintomas_mialgia	Preditor	283	12	4.1
sintomas_rash	Preditor	283	12	4.1
sintomas_menor_sangramento	Preditor	283	12	4.1
sintomas_tontura	Preditor	283	12	4.1
hepatomegalia	Preditor	283	12	4.1
sintomas_cefaleia	Preditor	283	12	4.1
sintomas_convulsões	Preditor	170	125	42.4
sintomas_pulmonares	Preditor	283	12	4.1
sintomas_desidratação	Preditor	283	12	4.1
sintomas_diarreia	Preditor	283	12	4.1
sintomas_dor_abdominal	Preditor	283	12	4.1
sintomas_dor_panturrilhas	Preditor	247	48	16.3
sintomas_derrames_cavidade	Preditor	283	12	4.1
sintomas_hematomas	Preditor	283	12	4.1
sintomas_Flapping	Preditor	170	125	42.4
sintomas_hematemese	Preditor	282	13	4.4
sintomas_melena	Preditor	283	12	4.1

sintomas _metrorragia	Preditor	283	12	4.1
sintomas _hematuria	Preditor	283	12	4.1
sintomas _hipotensão	Preditor	283	12	4.1
sintomas _secundaria_infecção	Preditor	283	12	4.1
sintomas _insonia	Preditor	283	12	4.1
sintomas _diurese_reduzida	Preditor	282	13	4.4
sintomas _palidez	Preditor	283	12	4.1
sintomas _pancreatite	Preditor	175	120	40.7
sintomas _petequias	Preditor	283	12	4.1
sintomas _poliuria	Preditor	168	127	43.1
sintomas _conjuntival_hemorragia	Preditor	283	12	4.1
vital_pressão_sistolica_admissão	Preditor	258	37	12.5
vital_pressão_diastolica_admissão	Preditor	254	41	13.9
vital_FC_admissional	Preditor	243	52	17.6
vital_FR_admissional	Preditor	219	76	25.8
PAM	Preditor	248	47	15.9
vasopressor	Preditor	236	59	20.0
Diuretico	Preditor	234	61	20.7
blood_transfussion	Preditor	232	63	21.4
antibioticos	Preditor	295	0	0.0
lab_ureia	Preditor	259	36	12.2
lab_pos_ureia	Preditor	144	151	51.2
lab_creatinina	Preditor	277	18	6.1
lab_sodio	Preditor	238	57	19.3
lab_potassio	Preditor	255	40	13.6
lab_bicarbonato	Preditor	151	144	48.8
lab_pH	Preditor	155	140	47.5
lab_bilirrubina_direta	Preditor	209	86	29.2
lab_bilirrubina_indireta	Preditor	208	87	29.5
lab_TGO	Preditor	242	53	18.0
lab_TGP	Preditor	240	55	18.6
lab_HTc	Preditor	283	12	4.1
lab_Hb	Preditor	272	23	7.8

lab_leucocitos	Preditor	284	11	3.7
lab_plaquetas	Preditor	284	11	3.7
tempo_internamento	Preditor	262	33	11.2
hemodialise	Desfecho	295	0	0.0
N_dialisis_sessões	Desfecho	128	167	56.6
dialise_tipo	Desfecho	100	195	66.1
IRA	Desfecho	295	0	0.0
UTI	Desfecho	28	267	90.5
KDIGO	Desfecho	295	0	0.0
KDIGO3	Desfecho	295	0	0.0
death	Desfecho	295	0	0.0
desfecho_composto	Desfecho	295	0	0.0
SPIRO_escore	Desfecho	295	0	0.0

PAM- pressão arterial média, FC – frequência cardíaca, FR – frequência respiratória, Ht – hematócrito, Hb – hemoglobina, IRA - injúria renal aguda, UTI – unidade de terapia intensiva

Preditores totais: 63; Desfechos: 10

Removido as variáveis com mais de 30% dados ausentes (9/63 preditores):

1. sintoma_taquipnéia
2. sintoma_palpitação
3. sintoma_convulsões
4. sintoma_flapping
5. sintoma_pancreatite
6. sintoma_poliúria
7. lab_pos_ureia
8. lab_bicarbonato
9. lab_pH

S2 - Tabela 2 – Seleção de variáveis por Boruta

Variável	Tipo de variável	N	Classificação	Manter no modelo
idade	Preditor	295	Confirmado	Sim
gênero	Preditor	295	Rejeitado	Não
ocupação	Preditor	233	Rejeitado	Não
tempo_sintomas_admissao	Preditor	250	Rejeitado	Não
sintomas_letargia	Preditor	283	Tentativa	Sim
sintomas_febre_calafrios	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_vomito	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_palpitação	Preditor	196	Rejeitado	Não
sintomas_colestatica_sindrome	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_taquipneia	Preditor	108	Rejeitado	Não
sintomas_mialgia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_rash	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_menor_sangramento	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_tontura	Preditor	283	Rejeitado	Não
hepatomegalia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_cefaleia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_convulsões	Preditor	170	Rejeitado	Não
sintomas_pulmonares	Preditor	283	Confirmado	Sim
sintomas_desidratação	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_diarreia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_dor_abdominal	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_dor_panturrilhas	Preditor	247	Rejeitado	Não
sintomas_derrames_cavidade	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_hematomas	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_Flapping	Preditor	170	Rejeitado	Não
sintomas_hematemese	Preditor	282	Rejeitado	Não
sintomas_melena	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_metrorragia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas_hematuria	Preditor	283	Rejeitado	Não

sintomas _hipotensão	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas _secundaria_infecção	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas _insonia	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas _diurese_reduzida	Preditor	282	Rejeitado	Não
sintomas _palidez	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas _pancreatite	Preditor	175	Rejeitado	Não
sintomas _petequias	Preditor	283	Rejeitado	Não
sintomas _poliuria	Preditor	168	Rejeitado	Não
sintomas _conjuntival_hemorragia	Preditor	283	Rejeitado	Não
vital_pressão_sistolica_admissão	Preditor	258	Tentativa	Não *
vital_pressão_diastolica_admissão	Preditor	254	Tentativa	Não *
vital_FC_admissional	Preditor	243	Rejeitado	Não
vital_FR_admissional	Preditor	219	Rejeitado	Não
PAM	Preditor	248	Confirmado	Sim
vasopressor	Preditor	236	Rejeitado	Não
Diuretico	Preditor	234	Rejeitado	Não
blood_transfussion	Preditor	232	Rejeitado	Não
antibioticos	Preditor	295	Rejeitado	Não
lab_ureia	Preditor	259	Tentativa	Sim
lab_pos_ureia	Preditor	144	Rejeitado	Não
lab_creatinina	Preditor	277	Rejeitado	Não
lab_sodio	Preditor	238	Tentativa	Sim
lab_potassio	Preditor	255	Rejeitado	Não
lab_bicarbonato	Preditor	151	Rejeitado	Não
lab_pH	Preditor	155	Rejeitado	Não
lab_bilirrubina_direta	Preditor	209	Tentativa	Sim
lab_bilirrubina_indireta	Preditor	208	Rejeitado	Não
lab_TGO	Preditor	242	Tentativa	Sim
lab_TGP	Preditor	240	Rejeitado	Não
lab_HTc	Preditor	283	Confirmado	Sim
lab_Hb	Preditor	272	Confirmado	Não +
lab_leucocitos	Preditor	284	Tentativa	Sim
lab_plaquetas	Preditor	284	Confirmado	Sim

tempo_internamento	Preditor	262	Rejeitado	Não
--------------------	----------	-----	-----------	-----

PAM- pressão arterial média, FC – frequência cardíaca, FR – frequência respiratória, Ht – hematócrito, Hb – hemoglobina

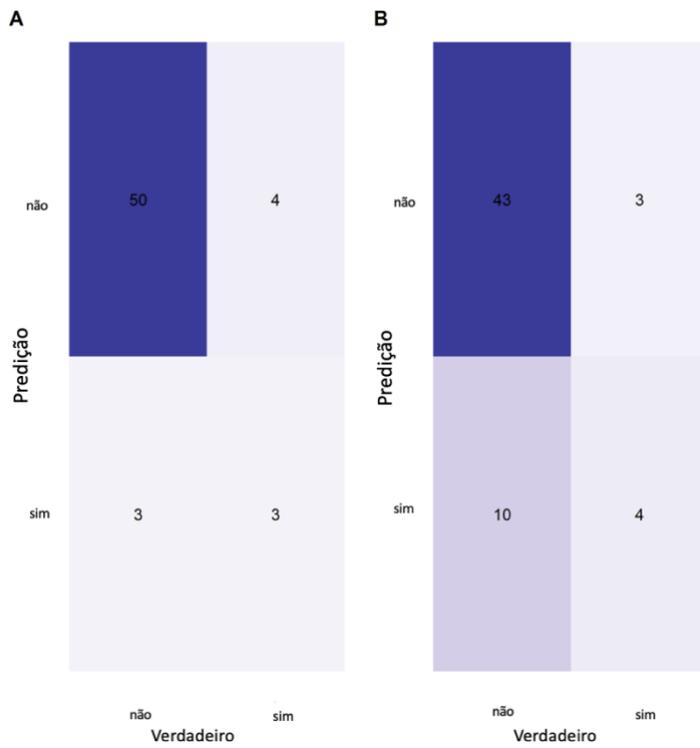
Total preditores: 63;

Total de preditores mantidos: 11

Retemos os preditores confirmados e possíveis para o modelo de treinamento.

* Pressão sistólica e diastólica na admissão porque derivamos a pressão arterial média (PAM) +Removemos preditores colineares (lab_Hb)

S3 - Figura 1 – Matriz da confusão como os resultados do xgBoost (A) e Lasso (B) na coorte de validação.



S5 - Tabela 3 – Coeficientes de importância da regressão Lasso (modelo final)

Variável	Coeficiente	Penalidade
(Intercept)	-1.6626800	0.0158489
Letargia	0.5782276	0.0158489
Envolvimento Pulmonar	0.6241528	0.0158489
PAM	-0.6098900	0.0158489
Lab ureia	0.0000000	0.0158489
Lab sódio	0.0000000	0.0158489
Lab bilirrubina direta	0.3628840	0.0158489
Lab TGO	0.4899103	0.0158489
Lab HTc	-0.6401537	0.0158489
Lab leucocitos	0.0000000	0.0158489
Lab plaquetas	0.0000000	0.0158489
Idade ns_1	0.0000000	0.0158489
Idade ns_2	3.4625012	0.0158489
Idade ns_3	0.0000000	0.0158489
Idade ns_4	0.5815910	0.0158489

PAM – pressão arterial média, Htc- hematócrito

A penalidade ideal foi selecionada por bootstrap no conjunto de treino.

Para idade, usamos splines naturais (ns) com 4 graus de liberdade.

Para construir o QuickLepto, usamos os preditores com valores estimados mais altos (em módulo).

ANEXOS
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – PARECER 1

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E TERAPÊUTICOS AO LONGO DE 30 ANOS EM PACIENTES COM LEPTOSPIROSE GRAVE E A CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO

Pesquisador: ELIZABETH DE FRANCESCO DAHER

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65452016.2.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.985.754

Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E TERAPÊUTICOS AO LONGO DE 30 ANOS EM PACIENTES COM LEPTOSPIROSE GRAVE E A CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO

Trata-se de um estudo retrospectivo, tipo observacional, através da revisão de prontuários.

O presente estudo pretende avaliar a evolução, ao longo de 30 anos, do perfil clínico, laboratorial e utilização de terapêuticas em pacientes com lesão renal aguda associada à leptospirose.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

Avaliar os fatores prognósticos em pacientes com lesão renal aguda (LRA) associada à leptospirose ao longo de 30 anos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.985.754

Cronograma	Cronograma.pdf	06/03/2017 18:34:26	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_finalizadoLEPTOcomNovoCrono grama.docx	06/03/2017 18:33:30	ELIZABETH DE FRANCESCO DAHER	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaolsencaoOnus.pdf	19/01/2017 12:55:36	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Outros	Oficiodeencaminhameto.pdf	19/01/2017 12:54:30	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Orçamento	DescricaoDespesas.pdf	19/01/2017 12:54:01	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Outros	TermoFielDepositario.pdf	19/01/2017 12:44:28	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Outros	CartadeAnuencia.pdf	19/01/2017 12:44:02	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	09/11/2016 10:17:09	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoInstitucional.pdf	04/11/2016 13:14:38	ELIZABETH DE FRANCESCO DAHER	Aceito
Outros	CurriculoLattes.pdf	31/10/2016 18:31:22	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Outros	Termocompromisso.pdf	31/10/2016 18:24:15	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacaoisencao.pdf	31/10/2016 18:23:24	ELIZABETH DE FRANCESCO DAHER	Aceito
Outros	Cartaapreciacao.pdf	31/10/2016 18:23:00	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodeconcordancia.pdf	31/10/2016 18:21:06	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito
Orçamento	Declaracaoorcamento.pdf	31/10/2016 18:20:35	ELIZABETH DE FRANCESCO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

Página 03 de 04

Continuação do Parecer: 1.985.754

FORTALEZA, 28 de Março de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – PARECER 2

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ / HUWC -
UFC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação Do Papel Dos Biomarcadores Renais E Endoteliais Como Preditores De Complicações E Cronicidade Em Pacientes Com Leptospirose Grave

Pesquisador: GABRIELA STUDART GALDINO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46442921.4.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.831.593

Apresentação do Projeto:

Contextualização: A Leptospirose, apesar de ser a zoonose mais comum no mundo, é uma doença negligenciada e reemergente. No Brasil, é um importante problema de saúde pública gerando morbimortalidade tanto em animais quanto em humanos. O agente etiológico da doença é a bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira* que possui 9 espécies patogênicas identificadas. A leptospirose apresenta amplo espectro clínico, sendo de difícil diagnóstico. O rim é um dos principais alvos do *Leptospira*, onde a lesão renal aguda (LRA) pode ocorrer em 20-85%, entretanto os mecanismos fisiopatológicos ainda não estão totalmente elucidados o que dificulta a identificação de preditores confiáveis para a detecção dos pacientes mais graves de forma precoce.

Será realizado estudo de coorte prospectivo em pacientes internados por leptospirose. Local Do Estudo: o estudo será realizado em 3 hospitais públicos, situados na cidade de Fortaleza, Ceará: O Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) - Universidade Federal do Ceará (UFC); Hospital a identificação de preditores confiáveis para a detecção dos pacientes mais graves de forma precoce.

Será realizado estudo de coorte prospectivo em pacientes internados por leptospirose. Local Do Estudo: o estudo será realizado em 3 hospitais públicos, situados na cidade de Fortaleza, Ceará: O

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo,1142

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8589

Fax: (85)99267-4630

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ / HUWC -
UFC**



Continuação do Parecer: 4.831.593

Básicas do Projeto	ETO_1731744.pdf	20:44:18		Aceito
Outros	carta_pendencias_CEP.docx	20/06/2021 20:40:33	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_lepto_biomarcadoresajust2.pdf	20/06/2021 20:39:31	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEsadio_lepto_biomarcadoresajust.pdf	17/06/2021 21:55:07	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gabriela_doutoradoajust1.pdf	17/06/2021 21:54:29	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Outros	carta_encaminhamento.docx	04/05/2021 00:15:35	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	10_termodecompromisso.pdf	30/04/2021 15:21:31	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Outros	09_fieldepositario.pdf	30/04/2021 15:20:11	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Cronograma	08_cronograma_biomarcadores.pdf	30/04/2021 15:19:18	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Declaração de concordância	07_declaracaoconcordancia.pdf	30/04/2021 15:16:04	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Outros	06_CV_Gabriela_Studart_Galdino.pdf	30/04/2021 15:15:49	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Outros	06_CV_Elizabeth_De_Francesco_Daher.pdf	30/04/2021 15:15:33	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Outros	05_autorizacaolocalpesquisa.pdf	30/04/2021 15:14:53	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Orçamento	04_orcamento_biomarcadores2.pdf	30/04/2021 15:12:10	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	30/04/2021 15:04:04	GABRIELA STUDART GALDINO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo,1142
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8589 **Fax:** (85)99267-4630 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

Página 05 de 06

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ / HUWC -
UFC**



Continuação do Parecer: 4.831.593

FORTALEZA, 07 de Julho de 2021

**Assinado por:
Maria Helene Costa Gurgel
(Coordenador(a))**

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Título da Pesquisa: “Determinação do papel dos biomarcadores renais e endoteliais como preditores de complicações e cronicidade em pacientes com leptospirose grave”.

Pesquisador responsável: Gabriela Studart Galdino, médica clínica, doutoranda, orientada pela Dra Elizabeth de Francesco Daher, médica nefrologista, professora do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará.

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos. Este estudo pretende avaliar alterações na função de seus rins. Trata-se de uma pesquisa de observação, significando que seu tratamento não será alterado de forma alguma pela sua participação na pesquisa. Para tanto peço autorização para que o você participe deste estudo.

Ao participar desta pesquisa você será convidado a responder algumas questões que buscam caracterizar o ambiente que você vive, seu passado médico e medicações em uso. Também serão coletados dados da sua história como exames laboratoriais anteriores, dados sobre sua doença e por seguinte será coletada uma amostra de sangue (5ml – uma colher de sopa) e uma amostra de urina (5ml – uma colher de sopa) que serão armazenadas para posterior realização de exames. Esses exames que serão realizados não são da prática médica do dia a dia e tem a finalidade de avaliar lesões nos rins em estágios bem iniciais.

A amostra de sangue será processada e guardada uma amostra de soro (sangue sem as células). Essa amostra de soro e de urina serão guardadas em um congelador especial (-80°C) e será utilizada para a pesquisa da qual você está fazendo parte.

O material armazenado será identificado por código, sendo mantido o seu sigilo e o seu acesso ao material guardado será garantido através do contato com o pesquisador abaixo.

Após um período de seis meses, o material será descartado de forma apropriada. Essas amostras pertencem a você e apenas ficarão sob nossa guarda durante o período necessário para realizar a pesquisa. Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado a resposta dos questionários, sem nenhum prejuízo para você.

Haverá risco mínimo para você ao participar dessa pesquisa. Poderá sentir desconforto durante a picada da agulha para a coleta do sangue e qualquer constrangimento será evitado, mantendo o sigilo da sua pessoa.

A sua participação possibilitará o levantamento de informações sobre a sua saúde e favorecerá o estabelecimento de estratégias para melhorar o atendimento prestado nessa instituição.

As informações serão utilizadas em trabalhos, divulgadas em congressos ou publicadas em revista científica, sem permitir que você seja identificado. Acredita-se que a realização deste estudo terá como benefícios a melhoria da qualidade da assistência nesta instituição, atendendo-o de forma individualizada, conforme as reais necessidades do paciente.

Você poderá ter acesso às informações e poderá tirar dúvidas sobre este trabalho em qualquer momento. Você terá a liberdade de desistir de participar, sem que isso lhe cause problemas no seu acompanhamento na instituição. Caso o Sr (a) aceite participar da pesquisa NÃO receberá pagamento ou gratificação pela participação no estudo. Este termo será realizado em duas vias, permanecendo uma com o (a) senhor (a) e outra com a pesquisadora.

Estaremos à disposição para dar informações sobre o nosso trabalho. Caso o senhor (a) precise entrar em contato com a gente, nosso endereço e telefone estão abaixo:

CONTATOS: Professora Dra. Elizabeth Daher (orientadora da pesquisa) Universidade Federal do Ceará – Depto de Medicina Clínica (85) 3366-8589 ou Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Coronel Nunes de Melo S/N- Térreo, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br”

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Eu, _____, portador (a) da cédula de identidade _____, declaro que, após leitura detalhada do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.
E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Fortaleza, _____ de _____ de _____

_____ Assinatura do participante	_____ Assinatura do responsável pela coleta de dados	DIGITAL
_____ Assinatura da testemunha	_____ Assinatura do Pesquisador	