



INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA - IMIP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

DOUTORADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE INATA: EXPRESSÃO DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS DAS PLAQUETAS (sCD62P) E DO
ENDOTÉLIO VASCULAR (sCD40) NA SEPSE
MENINGOCÓCICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes

Recife, dezembro de 2020

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA - IMIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
DOUTORADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE INATA: EXPRESSÃO DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS DAS PLAQUETAS (sCD62P) E DO
ENDOTÉLIO VASCULAR (sCD40) NA SEPSE
MENINGOCÓCICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-
graduação *stricto sensu* em Saúde Materno
Infantil do IMIP em cumprimento às
exigências para obtenção do grau de Doutora

Doutoranda: Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Leuridan Cavalcante Torres

Linha de Pesquisa: Estudos epidemiológicos, clínicos e translacionais de
doenças infecciosas e não infecciosas no ciclo vital

Apoio financeiro: FACEPE (Processo nº APQ-0496-4.01/15).

Recife, dezembro de 2020

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP
Ficha Catalográfica BAB-012/2021
Elaborada por Túlio Revoredo CRB-4/2078

M543a Menezes, Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de

Avaliação de mecanismos de regulação da resposta imune inata: expressão de mediadores inflamatórios das plaquetas (scd62p) e do endotélio vascular (scd40) na sepse meningocócica em crianças e adolescentes / Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes. Orientadora: Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte. Coorientadora: Leuridan Cavalcante Torres – Recife: Do Autor, 2021.

113 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Integral) – Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, 2021.

1. Endotélio Vascular. 2. Indicadores de Morbimortalidade. 3. Ligante de CD40. I. Duarte, Maria do Carmo Menezes Bezerra: orientadora. II. Torres, Leuridan Cavalcante: coorientadora. III. Título.

CDD 616.1

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNE INATA: EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DAS
PLAQUETAS (sCD62P) E DO ENDOTÉLIO VASCULAR (sCD40) NA
SEPSE MENINGOCÓCICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Saúde Materno Infantil do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP, submetida à defesa pública e aprovada pela Banca Examinadora em 14 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Fiocruz)

Prof. Dra. Nara Cavalcante Vasconcelos (USP)

Prof. Dra. Lívia Barboza Andrade (IMIP)

Prof. Dra. Patrícia Gomes de Matos Bezerra (IMIP)

Prof. Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte (Orientadora - IMIP)

Recife, dezembro de 2020

DEDICATÓRIA

Aos pacientes que são minha motivação para estudo, pesquisa e replicação do conhecimento com objetivo de beneficiá-los.

Aos meus filhos Bruno, Pietra e Mário Neto, por me mostrarem o amor incondicional; aos meus pais Pedro e Terezinha, com gratidão, amor e por abrir mão muitas vezes dos sonhos deles para da vazão aos nossos; ao meu marido Mário, por incentivo, apoio e amor irrestrito; aos meus irmãos, Pedro Leão, Luís Antonio e Rita Maria, por compartilhar a vida e o amor; à minha avó Diva, minha primeira e inspiradora professora, e à minha orientadora, Carminha, simplesmente por ela ser quem ela é, pelo apoio e incentivo incondicionais, a quem serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de servir ao próximo no exercício da minha profissão.

À Profa. Dra. Carminha Duarte, por me acolher na terapia intensiva e na pesquisa e por juntas, tornar essa tese possível. Eterna admiração pela dedicação, compromisso brilhantismo e simplicidade.

À Profa. Dra. Leuridan Torres, pela minha estreia na pesquisa translacional e por aceitar a orientação. Sempre encantada pela sua inteligência e simplicidade.

A Moacir e Manuela, pela amizade, apoio e incentivo e por aceitar caminharmos juntos nessa tão desbravadora jornada.

A toda equipe do Hospital Correia Picanço (HCP), instituição colaboradora do projeto, fonte do desejo de fazer algo maior por aqueles que sofrem, uma verdadeira família. A Dr. Tadeu Calheiros, com sua excelência em coordenação, e às queridas Dra. Clarice Santos e Dra. Patrícia Monteiro, pelo apoio e colaboração na fase mais difícil dessa jornada. Às minhas amigas Eliana Valentim, Vanessa Vieira, Luzinete Nascimento pelo companheirismo, cumplicidade e colaboração essenciais para concretização desse estudo. À toda equipe de médicos, enfermeiras e técnicos de enfermagem sem os quais não conseguiria realizar esse trabalho.

A toda equipe do Hospital Esperança, família parte III, em especial às amigas Dra. Anuska Lins e Dra. Elizane Laurentino, pela amizade e cooperação, inestimáveis para viabilização da pesquisa; à cada membro da equipe, pelo apoio e amizade.

Ao Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP sob coordenação da Prof. Dra. Leuridan Torres onde foi desenvolvido o estudo de bancada.

A todos do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP, em particular ao Dr. José Roberto da Silva Júnior, pelas coordenadas para concretização da tese; à Diana e Cristina pelo apoio operacional.

A toda minha turma do doutorado de Saúde Materno Infantil do IMIP pelo apoio, pela caminhada e conquista, em especial às Dras. Paula Lyra e Paula Diniz, com apoio e contribuições inestimáveis para a conclusão deste trabalho.

Aos pacientes e seus responsáveis por aceitaram participar da pesquisa e assim permitir a concretização do estudo.

Às minhas amigas Ana Paula Guimarães, Andréa Sena, Cristiane Percílio e Alessandra Muniz, agregadas pelo trabalho e unidas pela vida, por não me deixarem desistir e por tantos dias de café e amizade.

À minha amiga Daniela Davino pelo suporte fiel.

Aos meus pais, irmãos e sogros pelo incentivo e apoio sempre.

Ao meu marido e meus filhos, por tantos dias de renúncia e companheirismo.

À Fernando, Carol, Luiza e Bruno por permitirem esta parceria com Carminha, que por muitas vezes tomou o tempo deles.

À FACEPE por ter sido o órgão de fomento dessa pesquisa.

Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes

“As coisas não caem do céu. É preciso buscá-las. Algumas delas é preciso conquistar. Mergulhar fundo, correr atrás, criar asas e voar. Por vezes, será preciso voltar ao começo e refazer tudo de novo. As coisas não caem do céu. Mas quando, após haverem empenhado coração, cérebro, nervos, finalmente chegarem ao resultado desejado, finalmente chegarem onde pretendiam, desfrutem a vitória, saboreiem o sucesso gota a gota- é uma delícia; sem esquecer, no entanto, que ninguém é bom sozinho, e que, no fundo, no fundo, por paradoxal que pareça, as coisas caem mesmo é do céu; é preciso agradecer.”

Ministro Luís Roberto Barroso

RESUMO

Introdução: a sepse bacteriana grave permanece um desafio à saúde pública devido à sua alta morbimortalidade. Sepse é uma síndrome heterogênea e potencialmente fatal, causada pela desregulação do sistema imunológico. A sepse meningocócica é rapidamente progressiva e a morte pode ocorrer algumas horas após o início dos sintomas. Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia do choque séptico meningocócico, os estudos sobre os mecanismos que desencadeiam o início do curso fulminante na sepse meningocócica são limitados. Diversas proteínas na forma de receptores de membrana ou solúveis no plasma têm sido investigadas em pacientes com sepse. Algumas dessas proteínas regulam o sistema imune e fazem parte de moléculas do *checkpoint* imunológico. Entre essas moléculas, o CD40, seu ligante CD40 (CD40L) e a P-selectina (CD62P) atuam na resposta imune inata. **Objetivo:** avaliar os mecanismos de regulação da resposta imune inata através da expressão de mediadores inflamatórios relacionados às plaquetas (sCD62p) e ao endotélio vascular (sCD40), em crianças com sepse meningocócica. **Métodos:** estudo translacional do tipo corte transversal, com grupo de comparação de crianças e adolescentes saudáveis. Foram incluídas crianças e adolescentes (de seis meses a 14 anos) com diagnóstico de sepse meningocócica (SM) e sepse não meningocócica (SNM) internados no Hospital Correia Picanço. Os pacientes do grupo de comparação foram crianças saudáveis (CS) sem história de infecção recente ou de internamento nos últimos 30 dias, no ambulatório de cirurgia pediátrica do Hospital Maria Lucinda para realização de cirurgias eletivas de pequeno porte. Foram avaliadas variáveis biológicas, clínicas e laboratoriais. As dosagens de sCD62P e sCD40 foram realizadas por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Na análise descritiva foram construídas tabelas de distribuição de frequência e realizadas medidas de tendência central e de dispersão. O teste de qui-quadrado e exato de Fisher foram usados

para comparar variáveis categóricas e para variáveis numéricas os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação entre três e dois grupos, respectivamente, devido a distribuição não normal. Teste não paramétrico de Spearman foi usado para análise de correlação entre duas variáveis. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada usando GraphPad Prism v8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos do IMIP sob o CAAE 29385614.1.0000.5201. **Resultados:** foram encontrados altos níveis de sCD40 em pacientes com SM, quando comparados com os grupos de SNM e CS ($p < 0,001$). Altos níveis de sCD62P foram encontrados em pacientes dos grupos SM e SNM, quando comparados ao grupo CS ($p = 0,010$ e $p = 0,002$, respectivamente). Em pacientes com SM, os níveis de sCD62P e sCD40 encontravam-se mais elevados nos pacientes com plaquetopenia do que nos pacientes com níveis de plaquetas normais ($p < 0,048$). Nos pacientes com SM houve uma correlação moderada entre os níveis de sCD62P e sCD40 $r = 0,556$, $p = 0,007$). A mortalidade foi de 25% nos grupos de pacientes com SM e SNM. **Conclusão:** os pacientes com SM apresentam uma desregulação da imunidade inata, representadas pela ativação de mediadores plaquetários (sCD62P) e do endotélio vascular (sCD40).

Palavras-chave: sepse; imunidade, inata; selectina-P; antígeno CD40; infecções meningocócicas.

ABSTRACT

Introduction: severe bacterial sepsis remains a public health challenge due to its high morbidity and mortality. Sepsis is a heterogeneous and life-threatening syndrome caused by the dysregulation of the immune system. Despite advances in understanding the pathophysiology of meningococcal septic shock, studies on the mechanisms that trigger the onset of the fulminant course in MS are limited. Meningococcal sepsis is rapidly progressive and death can occur within hours of symptom onset. Several proteins in the form of membrane receptors or soluble in plasma have been investigated in patients with sepsis. Some of these proteins regulate the immune system and are part of immunological checkpoint molecules. Among these molecules, CD40, its CD40 ligand (CD40L) and P-selectin (CD62P) act on the innate immune response. **Objective:** evaluate mechanisms of dysregulation of innate immune response by expression of platelet-related inflammatory mediators (sCD62P) and vascular (sCD40) in children and adolescents (six months to 14 years) with meningococcal sepsis. **Methods:** exploratory, translational cross-sectional study. Children diagnosed with meningococcal sepsis (MS) were included and no meningococcal sepsis (NMS) admitted to the Correia Picanço Hospital. The patients in the comparison group were healthy children (HC) with no history of recent infection or hospitalization in the last 30 days, at the pediatric surgery outpatient clinic of Hospital Maria Lucinda for performing minor elective surgeries. Biological, clinical and laboratory variables were evaluated. In platelet-poor plasma samples, sCD40 and sCD62P concentrations were measured by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique. In the descriptive analysis, frequency distribution tables were constructed, and measures of central tendency and dispersion were performed. The chi-square test and Fisher's exact test were used to compare categorical variables and for numerical variables, the Kruskal-Wallis and

Mann-Whitney tests for comparison between three and two groups, respectively, due to non-normal distribution. Spearman's nonparametric test was used to analyze the correlation between two variables. Statistical significance was considered for values of $P < 0.05$. Data analysis was performed using GraphPad Prism v8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA). This study was approved by the IMIP Human Ethics Committee (CAAE 29385614.1.0000.5201). **Results:** high levels of sCD40 in patients with MS compared the NMS and HC groups ($p < 0.001$). High levels of sCD62P were found in patients with MS and NMS compared to the HC group ($p = 0.010$ and $p = 0.002$, respectively). In patients with MS, sCD40, and sCD62P levels were elevated in the thrombocytopenia group compared to the group without thrombocytopenia ($p < 0.048$). In the correlation analysis of patients in the MS group, a moderate correlation was observed between sCD40L and sCD62P levels ($r = 0.556$, $p = 0.007$). Mortality was 25% in both sepsis groups. **Conclusions:** MS presents dysregulation of the innate immune response, represented by high levels of platelet activation mediator (sCD62P) and vascular endothelium (sCD40).

Keywords: meningococcal infections; sepsis; immunity, innate; p-selectin; CD40.

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	01
II	OBJETIVOS	15
	2.1 Objetivo geral	15
	2.2 Objetivos específicos	15
III	MÉTODOS	16
	3.1 Desenho do estudo	16
	3.2 Local do estudo	16
	3.3 Período do estudo	16
	3.4 População e amostra do estudo	16
	3.5 Critérios de elegibilidade	17
	3.5.1 Critérios de inclusão	17
	3.5.2 Critérios de exclusão	18
	3.6 Procedimentos para captação e acompanhamento dos participantes	18
	3.7 Fluxograma da pesquisa	20
	3.8 Fluxograma para captação	21
	3.9 Aspectos éticos	22
	3.10 Definição de termos e variáveis	23
	3.10.1 Variáveis demográficas	23
	3.10.2 Variáveis relacionadas à história médica atual	23
	3.10.3 Variáveis laboratoriais	24
	3.11 Coleta de sangue	24
	3.12 Testes laboratoriais	25
	3.12.1 Dosagem de moléculas coestimuladoras (sCD62P e sCD40)	25
	3.13 Coleta de dados e controle de qualidade de informações	26
	3.14 Processamento e análise dos dados	26
IV	RESULTADOS	28
	4.1 Artigo 1	29
V	CONCLUSÃO	
	5.1 Importância e aplicabilidade do estudo	48
	5.2 Impacto institucional	49

5.3 Recomendações para pesquisa	49
VI REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	
I – Artigo: Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with COVID-19 in Pernambuco, Brazil	54
II – Lista de checagem	61
III – Formulário da pesquisa	63
IV – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	65
V - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)	71
VI – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - MIS-C	74
ANEXOS	
I - Definições de síndrome de resposta inflamatória sistêmica, infecção, sepse grave e choque séptico	77
II – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	80
III – Carta de anuência do Hospital Correia Picanço	82
IV – Carta de anuência do Hospital Maria Lucinda	83
V – Instruções para os autores artigo 1	84
VI – Instruções para os autores artigo 2	88

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CCL	Do inglês “ <i>chemokine CC motif ligand</i> ”
CD40L	CD40 ligante
CD62P	P-selectina
CDC	Do inglês “ <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ”
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CLEC-2	Do inglês “ <i>C-type lectin-like receptor-2</i> ”
CLR	Do inglês “ <i>C-Lectin like receptors</i> ”
COVID	Do inglês “ <i>Corona Virus Disease</i> ”
CPK	Do inglês “ <i>Creatinophosphokinase</i> ”
CPR	Do inglês “ <i>C Reactive Protein</i> ”
CS	Controle saudável
CXCL	Do inglês “ <i>C-X-C chemokine receptor</i> ”
DAMP	Do inglês “ <i>Damage-associated molecular patterns</i> ”
DC	Do inglês “ <i>Dendritic cell</i> ”
DM	Doença meningocócica
DMI	Doença meningocócica invasiva
DNA	Do inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”
DP	Desvio padrão
EA	Do inglês “ <i>Enzymatic activity</i> ”
EDTA	Do inglês “ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”
EF	Do inglês “ <i>Ejection fraction</i> ”

EFLV	Do inglês “ <i>Ejection fraction left ventricle</i> ”
ELISA	Do inglês “ <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> ”
ESR	Do inglês “ <i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i> ”
FACEPE	Fundação de Amparo, a Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FC	Frequência cardíaca
FPS	Faculdade Pernambucana de Saúde
Fiocruz	Fundação Osvaldo Cruz
GP	Do inglês “ <i>Platelet glycoprotein</i> ”
GM-CSF	Do inglês “ <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator</i> ”
GRO- α	Do inglês “ <i>Chemokine growth-regulated protein alpha</i> ”
HC	Do inglês “ <i>Health Control</i> ”
HCP	Hospital Correia Picanço
HLA-DR	Do inglês “ <i>Human Leukocyte Antigen – D Related</i> ”
HMGB 1	Do inglês “ <i>High mobility group box 1 protein</i> ”
ICU	Do inglês “ <i>Intensive Care Unit</i> ”
Ig	Imunoglobulina
IIQ	Intervalo interquartil
IL	Do inglês “ <i>Interleukin</i> ”
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira
INR	Do inglês “ <i>International Normalized Ratio</i> ”
IQR	Do inglês “ <i>Interquartile range</i> ”
ISSN	Do inglês “ <i>International Standard Serial Number</i> ”
LAF	Do inglês “ <i>Lymphocyte function-associated antigen</i> ”
LCR	Líquido Céfalo-raquidiano

LDH	Do inglês “ <i>Lactate dehydrogenase</i> ”
LILACS	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MAC - 1	Do inglês “ <i>Macrophage 1 antigen</i> ”
MCP-1	Do inglês “ <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> ”
MDSC	Do inglês “ <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> ”
MIP-1	Do inglês “ <i>Macrophage inflammatory protein 1</i> ”
MIS-C	Do inglês “ <i>Multisystem inflammatory syndrome in children</i> ”
MM	Meningite meningocócica
MMP	Do inglês “ <i>Matrix metalloproteinases</i> ”
MS	Do inglês “ <i>Meningococcal sepsis</i> ”
mtDNA	Do inglês “ <i>Mitochondrial deoxyribonucleic acid</i> ”
MTP1	Do inglês “ <i>Membrane type-1</i> ”
NAP-2	Do inglês “ <i>Neutrophil activating peptide 2</i> ”
NET	Do inglês “ <i>Neutrophil extracellular traps</i> ”
NLR	Do inglês “ <i>Nucleotide like receptor</i> ”
NMS	Do inglês “ <i>No Meningococcal Sepsis</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Do inglês “ <i>Platelet-activating factor</i> ”
PAMP	Do inglês “ <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> ”
PCR	Proteína C reativa
PCT	Procalcitonina
PIM	Do inglês “ <i>Pediatric Index of Mortality</i> ”
PMV	Do inglês “ <i>Platelet microvesicles</i> ”
PRISM	Do inglês “ <i>Pediatric Risk of Mortality</i> ”

PSGL	Do inglês “ <i>P-selectin glycoprotein ligand</i> ”
RT-PCR	Do inglês “ <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> ”
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RLR	Do inglês “ <i>Retinoic acid like receptors</i> ”
SARS CoV-2	Do inglês “ <i>Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2</i> ”
sCD40L	CD40 ligante solúvel
sCD62P	P-selectina solúvel
SciElo	Do inglês “ <i>Scientific Electronic Library Online</i> ”
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SM	Sepse meningocócica sem meningite
SMM	Sepse meningocócica com meningite
SNM	Sepse não meningocócica
SPROUT	Do inglês “ <i>Sepsis Prevalence Outcomes and Therapy</i> ”
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFβ	Do inglês “transforming growth factor beta”
TLR	Do inglês “ <i>Toll like receptors</i> ”
TNF	Do inglês “ <i>Tumor necrosis factor</i> ”
tPA	Do inglês “ <i>Tissue plasminogen activator</i> ”
TPO	Do inglês “ <i>Thyroid peroxidase</i> ”
TREM	Do inglês “ <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i> ”
uPA	Do inglês “ <i>Urokinase-type plasminogen activator</i> ”
uPAR	Do inglês “ <i>Urokinase receptor</i> ”

UTIP	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica
VEH	Vigilância epidemiológica hospitalar
vWF	Do inglês “ <i>Von Willebrand fator</i> ”

LISTAS DE FIGURAS

Tese	Figura 1. Resposta imune do hospedeiro à infecção e a sepse	6
	Figura 2. Regulação da função de células do sistema imune pelas plaquetas	7
	Figura 3. Função imune das plaquetas	9
	Figura 4. - Interações das plaquetas no endotélio vascular	10
	Figura 5. Participação da via CD40-CD40L no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação	13
	Figura 6. Fluxograma da pesquisa	20
	Figura 7. Fluxograma de captação dos pacientes	21
Artigo 1	Figure 1. Soluble levels sCD40 and sCD62p in children with meningococcal sepsis (MS), non-meningococcal sepsis (NMS), and in healthy control (HC).	45
	Figure 2. Soluble levels of sCD40 and SCD 62p in patients with and without thrombocytopenia ($\leq 150 \times 10^3/\mu\text{L}$).	46
	Figure 3. Correlation analysis of between sCD40 <i>versus</i> sCD62p, platelets count ($\times 10^3/\mu\text{L}$) <i>versus</i> sCD40 and sCD62p levels of patients with meningococcal sepsis.	47

LISTAS DE TABELAS E DE QUADROS

Tese	Tabela 1. Frequência absoluta de crianças e adolescentes com sepse meningocócica internados na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Correia Picanço no período de 2015 a 2020	3
Artigo 1	Table 1. Clinical and laboratory characteristics of children and adolescents with meningococcal sepsis, non-meningococcal sepsis, and healthy controls.	43
	Table 2. Hematologic variables of children and adolescents with meningococcal sepsis, non-meningococcal sepsis, and healthy controls.	44
Artigo 2	Chart 1. Clinical, laboratory, radiological and therapeutic of 11 patients with Multisystem Inflammatory Syndrome during COVID-19 pandemic.	60

APRESENTAÇÃO

Este modelo de formatação de tese segue a recomendação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do IMIP e orienta a substituição das sessões resultados e discussão da Tese por dois artigos produzidos durante o doutorado.

O projeto de pesquisa original testou a hipótese de que as plaquetas têm uma função essencial na regulação do sistema imune inato e que as alterações no mecanismo de ativação plaquetária possam estar associadas a maior morbi-letalidade das crianças e nos adolescentes com sepse meningocócica. Como produto de tese foi escrito o primeiro artigo intitulado “Dysregulation of the innate immune response in meningococcal sepsis in children and adolescents: an essential role of platelets (sCD62p) and vascular endothelium (sCD40) soluble mediators”.

Durante o último ano do doutorado (2020) ocorreu a pandemia da COVID-19, causada pelo SARSCoV-2. Onde os dados reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 19 de outubro de 2020 eram alarmantes, referindo quase 40 milhões de pessoas contaminadas e mais de 1 milhão e 100 mil mortes em todo mundo. O Brasil foi considerado um dos epicentros da pandemia, com uma das maiores taxas de contaminação e de morte. Além disso, a partir de abril de 2020, uma síndrome inflamatória multissistêmica na criança (MIS-C) foi descrita em vários países relacionada ao SARS-CoV-2.

Em Pernambuco observou-se nos hospitais de referência para COVID-19 um aumento do número de crianças e adolescentes com MIS-C com evolução grave e casos de morte. A doutoranda vivenciou a pandemia em um dos Centros de Referência para Doenças Infectocontagiosas do Estado, o Hospital Correia Picanço (HCP). Por isso, considerou-se relevante e oportuno acompanhar essas crianças e adolescentes e descrever uma série de casos. O objetivo dessa série de casos visa alertar os profissionais de saúde para a

necessidade de reconhecimento precoce e terapêutica imediata e adequada em países como o Brasil, onde o acesso aos serviços e os recursos à saúde são limitados. Dessa forma, originou-se o artigo intitulado: “Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with COVID-19 in Pernambuco, Brazil”.

Ressalta-se que na tese, as sessões de introdução, objetivos, método e resultado estão relacionadas ao projeto âncora sobre mecanismos de regulação da resposta imune em crianças e adolescente com sepse meningocócica. O segundo artigo exigido pela Pós-graduação para obtenção do grau de Doutora encontra-se no Apêndice I deste documento.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

A sepsis é uma condição clínica ameaçadora de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção, que impacta em mais de um milhão de mortes infantis por ano^{1,2}. Recentes dados mostram que são estimados 22 casos de crianças sepsis por 100.000 pessoas/ano¹. Mais de 4% dos pacientes hospitalizados são crianças e aproximadamente 8% das crianças internadas vão necessitar de cuidados em unidade de terapia intensiva pediátrica (UTIP). O estudo multicêntrico *Sepsis Prevalence Outcomes and Therapy* (SPROUT) envolvendo 26 países de todos os continentes encontrou uma prevalência global de sepsis em crianças menores de 18 anos de 8,2%^{3,4}.

Do total de 6,3 milhões de mortes em crianças menores de cinco anos de 2000 a 2013, a sepsis foi responsável por 7% dos casos⁵. A mortalidade por sepsis na criança varia de 4 a 50% dependendo da gravidade da doença, fatores de risco e localização geográfica. A maior parte das crianças morrem por choque refratário e falência de múltiplos órgãos, com a maioria ocorrendo nas primeiras 48-72h do tratamento inicial⁴. Em 2017, a Assembleia de saúde mundial emitiu uma resolução sobre sepsis como uma prioridade para a próxima década⁶.

Usa-se os critérios publicados no consenso da conferência internacional de sepsis pediátrica de 2005 para definição dos conceitos sepsis e sepsis grave, sendo sepsis grave definida como: 1) maior ou igual a 2 critérios para síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), 2) infecção invasiva confirmada ou suspeita e 3) disfunção cardiovascular, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) ou maior ou igual a 2 disfunções orgânicas não cardiovasculares⁷(ANEXO1). A mais recente diretriz sobre sepsis, do ano de 2020, descreve choque séptico em crianças como infecção grave que leva à disfunção cardiovascular (incluindo hipotensão, necessidade de tratamento com medicação vasoativa

ou perfusão prejudicada) e "disfunção orgânica associada à sepse" em crianças como sepse grave que leva à disfunção cardiovascular e/ou disfunção não cardiovascular⁴.

Estudo inglês refere que uma grande porção desses pacientes que vai à óbito precocemente (35%), até mesmo antes de ou dentro das primeiras 24 horas após referenciado para UTIP tiveram diagnóstico clínico de sepse meningocócica fulminante (47%)⁸. A sepse meningocócica apresenta uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) exacerbada, necessitando dos profissionais de saúde um alto índice de suspeição e instituição de terapia guiada por metas, tempo sensível de acordo com diretrizes internacionais².

1.2 Doença meningocócica (DM)

A doença meningocócica invasiva (DMI) é importante causa de morbidade e letalidade no mundo, sendo fatal em 50-80% dos casos não tratados e em 10 a 15% dos casos que recebem tratamento adequado. Entre os sobreviventes 12 a 20% evoluem com seqüela clínica importante⁹. Na América Latina é mais frequente no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. No Brasil, esse coeficiente é de dois casos para cada 100.000 habitantes, sendo de menos de um caso para cada 100.000 habitantes na região nordeste¹⁰. Dados de sepse meningocócica com ou sem meningite admitidos na UTIP do Hospital Correia Picanço (HCP), hospital de referência para doença meningocócica no estado de Pernambuco nos anos de 2013 a 2020 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência absoluta de crianças e adolescentes com sepse meningocócica internados na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Correia Picanço no período de 2013 a 2020.

ANO	SMM*	SM**	Total
2013	27	14	41
2014	11	6	17
2015	4	2	6
2016	4	4	8
2017	1	1	2
2018	0	1	1
2019	2	2	4
2020 (Jan-Nov)	3	1	4

Fonte: Relatório de Gestão da Vigilância Epidemiológica Hospitalar (VEH) do Hospital Correia Picanço. *SMM: sepse meningocócica com meningite; **SM: sepse meningocócica.

O agente causal da doença meningocócica (DM) é a *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), também chamado meningococo, um diplococo anaeróbico Gram negativo, hospedeiro exclusivo do ser humano. Foram identificados 12 sorogrupos, com seis desses (A, B, C, W, X e Y) sendo responsáveis por quase todas as formas invasivas da doença¹¹.

Na criança, a letalidade é menor que nos adultos, variando de 6 a 10%, mas a presença de pelo menos uma seqüela é encontrada em 33% dos pacientes, sendo as mais comuns: dificuldade de aprendizado (22,6%), déficit comportamental (14,8%), neurológico (12,2%), motor (10,4%) e perda auditiva (7%). As maiores taxas de complicações são encontradas nas crianças com sepse meningocócica sem meningite (SM) com choque¹². Os principais fatores de risco para ocorrência da DM são baixa idade (recém-nascidos e crianças menores de um ano), adolescência, viagens de longa duração para áreas endêmicas, imunossupressão, coinfeção por *Mycoplasma* ou vírus respiratórios, baixo nível

socioeconômico, populações fechadas como recrutas militares e estudantes universitários, minorias étnicas, idosos e exposição a fumaça de cigarro ou poluição¹¹⁻¹³.

A apresentação clínica da DM varia desde a forma assintomática a formas graves e invasivas como a sepse meningocócica (SM), sepse meningocócica com meningite (SMM) e meningite meningocócica (MM). Também pode se apresentar como infecção crônica e localizada como pneumonia, endoftalmite, artrite, pericardite ou miosite⁹. A SM é caracterizada pela presença de lesões hemorrágicas e/ou rash maculopapular em pele e/ou mucosas, com lesões petequiais, purpúricas e/ou equimoses, podendo evoluir para púrpura fulminante como manifestação de coagulação intravascular disseminada. O choque séptico é mais comum na criança, podendo haver progressão rápida para falência de múltiplos órgãos e morte em menos de 24 horas^{12,14}.

1.3 Resposta imune na sepse

Por muitos anos a resposta inflamatória desproporcional da sepse foi considerada seu mecanismo fisiopatológico principal. Estudos descrevem que essa alteração envolve uma resposta inflamatória inicial excessiva com desregulação da homeostase, culminando com inflamação sustentada e imunossupressão¹⁵⁻¹⁷. Dessa forma, a resposta imune não é constituída apenas pelo aumento da inflamação e/ou imunossupressão, mas por uma reorganização dos processos celulares metabólicos e imunes¹⁶.

As características fisiopatológicas da sepse são amplamente atribuídas a resposta do sistema imune inato ao patógeno agressor, incluindo neutrófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos. Leucócitos e células epiteliais estão envolvidas na resposta imune local¹⁶. Estas células reconhecem e são ativadas pelos patógenos associados a padrões moleculares (PAMP), e a ligação se dá por proteínas que são expressas constitutivamente nessas células denominados de receptores de reconhecimento padrão (RRP), entre eles os

receptores tipo toll (TLR), receptores tipo nucleotídeos (NLR), receptores tipo ácido retinóico (RLR) e receptores tipo Lecitina C (CLR). Os RRP mais conhecidos são os TLR, que estão presentes em células endoteliais, plaquetas e células apresentadoras de antígenos¹⁸.

O sistema imune inato é, na maioria das vezes, eficiente em eliminar o patógeno através de uma variedade de reações pró-inflamatórias, como liberação de citocinas e quimiocinas, recrutamento de fagócitos, e ativação do sistema do complemento e de coagulação, com retorno a homeostase. Durante algumas infecções, o patógeno não é eliminado por esses mecanismos, apesar da resposta imune ativada, a qual se torna desbalanceada e prejudicial ao hospedeiro. A resposta do hospedeiro durante a sepse é caracterizada por uma fase de inflamação excessiva e de outra de imunossupressão^{16,18} (Figura 1).

A hiperinflamação é mediada por moléculas pró-inflamatórias em múltiplas células, ativação do sistema de complemento, de coagulação e do endotélio vascular. A inflamação excessiva é caracterizada por injúria celular resultando na liberação de padrões moleculares associado ao dano (DAMP), levando à injúria tecidual, disfunções orgânicas e catabolismo^{16,18}.

A imunossupressão envolve imunidade inata e adaptativa. e é caracterizada por apoptose de células T, células B e células dendríticas, exaustão de células T, expansão de células T reguladores e de populações de células supressores derivadas da linhagem mieloide e reprogramação de células apresentadoras de antígeno¹⁶.

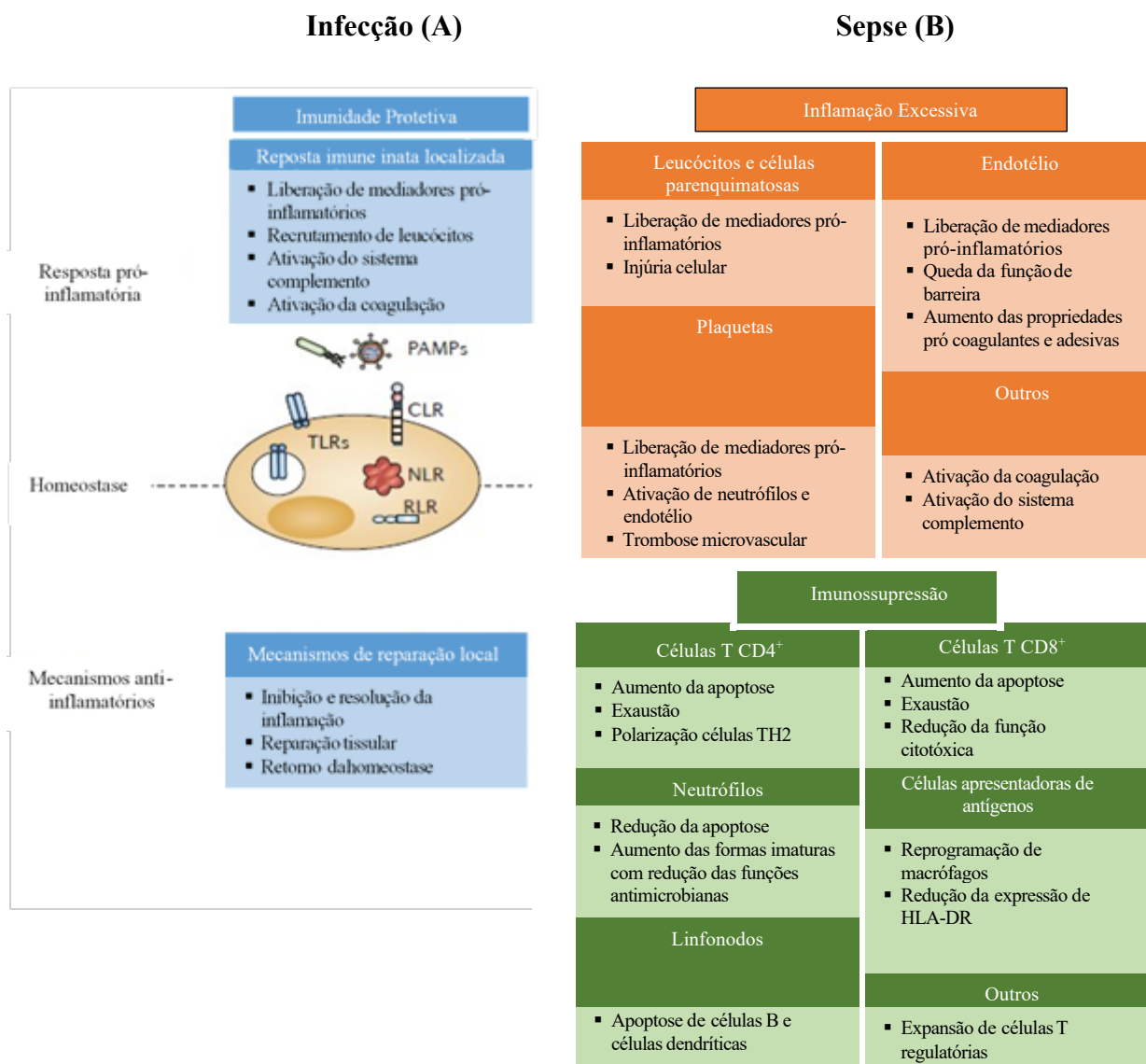


Figura 1. Resposta imune do hospedeiro à infecção e a sepse. A) Frente a uma infecção, o sistema imune inato do hospedeiro responde ao patógeno agressor (à esquerda). Células imunes como leucócitos, células epiteliais e endoteliais estão envolvidas na resposta imune local. Na maioria dos casos, o sistema imune inato é eficiente em eliminar o patógeno através de reações pró-inflamatórias (imunidade protetora). B) Em algumas situações o patógeno se multiplica e ativa uma resposta imune desbalanceada e danosa ao hospedeiro (à direita) caracterizada por inflamação excessiva e imunossupressão. Modificado de Van der Pool¹⁶

1.4 Resposta imune na sepse regulada pelas plaquetas

As plaquetas são fundamentais na resposta imune na sepse, além de suas funções na hemostasia e trombose bem definidas. São células anucleadas que patrulham a vasculatura e chegam imediatamente frente a algum dano vascular, elas são repletas de RRP,

rapidamente detectam injúria tecidual e a ameaça microbiana que geralmente acompanham o trauma¹⁹⁻²².

As plaquetas têm papel importante durante a infecção aguda, interagindo diretamente com o patógeno ou recrutando e estimulando células do sistema imune inata (Figura 2). As plaquetas liberam microvesículas, mediadores lipídicos e de nucleosídeos, DNA mitocondrial, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Elas formam agregados com os neutrófilos (agregados plaquetas-neutrófilo), armadilhas extracelulares, promovem eliminação do patógeno e possuem atividade microbicida.

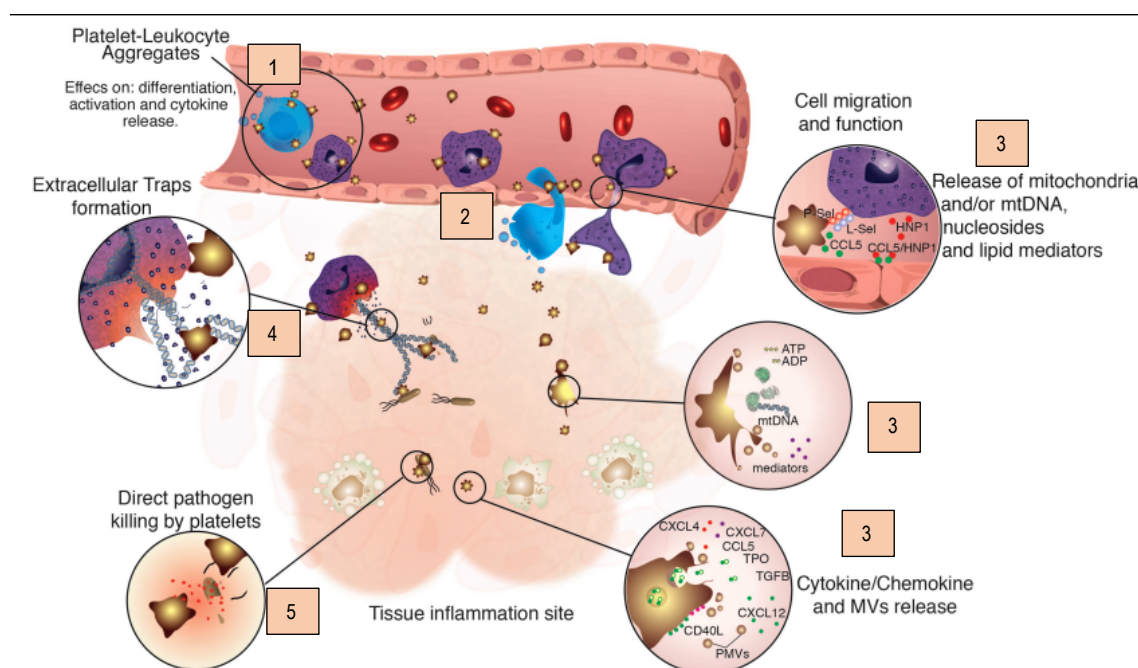


Figura 2. Regulação de células do sistema imune pelas plaquetas. As plaquetas estão envolvidas diretamente ou auxiliam e regulam múltiplas funções imunes. (1) Recrutamento e adesão de leucócitos. (2) Transmigração, fagocitose e atividades microbidas; (3) Liberação de microvesículas, mediadores lipídicos, nucleosídeos, DNA mitocondrial, fatores de crescimento bem como citocinas e quimiocinas. (4) Formação de redes/armadilhas extracelulares. (5) *Clearance* do patógeno. Modificado de Ribeiro, 2019²³. CXCL4: C-X-C chemokine receptor type 4; CXCL7: chemokine (C-X-C) ligand 7; CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; TPO: thyroid peroxidase; TGFB: transforming growth factor beta; CXCL12: C-X-C chemokine receptor type 12; PMV: platelet microvesicles; mtDNA: mitochondrial deoxyribonucleic acid; ADP: adenosine diphosphate; ATP: adenosine triphosphate;

Em condições inflamatórias, as plaquetas são os primeiros componentes sanguíneos celulares que aderem ao endotélio inflamado. Plaquetas aderidas ao endotélio recrutam neutrófilos e os guiam na sua adesão e transmigração através de interação célula a célula ou por liberação de quimiocinas no endotélio vascular. No sítio de transmigração de leucócitos, as plaquetas asseguram a integridade celular endotelial através da formação de trombo e estabilidade vascular limitando o sangramento inflamatório (Figura 3). As interações celulares são estabelecidas através de moléculas de adesão, como a P-selectina (CD62P), que liberam fatores de crescimento e mediadores inflamatórios pelas plaquetas^{20,24-26}. Plaquetas e neutrófilos ativados recrutam monócitos com estímulos inflamatórios específicos, como secreção de MCP-1. Com a transmigração, os monócitos se diferenciam em macrófagos no tecido inflamado e secretam mediadores pró-inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa [TNF α] e interleucina [IL]-1) e anti-inflamatórios (IL-10) (Figura 3)²⁰.

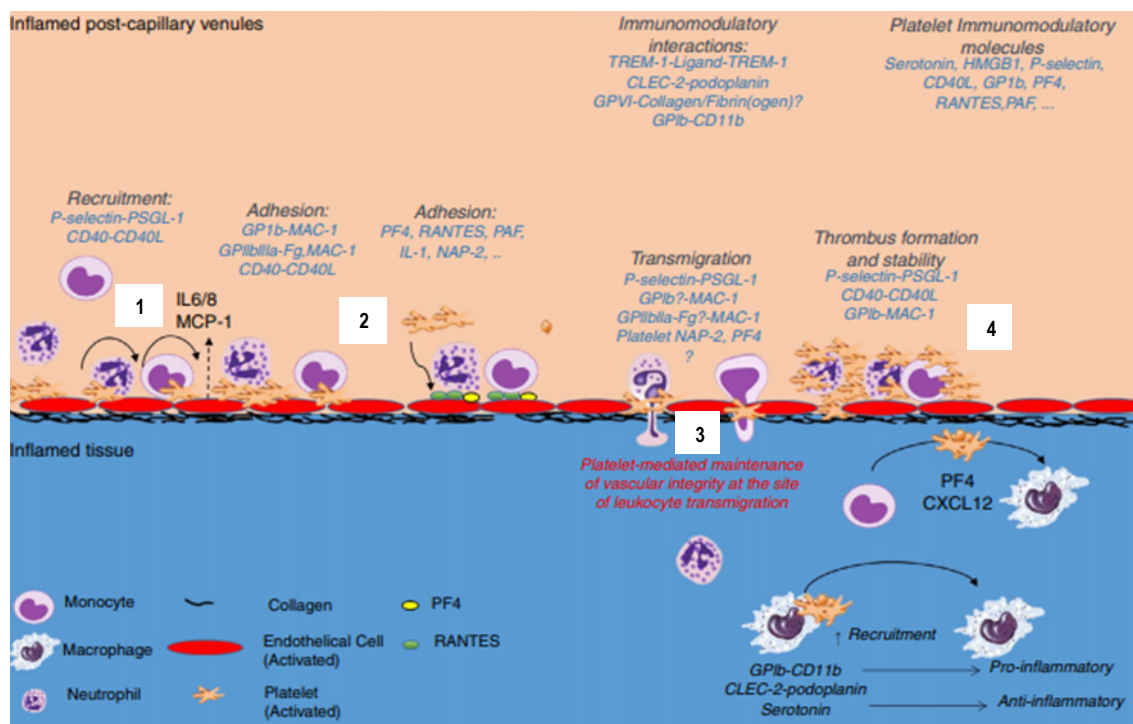


Figura 3. Função imune das plaquetas. (1) Recrutamento dos leucócitos. (2) Adesão dos neutrófilos e dos monócitos. (3) Transmigração dos leucócitos para os sítios de inflamação. (4) Formação de trombo e estabilidade vascular para manutenção da integridade vascular. Modificado de Rayes, 2019²⁰. CLEC - 2, receptor semelhante à lectina do tipo C - 2; GPVI, glicoproteína VI; IL-1, interleucina-1; GPIb, glicoproteína Ib; HMGB - 1, alta mobilidade caixa de grupo 1; MAC-1, antígeno do macrófago 1; NAP - 2, peptídeo ativador de neutrófilos 2; PAF, fator ativador de plaquetas; PF4, fator plaquetário 4; PSGL - 1, ligante da glicoproteína da selectina P - 1; TREM - 1, receptor gatilho expressos em células mielóides.

A sepse é caracteristicamente acompanhada por uma queda na contagem de plaquetas, refletindo sequestro e consumo no micro trombo, entretanto outros mecanismos podem contribuir para gravidade e persistência da plaquetopenia^{25,27-29}.

1.5 A resposta imune das plaquetas e o endotélio vascular na sepse

A quebra da barreira endotelial é um fenômeno crucial na fisiopatogênese da sepse. A barreira endotelial é mantida pelo citoesqueleto celular, o glicocálix, moléculas de adesão intracelulares e outras proteínas. Na infecção local, leucócitos e plaquetas aderem à superfície endotelial e migram para os sítios em que as bactérias estão se multiplicando. Na sepse, esse processo é exacerbado contribuindo para a quebra da barreira. Trombina e matriz

metaloproteinase 1 (MMP1) têm sido implicadas na disfunção da barreira¹⁶. A ativação e adesão das plaquetas à parede vascular é facilitada por várias interações do receptor com células endoteliais (Figura 4).

A parede de um vaso inflamado adota um fenótipo pró-trombótico. A adesão das plaquetas ativa as células endoteliais e, juntamente com potentes mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas, induz a expressão de integrinas, moléculas de adesão e outros receptores na superfície endotelial, bem como faz com que o endotélio secrete quimiocinas e outros mediadores. As plaquetas aderidas ao endotélio se ligam aos leucócitos circulantes, contribuindo para o recrutamento de leucócitos para o endotélio. Esses mecanismos amplificam e facilitam o recrutamento de leucócitos e aumentam a inflamação²⁹.

A translocação de P-selectina e CD40L na superfície das plaquetas, favorece a interação com células imunes e endoteliais promovendo aumento da permeabilidade vascular, trombose e inflamação^{20,30,31}.

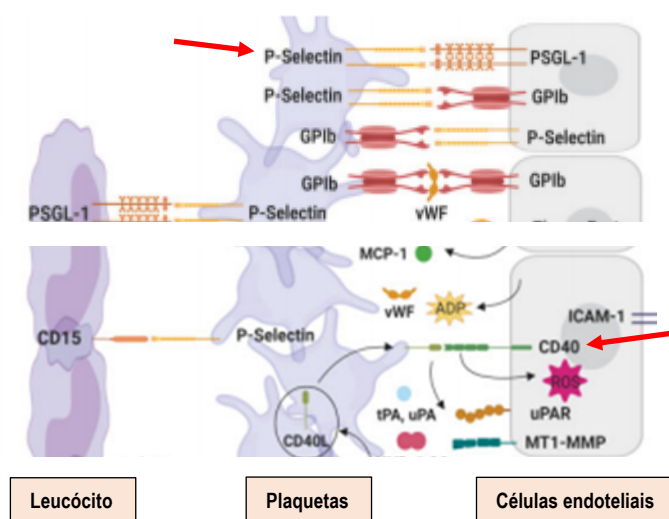


Figura 4 - Interações das plaquetas no endotélio vascular. A ativação e adesão plaquetária é facilitada pela interação com vários receptores. O endotélio inflamado adota um fenótipo pró-trombótico e libera fatores estimuladores e de adesão. A adesão das plaquetas ativa células endoteliais e junto com mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas induzem a expressão de integrinas, moléculas de adesão e outros receptores na superfície endotelial com liberação de quimiocinas e outros mediadores. Modificado de van Gils et al³². MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos 1; MTP1-MMP: membrana tipo 1 da metaloproteinase de matriz; PSGL-1: P-selectina ligante 1; tPA: ativador do plasminogênio tecidual; uPA: ativador de plasminogênio do tipo uroquinase; uPAR: receptor de uroquinase; ICAM-1: proteína de adesão intracelular 1; vWF: fator de von Willebrand; ROS: espécies reativas de oxigênio.

1.6 Biomarcadores da imunidade inata e sepse

Biomarcadores de diferentes vias fisiopatológicas da sepse têm sido investigados para complementar o julgamento clínico e interpretação de outros testes diagnósticos e prognósticos. Assim, alguns biomarcadores já estão bem estabelecidos, como procalcitonina (PCT) e proteína C reativa (PCR) séricas que mostraram valores clínicos diagnósticos (avaliação do risco para infecção bacteriana) e prognósticos (dosagens seriadas)^{33,34}. Na SM na criança, além da PCT e da PCR, um número crescente de novos marcadores, entre eles, citocinas (fator de necrose tumoral (TNF); interleucina (IL) 1Ra; IL-6; IL-10); quimiocinas (IL-8, MCP-1; MIP-1 alfa; GRO-alfa); marcadores de coagulação intravascular disseminada (CIVD), de plaquetas (sCD40L); genéticos, entre outros, têm sido avaliados³⁵⁻³⁸.

1.6.1 CD62P

Nas plaquetas em repouso o CD62P é armazenado na membrana de um α -grânulo e torna-se exposto na superfície plaquetária após ativação. CD62P funciona como molécula de adesão e é responsável pela interação da plaqueta com endotélio celular e leucócitos via interação com seu ligante, a PSGL-1, que permite que a plaqueta faça um refinamento nas suas funções²⁵.

A interação inicial da CD62P das plaquetas com *clusters* de PSGL-1 nos neutrófilos desempenha um papel central no recrutamento de neutrófilos, ativação de MAC-1 e α L β 2 (LFA-1) e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)^{20, 39-41}. A ativação de MAC-1 também permite a ligação direta de plaquetas através de GPIb- α e indiretamente para GPIIbIIIa através do fibrinogênio, aumentando adesão de neutrófilos e transmigração. Essas interações estreitam fisicamente a ponte entre os neutrófilos e células endoteliais e induzem sinalização em neutrófilos promovendo sua adesão e transmigração^{20, 39,42,43}.

1.6.2 CD40-CD40L

O CD40, membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral, é expresso constitutivamente em células B e de forma induzível nas células T, células dendríticas, monócitos, plaquetas, macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos. O gene do CD40 humano tem alta expressão nas células dendríticas e intermediárias em células B e nas plaquetas. Sua expressão é regulada por mecanismos inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1, IFN- γ , CD40L e outros. De todos, o receptor CD40L tem mostrado maior afinidade pelo CD40⁴⁴.

As plaquetas liberam aproximadamente 95% do sCD40L circulante e essa citocina é essencial para ativação de células imunes. A interação de neutrófilos e plaquetas via CD40

ativa um ciclo de feedback positivo caracterizado pelo aumento da liberação de superóxido e ROS pelos leucócitos, estimulando a secreção de CD40L pelas plaquetas^{23,29,43}.

Nas células endoteliais vários mecanismos simultâneos contribuem para o recrutamento, adesão e transmigração dos leucócitos nos tecidos inflamados, como apresentado na figura 5.

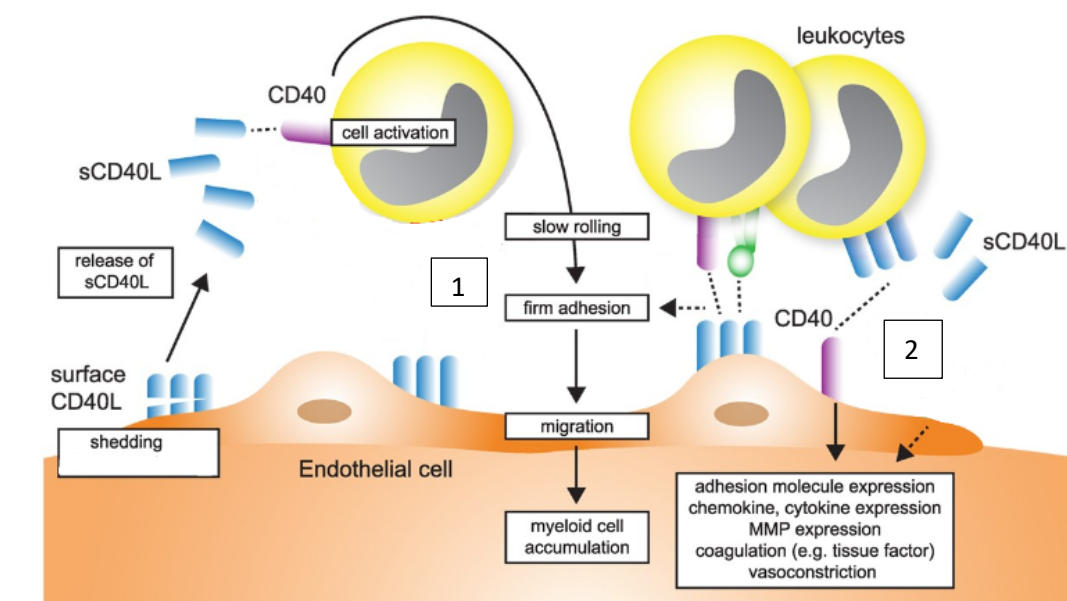


Figura 5. Participação da via CD40-CD40L no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação. (1) CD40 expresso nos leucócitos participa do rolamento, adesão e migração. (2) CD40 expresso nas células endoteliais se liga ao sCD40L ou CD40L de membrana e como resultado eles regulam a expressão de moléculas de adesão e secreção de quimiocinas e de outros fatores pró-inflamatórios. Modificado de Michel *et al.* 2017.

CD40L (solúvel ou de membrana) regula as plaquetas ativadas, interagem com CD40 nas células imunes e promovem trombose e inflamação²⁰. A expressão de CD40L nas plaquetas estimulam as células endoteliais que expressam CD40 a regular positivamente a E-selectina, molécula de adesão a células vasculares 1 (VCAM1) e moléculas de adesão intracelulares 1 (ICAM1). Além de promover a secreção, pelo endotélio, de mediadores pró-inflamatórios como CCL2 e IL8³⁹.

Estudos sobre marcadores da resposta imune inata que possam identificar precocemente pacientes de alto risco são limitados. Após a revisão dos descritores da

literatura nas bases de dados PubMed, SciElo e LILACS (meningococcal infections; sepsis; immunity, innate; immunity; blood platelets; p-selectin; CD40 Antigens e CD40 ligand) não foram encontrados estudos sobre a importância das moléculas coestimuladoras CD62P e CD40 em crianças e adolescentes com sepse meningocócica. A hipótese do estudo foi que as plaquetas têm um papel importante na regulação da imunidade inata. O objetivo do estudo foi avaliar os mecanismos de regulação da resposta imune inata através da expressão de mediadores inflamatórios relacionados às plaquetas (sCD62P) e ao endotélio vascular (sCD40) em crianças e adolescentes com sepse meningocócica.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de regulação da resposta imune inata pela expressão de mediadores inflamatórios relacionados às plaquetas (sCD62P) e ao endotélio vascular (sCD40), em crianças e adolescentes com sepse meningocócica.

2.2 Objetivos específicos

Em crianças e adolescentes com sepse meningocócica:

- Descrever características biológicas, clínicas e laboratoriais.
- Determinar as concentrações séricas de moléculas coestimuladoras da imunidade inata (sCD40 e sCD62P)
- Avaliar a associação entre as moléculas coestimuladoras sCD40 e sCD62P entre pacientes com sepse meningocócica e sepse não meningocócica.
- Avaliar a associação entre as moléculas coestimuladoras sCD40 e sCD62P, e plaquetopenia nas crianças com sepse meningocócica.
- Avaliar a correlação entre as moléculas coestimuladoras sCD40 e sCD62P.
- Avaliar a correlação entre as moléculas coestimuladoras sCD40 e sCD62P com contagem de plaquetas.

III. MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo translacional, observacional, do tipo corte transversal com grupo de comparação interno.

3.2. Local do estudo

Foram avaliados as crianças e adolescentes da UTIP do HCP, Centro de Referência em Pernambuco para o tratamento de doenças infecto-contagiosas, entre elas a doença meningocócica. Na urgência pediátrica são realizados 200 atendimentos por mês e na UTIP uma média de 100 internamentos por ano.

3.3 Período do estudo

O estudo foi desenvolvido no período de março de 2015 a outubro de 2020.

3.4 População e amostra do estudo

A população do estudo foi constituída por crianças e adolescentes admitidas na UTIP do HCP com suspeita de sepse meningocócica com idade entre seis meses a menor de 14 anos durante o período de coleta de dados. Além dos pacientes, o grupo de comparação foi composto por crianças e/ou adolescentes saudáveis denominadas neste estudo de controles saudáveis (CS), captados no ambulatório cirúrgico do Hospital Infantil Maria Lucinda durante a avaliação pré-operatória para realização de cirurgias eletivas de pequeno porte.

A amostra foi constituída por crianças e adolescentes com suspeita de SM internadas na UTIP do HCP durante o período de coleta de dados (outubro de 2015 a outubro de 2018). Devido à ausência de estudos semelhantes não foi possível calcular o tamanho da amostra.

Dessa forma, por se tratar de estudo exploratório, foram avaliados todos os pacientes que preencheram os critérios de elegibilidade durante o período destinado à coleta de dados (36 meses). A amostra do grupo CS foi constituído por 15 crianças e/ou adolescentes saudáveis.

3.5 Critérios de elegibilidade

3.5.1 Critérios de inclusão dos pacientes

Crianças de seis meses a menores de 14 anos de idade, de ambos os sexos, com suspeita de sepse meningocócica, pelos seguintes critérios:

- **Sepse meningocócica com ou sem meningite:** diagnosticada pelos critérios da Conferência de Consenso de Sepse Pediátrica Internacional (Goldstein, 2005) mais lesões hemorrágicas, na presença de *Neisseria meningitidis* em cultura ou reação de polimerase em cadeia (PCR) de sangue ou no líquido cefalorraquidiano sem identificação de outro microorganismo nas culturas. Presença ou ausência de aumento de celularidade no LCR e/ou de sinais meníngeos (cefaléia, alteração do nível de consciência, positividade de sinais como rigidez nuchal, Kernig, Brudzinski ou Lasègue). Considerou-se critério clínico-epidemiológico de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, a presença de sinais e sintomas de doença meningocócica com a presença de petéquias ou paciente que cumpra os critérios de caso suspeito e que apresente história de vínculo epidemiológico com caso confirmado laboratorialmente para *N. meningitidis* por um dos exames laboratoriais específicos, mas que não tenha realizado nenhum deles⁴⁵.
- **Sepse não meningocócica com ou sem meningite (preencheram inicialmente critérios de inclusão para sepse meningocócica):** mesmos critérios referidos acima para sepse na presença de hemocultura ou PCR para outras bactérias que não a *N. meningitidis*.

3.5.2 Critérios de inclusão dos controles saudáveis

Crianças de seis meses a menores de 14 anos de idade, de ambos os sexos, saudáveis, sem história de infecção ou de internamento hospitalar nos últimos 30 dias.

3.5.3 Critérios de exclusão para pacientes e controles saudáveis

- Uso crônico de drogas imunossupressoras;
- Diagnóstico prévio de imunodeficiência primária ou secundária;
- Diagnóstico de síndrome nefrótica;
- Diagnóstico de anemia falciforme ou esplenectomizados;
- Diagnóstico de neoplasia maligna;
- Diagnóstico de diabetes *mellitus*;
- Pacientes que sofreram parada cardiorrespiratória e foram submetidos a manobras de ressuscitação cardiopulmonar antes da coleta das amostras.
- Pacientes que receberam transfusão de plaquetas ou plasma fresco nos últimos sete dias.
- Pacientes com meningites secundárias a procedimentos neurocirúrgicos, fístulas liquóricas, traumatismos cranioencefálicos, dispositivos intracranianos (válvulas de derivação ventrículo-peritoneal) e processos infecciosos contíguos (otomastoidite e sinusite).

3.6 Procedimentos para captação e acompanhamento dos participantes

Os participantes foram selecionados, segundo os critérios de elegibilidade, nas primeiras 24 horas de internamento no HCP. Foi utilizada para a identificação e captação dos casos uma lista de checagem (APÊNDICE II) que incluíram os critérios de inclusão e de exclusão do estudo. Foi realizado o registro dos participantes de acordo com a data de entrada em um livro de registro criado para o estudo, no qual foram coletados dados

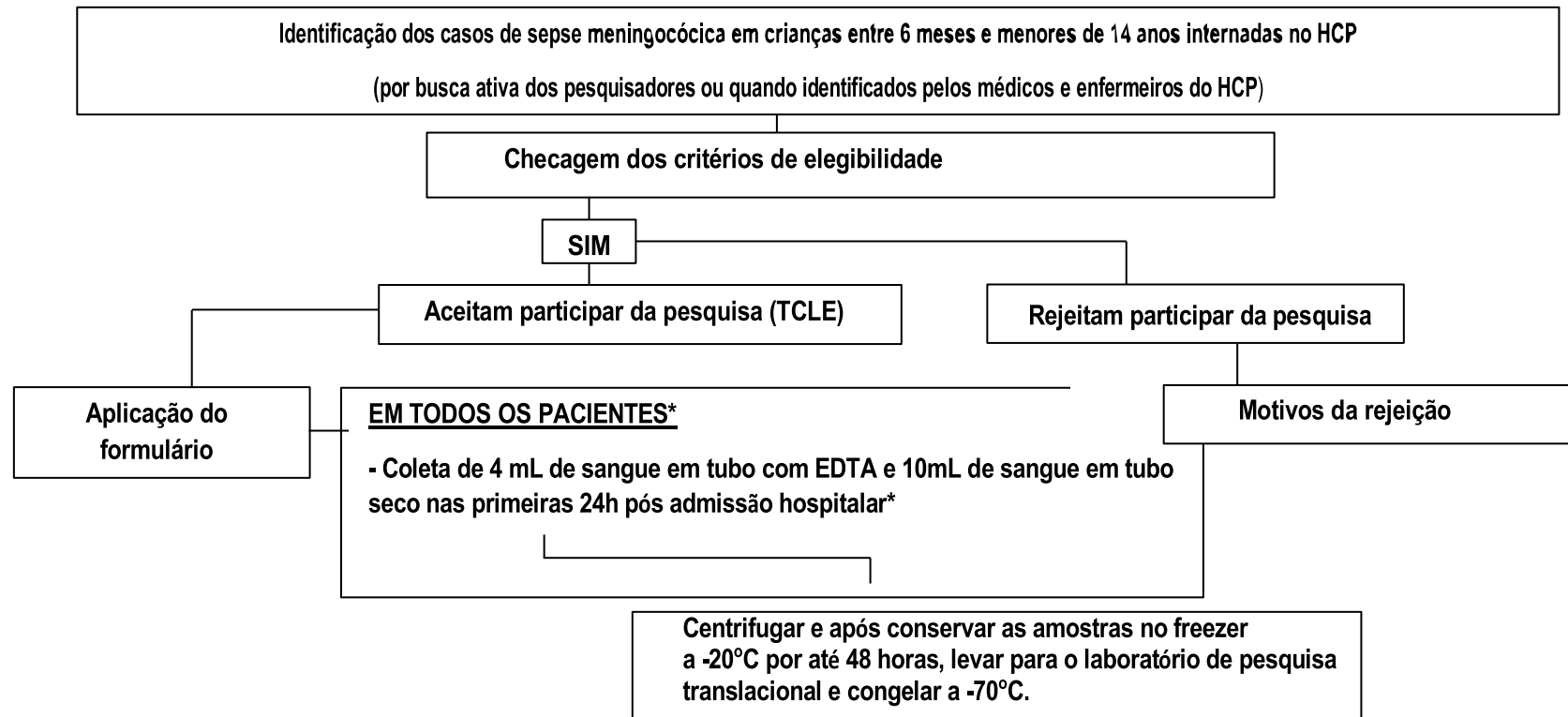
referentes aos pacientes pelos pesquisadores envolvidos no estudo. A duração de coleta de dados foi de 36 meses, de outubro de 2015 a outubro de 2018.

A partir da identificação dos casos, foi aplicado um formulário para coleta dos dados criado para a pesquisa (APÊNDICE III) após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis pelas crianças e adolescentes (APÊNDICE IV). A aplicação do formulário, a coleta de exames, bem como a conservação e processamento das amostras seguiu o fluxograma da pesquisa (vide item 3.7).

3.7 FLUXOGRAMA DE PESQUISA

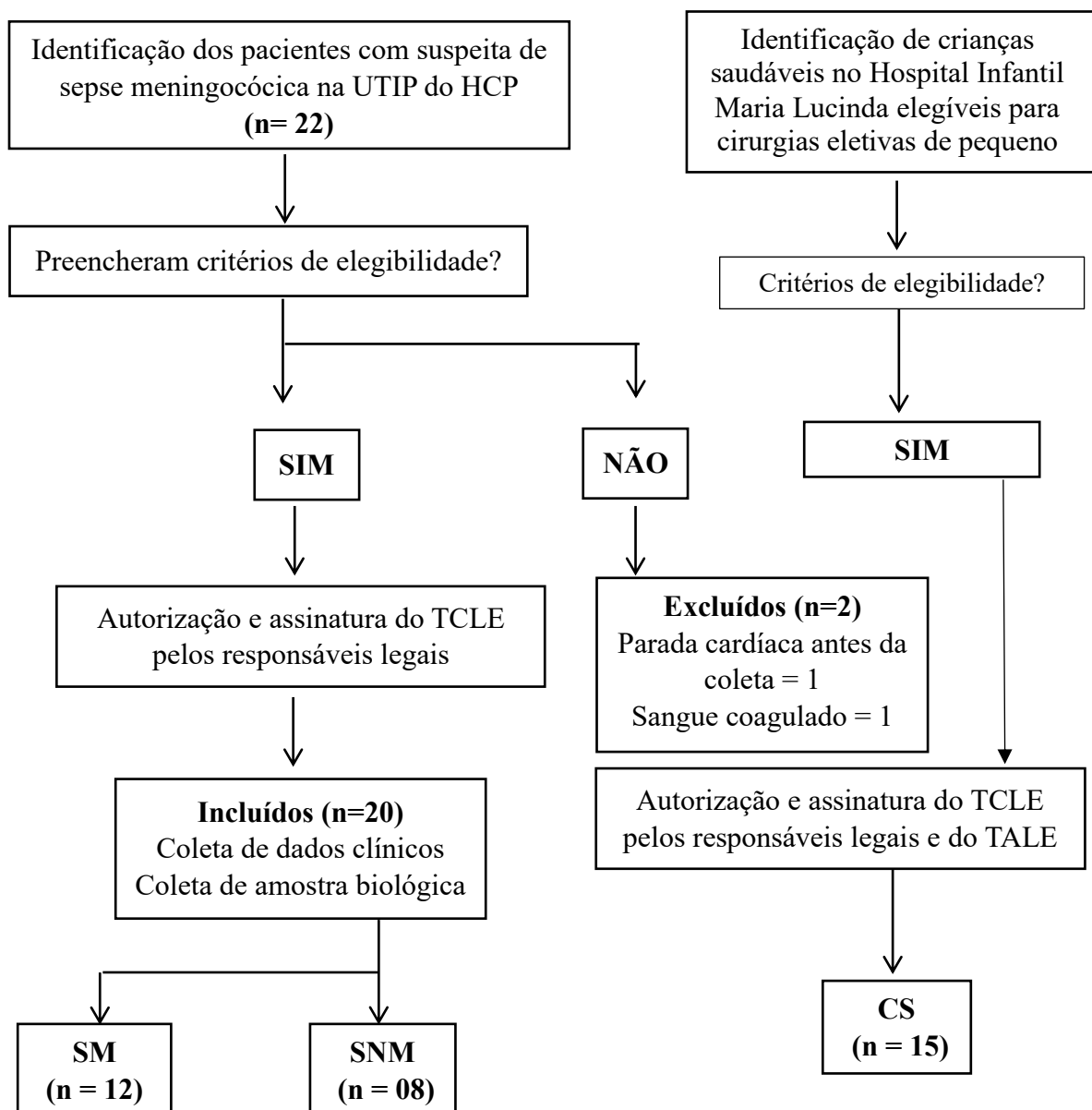
Pesquisadoras responsáveis: Thaysa Menezes, Maria do Carmo Duarte e Leuridan Torres.

- **Crítérios de inclusão:** pacientes entre seis meses a menor de 14 anos, de ambos os sexos, com suspeita de sepsé meningocócica com ou sem meningite internados na UTIP do Hospital Correia Picanço (HCP).



*A coleta dos espécimes até a 24ª hora de admissão no HCP. Exames – sangue: dosagem sanguínea de marcadores inflamatórios de plaquetas e citocinas pró-inflamatórias.

3.8 Fluxograma de captação dos participantes e controles saudáveis



3.9 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP sob o CAAE 29385614.1.0000.5201 (Anexo II). Todos os participantes ou responsáveis legais foram esclarecidos acerca dos objetivos, dos métodos e da importância do estudo, e a coleta de dados e sangue periférico de cada paciente só foi realizada após a obtenção por escrito do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os controles saudáveis assinaram também o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) quando maior de oito anos (APÊNDICE V).

3.10. Definição de termos e variáveis

3.10.1 Variáveis demográficas

- **Idade:** variável numérica discreta, expressa em meses e anos, aferida pelo pesquisador a partir da data de nascimento do documento de identificação, registro de nascimento ou cartão da criança, ou por informação do acompanhante.
- **Peso:** variável numérica contínua, expressa em quilogramas, obtida por aferição no momento da internação hospitalar.
- **Sexo:** variável categórica nominal, dicotômica (masculino/feminino).

3.10.2 Variáveis relacionadas à história médica atual

- **Forma clínica da doença meningocócica:** variável categórica dicotômica, definida como sepse com meningite ou sepse sem meningite, obtida pelos pesquisadores através da análise do prontuário.
- **Sepse não meningocócica:** variável categórica dicotômica, definida como sepse com meningite ou sepse sem meningite, excluindo a *Neisseria meningitidis* como etiologia, obtida pelos pesquisadores através da análise do prontuário.

- **Índice Pediátrico de Mortalidade PIM2:** variável numérica discreta expressa em pontos, obtida pelos pesquisadores.
- **Índice Pediátrico de Mortalidade PRISM 2:** variável numérica discreta expressa em pontos, obtida pelos pesquisadores.
- **Duração da doença:** variável numérica contínua expressa em horas, obtida do prontuário médico.
- **Tempo de permanência na UTI:** variável numérica contínua expressa em dias, obtido do prontuário médico.
- **Condição de saída:** variável nominal policotômica (alta/óbito/transferência com ou sem sequelas) obtido do prontuário médico.
- **Doença de base coexistente:** variável categórica nominal obtida pelos pesquisadores segundo relato dos responsáveis legais do paciente.
- **Disfunção orgânica:** variável categórica nominal, dicotômica (sim/não).

3.10.3 Variáveis laboratoriais

- **Leucócitos totais:** variável numérica contínua expressa pelo número total de leucócitos em mm^3 , obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Neutrófilos:** variável numérica contínua expressa pelo número total de neutrófilos em mm^3 , obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Hemoglobina:** variável numérica contínua expressa pela hemoglobina em g/dl de sangue, obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Plaquetas:** variável numérica contínua expressa em mm^3 , obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.

- **Trombocitopenia:** variável categórica nominal dicotômica (sim/não) quanto à presença de contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$, obtida pela pesquisadora através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **PCR:** variável numérica contínua expressa em mm^3 , obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Hemocultura:** variável categórica nominal dicotômica (positiva/negativa), obtida através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Bactéria identificada na hemocultura:** variável categórica nominal identificada na hemocultura, resultado obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Contagem de leucócitos total no LCR:** variável numérica contínua expressa pelo número total de leucócitos por mm^3 de LCR, resultado obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Contagem de leucócitos diferencial no LCR:** variável numérica contínua expressa pelo número diferencial de leucócitos por mm^3 de LCR, resultado obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Cultura de LCR:** variável categórica nominal dicotômica (positiva/negativa), resultado obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Bactéria identificada na cultura do LCR:** variável categórica nominal identificada na cultura do LCR, resultado obtido através do sistema de diagnóstico laboratorial do HCP ou do prontuário do paciente.
- **Concentração de sCD62P:** variável numérica, contínua, expressas em ng/ml.
- **Concentração de sCD40:** variável numérica, contínua, expressas em pg/ml.

3.11 Coleta de sangue:

A amostra de sangue foi coletada pelos pesquisadores ou por técnicos de laboratório do HCP, imediatamente após inclusão do paciente no estudo. Um volume de 4 mL de sangue foi colhido em tubo com anticoagulante EDTA e 10 mL em tubo seco, que foi centrifugado para obtenção do plasma, o qual foi analisado conforme descrição abaixo. Sempre que possível, a coleta de sangue foi realizada aproveitando-se o momento da coleta de exames solicitados pela equipe médica acompanhante, a fim de evitar repetições de punções.

3.12 Testes laboratoriais

3.12.1 Determinação da concentração de hemoglobina, contagem de leucócitos, plaquetas e PCR.

A realização do hemograma completo foi realizada por automação no aparelho ABX Pentra DX 80 (Horiba, Japão) e o PCR no aparelho Vitros 250 (Estados Unidos da América) do Laboratório de Análises Clínicas, situado no HCP e os resultados obtidos após consulta em prontuário médico.

3.12.2 Dosagem de moléculas coestimuladoras (sCD62P e sCD40)

A dosagem de sCD62P e sCD40 foi realizada por Ensaio imunoenzimático com técnica de leitura *Humans sCD62P Platinum ELISA* e o *Humans sCD40 Platinum ELISA, Kit* (eBioscience, USA), respectivamente, para a detecção quantitativa de sCD62P e sCD40 solúveis no plasma dos pacientes e controles saudáveis, conforme instruções dos fabricantes.

Após a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) e diluição 1:2 das amostras e controles, 100 µL dos anticorpos de captura específicos anti-sCD40 e anti-sCD62P foram adicionadas a placa de ELISA e incubados a temperatura ambiente (TA) “*overnight*”. Após

incubação, 100 μ L das amostras foram pipetadas e, posteriormente conjugadas aos anticorpos anti-humanos de detecção, tanto nas diluições da curva como no plasma controle dos kits. A seguir adicionou-se 100 μ L de substrato capaz de produzir uma coloração proporcional a quantidade de sCD40 e sCD62P presentes no plasma dos pacientes e controles. A leitura das absorbâncias foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. Os valores foram expressos em pg/dl e ng/mL respectivamente para sCD40 e sCD62P, sendo o limite de detecção do kit 1,3pgdl para o CD40 e 0,20ng/dl para sCD62P.

3.13 Coleta de dados e controle de qualidade das informações

Os pacientes foram identificados pelos médicos e enfermeiras plantonistas da Emergência e da UTIP do HCP, previamente cientes do estudo. A pesquisadora principal entrou em contato com os pais/responsáveis legais pelas crianças e adolescentes e aqueles que aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1V). Em seguida, os responsáveis pelas crianças responderam a um instrumento padronizado de coleta de dados pra a pesquisa (APÊNDICE III). Após o preenchimento dos formulários, estes foram revisados, um a um, pela pesquisadora principal a fim de detectar eventuais falhas ou omissões para que pudessem ser corrigidas.

Os questionários foram numerados e correlacionados com a numeração das amostras, visando-se a acurácia dos dados. Desta forma, todas as amostras de sangue foram rotuladas e receberam um número sequenciado. Estas foram centrifugadas e estocadas em freezer a -20° por até 48 horas após coleta no laboratório do HCP e em seguida mantidas congeladas a -80°C até serem analisadas no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. As boas práticas de segurança clínicas e laboratoriais foram seguidas.

3.14 Processamento e análise dos dados

Na análise descritiva dos dados, os resultados são apresentados em forma de tabela de distribuição de frequência absoluta e relativa. As variáveis categóricas foram expressas como números absolutos e percentuais e as variáveis numéricas pelas medidas de tendência central e de dispersão, ou seja, média \pm desvio padrão (DP), em casos de distribuição normal, ou mediana com intervalo e intervalo de interquartil (IIQ), em caso de distribuição não normal.

Para verificar a existência de associação entre variáveis categóricas utilizou-se o Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher quando pertinente. Para as variáveis numéricas foi inicialmente aplicado teste de normalidade Shapiro-Wilk. Testes não paramétricos foram usados para comparar variáveis numéricas com distribuição não normal entre três grupos ou mais (Teste de Kruskal-Wallis) e em dois grupos (Teste de Mann-Whitney). Coeficiente de Spearman (não normal) foi usado para realizar correlação e interpretado da seguinte forma: 0,00 a 0,30 desprezível; 0,30 a 0,50 baixo; 0,50 a 0,70 moderado; 0,70 a 0,90 alto e 0,90 a 1,00 muito alto. Significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os dados foram analisados nos Softwares Excel 2010 e GraphPad Prism v8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

V. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados no formato de artigo científicos. O primeiro artigo originou-se do projeto de pesquisa original.

4.1 Artigo 1

Tipo: *Original article*

Dysregulation of the innate immune response in meningococcal sepsis in children and adolescents: an essential role of platelets (sCD62p) and vascular endothelium (sCD40) soluble mediators

Autores: Thaysa M.G.A.L. Menezes, Maria do Carmo M.B. Duarte, Leuridan C. Torres.

Revista: Pediatric Critical Care Medicine PedCCM (ISSN 1529-7537)

Fator de impacto (2019): 2.854

Situação: submetido

Dysregulation of the innate immune response in meningococcal sepsis in children: an essential role of platelets (sCD62p) and vascular endothelium (sCD40) soluble mediators

Menezes, Thaysa M.G.A.L., MSc^{1,2}; Duarte, Maria do Carmo M.B., PhD^{1,2}; Torres Leuridan C., PhD^{1,2}.

¹Research Department, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Recife, Pernambuco, Brazil.

² Translational Research Laboratory, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Recife, Pernambuco, Brazil

Supported by the Fundação de Amparo, a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; Number grants APQ-0496-4.01/15).

The authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

Keywords: meningococcal infections, sepsis, immunity, innate, p-selectin, CD40.

ABSTRACT

Objectives: to evaluate mechanisms of dysregulation of innate immune response by expression of platelet-related inflammatory mediators (sCD62P) and vascular (sCD40) in children with meningococcal sepsis (MS).

Design: a cross-sectional study with comparison group.

Setting: Pediatric Emergency unit of the Hospital Correia Picanço (HCP) and at the Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil.

Patients: children and adolescents between six months and 14 years (n=35) were included in the study, divided into three groups: meningococcal sepsis with or without meningitis (MS; n=12), non-meningococcal sepsis (NMS; n=8), and clinically healthy children undergoing minor abdominal surgeries, and were called healthy control (HC; n=15).

Measurements and Main Results: high levels of sCD40 in patients with MS compared the NMS and HC groups ($p < 0.001$). High levels of sCD62P were found in patients with MS and NMS compared to the HC group ($p = 0.010$ and $p = 0.002$, respectively). In patients with MS, sCD40, and sCD62P levels were elevated in the thrombocytopenia group compared to the group without thrombocytopenia ($p < 0.048$). In the correlation analysis of patients in the MS group, a moderate correlation was observed between sCD40L and sCD62P levels ($r = 0.556$, $p = 0.007$). There was no correlation between platelet levels versus sCD40 and platelet levels versus sCD62P. Mortality at 28 days was 25% in both sepsis groups.

Conclusions: MS presents dysregulation of the innate immune response, represented by high levels of platelet activation mediator (sCD62P) and vascular endothelium (sCD40). These molecules may be useful as early biological markers in severe sepsis/septic shock.

1 INTRODUCTION

Several proteins in the form of membrane receptors or soluble in plasma have been investigated in patients with the chronic inflammatory process, especially autoimmune diseases and cancer, and acute infectious diseases, as well as sepsis. Some of these proteins are regulators of the immune system and are part of the immune checkpoint molecules (1-6).

One of the immune checkpoint molecules is the CD40, and its activation occurs through CD40 ligand (CD40L). CD40 and CD40L receptors are present in the cell membrane, and in the soluble form called soluble CD40 (sCD40) and soluble CD40L (sCD40L). CD40L is expressed on the platelet surface and induces the extrinsic coagulation cascade, activates dendritic cells, B cells, and T lymphocytes (3, 4, 7). -Immune response activation by mediators secreted of activated platelets has been related to morbidity and mortality in cardiovascular diseases, severe infections, autoimmune and autoinflammatory diseases, and cancer (8-12).

Activated platelets can release approximately 95% of circulating sCD40L. sCD40L is an essential cytokine for activation of immune cells (13), and some receptors express in the platelet membrane play a fundamental role in sepsis. These receptors in platelets can trigger activation, recruitment, adhesion, transmigration, thrombus formation, and stability vascular (4, 8, 14, 15). The cellular interactions are established through adhesion molecules, such as P-selectin (CD62P), which play an essential role in innate immunity stimulating the release growth factors and inflammatory mediators by platelets (8, 14, 15).

Severe bacterial sepsis remains a public health challenge due to its high morbidity and mortality. Sepsis is a heterogeneous and life-threatening syndrome caused by the dysregulation of the immune system (6). Meningococcal sepsis (MS) is rapidly progressive, and death may occur a few hours after the onset of symptoms (16).

Despite advances in understanding the pathophysiology of meningococcal septic shock, studies on the mechanisms that trigger the onset of the fulminant course in MS are limited (17). Therefore, early identification of patients at high risk of death or severe disease an early stage of the disease is essential to define a personalized and aggressive clinical treatment (16).

Some proteins are already well established to assess the risk of bacterial infection and are predictive of prognosis, such as pro-calcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) (18). Furthermore, the findings of new immune response proteins, such as cytokines and chemokines, intravascular coagulation markers, and platelet mediators were investigated (16, 17, 19, 20).

We hypothesis that platelets play an essential role in regulating the immune system and that changes in the mechanisms involved in platelet activation may be present in morbidity and mortality in MS.

2 METHODS

2.1 Study design and ethical aspects

A cross-sectional and exploratory study carried out in the pediatric emergency service of the Hospital Correia Picanço (HCP) and in the Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil, from october 2015 to october 2018. Research Ethics Committees approved the research. All parents of children agreed to participate of this study and signed the Informed Consent Form.

2.2 Participants

In this study, a total of 35 children aged six months and 14 years were evaluated. The patients were distributed into three groups, a) children with meningococcal sepsis with or without meningitis (MS, n=12); b) children with non-meningococcal sepsis (NMS, n=8),

and c) healthy children recruited preoperatively from small abdominal surgeries, called the healthy control group (HC, n=15).

We included children with severe sepsis (organic dysfunction associated with sepsis) or septic shock (severe sepsis with cardiovascular dysfunction) (21, 22). Diagnosis of meningococcal sepsis was based on microbiological confirmation of *Neisseria meningitidis* infection by blood or liquor culture, or reverse polymerase chain reaction - PCR, in addition to the presence of hemorrhagic lesions on the skin or mucous.

Non-meningococcal sepsis was considered when microbiological confirmation for microorganisms other than *Neisseria meningitidis* in the presence or absence of hemorrhagic lesions. Were excluded children with a clinical history of immunodeficiency, meningitis secondary to neurosurgical procedures, and contiguous infectious processes (otomastoiditis and sinusitis).

The trained research team interviewed parents or legal guardians and followed patients daily to the hospital discharge outcome using a standardized form. The variables evaluated were: demographic (age), the duration (in hours) of disease onset to hospital admission, risk of death measured by Pediatric Mortality Index II (PIM II) and Pediatric Mortality Risk II (PRISM II) (23,24), septic shock, length of stay an intensive care unit (ICU) in days and mortality. Hematological parameters of the blood (numbers of leukocytes, neutrophils, monocytes, platelets, and hemoglobin concentration), and C-reactive protein (CRP) were also analyzed.

2.3 Blood collection and sample processing

A volume of 4 mL of whole blood was collected from patients and healthy controls in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulant (EDTA - BD Vacutainer) and 10ml in tube without substrate in the first 24 hours of hospitalization and kept at 4oC for a maximum of one hour.

For soluble analyses of sCD40L and sCD62P, whole blood was centrifuged at 300 G for 5 minutes at a temperature of 4 °C to obtain platelet-rich plasma. Subsequently, plasma was separated into aliquots of 1 mL and centrifuged at 14.000 G for 10 minutes to obtain platelet-poor plasma. Aliquots of 500 µL stored in microtubes were made frozen in a freezer at 80oC negative until the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was performed.

2.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In platelet-poor plasma samples, sCD40 and sCD62P concentrations were measured by the ELISA technique. The ELISA kits used were Human CD40/TNFRSF5 DuoSet Elisa Kit and Human P-Selectin/CD62P DuoSet Elisa Kit (R&D, Minneapolis, MN. The USA). To perform the sCD40 and sCD62P dosages, the kits manual was followed, as recommended by the manufacturer. According to the manufacturer's information, "The limit of detection of soluble human CD40 defined as the analyte concentration resulting in a significant absorption higher that was determined to be 1.3 pg/mL; and of detection of human P-selectin was determined to be 0.20 ng/mL".

2.5 Statistics Analyses

Categorical variables were expressed in absolute numbers and percentages. The continuous variables were presented in the median and interquartile interval (IQ) because they had non-normal distribution according to the Shapiro-Wilk normality test. The chi-square test and Fischer's exact test were used to compare categorical variables. Subsequently, nonparametric tests were used to compare three groups (Kruskal-Wallis) and two groups (Mann-Whitney). Spearman's nonparametric test evaluated the correlation between the variables. The correlation coefficient (r) was interpreted as: 0.00-0.30 insignificant; 0.30-0.50 low; 0.50-0.70 moderate; 0.70-0.90 high and 0.90-1.0 extremely high (25). The significance statistic was defined with a value of $p < 0.05$. Data analysis was

performed using GraphPad Prism v8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA). Samples with undetectable values were excluded from the analysis.

3 RESULTS

3.1 Clinical Variables

Clinical variables of patients (n=20) and healthy individuals (n=15) are presented in table 1. Regarding the clinical variables, the duration (in hours) of disease onset to hospital admission in the NMS group compared to the MS group (p=0.02). Time between admission and blood sample was less than four hours. There was a higher number of septic shocks in the group of patients with MS (p=0.03). Mortality at 28 days was 25% in both groups. In the MS group, there were three deaths from septic shock in the ≤ 8 hours of hospitalization. In the NMS, we observed a child with brain hernia within five days of hospitalization and a child who evolved to refractory septic shock, evolving to death within three days after hospitalization.

3.2 Hematologic Variables

Hematological variables during hospitalization are presented in table 2. The concentrations of leukocytes and neutrophils were higher in the NMS group than group HC (p=0.004 and p=0.001, respectively). Low platelet and hemoglobin levels in MS compared to CS (p<0.001 and p<0.001, respectively). The presence of thrombocytopenia was observed in 83% ($\leq 150 \times 10^3/\mu\text{L}$) in MS patients and 25% in the NMS group (p<0.0001). Five children with MS had platelet levels $\leq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ (42%), and three of the five children evolved to death, and their platelet levels were $32 \times 10^3/\mu\text{L}$, $21 \times 10^3/\mu\text{L}$, and $83 \times 10^3/\mu\text{L}$.

3.3 Soluble levels of sCD40 and sCD62P

Patients with MS had median concentration of 415 pg/dl (IQR₂₅₋₇₅=324-510) of sCD40 and NMS patients had median of 195 pg/dl (IQR₂₅₋₇₅=155-235). Patients with MS had median concentration of 479 ng/dl (IQR₂₅₋₇₅=364-714) of sCD62P and NMS patients had median of 347 ng/dl (IQR₂₅₋₇₅=170-534).

3.4 Analyses of soluble levels of sCD40 and sCD62P in the blood

High levels of sCD40 in patients with MS compared with the SNM and HC groups ($p < 0.0001$). There was no significant difference between the groups of patients with NMS and HC (Figure 1).

High levels of sCD62p were found in the groups of patients with MS and the NMS compared to group CS ($p = 0.010$ and $p = 0.002$, respectively). There was no significant difference between the MS and NMS groups (Figure 1B).

In patients with MS, sCD40, and sCD62p levels were elevated in the group with thrombocytopenia ($\leq 150 \times 10^3/\mu\text{L}$) compared to the group without thrombocytopenia ($> 150 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p < 0.048$; Figure 2).

In the correlation analysis of patients in the MS group, a moderate correlation was observed between sCD40L and sCD62p levels ($r = 0.556$, $p = 0.007$). There was no correlation between platelet level versus sCD40 and platelet level versus sCD62p (Figure 3).

4 DISCUSSION

This study investigated dysregulation mechanisms of the innate immune response by expressing soluble inflammatory mediators related to platelets and vascular endothelium in a homogeneous group of children with MS. Data show that patients with SM present dysregulation of the inflammatory cascade, characterized by high sCD62p and sCD40 levels. Among patients in the MS group, thrombocytopenia was significantly associated with higher levels of these mediators, with a moderate positive correlation.

Studies on platelet function in the innate immune response to an infectious agent in children are scarce, especially in specific pathogen sepsis (20). In inflammatory and infectious conditions, platelets interact with pathogens and immune cells through their surface receptors (26-28). Platelets form complexes with neutrophils to potentiate their effects and bacterial clearance. Platelets interact with neutrophils through multiple receptors, including CD62P and CD40L, expressed on activated platelets' surface. These interactions promote reactive oxygen species production, forming extracellular neutrophil traps (NETs) with pathogen capture and death, adhesion, transmigration to the inflammatory site, and neutrophil granulation. Activated platelets also release microbicide proteins and secrete large amounts of chemokines that potentiate the process (14, 29, 30).

sCD62P and sCD40L molecules have been considered markers of platelet activation in sepsis (5, 8, 28). Platelet-neutrophil interactions are predominantly established by the CD62p binding of platelets activated with their PSGL1 in neutrophils and vascular endothelium and responsible for forming the platelet aggregate leukocytes at the beginning of the process of molecular binding to activated vascular endothelium (8, 14, 15). In the present study, higher levels of sCD62P were found in children with MS and NMS. Data were like those found in adult patients with sepsis (5, 31, 32). A study with 89 adults showed higher sCD62P levels in septic patients than non-septic patients and better prognostic accuracy of sCD62P and procalcitonin than C-reactive protein (31). Another study analyzed nine soluble markers in adults with sepsis and found that CD62P did not differ among the groups with Gram-negative, Gram-positive, and fungal bloodstream infection (33). In children with bacterial sepsis, we did not find studies with sCD62P.

During acute infection, immune dysregulation may promote platelet hyper-stimulation or exhaustion of the immune response (9). In the present study, MS patients with thrombocytopenia had significantly higher levels of sCD40 and sCD62P mediators.

Experimental studies in mice have shown that thrombocytopenia in sepsis is associated with increased platelet aggregate in neutrophils, reducing free platelets in the blood (34, 35). A study involving 227 children with the invasive meningococcal disease showed that the platelet-neutrophil product at hospital admission was associated with a higher risk of death (36).

An analysis carried out with 163 children showed that thrombocytopenia an independent risk factor for death caused by meningococcal sepsis with or without meningitis (37). Higher sCD40 levels in patients in the MS group compared to those of the NMS and HC groups in this study can be explained by the mechanism of immune regulation of the CD40/CD40L interaction of the innate immune response. CD40 is found in large numbers in the vascular endothelium. It is considered an inflammatory activation molecule, but when secreted, it regulates the inflammatory process (regulating molecule) by blocking the interaction of sCD40L to the vascular endothelium, decreasing platelet activation (28).

sCD40 occupies the cleft of its ligand, sCD40L, not letting the platelets activate the vascular endothelium, thus demonstrating the importance of double signaling in the regulatory effect of platelets (28). A study with 57 children with MS, of which 15 were severe, found high levels of sCD40L, but not associated with the severity of thrombocytopenia (20). In children with bacterial sepsis, we did not find studies evaluating the importance of sCD40.

The present study showed that the activation mechanisms of co-stimulating molecules sCD40 and sCD62P are correlated. Platelets release sCD40L promote activation of endothelial cells by CD40 increases surface expression of adhesion molecules that interact with sCD62P, and both induce the production of cytokines. The reciprocal action of platelets and endothelial cells amplifies inflammation at sites of infection. Platelets also have a barrier function to try to maintain vascular integrity (9, 14).

MS is a severe systemic disease with significant vascular impairment and damage (vasodilation, increased vascular permeability, and hypovolemia) with increased cleavage of the CD40 molecule expression in the vascular endothelium. It is hypothesized that this cleavage is due to the activation of neutrophils by platelets aggregates in the vascular endothelium, leading to an increase of sCD40 and other soluble mediators produced in this phase. This phenomenon occurs by dysregulating the innate immune response.

5 CONCLUSIONS

The present study shows that children and adolescents with MS present a dysregulation of the innate immune response, represented by the high levels of platelet activation mediators (sCD62p) and vascular endothelium (sCD40). These molecules may be useful as early biomarkers in severe sepsis and septic shock.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE; Number grants APQ-0496-4.01/15) for supporting and encouraging research. To the employees of the IMIP Translational Research Laboratory for technical support. To the staff of the Hospital Correia Picanço for their support.

REFERENCES

1. Lelubre C, Vincent JL: Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Jul;14(7):417-427.
2. Sonar S, Lal G: Role of superfamily tumor necrosis factor in neuroinflammation and Autoimmunity. *Frontal Immunol.* July 20, 2015; 6:364.
3. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al.: Molecular mechanism and function of cd40/CD40L engagement in the immune system. *Rev. Immunol* 2009 May;229(1):152-72.
4. Dewitte A, Tanga A, Villeneuve J, et al.: New borders for CD154 platelets. *Exp Hematol Oncol.* 2015 Mar 1; 4:6.
5. Schrijver IT, Kemperman H, Roest M, et al.: Soluble p-selectin as a biomarker for infection and survival in patients with systemic inflammatory response syndrome in the Intensive Care Unit. *Biomark Insights.* 7 February 2017; 12:1177271916684823.
6. Van der Poll T, Van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al.: Immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017. Jul;17(7):407-420.
7. Dewitte A, Lepreux S, Villeneuve J, et al.: Blood platelets and pathophysiology of sepsis: A new therapeutic perspective in severely [corrected] patients? published correction appears in *Ann Intensive Care.* 2018;28;8 (1):32.
8. Assinger A, Schrottmaier WC, Salzmann M, et al.: Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data. *Frontal Immunol.* 17 July 2019; 10:1687.
9. Gaertner F, Massberg S: Patrolling vascular boundaries: platelets in immunity to infection and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(12):747-760
10. Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, et al.: The Inflammatory Role of Platelets through Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol.* 2015 Mar 2; 6:83
11. Argiriadi MA, Benatuil L, Dubrovskaja I, et al.: CD40/anti-CD40 antibody complexes illustrating agonist and antagonist structural switches. *BMC Mol Cell Biol.* 2019;20(1):29.
12. Cangemi R, Casciaro M, Rossi E, et al:
Platelet activation is associated with myocardial infarction in patients with pneumonia. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(18):1917-1925.
13. Danese S, Katz JA, Saibeni S, et al.: Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 1435-1441

14. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP: The double role of innate immune cell interactions of platelets in thrombo-inflammation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019; 17;4(1):23-35.
15. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Je Freedman: Circulating platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018;122(2):337-351.
16. Montero-Martín M, Inwald DP, Carrol ED, *et al.*: Prognostic markers of meningococcal disease in children: recent advances and future challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(11):1357-1369.
17. Briassoulis G, Galani A: Prognostic markers of pediatric meningococcal sepsis. *Specialist Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1017-1020.
18. Heilmann E, Gregorian C, Schuetz P: Infection Biomarkers: Are they useful in the ICU? *Semin Respir Crit Care Med.* 2019 Aug;40(4):465-475.
19. Møller AS, Bjerre A, Brusletto B, *et al.*: Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2005;191(5):768-775.
20. Inwald DP, Faust SN, Lister P, *et al.*: Platelet and CD40L soluble in meningococcal sepsis. *Intensive Care Med.* 2006;32(9):1432-1437.
21. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, *et al.* The international guidelines of the surviving sepsis campaign for the management of septic shock and organ dysfunction associated with sepsis in children. *Intensive Care Med.* 2020 Feb;46(Suppl 1):10-67.
22. Goldstein B, Giroir B, Randolph A: International Consensus Conference on Pediatric Sepsis (2005) International Consensus Conference on Pediatric Sepsis: Definitions for Sepsis and Organ Dysfunction in Pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 6:2-8 1
23. Slater *et al.* PIM 2 : a revised version of the Paediatric Index of Mortality. *Intensive Care Med* 2003 ;29:278-85.
24. Pollack MM *et al.* Pediatric Risk of Mortality score. *Crit Care Med* 1988;16:1110-6
25. Mukaka MM; Statistical singing: a guide to the proper use of the correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012; 24: 69-71.
26. Yeaman MR: Platelets: in the antimicrobial defense. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Jun;12(6):426-37
27. Lisman T: Platelets-neutrophils as conductors of inflammatory and thrombotic diseases. *Resarcular* 2018; 371(3): 567-576.
28. Ribeiro LS, Migliari BL, Franklin BS. Regulation of Innate Immune Responses by Platelets. *Front Immunol.* Jun 2019 11; 10:1320.

29. Deppermann C, Kubes P; Start a fire, kill the insect: The role of platelets in inflammation and infection. *Immunized* 2018;24(6):335-348.
30. Page MJ, Pretorius E; A champion of host defense: a large-scale generic cause for platelet dysfunction and exhaustion in infection. *Semin Thromb Hemost* 2020;46(03):302-319
31. Vassiliou AG, Mastora Z, Orfanos SE, et al.: Elevated biomarkers of endothelial dysfunction/activation at ICU admission are associated with the development of sepsis. *Cytokines*. 2014; 69:240-247.
32. Duman A, Turkdogan KA, Avcil M, et al.: The predictive value of inflammatory markers P-selectin and MCP1 in determining the length of stay and survival of 30 days in the differentiation of patients with sepsis. *Jpma. J Pak Med Assoc*. 2018; 68:1321–6.
33. Xinjun LI, Xiaozhou Y, Chengbin W: The clinical value of IL-3, IL-4, IL-12p70, IL17A, IFN- γ , MIP-1 β , NLR, P-selectin and TNF- α in the differentiation of bloodstream infections caused by gram-negative, gram-positive bacteria and fungi in hospitalized patients: An Observational Study. *Medicine*. 2019; 98 (38).
34. Liverani E, Mondrinos MJ, Sun S, Kunapuli SP, Kilpatrick LE: Role of Protein Kinase C-delta in the regulation of platelet activation and platelet-leukocyte interaction during sepsis. *PloS 1*. 2018; 13(4).
35. Bounes FV, Mémier V, Marcaud M, et al.: Platelet activation and prothrombotic properties in a mouse model of peritoneal sepsis. *Scientific reports*. 2018; 8(1), 1-12.
36. Peters MJ, Ross-Russell RI, White D, et al.: Neutropenia and early severe thrombocytopenia identify cases of increased risk of severe meningococcal disease. *Pediatr Crit Care Med*. 2001; 2:225-31.
37. Duarte MC, Amorim MR, Cuevas LE, et al.: Risk factors for death from meningococcal infection in Recife, Brazil. *J Trop Pediatr*. 2005;51(4):227-231.

TABLES

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of children and adolescents with meningococcal sepsis, non-meningococcal sepsis, and healthy controls.

Variables	MS (n=12)	NMS (n=8)	HC (n=15)	p-value
	median (IQR)	median (IQR)	median (IQR)	
Age (months)	73 (32.5-125.0)	105 (70-135.0)	61 (46.7-121.0)	0,40 ^a
Disease duration (hours)	24 (13.2-24.0)	42 (22.5-48.0)	NA	0.02^b
Risk of Death				
PRISM II	23,9 (1.3-64.0)	1.4 (0.8-54.0)	NA	0.25 ^b
PIM 2	33,7 (7.0- 91.0)	8.7 (3.3-77.0)	NA	0.20 ^b
CRP (mg/L)	90 (78.0–189.0)	46 (21.0–115.0)	NA	0.34 ^b
Hemorrhagic injuries	N (%)	N (%)		0.14^b
Yes	12 (100%)	6 (66.6%)	NA	
No	0 (0%)	2 (33.3%)		
Septic shock	N (%)	N (%)		0.03^b
Yes	8 (66.6%)	1 (12.5%)	NA	
No	4 (33.3%)	7 (87.5%)		

MS: meningococcal sepsis with or without meningitis; NMS: non-meningococcal sepsis; HC: healthy control; NA: Not applicable. CRP: C Reactive protein. ^aMann Whitney test; ^bFisher's exact test. Considered significant p<0.05. PIM paediatric index of mortality, PRISM pediatric risk of mortality.

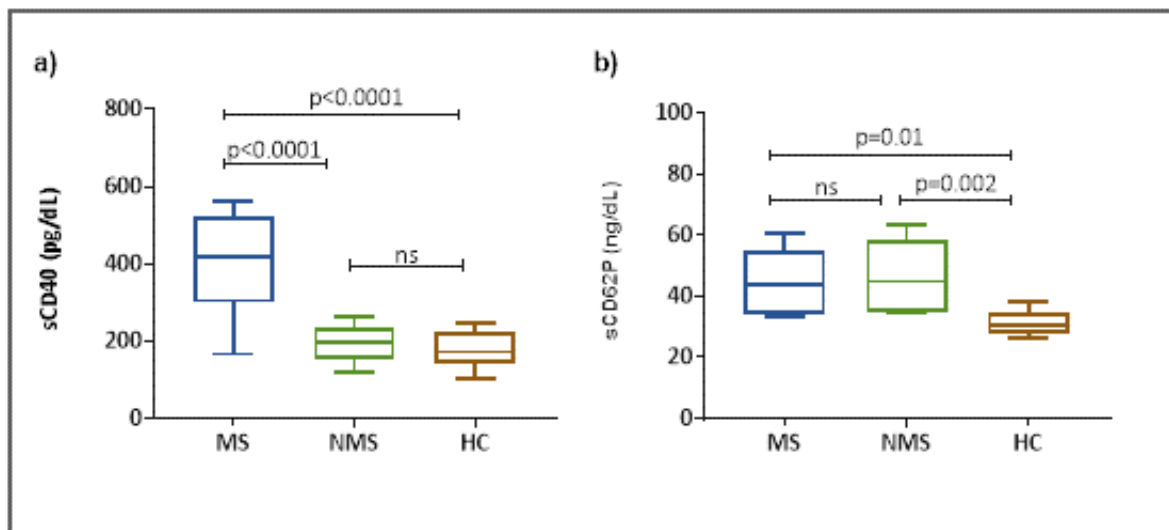
Table 2. Hematologic variables of children and adolescents with meningococcal sepsis, non-meningococcal sepsis, and healthy controls.

Groups	MS (A)	NMS (B)	HC (C)	<i>A vs B</i>	<i>A vs C</i>	<i>B vs C</i>
	n=12	n=8	n=15			
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	p-value	p-value	p-value
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	14.6 (5.9-24.4)	22.6 (16.7-27.5)	7.6 (6.4 - 9.5)	0.83	0.2	0.004
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	12.5 (3.9 - 17)	20.1 (9.2 -22.1)	4.3 (3.2 - 6.1)	0.43	0.07	0.001
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.3 (0.06 - 0.9)	0.7 (0.4 - 1.1)	0.5 (0.4 - 0.6)	0.18	0.87	0.91
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	110 (33 - 210)	242 (75 - 333)	338 (308 - 365)	0.35	0.001	0.11
Hemoglobin (g/dL)	9.9 (9.1-11.2)	10.9 (9.7 - 12.6)	12.4 (11.6 -12.8)	0.38	0.001	0.22

MS: meningococcal sepsis with or without meningitis; NMS: non-meningococcal sepsis; HC: healthy control; Kruskal-Wallis test. Considered significant $p < 0.05$.

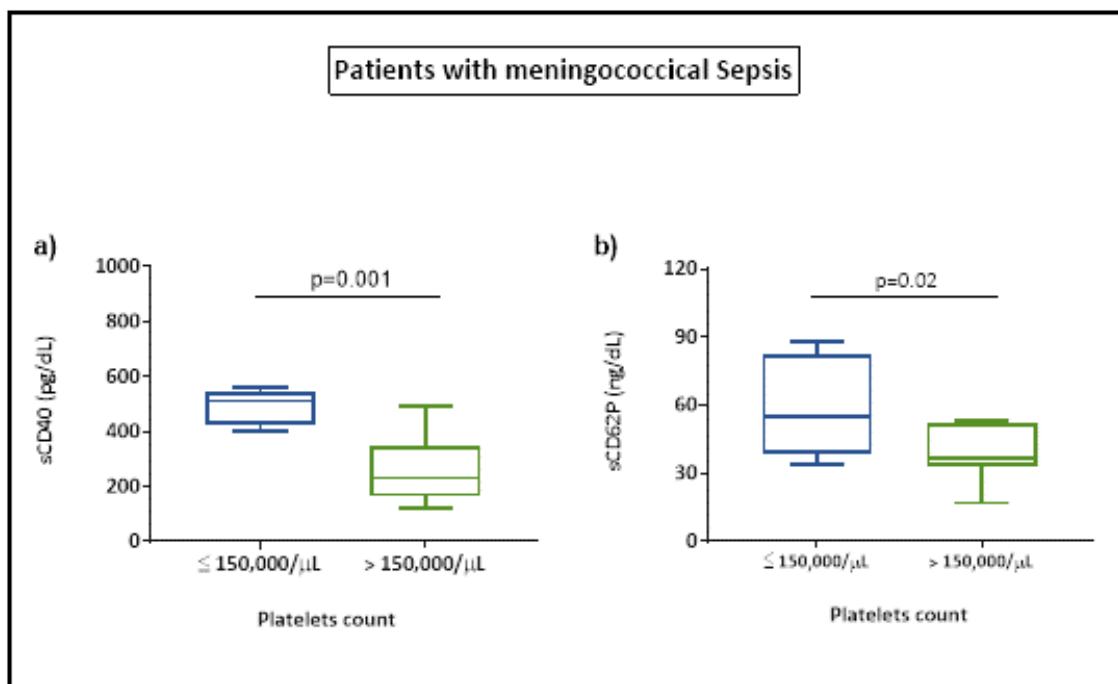
LEGENDS FIGURES

Figure 1 - Soluble levels sCD40 and sCD62p in children with meningococcal sepsis (MS), non-meningococcal sepsis (NMS), and in healthy control (HC).



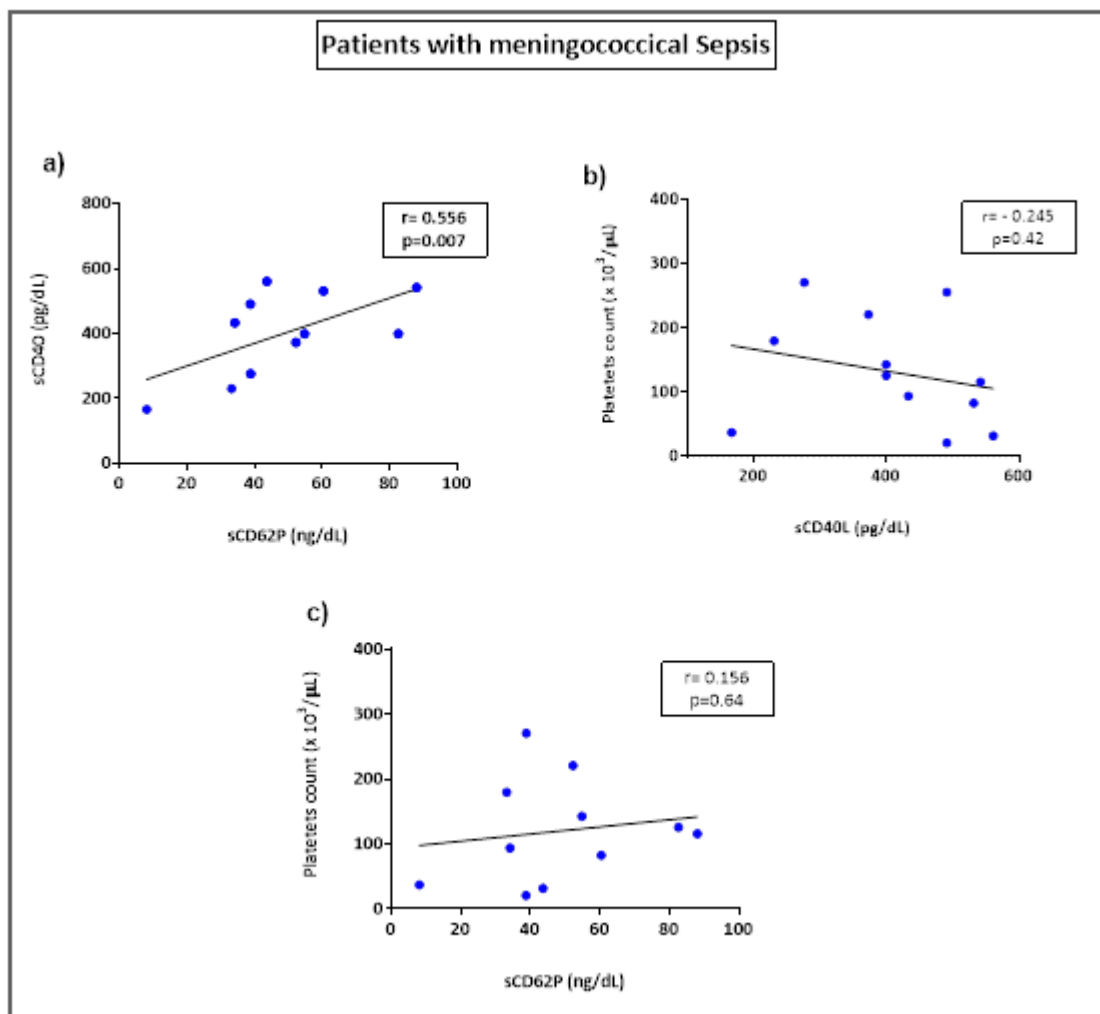
The graphs are represented with median and Interquartile (IQR: 25-75%). The Kruskal-Wallis test was performed for analysis between the groups. $P < 0.05$. ns: no significant

Figure 2- Soluble levels of sCD40 and SCD 62p in patients with and without thrombocytopenia ($\leq 150 \times 10^3/\mu\text{L}$).



The graphs are represented with median and Interquartile (IQR: 25-75%). Mann-Whitney test. * $p < 0.05$

Figure 3- Correlation analysis of between sCD40 *versus* sCD62p, platelets count ($\times 10^3/\mu\text{L}$) *versus* sCD40 and sCD62p levels of patients with meningococcal sepsis.



Spearman's correlation test. $P < 0.05$.

V. CONCLUSÃO

5.1 Importância do estudo e aplicabilidade

5.1.1 Estudos sobre a patogênese das infecções bacterianas agudas graves em crianças e adolescentes são de grande relevância devido à elevada morbidade e mortalidade de tais infecções, particularmente em países pobres e em desenvolvimento.

5.1.2 Mediadores inflamatórios medeiam diversas etapas da resposta imune do hospedeiro e, portanto, um maior conhecimento sobre a expressão delas durante a sepse na criança pode contribuir com informações para preencher uma lacuna do conhecimento científico, até então, pouco investigada.

5.1.3 O primeiro artigo mostra que crianças com SM apresentam desregulação da resposta imune inata, representada pelos elevados níveis de mediadores da ativação plaquetária (sCD62P) e endotélio vascular (sCD40). Essas moléculas têm potencial para serem úteis como biomarcadores precoces na sepse grave e choque séptico.

5.1.4 No segundo artigo, relatamos 11 casos de crianças com apresentação de uma síndrome rara e grave, a MIS-C associada a COVID 19. A letalidade encontrada foi elevada em comparação a dos países desenvolvidos. Ressalta-se que durante a pandemia de COVID-19 em regiões com recursos limitados, a suspeita clínica de uma condição ameaçadora de vida como a MIS-C se faz soberana para garantir manuseio e a terapêutica imediatos e adequados. Mais estudos são necessários para estabelecer o tratamento ideal de acordo com fenótipos da MIS-C.

5.2 Impacto institucional

O presente estudo teve uma abordagem de pesquisa translacional, colocando a bancada do laboratório a serviço das perguntas clínico-epidemiológicas, proporcionando aproximação entre a bancada e a beira do leito além da ampliação da formação da doutoranda com a vivência em laboratório de pesquisa. Adicionalmente, contribuiu para fortalecer a linha de pesquisa “Estudos clínicos, epidemiológicos e translacionais das doenças infecciosas na infância e adolescência”.

5.3 Recomendações para a pesquisa

Estudos futuros devem aprofundar o conhecimento sobre o tema através da inclusão de maior número de pacientes. Dosagens seriadas dessas e de outras moléculas coestimuladoras da imunidade inata podem identificar precocemente os pacientes de alto risco.

VI. REFERÊNCIAS

1. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, *et al*: The global burden of paediatric and neonatal sepsis: A systematic review. *Lancet Respir Med* 2018; 6:223–230.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al*: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315:801–810.
3. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, *et al*; Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies (SPROUT) Study Investigators and Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators (PALISI) Network: Global epidemiology of pediatric severe sepsis: The sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:1147–1157.
4. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, *et al*. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Intensive Care Med*. 2020; 46(1):10-67.
5. Liu L, Oza S, Hogan D, *et al*. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015; 380:430-40.
6. Reinhart K, Daniel R, Kissoon N, *et al*. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *N Engl J Med*. 2017;377(5):414–7.
7. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, *et al*. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6: 2-8
8. Cvetkovic M, Lutman D, Ramnarayan P, *et al*: Timing of death in children referred for intensive care with severe sepsis: Implications for interventional studies. *Pediatr Crit Care Med* 2015; 16:410–417
9. Borrow R, Alarcón P, Carlos J, *et al*. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 0(0):116.
10. Sáfadi MAP, O’Ryan M, Valenzuela Bravo MT, *et al*. The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. *Vaccine*. 2015;33(48):6529-36.
11. Gabutti G, Stefanati A, Kuhdari P. Epidemiology of *Neisseria meningitidis* infections: Case distribution by age and relevance of carriage. *J Prev Med Hyg*. 2015; 56(3):116-120.
12. Bosis S, Mayer A, Esposito S. Meningococcal disease in childhood: Epidemiology, clinical features and prevention. *J Prev Med Hyg*. 2015; 56(3):121-124.

13. Pizza M, Rappuoli R. *Neisseria meningitidis*: Pathogenesis and immunity. *Curr Opin Microbiol.* 2015; 23:68-72.
14. Cohn A, MacNeil J. The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(4):667-677.
15. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(2):121-137.
16. Poll T Van Der, Veerdonk FL Van De, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis. *Nat Publ Gr.* 2017;17(7):407-420.
17. Fallon EA, Biron-Girard BM, Chung CS, Lomas-Neira J, Heffernan DS, Monaghan SF, Ayala A. A novel role for coinhibitory receptors/checkpoint proteins in the immunopathology of sepsis. *J Leukoc Biol.* 2018.
18. Hall, M. W. Immune modulation in pediatric sepsis. *Journal of pediatric intensive care.* 2019; 8(01), 42-50.
19. Yeaman, M.R. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12, 426–437.
20. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;4(1):23-35.
21. Deppermann C, Kubes P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immun.* 2018; 24(6):335-348.
22. Deppermann C and Kubes P. Platelets and infection. *Semin Immunol* 2016; 28: 536–545.
23. Ribeiro, L. S., Migliari Branco, L., & Franklin, B. S. Regulation of innate immune responses by platelets. *Frontiers in Immunology*, 2019; 10, 1320.
24. Dewitte A, Tanga A, Villeneuve J, et al: New borders for CD154 platelets. *Exp Hematol Oncol.* 2015; Mar 1; 4:6.
25. Assinger, A., Schrottmaier, W. C., Salzman, M., *et al.* Platelets in sepsis: an update on experimental models and clinical data. *Frontiers in immunology.* 2019 10, 1687.
26. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H.A., Circulating platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. *Circ Res.* 2018;122(2):337-351.
27. Tsirigotis, P., Chondropoulos, S., Frantzeskaki, F., *et al.* Thrombocytopenia in critically ill patients with severe sepsis/septic shock: prognostic value and association with a distinct serum cytokine profile. *Journal of critical care.* 2016; 32, 9-15.

28. Claushuis, T. A., van Vught, L. A., Scicluna, B. P., *et al.* Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016; 127(24), 3062-3072.
29. Page, M. J., & Pretorius, E. A champion of host defense: a generic large-scale cause for platelet dysfunction and depletion in infection. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2020; 46 (03), 302-19.
30. Gros, A., Ollivier, V., & Ho-Tin-Noé, B. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Frontiers in immunology*, 2015; 5, 678.
31. Ed Rainger, G., Chimen, M., Harrison, M. J., *et al.* The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*, 2015; 26(6), 507-20
32. Van Gils, J. M., Zwaginga, J. J., & Hordijk, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *Journal of leukocyte biology*, 2009; 85(2), 195-204.
33. Heilmann E, Gregoriano C, Schuetz P. Biomarkers of Infection: Are They Useful in the ICU? *Semin Respir Crit Care Med*. 2019; 40(4):465-75.
34. Chen, Guan-yu and Lin, Ruan, Prognostic Biomarkers for Predicting Survival Outcome in Adult Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis.2019. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3426069>.
35. Møller AS, Bjerre A, Brusletto B, *et al.*: Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis*. 2005;191(5):768-775.
36. Inwald D, Peters M. Meningococcal disease: identifying high-risk cases. *Critical Care*. 2006; 10:129
37. Montero-Martín M, Inwald DP, Carrol ED, *et al.*: Prognostic markers of meningococcal disease in children: recent advances and future challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(11):1357-69.
38. Briassoulis G, Galani A: Prognostic markers of pediatric meningococcal sepsis. *Specialist Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(9):1017-20.
39. Gaertner, F., & Massberg, S. Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 2019;1-14.
40. Lisman, T. Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell and tissue research*, 2018; 371(3), 567-76.
41. Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 2014; 346(6214), 1234-38.

42. Zuchtriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D. *et al.* Platelets guide leukocytes to their sites of extravasation. *PLoS biology*, 2016; 14(5).
43. Lam, F. W., Burns, A. R., Smith, C. W., *et al.* Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011; 300(2), 468-75.
44. Michel, N. A., Zirlik, A., & Wolf, D. CD40L and its receptors in atherothrombosis—an update. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2017; 4, 40.
45. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

APÊNDICE I

Artigo 2

Tipo: *Research letter*

Título: Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with COVID-19 in Pernambuco, Brazil

Autores: Paula F. da C. de M. D. Maia, Thaysa M.G.A.L. Menezes, Mozart Júlio Tabosa Sales, Bruna Duque de Almeida Braga, Gabriela de Menezes Nunes, Zelina Barbosa de Mesquita Maria do Carmo M.B. Duarte.

Revista: JAMA pediatrics (ISSN 2168-6203)

Fator de impacto (2019): 13.946

Situação: submetido

Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with COVID-19 in Pernambuco, Brazil

1. Paula Ferdinanda Conceição de Mascena Diniz Maia, PhD, Professor at Pernambuco Federal University (UFPE – Portuguese acronym) and at Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS) and pediatrician at Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP).
2. Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes, MS, post-graduate student in mother and child health at IMIP; physician at the Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) and at Hospital Esperança.
3. Mozart Júlio Tabosa Sales, MS, post-graduate student in integrative health at IMIP and professor at IMIP.
4. Bruna Duque de Almeida Braga, MD, IMIP
5. Gabriela de Menezes Nunes, MD, IMIP
6. Zelina Barbosa de Mesquita, MS, physician at IMIP and professor at FPS
7. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte*, PhD, Research Department, IMIP. Recife, Pernambuco, Brazil

Letter contribution

***Corresponding author**

Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte; e-mail: mcduarte2010@gmail.com

Research Department, Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP).

Recife, Pernambuco, Brazil

Introduction

The pandemic of respiratory syndrome related to coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causing COVID-19, started in China at the end of 2019 and rapidly spread all over the world.

Children and adolescents affected by COVID-19 in the acute phase in less than 6% of all cases, and the lethality is lower than 0.1%^{1,2}. MIS-C is a severe multi-system inflammatory syndrome which affects children and is constituted by three different phenotypes³. This study describes the first cases of MIS-C in Recife, Brazil, one of the disease's epicenters, during the SARS-COV-2 pandemic.

Methods

This series of cases included 11 children (age ≤ 14 years); hospitalized in Prof. Fernando Figueira Institute of Integrative Medicine (IMIP) and Correia Picanço Hospital (HCP), in Recife, Northeast of Brazil, between April 30, 2020 and August 27, 2020; and that fulfilled CDC criteria for MIS-C⁴. Patients performed reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of oro-nasopharyngeal swab for SARS-CoV-2, Charité protocol: SARS-CoV-2 (E/P1) from Bio-Manguinhos/Fiocruz and serology for IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2 (Novel Coronavirus [2019-nCoV] IgG/IgM Test Kit [Colloidal gold]). We reported patient's characteristics: biological, clinical, hematological, of image, inflammatory markers and therapies in hospital admission. All patients provided written consent.

Results

Eleven patients were admitted (six girls, mean age, 7 years [variation, 1-13 years]) fulfilled eligibility criteria for MIS-C. According to Godfred-Cato *et al*³: class 1=9 (82%); class 2 and 3, both 1. According to CDC⁴, 10 (91%) children had laboratorial evidence for SARS-

CoV-2 and on child, epidemiological criteria. Characteristics of patients are described in Table 1. All patients were previously healthy (except patient 2 who was obese), and 100% of cases had fever for more than 3 days. Gastrointestinal manifestations were present in ten (91%) children (abdominal pain, n=9). Mucocutaneous findings were observed in 10 (91%) children (rash, n=10; conjunctivitis, n=5). Seven (64%) presented interstitial infiltrates on chest x-ray. It was visualized ground-glass consolidation in computed chest tomography of three patients (1, 5 and 11) of the four submitted to the examination. High CRP and LDH levels seen in all children; D-dimer (6/6 tested) and troponin (6/9 tested). Lymphocytopenia $< 1,500$ in 4/11 cases. Echocardiogram with Doppler was executed in five patients, of which two (3 and 5) showed left ventricular ejection fraction (EF) $< 55\%$ and one (11) coronary dilatation. Ten (91%) children received corticoids (methylprednisolone = 2mg/kg/day [9 cases] and hydrocortisone = 100 mg/ m²/day [1 case]) and seven (63%) received human immunoglobulin (2g/kg). Only 1 patient used anticoagulant [patient5]. Nine (82%) children were admitted in ICU, ten (91%) children received support from vasopressor drugs and five (45,5%) were submitted to mechanical ventilation. The mortality was of 18%, case 1 was shocked when admitted in hospital and case 2 had quickly worsened in the first 6 hours and died with 24 hours of admission, without access to ICU due to vacancy unavailability.

Discussion

This study describes a series with 11 children and adolescents previously healthy who developed MIS-C, according to CDC⁴ criteria, in Brazil, one of the COVID-19 pandemic epicenters. Nine children presented in admission a phenotype of higher severity with at least six affected organs/systems (class 1) and one of them did not have access to ICU. Patients who received intravenous immunoglobulin rapidly got better, which differs from

other studies^{3,5}. The mortality was high, contradicting that related in developed countries (around 2%)^{3,5,6}. Our study had a small amount of patients and the majority of children presented shock. We highlight that during COVID-19 pandemic, in regions with limited resources, the clinical suspicion of a life-threatening condition such as MIS-C is crucial to ensure immediate and adequate management and therapy. More studies will be necessary to establish the ideal treatment according to MIS-C phenotypes.

References

1. Castagnoli R, Votto M, Licari A, Brambilla I, Bruno R, Perlini S, Rovida F, Baldanti F, Marseglia GL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Children and Adolescents: A Systematic Review. *JAMA Pediatr.* 2020 Apr 22. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.1467. Epub ahead of print. PMID: 32320004.
2. Hoang A, Chorath K, Moreira A, Evans M, Burmeister-Morton F, Burmeister F, Naqvi R, Petershack M, Moreira A. COVID-19 in 7780 pediatric patients: A systematic review. *EClinicalMedicine.* 2020 Jun 26;24:100433.
3. Godfred-Cato S, Bryant B, Leung J, Oster ME, Conklin L, Abrams J, Roguski K, Wallace B, Prezzato E, Koumans EH, Lee EH, Geevarughese A, Lash MK, Reilly KH, Pulver WP, Thomas D, Feder KA, Hsu KK, Plipat N, Richardson G, Reid H, Lim S, Schmitz A, Pierce T, Hrapcak S, Datta D, Morris SB, Clarke K, Belay E; California MIS-C Response Team. COVID-19-Associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children - United States, March-July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020 Aug 14;69(32):1074-1080. doi: 10.15585/mmwr.mm6932e2. PMID: 32790663; PMCID: PMC7440126.

4. Center of Disease Control. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Published may 14, 2020. Accessed october 12, 2020. <https://www.cdc.gov/mis-c/hcp/>.
5. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF, Newburger JW, Kleinman LC, Heidemann SM, Martin AA, Singh AR, Li S, Tarquinio KM, Jaggi P, Oster ME, Zackai SP, Gillen J, Ratner AJ, Walsh RF, Fitzgerald JC, Keenaghan MA, Alharash H, Doymaz S, Clouser KN, Giuliano JS Jr, Gupta A, Parker RM, Maddux AB, Havalad V, Ramsingh S, Bukulmez H, Bradford TT, Smith LS, Tenforde MW, Carroll CL, Riggs BJ, Gertz SJ, Daube A, Lansell A, Coronado Munoz A, Hobbs CV, Marohn KL, Halasa NB, Patel MM, Randolph AG; Overcoming COVID-19 Investigators; CDC COVID-19 Response Team. Multisystem Inflammatory Syndrome in U.S. Children and Adolescents. *N Engl J Med*. 2020 Jul 23;383(4):334-346. doi: 10.1056/NEJMoa2021680. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32598831; PMCID: PMC7346765.
6. Dufort EM, Koumans EH, Chow EJ, Rosenthal EM, Muse A, Rowlands J, Barranco MA, Maxted AM, Rosenberg ES, Easton D, Udo T, Kumar J, Pulver W, Smith L, Hutton B, Blog D, Zucker H; New York State and Centers for Disease Control and Prevention Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Investigation Team. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in New York State. *N Engl J Med*. 2020 Jul 23;383(4):347-358. doi: 10.1056/NEJMoa2021756. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32598830; PMCID: PMC7346766.

Chart 1. Clinical, laboratory, radiological and therapeutic of 11 patients with Multisystem Inflammatory Syndrome during COVID-19 pandemic.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Age (years)	7	11	3	1	13	5	5	9	9	9	7
Weight (kilograms)	47	62	16.6	11.7	33	15	14	22	38	40	21
Sex	Male	Female	Female	Female	Male	Male	Female	Male	Female	Female	Male
Fever and other symptoms											
Abdominal pain	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
diarrhea	Yes	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No
vomit	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No
conjunctival hyperemia	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
periorbital edema	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No	No
Rash	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
odynophagia	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No
cough	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
dyspnea	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
oliguria	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Comorbidities	-	obesity	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laboratory* and radiological characteristics											
Leukocytes (mm ³)	16,700	11,800	13,400	23,200	8,800	16,000	11,400	15,520	10,400	24,290	5,000
Typical and atypical lymphocytes (mm ³)	5,010/0	1,180/0	2,010/0	14,012/0	264/0	1,600/0	2,166/0	1,086/0	1,664/0	5,100/485	850/0
Platelets** (150,000-450,000 mm ³)	98,000	156,000/ 188,000	56,000/ 530,000	140,000/ 1,139,000	177,000/ 330,000	43,000/ 129,000	206,000/ 403,000	63,000/ 182,000	86,000/ 452,000	86,00/ 499,000	100,00/ 647,000
Albumin (3.5-5 g/dL)	1.86	4.05	2.53	3.02	2.67	2.1	2.9	2.63	2.77	2.6	2.6
CRP (<5 mg/L)	>160	>160	>160	>160	234	161	7	62	256	7.5	146
ESR (<10 mm)	-	66	59	36	-	-	-	-	-	-	-
D-Dimer (<500 ng/dL)	-	-	-	-	3,140	> 4,000	2,680	3,650	2,420	-	2,370
Ferritin (22-322 ng/mL)	>1.650	-	434	195	-	-	529	111.3	-	-	-
Troponin (<0.016 ng/mL)*****	0.19	4.07	0.018	0.024	0.044	-	54.7	< 40	0.273	< 40	-
LDH (125-220 U/L)	383	311	366	575	228	259	558	550	241	3,820	514
CPK (30-200 U/L)	101	506	37	-	20	-	-	323	-	668	-
Urea (10-36 mg/dL)	124	32	30	25	16.3	-	29.4	35	32.7	48	13.5
Creatinine (0.7-1.5 mg/dL)	2.5	0.85	0.43	0.51	0.3	-	0.3	0.4	0.4	0.9	0.2
INR/EA (0.8-1.2/70-100%)	1.25/71	1.38/73	1.15/80	1.24/99	1.26/69	1/91	1/101	1/98	1.13/82	1.2/70	1/96
SARS-CoV-2 RT-PCR	non-reactive	non-reactive	non-reactive	non-reactive	reactive	non-reactive	non-reactive	non-reactive	non-reactive	reactive	non-reactive
IgG/IgM SARS-CoV-2	EC*****	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/ undone	undone	+/+
Blood culture	-	Neg***	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Chest X-ray	Interstitial infiltrate, congestion increased cardiac area	Normal	Interstiti al infiltrate	Normal	Interstitial infiltrate	increased cardiac area	Interstitial infiltrate	Interstitial infiltrate	Interstitial infiltrate	Interstitial infiltrate	increased cardiac area
Tomography chest (ground glass consolidations)	Yes	-	-	-	Yes	-	-	Bilateral pleural effusion	-	-	Yes
Echocardiogram (EFLV)	-	-	52%	-	51%	-	Normal	-	Normal	-	*****coronary dilatation
Length of stay (days)	2	1	9	10	12	11	6	10	3	16	8
Godfred-Cato et al¹, Class	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1
Treatment											
Immunoglobulin	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Corticoid	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Inotropes/vasopressor	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Mechanical ventilation	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
Pediatric ICU	Yes	No (no vacancy)	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Death	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No

CRP = C-reactive protein. ESR = erythrocyte sedimentation rate. LDH = lactic dehydrogenase. CPK = creatine phosphokinase. INR/EA = international normalized ratio / enzyme activity. SARS-CoV-2 reverse transcriptase-polymerase chain reaction RT-PCR = severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 real time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. PNM = Pneumonia. LVEF: left ventricular ejection fraction. *Laboratory: references values ** Platelets: minor and maximum value. ***Neg = negative. ****Troponin: patients 7,8 and 10 normal reference value < 40. *****Echo 15 days after discharge.***** Epidemiological criteria.

APÊNDICE II**LISTA DE CHECAGEM (Pacientes com sepse meningocócica)**Nome _____ Registro **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Meningite Meningocócica
- Sepse Meningocócica sem Meningite
- Sepse Meningocócica com Meningite

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Uso crônico de droga imunossupressora
- Diagnóstico prévio de imunodeficiência primária ou secundária
- Diagnóstico de síndrome nefrótica
- Diagnóstico de anemia falciforme
- Paciente esplenectomizado
- Diagnóstico de neoplasia maligna
- Diagnóstico de diabetes mellitus
- Paciente que sofreu parada cardiorrespiratória e reanimação cardiorrespiratória antes da coleta das amostras
- Paciente transfundido com plasma fresco ou concentrado de plaquetas nos últimos 7 dias
- Paciente com meningite secundária a procedimento neurocirúrgicos, fístulas líquóricas, trauma crâneo-encefálico, dispositivo intracraniano ou processo infeccioso contíguo

CONCLUSÃO

- Elegível
- Não elegível

SE ELEGÍVEL, CONCORDA EM PARTICIPAR? Sim Não

LISTA DE CHECAGEM (pacientes do controle saudável)

Nome _____

Registro **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Ausência de infecção nos últimos 30 dias
- Ausência de internamento hospitalar nos últimos 30 dias

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Uso crônico de droga imunossupressora
- Diagnóstico prévio de imunodeficiência primária ou secundária
- Diagnóstico de síndrome nefrótica
- Diagnóstico de anemia falciforme
- Paciente esplenectomizado
- Diagnóstico de neoplasia maligna
- Diagnóstico de diabetes mellitus
- Paciente que sofreu parada cardiorrespiratória e reanimação cardiorrespiratória antes da coleta das amostras
- Paciente transfundido com plasma fresco ou concentrado de plaquetas nos últimos 7 dias
- Paciente com meningite secundária a procedimento neurocirúrgico, fístulas liquóricas, trauma crâneo-encefálico, dispositivo intracraniano ou processo infeccioso contíguo

CONCLUSÃO

- Elegível
- Não elegível

SE ELEGÍVEL, CONCORDA EM PARTICIPAR? Sim Não

APENDICE III –FORMULÁRIO DE PESQUISA

Mediadores inflamatórios de plaquetas na doença meningocócica

FORMULÁRIO N° <input type="text"/> <input type="text"/>	NUM <input type="text"/> <input type="text"/>
Responsável pelo preenchimento:	
<u>Dados gerais</u> Data de admissão <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Hora _____: __ Registro Nome _____ Endereço completo: _____ Ponto de referência: _____ Nome do responsável e telefones para contato: <hr/> Data de nascimento <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Idade <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Sexo (Masc 1; Fem 2) <input type="checkbox"/> Internamento na enfermaria (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/> Internamento na UTI (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/>	INCLU <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> DN <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> IDADEM <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> SEXO <input type="checkbox"/> ENFA <input type="checkbox"/> UTI <input type="checkbox"/>
<u>História médica progressa</u> Comorbidades (especificar)	COMORB
<u>Diagnóstico Clínico</u> 1. Meningite <input type="checkbox"/> 2. Sepses com meningite <input type="checkbox"/> 3. Sepses sem meningite <input type="checkbox"/>	MM <input type="checkbox"/> SMM <input type="checkbox"/> SM <input type="checkbox"/>
<u>Exame físico na admissão</u> Peso <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> g Estatura <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> cm Tempo de duração da doença <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> PIM2 _____ Escore de Glasgow para Doença meningocócica _____ Descrição das lesões hemorrágicas _____ Choque (hipotensão arterial) (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/>	PESO <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> EST <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> TEMPO <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> PIM <input type="checkbox"/> EGDM LESOES <input type="checkbox"/> CHOQUE <input type="checkbox"/>

<p>Distúrbios metabólicos (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, especificar _____</p> <p>Distúrbios acidobásico (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, especificar _____</p> <p>A amostra laboratorial de sangue foi coletada? (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/></p> <p>A amostra laboratorial de LCR foi coletada? (Sim=1, Não=2) <input type="checkbox"/></p>	<p>DM <input type="checkbox"/></p> <p>DAB <input type="checkbox"/></p> <p>SANGUE <input type="checkbox"/></p> <p>LCR <input type="checkbox"/></p>														
<u>Seguimento do paciente hospitalizado (1º exame)</u>															
<p>Hemoglobina _____ g% N° leucócitos _____ g%</p> <p>N° plaquetas _____ mm³</p> <p>PCR _____ mg/dL LCR _____</p> <p>Contagem absoluta de neutrófilos <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>Contagem de neutrófilos imaturos <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>Ecocardiograma _____</p> <p>Disfunção orgânica durante hospitalização (Sim=1, Não=2) Se sim especificar _____</p> <p>Disfunção orgânica na alta (Sim=1, Não=2) Se sim especificar _____</p> <p>Presença de infecção hospitalar (Sim=1, Não=2, não conhecido=3)</p> <p>Tempo de permanência na UTI em dias _____</p> <p>Data da alta hospitalar _____</p> <p>Estado da saída (alta=1, óbito=2, transferência=3)</p> <p>Diagnóstico(s) na alta _____</p> <p>Critério de fechamento do caso (NEPI): _____</p>	<p>HGB <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>LEUC <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>PLAQ <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>PCR <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>NEUT LCR <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>NEUT S <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>IMATUROS S <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>ECO FE <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>DISF HOSP <input type="checkbox"/></p> <p>DISF ALTA <input type="checkbox"/></p> <p>IRAS <input type="checkbox"/></p> <p>PERM <input type="checkbox"/></p> <p>DATA ALTA <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p>SAÍDA <input type="checkbox"/></p> <p>DIAG FINAL _____</p> <p>NEPI _____</p>														
<u>Mediadores inflamatórios solúveis (pg/ml)</u>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 30%;">sCD40</td> <td></td> </tr> <tr> <td>sCD62P</td> <td></td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	sCD40		sCD62P												
sCD40															
sCD62P															

APÊNDICE IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)

Gostaríamos de convidar seu(sua) filho(a) para participar de nossa pesquisa. Para isso, precisamos dos seguintes dados:

NOME DO PACIENTE.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....
 BAIRRO:.....CIDADE.....
 CEP:.....
 TELEFONE: DDD (.....)

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **ESTUDO DO PAPEL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE PLAQUETAS NA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA MENINGOCÓCICA INVASIVA**

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

Dra. Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes – Cardiologista Pediátrica do PROCAPE e Hospital Esperança, intensivista pediátrica do Hospital Esperança e HCP; mestrado em Saúde da Criança e Adolescente pela UFPE.

Dr. Igor Paiva de Souza – Médico pediatra e residente da cirurgia cardiovascular do IMIP

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte – Intensivista pediátrica, coordenadora da UTI pediátrica do Hospital Esperança; docente pesquisadora do IMIP.

3. UNIDADE: Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4. PESQUISADORES COLABORADORES:

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR		

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

7. Gostaríamos de convidar seu filho(a) a participar de nossa pesquisa.

8. **Justificativa:** Existem evidências de que as plaquetas têm um papel fundamental na defesa do organismo. Mas, ainda não se conhece exatamente qual o papel dessas células durante a meningite e infecção por todo corpo. Por isso, vamos estudar substâncias produzidas pelas plaquetas.

9. **O objetivo** deste trabalho é avaliar a presença de substâncias produzidas pelas plaquetas durante a meningite e infecção por todo corpo.

10. Os testes laboratoriais serão realizados em amostras de sangue coletadas na rotina de acompanhamento dos pacientes.

11. A análise da amostra de LCR que é um líquido presente no canal da coluna será realizada apenas quando for coletada amostra deste líquido pelos médicos para exames de rotina na avaliação do paciente com suspeita de meningite. Não será realizada coleta do líquido da coluna exclusivamente para os testes laboratoriais vinculados ao presente projeto.

12. Existe um risco baixo para o participante de pesquisa. O mesmo que o risco que pode ocorrer com uma coleta de sangue na veia e de líquido da coluna. Ou seja, a coleta de sangue poderá provocar uma pequena mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha que desaparece com alguns dias.

13. Não existe benefício direto para a pessoa convidada. A pesquisa vai ajudar a esclarecer presença de substâncias produzidas pelas plaquetas durante a meningite e infecção por todo corpo.

14. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dr. Igor Paiva de Souza, Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte que são encontrados no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), na Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista (Telefone: (81) 99216231 ou 21225655).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que tem como objetivo defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas. O CEP-IMIP está situado na Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar = tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br. O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 hs (manhã) e 13:30 às 16:00 hs (tarde).

15. Os convidados poderão desistir de fazer parte da pesquisa a qualquer momento.

16. Não serão divulgados os nomes dos convidados.

17. Os convidados poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

18. Os convidados não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os participantes.

19. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue da veia, o convidado tem o direito a tratamento médico e hospitalar no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.

20. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que meu filho (a) ou convidado está isento de despesas e que tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente que meu/minha filho(a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste serviço.

Assinatura do participante ou responsável legal.

Assinatura da testemunha

Recife, _____ 20

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do paciente ou representante legal para participação neste Estudo.

Recife, _____ de _____ 20 _____

Dra. Maria do Carmo Duarte (Pesquisador)

Dra. Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONVIDADO)**1. NOME DO CONVIDADO**

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE.....

..CEP:.....

TELEFONE:(.....).....

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ESTUDO DO PAPEL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE PLAQUETAS NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA MENINGOCÓCICA INVASIVA**2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:**

Dra. Thaysa Menezes - Cardiologista Pediátrica do PROCAPE e Hospital Esperança, intensivista pediátrica do Hospital Esperança e HCP; mestrado em Saúde da Criança e Adolescente pela UFPE.

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte – Intensivista pediátrica, coordenadora da UTI pediátrica do Hospital Esperança; docente pesquisadora do IMIP.

3. UNIDADE: Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4. PESQUISADORES COLABORADORES:**Dr. Igor Paiva de Souza** – Médico pediatra e residente da cirurgia cardiovascular do IMIP**5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

7. Gostaríamos de convidá-la a participar de nossa pesquisa.

8. **Justificativa:** Existem evidências de que as plaquetas têm um papel fundamental na defesa do organismo. Mas, ainda não se conhece exatamente qual o papel dessas células durante a meningite e infecção por todo corpo. Por isso, vamos estudar substâncias produzidas pelas plaquetas.9. **O objetivo** deste trabalho é avaliar a presença de substâncias produzidas pelas plaquetas durante a meningite e infecção por todo corpo.

10. Os testes laboratoriais serão realizados em amostras de sangue coletadas na veia durante o processo de anestesia que acontece antes da cirurgia.

11. Existe um risco mínimo para o participante de pesquisa. O mesmo risco que pode ocorrer com uma coleta de sangue na veia. Ou seja, a coleta poderá provocar uma mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha.

12. Não existe benefício direto **para a pessoa convidada**.

13. **Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dr. Igor Paiva de Souza, Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte que são encontrados no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), na Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista (Telefone: (81) 99216231 ou 21225655).**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que tem como objetivo defender os interesses dos participantes, respeitando seus direito e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas. O CEP-IMIP está situada na Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar = **tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br**. O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 hs (manhã) e 13:30 às 16:00 hs (tarde).

14. **Os convidados** poderão desistir de fazer parte da pesquisa.

15. Não serão divulgados os nomes dos **convidados**.

16. Os **convidados** poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

17. Os **convidados** não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os participantes.

18. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue na veia, o convidado tem o direito a tratamento médico no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.

19. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a **convidada está isento de despesas e que tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário**. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste serviço.

Assinatura do participante ou responsável legal.

Assinatura da testemunha

Recife, _____ 20

Dra. Maria do Carmo Duarte e Dr. Thaysa Menezes
(Pesquisadoras)

APÊNDICE V – TEMO DE ASSENTIMENTO PARA PACIENTES SAUDÁVEIS

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TALE) PARA PACIENTES SAUDÁVEIS (IDADE DE 8 A
14 ANOS)**

Você está sendo convidado para participar da nossa pesquisa. Seus pais permitiram que você participasse, mas você não precisa participar se não quiser, é um direito seu e não tem nenhum problema se desistir.

Para isso, precisamos dos seguintes dados:

NOME DO PACIENTE _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N° _____ SEXO: M/F _____
DATA DE NASCIMENTO _____
ENDEREÇO _____ N° _____ APTO _____
BAIRRO _____ CIDADE _____
CEP _____ TELEFONE (____)

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE ESTIMULAÇÃO E INIBIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA MENINGOCÓCICA INVASIVA.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Manuela Guimarães Clemente – Médica Intensivista Pediátrica do Hospital Esperança, IMIP e HCP; Médica diarista da UTI Pediátrica do HOF.

Dr. Moacir Batista Jucá – Médico Infectologista do HCP; Coordenador da CCIH do HAM e Hospital Esperança; Professor da disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Curso de medicina da Uninassau.

Dra. Thaysa Menezes - Cardiologista Pediátrica do PROCAPE e Hospital Esperança, intensivista pediátrica do Hospital Esperança e HCP; mestrado em Saúde da Criança e Adolescente pela UFPE

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte – Intensivista pediátrica, coordenadora da UTI pediátrica do Hospital Esperança; docente pesquisadora do IMIP.

Nesta pesquisa pretendemos entender como as defesas do nosso corpo funcionam quando temos meningite e infecção no corpo todo. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é porque não conhecemos como isso acontece nessas doenças, principalmente nas crianças e adolescentes. Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): nós vamos fazer um exame de sangue junto com os exames que seu médico vai pedir para poder operar você. Para diminuir a sensação de dor vamos passar uma pomade anestésica no local antes da punção. Também pedimos sua autorização para ter acesso as informações do

seu prontuário médico quando necessário.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum gasto, nem receberá qualquer ajuda financeira. Você será esclarecido (a) sobre suas dúvidas e estará livre para participar ou não. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não levará à nenhuma modificação em seu tratamento. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Os riscos envolvidos na pesquisa são baixos, consistem em dor pela picada da agulha e possível aparecimento de mancha vermelha ou roxa no lugar da picada, que desaparece rápido. A pesquisa contribuirá para conhecermos melhor essas doenças e podermos melhorar o tratamento de outras crianças e adolescentes como você.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais: sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos dessa pesquisa, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP, que fica na Rua dos Coelhoos, no 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1o Andar tel: 2122-4756

– Email: comitedeetica@imip.org.br.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e

esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas *dúvidas*.

Recife, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do Menor

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE IV Termo Consentimento Livre e Esclarecido

(Responsável legal de criança e adolescente - menores de 18 anos)

A COVID-19 é uma doença nova que pode afetar a todos, por esse motivo, o (a) menor _____ sob sua responsabilidade, está sendo convidado para ser participante da pesquisa denominada **“Características clínicas, imunológicas, exames laboratoriais/imagem e terapêuticas de crianças com síndrome inflamatória multissistêmica por COVID-19”**. Para que você possa decidir se ele (a) deva participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências da participação do (a) menor.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar a participação do (a) menor, na pesquisa, depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e/ou com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para mais esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações e/ou o esclarecimento de suas dúvidas, caso queira participar, você poderá fornecer seu consentimento, rubricando e/ou assinando todas as páginas deste Termo, em duas vias (uma do pesquisador responsável e outra do participante da pesquisa). Esta pesquisa será realizada no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e no Hospital Correia Picanço (HCP).

O objetivo principal deste estudo é avaliar características clínicas, imunológicas, exames laboratoriais/imagem e terapêuticas de crianças com síndrome inflamatória multissistêmica pelo novo coronavírus (COVID-19).

Para participar do estudo, solicitaremos para que o (a) senhor(a) responda um questionário e que depois possamos coletar amostra de secreção da oro/nasofaringe de seu (sua) filho (a) e de sangue de sua criança/adolescente para realização de exames que possam explicar o por que em algumas crianças/adolescentes a doença pelo COVID-19 pode ser tão grave.

Se você concordar com a participação do (a) menor no estudo, nós iremos coletar um pouco de sangue (aproximadamente 4ml) de alguma veia do braço (ou equivalente) para pesquisa de imunidade contra o vírus. O exame de sangue é parecido com qualquer exame de rotina, que o (a) menor pode ter feito para avaliar se tem ou não anemia ou diabetes, por exemplo. Na coleta de sangue o (a) menor poderá sentir um pequeno desconforto no lugar da picada da agulha e, depois desse exame, poderá ficar com uma pequena marca roxa neste local. A marca roxa no local pode ocorrer devido ao extravasamento de sangue para o tecido sob a pele, durante ou após a coleta. Por isso orientamos após a coleta de sangue que ele (a) evite dobrar o braço. Nas primeiras 24 horas, pode-se utilizar compressa fria no local, como bolsa de água gelada ou gelo enrolado em toalha, para ajudar a reduzir a mancha roxa e a dor local.

O exame para detectar o vírus da COVID-19 é feito com a secreção respiratória. Na coleta será utilizado swabs (cotonetes com hastes grandes) que são

delicadamente inseridos no nariz e na garganta do(a) menor. Durante a coleta o(a) menor poderá sentir um leve desconforto, como vontade de espirar, náuseas e lacrimejar os olhos, que desaparecem após coleta. Ainda em pouquíssimos casos pode ocorrer sangramento no nariz, que pode ser resolvido com o movimento de abaixar a cabeça para frente e manter o nariz pressionado entre os dedos indicador e polegar durante 5 minutos. Além disso, para diminuir estes problemas, as pessoas responsáveis pela coleta são experientes e bem treinadas. Também serão utilizados equipamentos adequados e seguros para coleta dos exames. Os profissionais utilizarão equipamentos para evitar a transmissão de doenças, como luvas, máscara, avental, gorro e óculos. Para a realização dos exames laboratoriais no (a) menor, você deverá também dar o seu consentimento. As amostras laboratoriais armazenadas serão utilizadas para os fins previstos neste termo e enquanto durar o presente estudo, e, caso você autorize, a amostra de sangue e de secreção da oro/nasofaringe do (a) menor será armazenada no banco de amostras do IMIP para fins de pesquisas aprovadas futuramente por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Solicitamos também a sua permissão para podermos consultar o prontuário de sua criança/adolescente caso seja necessário.

Se você autorizar a participação do (a) menor nesta pesquisa, as informações sobre a saúde dele (a) e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. O nome dele (a) não será relacionado às respostas do questionário, mas será relacionado aos resultados dos testes para que, se necessário, profissionais possam oferecer assistência à saúde. Assim, os dados do (a) menor serão utilizados depois de anonimizados (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais e os resultados de exames. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, a identidade do seu filho (a) permanecerá em segredo.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Se algum teste de imunidade for alterado, o (a) senhor(a) receberá todas as orientações, assim como, será assegurado a ele (a) o acesso a rede de assistência do Sistema Único de Saúde para receber acompanhamento gratuito. Além disso, os resultados dessa pesquisa poderão beneficiar a outras crianças/adolescentes com síndrome inflamatória multissistêmica pelo COVID.

A participação do (a) menor é voluntária e sua recusa em autorizar esta participação não acarretará quaisquer penalidades. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento do estudo sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper a participação do(a) menor na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de dados relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

A pessoa responsável pela obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas.

Em qualquer fase da pesquisa, você poderá esclarecer suas dúvidas e ter acesso aos seus resultados, podendo entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa: Dra. **Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte**, no telefone: (81) 987821193; Dra. **Paula Diniz**, no telefone: (81) 997721000; Dra. **Maria Júlia Gonçalves de Mello**, no telefone: (81) 987393427; Dra. **Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes**, no telefone: (81) 991614589; Dr. **Mozart Júlio Tabosa Sales**, no telefone (81) 2122-4100.

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o objetivo do estudo. Ficaram claros para mim quais são os procedimentos a serem realizados, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a participação do (a) menor é isenta de despesas e que eu terei a garantia de acesso aos dados e de esclarecimento de dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que o nome do (a) menor não será publicado e que será assegurado seu anonimato.

Concordo voluntariamente com a participação do (a) menor nesta pesquisa e poderemos retirar o consentimento a qualquer momento, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que o(a) menor possa ter adquirido.

() Eu CONCORDO que o (a) menor participe desta pesquisa; e AUTORIZO que as amostras coletadas sejam depositadas e armazenadas no banco de amostras do IMIP para utilização em novas pesquisas; sendo que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa; e que para utilização do material armazenado, a cada pesquisa, eu deverei assinar um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

OU

() Eu CONCORDO que o (a) menor participe desta pesquisa e AUTORIZO que as amostras coletadas sejam depositadas, armazenadas e utilizadas para realização dos exames previstos nesta pesquisa. NÃO AUTORIZO o uso do material coletado em investigações futuras.

Eu, _____ por intermédio deste, concedo livremente meu consentimento para participação do (a) menor nesta pesquisa.

Assinatura do responsável

Assinatura da Testemunha Imparcial (quando aplicável)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao responsável do menor indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir o mesmo.

_____ Data / /

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do TCLE (1ª Via Entrevistador/Pesquisador;
2ª Via Voluntário(a))

ANEXO I

Definições de síndrome de resposta inflamatória sistêmica, infecção, sepse grave e choque séptico

SIRS^a

Presença de pelo menos dois dos quatro seguintes critérios, nos quais um deve ser temperatura anormal e contagem de leucócitos:

- Temperatura corporal ^b > 38,5°C ou < 36°C
- Taquicardia, definida como frequência cardíaca(FC) >2 desvios padrão acima do normal na ausência de estímulo externo, drogas de uso crônico ou estímulo doloroso; ou por outro lado elevação persistente acima de um período de 0,5 a 4 horas ou para crianças abaixo de um ano: bradicardia, definida como FC < percentil 10 para idade na ausência de estímulo vagal externo, drogas β-bloqueadoras ou doença cardíaca congênita; ou de outra forma depressão persistente por um período maior que 0,5h.
- Frequência respiratória média > dois desvios padrões acima do normal para idade ou ventilação mecânica por processo agudo, não relacionado com doença neuromuscular ou recebimento de anestesia geral.
- Contagem de leucócitos elevada ou diminuída para idade (não secundária a leucopenia induzida por quimioterapia) ou >10% de neutrófilos imaturos.

INFECÇÃO

Suspeita ou comprovada (por cultura positiva ou teste de reação de polimerase em cadeia) infecção causada por um patógeno OU síndrome clínica com alta probabilidade de infecção. Evidência de infecção incluem achados positivos no exame clínico, de imagem ou testes laboratoriais (exemplo – células brancas em fluido corporal normalmente estéril, radiografia torácica compatível com pneumonia, rash petequiral ou purpúreo ou púrpura fulminante).

SEPSE

SIRS na presença ou como resultado de infecção suspeita ou comprovada.

SEPSE GRAVE

Sepse mais um dos seguintes: disfunção cardiovascular ou insuficiência respiratória aguda ou duas ou mais outras disfunções orgânicas

CHOQUE SÉPTICO

Sepse e disfunção orgânica cardiovascular

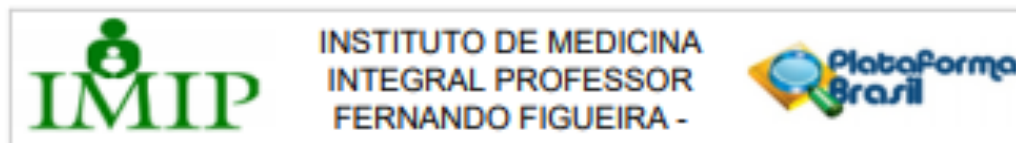
SINAIS VITAIS IDADE ESPECÍFICA

Idade	Frequência cardíaca/ bpm <hr/> Taquicardia bradicardia	Frequência Respiratória ipm	Contagem de leucócitos Leuc x 10 ³ /mm	Pressão sistólica mmHg
0 dias a uma semana	>180 <100	>50	>34	<65
1 semana a 1 mês	> 180 <100	>40	>19,5 ou < 5	<75
1 mês a 1 ano	>180 <90	>34	>17,5 ou <5	<100
2-5 anos	>140 NA	>22	>15,5 ou <5	<94
6-12 anos	>130 NA	>18	>13,5 ou < 4,5	<105
13 a <18 anos	>110 NA	>14	>11 ou <4,5	<117

NA – Não se aplica

DISFUNÇÃO CARDIOVASCULAR		CVC
DIAGNÓSTICO: apesar da administração em bolo de SF \geq 40 ml/Kg em 1 hora <input type="checkbox"/> 1 principal ou <input type="checkbox"/> 2 secundários		
PRINCIPAL <input type="checkbox"/> queda da PA abaixo do percentil 5 para a idade ou - 2 DP abaixo do normal para a idade <input type="checkbox"/> necessidade de drogas vasoativas para manter PA normal (dopa ou dobuta $>$ 5 μ g/Kg/min, epinefrina ou noradrenalina em qualquer dose)	SECUNDÁRIO <input type="checkbox"/> acidose metabólica inexplicada (déficit $>$ 5 mEq/L) <input type="checkbox"/> aumento do lactato arterial superior a 2 x limite normal <input type="checkbox"/> débito urinário \leq 0,5 ml/Kg/H <input type="checkbox"/> tempo de preenchimento capilar $>$ 5 segundos <input type="checkbox"/> diferença entre temperatura central e periférica $>$ 3° C	
DISFUNÇÃO RESPIRATORIA		RPR
DIAGNÓSTICO: <input type="checkbox"/> $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300$ na ausência de cardiopatia cianogênica ou doença pulmonar crônica (um dos citados) <input type="checkbox"/> $\text{PaCO}_2 > 65$ ou 20 mm Hg acima da PaCO_2 basal <input type="checkbox"/> Necessidade comprovada ou $\text{FiO}_2 > 50\%$ para manter saturação $\geq 92\%$ <input type="checkbox"/> Necessidade não eletiva de ventilação invasiva ou não invasiva (paciente em POI que desenvolve processo inflamatório ou infeccioso que impede a extubação) SDRA/"SARA" = $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 200$ + estabelecimento agudo + infiltrados bilaterais sem sinais de IC esquerda LPA (lesão pulmonar aguda) = mesma definição que SARA com $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300$		
DISFUNÇÃO NEUROLOGICA		NEU
DIAGNÓSTICO: <input type="checkbox"/> Escala de Coma de Glasgow (ECG) $<$ 11 (um dos citados) <input type="checkbox"/> mudança aguda do estado neurológico ou queda da ECG ≥ 3 em relação ao anterior		
DISFUNÇÃO HEMATOLOGICA		HEM
DIAGNOSTICO: <input type="checkbox"/> plaquetas $<$ 80.000 (um dos citados) <input type="checkbox"/> plaquetas com queda superior a 50% em relação a maior contagem dos últimos 3 dias (doentes crônicos hematológicos ou oncológicos) <input type="checkbox"/> INR $>$ 2		
DISFUNÇÃO RENAL		REN
(um dos citados) <input type="checkbox"/> creatinina sérica superior a 2 vezes o normal para a idade <input type="checkbox"/> creatinina sérica superior a 2 vezes o basal para o paciente		
DISFUNÇÃO HEPATICA		HEP
(um dos citados) <input type="checkbox"/> bilirrubina sérica ≥ 4 mg% (não valido para RN) <input type="checkbox"/> alanina transaminase $>$ normal para idade		

ANEXO II – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO PAPEL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE PLAQUETAS NA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA MENINGOCÓCICA INVASIVA

Pesquisador: LEURIDAN CAVALCANTE TORRES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29385614.1.0000.5201

Instituição Proponente: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP/PE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.518.638

Apresentação do Projeto:

Adequada

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel de mediadores de plaquetas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

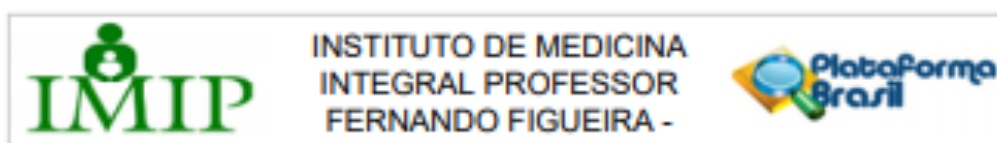
Emenda aceita e aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua dos Coelhos, 300
Bairro: Boa Vista **CEP:** 50.070-550
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2122-4756 **Fax:** (81)2122-4762 **E-mail:** comitedeetica@imip.org.br



Continuação do Parecer: 2.518.638

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_438409_E1.pdf	27/11/2014 18:46:55		Aceito
Outros	EMENTA.pdf	27/11/2014 18:45:05		Aceito
Outros	Carta de Anuência CAM.pdf	27/11/2014 18:44:32		Aceito
Outros	TCLE Paciente COM ALTERAÇÕES.docx	27/11/2014 18:44:10		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_293856.pdf	27/03/2014 23:11:48		Aceito
Folha de Rosto	fol_rosto 001.jpg	27/03/2014 23:09:49		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_293856.pdf	26/03/2014 22:57:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE CONTROLE.docx	21/03/2014 16:54:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Paciente.docx	21/03/2014 16:54:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	21/03/2014 16:54:05		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:


Não

RECIFE, 28 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Gláucia Virgínia de Queiroz Lins Guerra
(Coordenador)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300
Bairro: Boa Vista CEP: 50.070-550
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2122-4756 Fax: (81)2122-4782 E-mail: comitedeetica@imip.org.br

ANEXO III – Carta de anuência do HCP


GOVERNO DO ESTADO
DE PERNAMBUCO


GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO
HOSPITAL CORREIA PICANÇO

Recife, 15 de outubro de 2015.

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos que anuímos com a realização da pesquisa intitulada **“Perfil das Moléculas Coestimuladoras da Sepse Meningocócica.”** sob a orientadora Profª Drª. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte, com participação das pesquisadoras Leuridan Torres e Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes com o compromisso dos autores de divulgar o nome do Hospital nos resultados da pesquisa, assim como, fornecer uma cópia do estudo para nossa instituição ao final do mesmo seja na forma de monografias, dissertações, teses artigos publicados, entre outros.

Atenciosamente,


Rodrigo da Cunha Menezes
Gerente Geral
Hospital Correia Picanço

HOSPITAL CORREIA PICANÇO
Dr. Rodrigo da Cunha Menezes
GERENTE GERAL - FONE: 332.2857-3

Rua Padre Boena, Nº 149 – Tamarineira – Recife/PE
Fone: 3184-3960 (central)
e-mail: hcpdiretoria@hotmail.com ou hospcp@saude.pe.gov.br

ANEXO IV – Carta de Anuência do Maria Lucinda



CARTA DE ANUÊNCIA

Recife, 27 de junho de 2018

Declaramos que anuímos com a pesquisa intitulada de PERFIL DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS (sCD40L, sCD40 E sOX40) CIRCULANTES De RESPOSTA IMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA MENINGOCÓCICA INVASIVA sob a coordenação da Prof^a Dr^a Maria do Carmo M. B Duarte e Co-orientadora Prof^o Dr^o Leuridan Cavalcante Torres, procedente de Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Siqueira (IMIP), com a participação das alunas Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes e Manuela Guimarães *Clemente*, com o compromisso dos autores de divulgar o nome do Hospital nos resultados, assim como fornecer uma cópia do estudo à instituição ao final do tnesmo, seja na forma de monografias, teses, dissertações, artigos publicados, entre outros,

Atenciosamente

Luiz Alberto Pere

Hospital Maria Lucinda

Av. Pamamirim, 95 - Pamamirim, Recife - PE, 52060-000

Telefone: (81) 3267-4200

ANEXO V – Instruções aos autores PedCCM

https://journals.lww.com/pccmjournal/Documents/PCC_Inst_for_Authors.pdf



Pediatric Critical Care Medicine is an international, peer-reviewed journal that is interested in publishing the highest quality scientific studies in the field of pediatric critical care medicine.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts are submitted through Editorial Manager®, a Web-based manuscript tracking system in use by SCCM. This system allows authors to add a new manuscript or check the status of a submitted manuscript, while shortening the time needed for processing manuscripts in the Editorial Office and through peer review. To submit manuscripts for consideration, go to www.sccm.org, choose *Pediatric Critical Care Medicine* under the Publications tab, then select "Submit Manuscripts." Once you reach the Editorial Manager® home page, log on to the system by creating an account or entering through your existing account.

Editorial Manager® will easily guide authors through the manuscript submission process. Required information pertaining to the manuscript includes the name, address, telephone number, and e-mail address for the first author and all contributing authors, affiliated institutions, title of the manuscript, abstract, and key words. If authors wish, they may provide optional information that includes author's suggested reviewers and author's nonpreferred reviewers. The Editorial Office will automatically be notified of the submission and will send an e-mail confirming the submission of the manuscript to the author(s). After editorial office review of the submitted documents, a manuscript number will be assigned to each submitted manuscript, which will be used in all correspondence.

Each manuscript submission should designate one corresponding author and all contributing authors. The number of authors should be restricted to only those persons who have truly participated in the conception, design, execution, and writing of the manuscript. Authors must disclose any potential financial or ethical conflicts of interest regarding the contents of the submission.

SCCM accepts no responsibility for manuscripts that are lost or destroyed through electronic or computer problems. Authors are encouraged to keep copies of submitted manuscripts, including figures. If an author does not receive confirmation of submission into Editorial Manager® within two days, he or she should contact the Editorial Office at journals@sccm.org.

Copyright. Each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html). The form must be completed by each author. When the corresponding author submits the manuscript, the co-authors are automatically sent an e-mail containing a link to complete the form online. For additional information about electronically signing this form, go to <http://links.lww.com/ZUATA106>.

Compliance With NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements. A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, Wolters Kluwer will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Financial Disclosure and Conflicts of Interest. Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional, and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding." For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: "Author A" has received honoraria from "Company 1." "Author B" is currently receiving a grant (#12345) from "Organization Y," and is on the speaker's bureau for "Organization X" — the CME organizers for Company 1. For the remaining authors none were declared.

Human and Animal Subjects. All studies of human subjects must contain a statement within the Materials and Methods section indicating approval of the study by the Insti-

tutional Review Board (or institutional review body) that subjects have signed written informed consent, or that the Institutional Review Board waived the need for informed consent. **Before your submission can be sent out for peer review, it is necessary that you address this issue of institutional review approval.** This is in accordance with the International Committee of Journal Editors uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Please see <http://www.icmje.org> for more details. All animal studies must contain a statement within the Materials and Methods section confirming approval by the Institutional Animal Care and Use Committee and that the care and handling of the animals were in accord with National Institutes of Health guidelines or other internationally recognized guideline for ethical animal treatment.

Statistical Review. Any study containing quantitative data and statistical inference should be reviewed by a consultant with formal statistical training and experience.

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts must conform to *Pediatric Critical Care Medicine* Instructions for Authors and/or the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals," which can be found on the International Committee of Medical Journal Editors Web site, www.icmje.org. Manuscripts must be double-spaced with pages numbered consecutively, beginning with the title page. Each paragraph should be indented with a tab. The text portion of each manuscript should be in Microsoft Word format, including references and figure legends. Figures can be saved in .tif or .eps format in 300 dpi or higher. Tables should be submitted as Microsoft Word files; spreadsheets are not acceptable. Figures should be saved as separate files and uploaded after the text upload is complete. Specific guidelines for figure formatting are found on the Editorial Manager® home page. Documents submitted in pdf format are not acceptable.

When uploading the text, tables, and figures into Editorial Manager®, there is the option of entering files for review and files for production. Files for review are viewable by the editorial staff, the editor, and the reviewers. These documents should include all text, tables, and figures, as well as any special referenced material. Files for production are only seen by the editorial staff and will not be seen by reviewers.

MANUSCRIPT CONTENT

Title Page. The title page should contain 1) the title; 2) first name, middle initial, and last name of each author; 3) highest academic degrees, fellowship designations, and institutional affiliation for each author; 4) name of the institution(s) where the work was performed; 5) the address for reprints and a statement regarding whether reprints will be ordered; and 6) financial support used for the study, including any institutional departmental funds. The authors should also provide six key words for indexing, using terms from the Medical Subject Headings list of Index Medicus. Structured abstracts are required for all manuscripts (except editorials, letters, and book reviews) submitted to *Pediatric Critical Care Medicine*.

Editorial Manager® will prompt authors to input the above information into specific fields as they are submitting their manuscript. Authors should also upload their title page and structured abstract with the body of their manuscript. It is also important to note that if there is formatted text or Greek letters or symbols in the title or abstract, special coding is necessary and the Character Palette in Editorial Manager® will need to be used. *It is not necessary to code special characters and formats in the actual manuscript.*

Abstract. Abstracts should be no more than 300 words in length and must have the following headings: Objective, Design, Setting, Patients (for Clinical Investigations) or Subjects (for Laboratory Investigations), Interventions, Measurements and Main Results, and Conclusions. Review papers and special articles should use these headings in the abstract: Objective, Data Sources, Study Selection, Data Extraction, Data Synthesis, and Conclusions. For details regarding the preparation of structured abstracts, refer to the *American Medical Association Journal of Style*, Tenth Edition (p. 20-23).

Article Tweet. Each manuscript will be required to have a tweet entered on the manuscript submission page that can be used for dissemination on social media if the manuscript is accepted. Tweets are limited to 140 characters and should reflect the overall message of the manuscript. Examples of preferred tweet formats can be found at <https://twitter.com/pedcritcaremed>.

Text Material. The text should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions followed by Acknowledgments, References, Figure Legends, and Tables. Secretarial and editorial assistance are not acknowledged. Results may be presented in the text, in the figures, or in the tables. The Discussion section should interpret the results without unnecessary repetition. References to related studies should be included in the text section.

In addition, the following should be observed:

- The full term for which an abbreviation stands should be used at its first occurrence in the text unless it is a standard unit of measure. The abbreviation should appear in parentheses after the full term. Abbreviations should not be in the title, figure legends or table titles.
- For standard American units, do not use values that are more significant than your analysis is capable of accurately measuring (e.g., Pa, 84 torr [11.2 kPa], not 83.7 torr).
- Hemodynamic measurements for pressure (e.g., MAP) should appear in mm Hg and gas tension measurements (e.g., Po₂) should appear in torr with SI units in parentheses. The units of vascular resistance are dyne·sec/cm⁵.
- Please provide r² values for parametric data.

References. All references should be cited in sequential order in the text and typed on a separate sheet of paper. References should be identified in text, tables, and legends by full-size Arabic numerals on the line and in parentheses. Do not use wordprocessing footnote, endnote, or paragraph numbering functions to make a list of references. Titles of journals should be set in italics and abbreviated according to the style used in *Index Medicus*. If journal titles are not listed in *Index Medicus* they should be spelled out. Unpublished data or personal communications should be noted parenthetically within the text but not in the References section. Inclusive page numbers (e.g., p. 1-10) should be used for all references. Listed below are samples of standard references; however, a complete listing of references can be found on the International Committee of Medical Journal Editors Web site, www.icmje.org.

Standard Journal Article: Bone RC, Fisher CJ, Ciemer TP, et al: Sepsis syndrome: A valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989, 17:389-393

Standard Book with Authors: Covatta JM, Taylor RW, Kirby RR. *Critical Care*. Third Edition. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 1995

Standard Book with Editor: Norman LJ, Refen SJ (Eds): *Mental Health Care for Elderly People*. New York, Church & Livingstone, 1996

Standard Chapter in a Book: Phillips SJ, Whisnant JP: Hypertension and stroke. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Laragh JH, Brenner BM (Eds). Second Edition. New York, Raven Press, 1995, pp 465-478

Standard Web Site/Electronic Forum: Marion DW, Domeier R, Dunham CM, et al: Practice management guidelines for identifying cervi-

cal spine injuries following trauma. Available at: <http://www.aast.org>. Accessed July 1, 2000

Equations. Equations should be created as normal text or as images. The use of equation editors or utilities may not convert correctly during the manuscript submission process and their use is discouraged.

Tables and Figures. The number of figures and tables should be appropriate for the length of the manuscript; do not use superfluous illustrations. Materials reproduced from another published source must be labeled "Reproduced with permission from..." In addition, a letter granting permission to reproduce the materials from the copyright holder must be received by SCCM when the manuscript is submitted for review. If the manuscript is accepted for publication, it will not be able to be printed unless this permission letter has been submitted. Adapted figure or table materials must be labeled "Adapted with permission from..." Letters of permission are also required for adapted materials. A sample of a permission request can be found on Editorial Manager® in the instruction section.

Tables. Do not use tabs to create tables and do not use table editors. Table building utilities will convert, providing that no special images were inserted. Do not reiterate tabular data in the text. Do not use abbreviations in table titles. Do not use all capital letters in table headings and text. Do not use center, decimal tab, and justification commands. Do not use spaces to separate columns. Use a single tab, not a space, on either side of the π symbol. Do not underline or draw lines within tables. Footnoted information should be referenced using italicized, superscript, lower case letters (i.e., ^a) in alphabetical order (reading from left to right). Avoid lengthy footnotes and insert descriptive narratives in the text.

Figures

A) Creating Digital Artwork

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork: <http://links.lww.com/ES/A42>
2. Create, scan, and save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guidelines Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager® in conjunction with your manuscript text and tables.

B) Digital Artwork Guidelines Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital art.

- Artwork should be saved as .tif or .eps files.
- Artwork is created as the actual size (or slightly larger) it will appear in the journal. (To get an idea of the size images should be when they print, study a copy of the journal to which you wish to submit. Measure the artwork typically shown and scale your image to match.)
- Crop out any white or black space surrounding the image.

- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi.
- Photographs, radiographs, and other half-tone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

- Cite figures consecutively in your manuscript.
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager® Web site and number figures consecutively in the Description box during upload.

For captions and variables within a figure, use Helvetica (or Arial) font, if possible, in upper and lower case letters. Radiographic prints must have arrows (if applicable) for clarity. Color photographs will occasionally be published in the journal if use of color is vital to making the point; authors will be charged the cost of color reproduction. Figures that do not conform to these specifications will be sent back to the corresponding author for correction.

Figure legends should contain enough information for the reader to understand the illustration without referring to the text, but should be concise and should not repeat information already stated in the text. Figure legends should be typed on a separate page. Figures must be referenced sequentially in the text. Authors must assume charges for changes made to figures after manuscripts are accepted.

Units of Measure. Authors should provide units of measurement in SI units. Authors should refer to the *American Medical Association Manual of Style*, Tenth Edition (p. 787) for details regarding SI units for laboratory data.

Manufacturer. Provide in parentheses the model number, name of manufacturer, their city, and state or country, for all equipment described in the paper.

Drug Names. Only generic drug names should be used. Trademark or brand names should not be used except in specific cases where the brand name is essential to reproduce or interpret the study. These exceptions should be noted in accompanying correspondence. The manufacturer with the city, state, and country must be provided for any brand name drugs.

Permissions. Any submitted materials that are to be reproduced (or adapted) from copyrighted publications must be accompanied by a written letter of permission from the copyright holder. Accepted manuscripts will be

delayed if necessary permissions are not on file. A sample of a permission request can be found on Editorial Manager® in the instruction section.

Supplemental Digital Content. Authors may submit supplemental digital content to enhance their article's text and to be considered for online-only posting. Supplemental digital content may include the following types of content: text documents, graphs, tables, figures, graphics, illustrations, audio, and video. Cite all supplemental digital content consecutively in the text. Citations should include the type of material submitted, should be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," should include a sequential number, and should provide a brief description of the supplemental content. Provide a legend of supplemental digital content at the end of the text. List each legend in the order in which the material is cited in the text. The legends must be numbered to match the citations from the text. Include a title and a brief summary of the content. For audio and video files, also include the author name, videographer, participants, length (minutes), and size (MB). Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from supplemental digital content unless they obtain written consent from the patients and submit written consent with the manuscript. Copyright and Permission forms for article content including supplemental digital content must be completed at the time of submission.

Supplemental Digital Content Size and File Type Requirements: To ensure a quality experience for those viewing supplemental digital content, it is suggested that authors submit supplemental digital files no larger than 10 MB each. Documents, graphs, and tables may be presented in any format. Figures, graphics, and illustrations should be submitted with the following file extensions: .tif, .eps, .ppt, .jpg, .pdf, .gif. Audio files should be submitted with the following file extensions: .mp3, .wma. Video files should be submitted with the following file extensions: .wmv, .mov, .qt, .mpeg, .mp4. Video files should also be formatted with a 320 x 240 pixel minimum-screen size. For more information, please review Wolters Kluwer's requirements for submitting supplemental digital content: <http://links.lww.com/A142>.

MANUSCRIPT CATEGORIES

Guidelines for the most frequent types of articles submitted to the journal are summarized below.

Clinical Investigations. These include randomized controlled trials, case-control series, and retrospective studies, among others. Within this category, we also feature four subspecialty categories including: Cardiac Intensive Care, Neonatal Intensive Care, Neurocritical Care, and Quality and Safety. This category of manuscript

has a word limit of 2000 to 4000 words (8-16 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; the Discussion section of the manuscript should be limited to no more than 1500 words; a maximum of 40 references; and no more than 7 Figures and/or Tables.

Laboratory Investigations. These include laboratory and animal research. This category of manuscript has a word limit of 2000 to 4000 words (8-16 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; the Discussion section of the manuscript should be limited to no more than 1500 words; a maximum of 40 references; and no more than 7 Figures and/or Tables.

Review Articles. These consist of critical assessment of literature and data pertaining to clinical topics. In review articles, emphasis should be placed on cause, diagnosis, therapy, prognosis, and prevention. Information concerning the type of study or analysis, population, intervention, and outcome should be included for all data used. The selection process used for all data should be described. Meta-analyses will be considered as review papers. The recommended length of review articles is 2000 to 3000 words (8-12 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; a maximum of 100 references; and no more than 10 Figures and/or Tables.

Brief Reports. These should be short reports of original studies or evaluations. The recommended length of brief reports is no more than 1500 words (6 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; a maximum of 25 references; and no more than 2 Figures and/or Tables.

PCCM Perspectives. These include articles that may fall outside the realm of formal clinical or basic science research, such as social policy, professional education, ethical dilemmas, and delivery of compassionate care. The recommended length is no more than 1500 words (6 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; a maximum of 25 references; and no more than 4 Figures and/or Tables.

Evidence-Based Journal Club. These articles provide an evidence-based critique of a recent important paper in the field of pediatric critical care medicine. The recommended length is no more than 1500 words (6 typed double-spaced pages) which includes an abstract of no more than 300 words; a maximum of 25 references; and no more than 4 Figures and/or Tables.

Letters to the Editor. Letters to the Editor are encouraged. Letters must specifically address a recent article published in *Pediatric Critical Care Medicine*. They should be no more than 500 words (2 typed double-spaced pages) with a maximum of 5 references.

Invited Editorial These represent commentaries addressing newly published articles in the journal and are by invitation only. Invited editorials should be no more than 1300 words (5 typed double-spaced pages) with a maximum of 15 references and a maximum of 2 Figures and/or Tables.

EDITORIAL REVIEW

All manuscripts will be reviewed by Editorial Board members or consultants selected by the editor-in-chief. Initial editorial reviews usually are completed within 8-10 weeks of manuscript submission. The time required for review of revised manuscripts is variable.

ACCEPTANCE

All information regarding the accepted manuscript and its publication date are confidential. No information regarding the manuscript can appear in print, on the television or radio, or in any electronic form until the day before its publication date. It cannot be released to the media until the day before the publication date.

Manuscripts accepted for publication are copy-edited and returned to the author for approval. Authors are responsible for all statements published in their work, including any changes made by the copyeditor. Authors are encouraged to proofread all edited manuscripts carefully. The journal reserves the right to charge authors for excessive changes made to the text and figures at the page proof stage.

Permissions

For permission and/or rights to use content for which the copyright holder is the Society of Critical Care Medicine or Wolters Kluwer, please go to the journal's Web site and after clicking on the relevant article, click on the "Request Permissions" link under the "Article Tools" box that appears on the right side of the page. Alternatively, send an e-mail to customerservice@copyright.com.

For Translation Rights & Licensing queries, contact Translations Rights & Licensing, contact Andrew White, Wolters Kluwer, Inc., Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103. Telephone: 215-521-8953; E-mail: andrew.white@wolterskluwer.com.

For Special Projects and Reprints (U.S./Canada), contact Alan Moore, Director of Sales, Wolters Kluwer, Inc., Two Commerce

Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103. Telephone: 215-521-8638. E-mail: alan.moore@wolterskluwer.com.

For Special Projects and Reprints (non-U.S./Canada), contact the Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Telephone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: TranslationRights@wolterskluwer.com.

OPEN ACCESS

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The article processing charge (APC) is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by the author, funding agency or institution. Payment must be processed for the article to be published open access. For a list of journals and pricing, please visit our Wolters Kluwer Open Health Journals page (<http://www.wkopenhealth.com/journals.php>).

Authors Retain Copyright

Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant Wolters Kluwer an exclusive license to publish the article and the article is made available under the terms of a Creative Commons user license. Please visit our Open Access Publication Process page (<http://www.wkopenhealth.com/process.php>) for more information.

Creative Commons License

Open access articles are freely available to read, download and share from the time of publication under the terms of the Creative Commons License Attribution-Non-Commercial No Derivative (CC BY-NC-ND) license (<http://creativecommons.org/licenses/>). This license does not permit reuse for any commercial purposes nor does it cover the reuse or modification of individual elements of the work (such as figures, tables, etc.) in the creation of derivative works without specific permission.

Compliance with Funder Mandated Open Access Policies

An author whose work is funded by an organization that mandates the use of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/>) is able to meet that requirement through the available open access license for approved funders. Information about the approved funders can be found here: <http://www.wkopenhealth.com/inst-fund.php>.

When an OA option is chosen after acceptance, the Corresponding Author (on behalf of all authors) will also sign a License to Publish.

The authors will retain the copyright.

It is the responsibility of the Corresponding Author to inform the *Pediatric Critical Care Medicine* Editorial Office that they have RCUK or Wellcome Trust funding. Neither the SCCM nor Wolters Kluwer, Inc., will be held responsible for retroactive deposits to PMC if the author has not completed the proper forms.

FAQ for Open Access

<http://www.wkopenhealth.com/openaccessfaq.php>

REPRINTS

Authors will receive an e-mail notification with a link to the order form soon after their article publishes in the journal (<https://shop.hww.com/author-reprint>). Reprints are normally shipped 6-8 weeks after publication of the issue in which the article appears. E-mail authorreprints@wolterskluwer.com with any questions.

CONTACT

Questions regarding the status of submitted manuscripts are best answered by logging on to the FAQ section of Editorial Manager®. The assigned manuscript number will allow authors to view the status of their manuscript. If authors need additional information regarding a manuscript, please send an e-mail to journals@sccm.org and include your manuscript number in the request, or call (847) 827-6869 Monday through Friday, from 0800 to 1700, Central Standard Time.

Correspondence can also be sent to:
Patrick M. Kochanek, MD, MCCM
Editor, *Pediatric Critical Care Medicine*
Society of Critical Care Medicine
500 Midway Drive
Mt. Prospect, IL 60056

ANEXO VI – Orientações para submissão de artigo JAMA Pediatrics

JAMA
Pediatrics



Research Letters are concise, focused reports of original research. Max 600 words of text and 6 references and may include up to 2 tables or figures. 7 authors. The text should include the full name, academic degrees, and a single institutional affiliation for each author and the email address for the corresponding author. Other persons who have contributed to the study may be indicated in an Acknowledgment, with their permission, including their academic degrees, affiliation, contribution to the study, and an indication if compensation was received for their role. In general, RL should be divided into the following sections: Introduction, Methods, Results, and Discussion. They should not include an abstract, but otherwise should follow all of the guidelines in [Manuscript Preparation and Submission Requirements](#).

Manuscript Submission - submitted [online manuscript submission and review system](#).

At the time of submission, complete contact information (affiliation, postal/mail address, email address, and telephone numbers) for the corresponding author is required. First and last names, email addresses, and institutional affiliations of all coauthors are also required. After manuscript submission, all authors of papers under consideration for publication will be sent a link to the Authorship Form to complete and submit.

Manuscript Components - Include in the manuscript file a title page, abstract, text, references, and as appropriate, figure legends and tables. Start each of these sections on a new page, numbered consecutively, beginning with the title page. Figures should be submitted as separate files (1 file per figure) and not included in the manuscript text.

Recommended File Sizes - We recommend individual file sizes of no more than 500 kB and not exceeding 1 MB, with the total size for all files not exceeding 5 MB (not including any video files).

Manuscript File Formats - For submission and review, please submit the manuscript as a Word document. Use **10-, 11-, or 12-point font size, double-space text, and leave right margins unjustified (ragged)**.

Findings: Results of the study/review. Include the design (eg, clinical trial, cohort study, case-control study, meta-analysis). Focus on primary outcome(s) and finding(s). Do not emphasize secondary outcomes. Report basic numbers only but state if results are statistically significant or not significant; do not include results of statistical tests or measures of variance (see example below). Can include 1 to 2 sentences.

Meaning: Key conclusion and implication based on the primary finding(s). Limit to 1 sentence.

Participants: State the clinical disorders, important eligibility criteria, and key sociodemographic features of patients (or other study participants). The numbers of eligible participants and how they were selected should be provided, including the number

approached but who refused or were excluded. For selection procedures, these terms should be used, if appropriate: random sample (where random refers to a formal, randomized selection in which all eligible individuals have a fixed and usually equal chance of selection); population-based sample; referred sample; consecutive sample; volunteer sample; convenience sample. If matching is used for comparison groups, characteristics that are matched should be specified. In follow-up studies, the proportion of participants who completed the study must be indicated.

Note: The preceding 3 sections are usually combined for accepted papers during the editing process as "Design, Setting, and Participants," but for manuscript submission these sections should be kept separate.

Main Outcome(s) and Measure(s): Indicate the primary study outcome measurement as planned before data collection began. If the manuscript does not report the main planned outcomes of a study, this fact should be stated and the reason indicated.

Results: Summary demographic information (eg, characteristics such as sex and age) and the number of study participants should be reported in the first sentence of the Results paragraph. The main outcomes of the study should be reported and quantified, including final included/analyzed sample. When possible, present numerical results (eg, absolute numbers and/or rates) with appropriate indicators of uncertainty, such as confidence intervals. Use means and standard deviations (SDs) for normally distributed data and medians and ranges or interquartile ranges (IQRs) for data that are not normally distributed.

Conclusions and Relevance: Provide only conclusions of the study that are directly supported by the results. Give equal emphasis to positive and negative findings of equal scientific merit. Also, provide a statement of relevance indicating implications for clinical practice or health policy, avoiding speculation and overgeneralization. The relevance statement may also indicate whether additional study is required before the information should be used in clinical settings.

Abbreviations

Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text. Expand all abbreviations at first mention in the text.

References: Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. Number references in the order they appear in the text; do not alphabetize. In text, tables, and legends, identify references with superscript arabic numerals. When listing references, follow [AMA style](#) and abbreviate names of journals according to the journals list in [PubMed](#). List all authors and/or editors up to 6; if more than 6, list the first 3 followed by "et al." Note: Journal references should include the issue number in parentheses after the volume number.

Tables and Figures: Restrict tables and figures to those needed to explain and support the argument of the article and to report all outcomes identified in the Methods section. Number each table and figure and provide a descriptive title for each. Every table and figure should have an in-text citation.

Frequency data should be reported as "No. (%)," Whenever possible, proportions and percentages should be accompanied by the actual numerator and denominator from which they were derived. This is particularly important when the sample size is less than 100. **Do not use decimal places (ie, xx%, not xx.xx%) if the sample size is less than 100.**

Tables have a minimum of 2 columns. **Do not duplicate data in figures and tables.** For all primary outcomes noted in the Methods section, exact values with measures of uncertainty should be reported in the text or in a table and in the Abstract, and not only represented graphically in figures.

All symbols, indicators, line styles, and colors in statistical graphs should be defined in a key or in the figure legend. Axes in statistical graphs must have labels. Units of measure must be provided for continuous data.

- Number all tables in the order of their citation in the text.
- **Include a brief title for each table (a descriptive phrase, preferably no longer than 10 to 15 words).**
- Include all tables at the end of the manuscript file.

Table Creation: Use the table menu in the software program used to prepare the text. Tables can be built de novo using Insert→Table or copied into the text file from another document (eg, Word, Excel, or a statistical spreadsheet).

Avoid using tabs, spaces, and hard returns to set up the table; such tables will have to be retyped, creating delays and opportunities for error.

Tables should be single-spaced and in a **10- or 12-point font** (do not shrink the point size to fit the table onto the page). Do not draw extra lines or rules—the table grid will display the outlines of each cell.

Each piece of data needs to be contained in its own cell. Do not try to align cells with hard returns or tabs; alignment will be imposed in the production system if the paper is accepted. Although individual empty cells are acceptable in a table, be sure there are no empty columns. To show an indent, add 2 spaces.

When presenting percentages, include numbers (numerator and denominator).

Place each row of data in a separate row of cells, and note that No. (%) and measures of variability are presented in the same cell as in the example [Table 1](#) below:

Table 1. Baseline Values in the Editors' Health Study

SI conversion factors: To convert cholesterol to mmol/L, multiply values by 0.0259.

If a table must be continued, repeat the title and column headings on the second page, followed by "(continued)."

Table Footnotes

Footnotes to tables may apply to the entire table, portions (eg, a column), or an individual entry. The order of the footnotes is determined by the placement in the table of the item to which the footnote refers. When both a footnote letter and reference number follow data in a table, set the superscript reference number first followed by a comma and the superscript letter. Use superscript letters (a, b, c) to mark each footnote and be sure each footnote in the table has a corresponding note (and vice versa). List abbreviations in the footnote section and explain any empty cells. If relevant, add a footnote to explain why numbers may not sum to group totals or percentages do not add to 100%.