



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Taís Thomsen Silveira

**ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ERITROCITÁRIAS DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO  
COM DESFECHOS CLÍNICOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS GRAVEMENTE DOENTES COM  
SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA**

Florianópolis  
2024

**Taís Thomsen Silveira**

**ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ERITROCITÁRIAS DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO  
COM DESFECHOS CLÍNICOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS GRAVEMENTE DOENTES COM  
SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Nutrição  
Orientadora: Profa. Yara Maria Franco Moreno, Dra.  
Coorientador: Prof. Heitor Pons Leite, Dr.

Florianópolis  
2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Thomsen Silveira, Taís

Associação das concentrações eritrocitárias de zinco, cobre e selênio com desfechos clínicos em pacientes pediátricos gravemente doentes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica / Taís Thomsen Silveira ; orientador, Yara Maria Franco Moreno, coorientador, Heitor Pons Leite, 2024.

79 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Sepsis. 3. Pediatria. 4. Elementos traço . 5. Disfunção de órgãos. I. Franco Moreno, Yara Maria. II. Pons Leite, Heitor. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. IV. Título.

Taís Thomsen Silveira

**ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ERITROCITÁRIAS DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO  
COM DESFECHOS CLÍNICOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS GRAVEMENTE DOENTES COM  
SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 5 de 4 de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Roberto José Negrão Nogueira, Dr.  
FCM/UNICAMP

Profa. Maria Izabel Siqueira de Andrade, Dra.  
FANUT/UFAL

Profa. Elisabeth Wazlawik, Dra.  
PPGN/UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Nutrição.

Profa. Ana Carolina Fernandes, Dra.  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição

Profa. Yara Maria Franco Moreno, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2024



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, por fornecer um ensino público de qualidade e pela formação acadêmica de excelência que me trouxeram maiores oportunidades na vida acadêmica, abrindo as portas da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, pela estrutura e apoio para a realização da pesquisa, e ao seu corpo docente por todos os ensinamentos valiosos para a minha formação profissional e acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a dedicação exclusiva na realização do curso de doutorado.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Yara Maria Franco Moreno, por sua orientação excepcional durante todo o processo de doutorado. Sua expertise, apoio e incentivo foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Agradeço de coração por ter ido muitas vezes além da sua obrigação. Além disso, sou imensamente grata pela compreensão e carinho que demonstrou em todos os momentos, tornando esta jornada não apenas educativa, mas também reconfortante. Seu impacto positivo em minha vida acadêmica e pessoal será eternamente valorizado.

Ao meu estimado co-orientador, Prof. Dr. Heitor Pons Leite, gostaria de expressar minha sincera gratidão, por sua valiosa contribuição e apoio ao longo desta jornada de doutorado. Sua disposição em aceitar co-orientar meu trabalho e confiar em nossa parceria foi verdadeiramente inspiradora e significativa para mim. Foi um privilégio poder aprender com sua vasta experiência e conhecimento especializado, que enriqueceram profundamente minha compreensão do tema. Sua orientação metódica e insights perspicazes foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço sinceramente por sua orientação contínua, paciência e incentivo, que foram essenciais para alcançar este marco em minha carreira acadêmica.

Às colegas Grupo de Pesquisa em Nutrição Baseada em Evidências para a Prática Clínica (INTEGRATE), pelos momentos de convivência e aprendizado. Em especial a Daniela B. Hauschild, Júlia C. Ventura e Luna D. A. Oliveira por todas as segundas-feiras felizes, mimosas, viagens divertidas e muito mais! Espero que a nossa amizade perdure por muitos e muitos anos!

Em especial quero agradecer às amigas que o doutorado meu deu, às minhas twin flames, Bruna Cunha Mendes e Gilciane Ceolin.

À Bruna, agradeço imensamente por me mostrar como eu posso ser melhor, e por me fazer acreditar em mim e reconhecer meu próprio valor. Obrigada pela sua constante presença e disponibilidade, por me dar carinho, apoio, honestidade, amor, acolhimento e muitas (mas muitas) risadas. Muito, obrigada por me ensinar a jogar uma bola de basquete na cesta. Antes disso, eu achava que a vida era um jogo e eu não sabia jogar, mas você me ensinou a pensar diferente. É um privilégio poder te acompanhar e presenciar a tua genialidade. Espero que a nossa amizade continue a crescer, e que a gente possa continuar dançando juntas. Você com toda a graça e ritmo que tem, e eu com meu jeitinho.

À Gil, gostaria de expressar minha profunda gratidão por sua presença constante em minha vida e pelos inúmeros momentos preciosos que compartilhamos juntas. Você não apenas é uma amiga incrível, mas também uma ouvinte excepcional, sempre pronta para oferecer apoio e conforto nos momentos em que mais precisei. Admiro imensamente sua mente aberta e sua habilidade de questionar as verdades absolutas, o que nos permite explorar novos conceitos e perspectivas juntas. Que nossa amizade continue a crescer e florescer, assim como os belos projetos que você cria com suas mãos talentosas.

Ao meu marido, Guilherme Zanotelli dos Santos, por todo apoio moral e técnico ao longo de todo esse processo, desde o meu TCC, passando pelo mestrado e agora pelo doutorado. Muito obrigada por cuidar de mim quando eu precisei de cuidado. Muito obrigada por me entender mesmo quando eu não sabia me explicar. Muito obrigada por me contar sobre as estrelas, e como nós vemos apenas um lado da lua, para que minha mente ansiosa pudesse ter alguns minutos de tranquilidade. Eu poderia escrever um livro sem fim contando todos os momentos em que você foi maravilhoso, mas resumindo, obrigada por ser você.

E por fim, agradeço à minha mãe Claudia Kraemer Thomsen Silveira e ao meu pai Luiz Carlos Muller Silveira, em primeiro lugar pela vida. Muito obrigada pelo apoio e amor incondicional. Vocês sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e me deram o que eu precisei para realizá-los. Sou, e serei eternamente grata por ter nascido filha de vocês, meus heróis. Ao meu irmão João Vítor Thomsen Silveira, obrigada por ser um exemplo de esforço e determinação, por me escutar e acreditar em mim quando eu mesma não acreditei. Obrigada por ser meu melhor amigo! Aos acadêmicos e docentes da minha família obrigada pela inspiração!

A todos que de alguma forma contribuíram e fizeram parte desse processo, muito obrigada.

## RESUMO

**Introdução:** Zn, Se e Cu são importantes para os sistemas antioxidante e de defesa imunológica, o que os torna essenciais para uma boa saúde e durante uma infinidade de doenças, especialmente em casos de doença grave e resposta inflamatória sistêmica, como a sepse. Esses elementos traço potencialmente impactam o prognóstico clínico, como disfunção de órgãos em crianças gravemente doentes com sepse. Os dados sobre elementos traço em crianças gravemente doentes são escassos e estudos observacionais apresentaram resultados contraditórios. Variáveis como idade e inflamação aguda podem afetar as concentrações plasmáticas e séricas de elementos traço em crianças gravemente doentes. No entanto, as medidas de elementos traço nos eritrócitos não estão associadas a condições agudas, como sepse. Ainda, os fatores de admissão associados às concentrações de elementos traço eritrocitários e os intervalos de referência para avaliação nesta população não são bem conhecidos. Portanto, esta tese teve como objetivo descrever o estado nutricional de Zn, Cu e Se e investigar sua associação com os fatores de admissão na UTIP em crianças gravemente doentes com sepse. Além disso, investigar o papel do Zn, Cu e Se na associação entre inflamação e disfunção de órgãos em crianças gravemente doentes com sepse. **Métodos:** Trata-se de uma análise secundária de 109 crianças com sepse internadas na UTIP de um hospital do sudoeste brasileiro entre agosto de 2014 e maio de 2016. Os dados demográficos foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Parâmetros antropométricos, PCR sérico, PCT e níveis de lactato foram medidos em até 72 horas da admissão na UTIP. Os eritrócitos Zn, Cu e Se foram coletados dentro de 24 horas após a admissão, suas concentrações expressas como nmol/g<sub>HB</sub>, e o status foi avaliado por gráficos percentis dependentes da idade. Os pacientes foram agrupados usando os níveis séricos mais elevados de PCR, PCT e lactato com o método *k*-means. As diferenças nas características basais entre grupos de inflamação foram analisadas usando o teste exato de Fisher, o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn e o teste de tendência quando aplicável. As associações entre a magnitude do cluster de inflamação e o tempo de internação e tempo de ventilação da UTIP foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e teste de log-rank. Foram aplicadas análises de regressão de Cox, bruta e ajustada, expressas como HRs e IC 95%. A associação entre a magnitude dos clusters de inflamação e dPELOD 2 foi avaliada por regressão de Poisson, bruta e ajustada, e expressa como coeficiente de IRR e IC 95%. A associação entre as concentrações de oligoelementos eritrocitários e os fatores de admissão foi realizada por meio de regressão linear bruta e ajustada, e expressa como  $\beta$  e IC 95%. O papel moderador das concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se na associação entre inflamação e magnitude da inflamação foi avaliado através de análise de interação. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ . **Resultados:** No total, 60% ( $n = 63$ ) eram do sexo masculino, com idade mediana de 25,4 [IQR: 7,3;93,4] meses. Quatro clusters foram identificados e rotulados como inflamação baixa ( $n=13$ ), leve ( $n=30$ ), moderada ( $n=36$ ) e alta ( $n=26$ ), com diferentes níveis de PCR e PCT. As crianças do grupo de alta inflamação apresentaram maior escore de disfunção orgânica e menor probabilidade de alta da UTIP. Na análise de sensibilidade, as crianças com choque séptico no grupo de alta inflamação tiveram menor probabilidade de receber alta da UTIP. As proporções de crianças com concentrações de oligoelementos eritrocitários abaixo de -3 escore z foram de 29,4% ( $n=32$ ) para Zn, 12,0% ( $n=13$ ) para Cu e 22,0% ( $n=24$ ) para Se. Utilizando um ponto de corte de -2 escore z, a maioria das crianças foi classificada com menor Zn (39,5%,  $n=43$ ), enquanto 18,4% ( $n=20$ ) apresentaram menor Cu e 25,7% ( $n=28$ ) apresentaram menor Se. O status eritrocitário de Zn, Cu e Se não foi associado à gravidade da doença, magnitude do cluster de inflamação, choque séptico, ventilação mecânica ou mortalidade. A idade foi inversamente associada ao Cu eritrocitário e ao Se, mas não ao Zn. Para crianças de um a dois anos e de dois a cinco anos, o aumento da idade representou uma diminuição no Cu eritrocitário ( $\beta = -0,33$ ; IC 95%: -0,60; -0,05;  $p = 0,02$ ,  $\beta = -0,28$ ; IC 95%: -0,52; -0,03;  $p = 0,02$ , respectivamente). Para crianças de cinco a 10 anos e maiores de 10 anos, o aumento da idade representou uma diminuição no Cu ( $\beta = -0,51$ ; IC 95%: -0,80; -0,22;  $p = 0,001$ ,  $\beta = -0,55$ ; IC 95%: -0,79; -0,29;  $p < 0,001$ , respectivamente) e Se ( $\beta = -0,40$ ; IC 95%: -0,73; -0,06;  $p = 0,02$ ,  $\beta = -0,40$ ; IC 95%: -0,68; -0,11;  $p = 0,007$ , respectivamente) concentração ajustada para desnutrição crônica e gravidade da doença. O



status de Zn teve uma interação na associação entre PCR e disfunção orgânica ( $\beta = -0,0021$ , IC 95%: -0,004 a -0,0003,  $p = 0,022$ ), e o status de Zn teve uma interação nesta associação para a magnitude moderada do cluster de inflamação ( $\beta = -0,015$ , IC 95%: -0,023 a 0,002,  $p = 0,021$ ). Cu e Se não apresentaram interação com biomarcadores inflamatórios ou com a magnitude da inflamação. **Conclusão:** Crianças com resposta inflamatória sistêmica e sepse apresentam diferentes magnitudes de inflamação, resultando em quatro grupos. Um cluster de alta inflamação está associado a uma permanência mais longa na UTIP e à disfunção de órgãos. A concentração de elementos traço eritrocitários na admissão na UTIP não é afetada pela magnitude da inflamação. A idade deve ser considerada ao avaliar o status dos oligoelementos eritrocitários em crianças gravemente enfermas com sepse. O aumento na concentração de Zn nos eritrócitos pode diminuir o efeito da inflamação na disfunção de órgãos. Juntos, esses resultados podem levar a novas hipóteses. Considerando a heterogeneidade na magnitude da inflamação durante a sepse e o papel biológico que Zn, Cu e Se têm na resposta imune, estudos futuros devem considerar a hipótese de que o status de Zn, Cu e Se modera os efeitos da inflamação durante a sepse, e pode ser testado posteriormente em conjuntos de dados mais amplos.

**Palavras-chave:** Zn, Cu, Se, cuidado intensivo, pediatria, sepse

## ABSTRACT

**Introduction:** Zn, Se, and Cu are important for antioxidant and immune defense systems, which makes them essential for good health and during a multitude of illnesses. These trace elements potentially impact clinical prognosis, such as organ dysfunction in critically ill children with sepsis. Data regarding trace elements in critically ill children are scarce, and observational studies presented contradicting results. Variables such as age and acute inflammation can affect plasma and serum trace element concentrations in critically ill children. However, erythrocyte measurements of trace elements are not associated with acute conditions such as sepsis. Nonetheless, the admission factors associated with erythrocyte trace element concentrations and reference intervals for assessment in this population are not well known. Therefore, this thesis aimed to describe Zn, Cu e Se status and investigate their association with the admission factors on PICU admission in critically ill children with sepsis. Also, to investigate the role of erythrocyte Zn, Cu e Se status in the association between inflammation and organ dysfunction in critically ill children with sepsis. **Methods:** A secondary analysis of 109 children with sepsis admitted to the PICU of a southwestern Brazilian hospital between August 2014 and May 2016. Demographic data were retrieved from the patient records. Anthropometric parameters, serum CRP, PCT, and lactate levels were measured within 72 h of PICU admission. Erythrocyte Zn, Cu and Se were collected within 24 h of admission, their concentrations expressed as nmol g<sub>Hb</sub>, and status were evaluated by age-dependent centile charts. The patients were clustered using the highest serum levels of CRP, PCT, and lactate with the *k*-means method. Differences in baseline characteristics between clusters of inflammation were analyzed using Fisher's exact test, Kruskal-Wallis' test with Dunn's test, and trend test when applicable. The associations between the magnitude of the inflammation cluster and PICU length of stay and length of ventilation were evaluated using the Kaplan-Meier method and log-rank test. Cox regression analysis, crude and adjusted, were applied, and expressed as HRs and CI 95%. The association between the magnitude of inflammation clusters and dPELOD 2 was assessed by Poisson regression, crude and adjusted, and expressed as the IRR coefficient and CI 95%. The association between erythrocyte trace element concentrations and admission factors was conducted using crude and adjusted linear regression, and expressed as  $\beta$  and CI 95%. The moderating role of erythrocyte concentrations of Zn, Cu and Se in the association between inflammation and magnitude of inflammation was evaluated through interaction analysis. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . **Results:** In total, 60% ( $n = 63$ ) were male, median age of 25.4 [IQR: 7.3;93.4] months. Four clusters were identified and labeled as low ( $n=13$ ), mild ( $n=30$ ), moderate ( $n=36$ ), and high ( $n=26$ ) inflammation, with different levels of CRP and PCT. Children in the high inflammation cluster had a higher organ dysfunction score, and lower probability of discharge from the PICU. In the sensitivity analysis, children with septic shock in the high inflammation cluster were less likely to be discharged from the PICU. Proportions of children with erythrocyte trace element concentrations under -3 z-score were 29,4% ( $n=32$ ) for Zn, 12,0% ( $n=13$ ) for Cu and 22,0% ( $n=24$ ) for Se. Using a cut-off point of -2 z-score, most children were classified with lower Zn (39,5%,  $n=43$ ), while 18,4% ( $n=20$ ) had lower Cu and 25,7% ( $n=28$ ) had lower Se. Erythrocyte Zn, Cu and Se status was not associated with severity of illness, magnitude of inflammation cluster, septic shock, mechanical ventilation or mortality. Age was inversely associated with erythrocyte copper and selenium, but not with zinc. For children aged one to two years and two to five years, an increase in age represented a decrease in erythrocyte copper ( $\beta = -0.33$ ; CI 95%: -0.60; -0.05;  $p = 0.02$ ,  $\beta = -0.28$ ; CI 95%: -0.52; -0.03;  $p = 0.02$ , respectively). For children aged five to 10 years and over 10 years, an increase in age represented a decrease in copper ( $\beta = -0.51$ ; CI 95%: -0.80; -0.22;  $p = 0.001$ ,  $\beta = -0.55$ ; CI 95%: -0.79; -0.29;  $p < 0.001$ , respectively) and selenium ( $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.73; -0.06;  $p = 0.02$ ,  $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.68; -0.11;  $p = 0.007$ , respectively) concentration adjusted for chronic undernutrition and severity of illness. Zn status had an interaction in the association between CRP and organ dysfunction ( $\beta = -0.0021$ , CI 95%: -0.004 to -0.0003,  $p = 0.022$ ), and Zn status had an interaction in this association for the moderate magnitude of inflammation cluster ( $\beta = -0.015$ , CI 95%: -0.023 to 0.002,  $p = 0.021$ ). Cu and Se did not

show interaction with inflammatory biomarkers or the magnitude of inflammation. **Conclusions:** Children with systemic inflammatory response and sepsis present with different inflammation magnitudes resulting in four clusters. A high inflammation cluster is associated with longer PICU stay and organ dysfunction. Erythrocyte trace element concentrations on admission to PICU are not affected by magnitude of inflammation. Age must be considered when evaluating erythrocyte trace element status in critically ill children with sepsis. The increase in Zn erythrocyte concentration may lower the effect of inflammation on organ dysfunction. Together, these results can lead to new hypothesis. Considering the heterogeneity in the magnitude of inflammation during sepsis, and the biological role Zn, Cu, and Se have in the immune response, future studies should consider the hypothesis that Zn, Cu, and Se status moderate the effects of inflammation during sepsis, and can be further tested in wider data sets.

**Keywords:** zinc, copper, selenium, critical care, children, sepsis

“Comece fazendo o necessário; depois faça o possível; então, de repente, você  
estará fazendo o impossível”

(São Francisco de Assis)

## NOMENCLATURA

### SIGLAS

<b>AMIB</b>	Associação de Medicina Intensiva Brasileira.
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono.
<b>Cu</b>	Cobre.
<b>DAG</b>	Grafo Acíclico Direto.
<b>DAMP</b>	Padrão molecular de dano.
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>dPELOD 2</b>	Escore Logístico de Disfunção de Órgãos Pediátrico diário.
<b>E/I</b>	Estatutura-para-Idade.
<b>ERO</b>	Espécie reativa de oxigênio.
<b>ESICM</b>	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i> first.
<b>ESPEN</b>	Sociedade Europeia de Nutrição Enteral e Parenteral.
<b>ESPGHAN</b>	European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
<b>Hb</b>	Hemoglobina.
<b>HR</b>	Chance de Risco.
<b>IC 95%</b>	Intervalo de Confiança de 95%.
<b>IIQ</b>	Intervalo Interquartil.
<b>IL</b>	Interleucina.
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal.
<b>IMC/I</b>	índice de Massa Corporal-para-Idade.
<b>IRR</b>	Razão de Risco de Incidência.
<b>LPS</b>	Lipopolissacararídeos.
<b>Mg</b>	Magnésio.
<b>MODS</b>	Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos.
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de necrose tumoral kappa B.
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde.
<b>P/E</b>	Peso-para-Estatutura.
<b>P/I</b>	Peso-para-Idade.
<b>PAMP</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos.
<b>PCR</b>	Proteína C-Reativa.
<b>PCT</b>	Procalcitonina.
<b>PELOD 2</b>	Escore Logístico de Disfunção de Órgãos Pediátrico.
<b>PIM</b>	Índice de Mortalidade Pediátrica.
<b>PIM 2</b>	Índice de Mortalidade Pediátrica atualizado.
<b>SCCM</b>	<i>Society for Critical Care Medicine</i> .
<b>SDRA</b>	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.
<b>Se</b>	Selênio.
<b>SIRS</b>	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central.
<b>SNS</b>	Sistema Nervoso Simpático.
<b>TLR-4</b>	Receptor do tipo <i>tool</i> .
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa.
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo.
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva.

<b>UTIP</b>	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica.
<b>VM</b>	Ventilação Mecânica.
<b>Zn</b>	Zinco.

#### SÍMBOLOS GREGOS

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Unidade</b>
$\beta$	Coeficiente de Interação	-
$\rho$	Coeficiente de correlação	-

#### ARTIGOS E MANUSCRITOS

$\beta$	Interaction Coefficient.
$\rho$	Correlation coefficient.
<b>BMI/A</b>	Body Mass Index-for-Age.
<b>CI 95%</b>	Confidence Interval of 95%.
<b>CRP</b>	C-Reactive Protein.
<b>Cu</b>	Copper.
<b>DAG</b>	Direct Acyclic Graph.
<b>dPELOD 2</b>	daily Pediatric Logistic Organ Dysfunction.
<b>ESPEN</b>	European Society of Parental and Enteral Nutrition.
<b>H/A</b>	Height-for-Age.
<b>Hb</b>	Hemoglobin.
<b>HR</b>	Hazar Ratio.
<b>ICU</b>	Intensive Care Unit.
<b>IQR</b>	Interquartile Range.
<b>IRR</b>	Incidence Risk Ratio.
<b>MODS</b>	Multiple Organ Dysfunction Syndrome.
<b>MV</b>	Mechanical Ventilation.
<b>PCT</b>	Procalcitonin.
<b>PELOD 2</b>	pediatric logistic organ dysfunction.
<b>PICU</b>	Pediatric Intensive Care Unit.
<b>PIM 2</b>	Updated Pediatric Index of Mortality.
<b>Se</b>	Selenium.
<b>SIRS</b>	Systemic Inflammatory Response Syndrome.
<b>UNIFESP</b>	Federal University of São Paulo.
<b>W/A</b>	Weight-for-Age.
<b>W/H</b>	Weight-for-Height.
<b>WHO</b>	World Health Organization.
<b>Zn</b>	Zinc.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	JUSTIFICATIVA	16
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
2.1	RESPOSTA METABÓLICA À DOENÇA GRAVE	19
2.2	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL NO PACIENTE PEDIÁTRICO GRAVEMENTE DOENTE	23
2.3	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO	24
2.4	ARTIGO 1	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO DE BASE	27
4.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
4.3	PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
5.1	MANUSCRITO 1	34
	REFERENCES	43
5.2	MANUSCRITO 2	47
	REFERENCES	54
5.3	MANUSCRITO 3	59
	REFERENCES	66
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>69</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na presença de um trauma ou doença grave resultando no comprometimento de um ou mais sistemas fisiológicos, existe a necessidade do cuidado intensivo e suporte à vida dentro da unidade de terapia intensiva (UTI). As principais causas de internação na unidade de terapia intensiva pediátrica (UTIP) são a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), infecções, traumatismos, distúrbios neurológicos e doenças onco-hematológicas (Campos-Miño; Sasbón; Dessauer, 2012). O estresse desencadeia uma resposta metabólica envolvendo componentes neuro-imuno-endócrinos. Essa resposta resulta na ativação do sistema nervoso simpático (SNS), do eixo hipotálamo-hipófise e, posteriormente, o processo inflamatório (Preiser et al., 2014). A resposta inflamatória é regulada pelo sistema nervoso central (SNC) e mediada pela liberação de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas (ILs) 1 e 6. Essas citocinas inflamatórias são responsáveis por alterações metabólicas durante a sepse.

A sepse é caracterizada como uma resposta imunológica exagerada do hospedeiro a uma infecção. A presença de inflamação aguda, hipóxia, hiperóxia e isquemia exacerbam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que por sua vez resulta em aumento na liberação de citocinas inflamatórias, formando um ciclo vicioso e a progressão da sepse pode levar a disfunção de órgãos.

Comumente alguns profissionais utilizavam os critérios para Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) para fazer o diagnóstico de sepse, porém, em 2024 uma nova definição de sepse para a população pediátrica foi publicada (Schlapbach et al., 2024). Essa nova definição recomenda a utilização do critério Phoenix Sepse Score de pelo menos 2 pontos para identificar pacientes pediátricos com sepse. Atualmente entende-se a sepse como uma condição dinâmica que apresenta sintomas inespecíficos em um grupo heterogêneo de pacientes, o que torna sua definição complexa. Em estudo com dados de 1.171.797 pacientes da Austrália e Nova Zelândia coletados entre 2000 e 2013, 109.663 (9,4%) dos pacientes apresentaram infecção ou disfunção de órgãos. Foi observado que 13.278 (12,1%) pacientes hospitalizados que não preencheram os critérios de SIRS na admissão, progrediram para infecção grave, Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) e óbito (Kaukonen et al., 2015). Por isso, nos últimos anos, o desenvolvimento de índices laboratoriais para identificar esses subgrupos de pacientes tem ganhado interesse da comunidade científica e profissionais da área (Chakraborty; Burns, 2021).

Visto que a frequência cardíaca e respiratória alterada são comuns em crianças, o diagnóstico de SIRS em pacientes pediátricos gravemente doentes requer, além de taquipneia e taquicardia, também a contagem de leucócitos superior a  $12.000\text{ l/mm}^3$  ou inferior a  $4.000\text{ l/mm}^3$ , ou mais de 10% de formas jovens de neutrófilos, ou presença de hipo ou hipertermia na ausência de infecção (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Singer et al., 2016; Weiss; Nicolson; Naim, 2020).

Desde a primeira definição de sepse em 1991, algumas atualizações foram sugeridas em termos de ampliar os critérios de SIRS e sepse já existentes, e somente em 2007, foi sugerida pela primeira vez a utilização de biomarcadores da resposta inflamatória como a proteína C-reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT) de forma complementar (Dellinger et al., 2008).

Apesar da importância e gravidade da sepse, os dados disponíveis não permitem uma perspectiva global sobre as diferenças na epidemiologia, etiologia e desfechos da sepse entre diferentes áreas geográficas, especialmente na população pediátrica (Souza, D.; Machado, 2019).

Em estudo brasileiro, multicêntrico, incluindo 21 UTIPs da América Latina, sendo 10 brasileiras, a prevalência de mortalidade devido à sepse em crianças gravemente doentes foi de aproximadamente 14% (Souza, D.; Machado, 2019). A taxa de mortalidade por sepse em países em desenvolvimento esteve associada ao não seguimento de diretrizes de tratamento, diagnóstico tardio, internação hospitalar tardia e fatores socioeconômicos (Kissoon et al., 2011; Jaramillo-Bustamante et al., 2012; Wang et al., 2014; ILAS, 2022). As diretrizes de tratamento incluem, além do rastreamento precoce, recursos de suporte à vida do paciente. Algumas das técnicas utilizadas para o suporte da sobrevivência do paciente incluem a ventilação mecânica (VM), monitores e aparelhos de diálise (Devictor; Latour; Tissières, 2008; Pollack et al., 2016; Pinto et al., 2017).



Visto que houve um aumento na sobrevivência dos pacientes por conta dos avanços nessas técnicas, as morbidades se tornaram desfechos importantes nessa população. Fatores como o uso e o tempo de VM, desenvolvimento de infecções hospitalares, necessidade de fármacos vaso ativos e o tempo de internação hospitalar na UTIP são alguns desses desfechos (Heneghan; Pollack, 2017).

Tanto a SIRS quanto as intervenções realizadas para o suporte à sobrevivência (por exemplo, o uso de medicamentos, os procedimentos cirúrgicos, o uso de VM invasiva) são fatores associados ao aumento na produção de EROs e de citocinas inflamatórias. Nesse contexto, os micronutrientes com propriedades antioxidantes têm recebido atenção nas pesquisas em UTIP, no entanto pouco se sabe sobre seus mecanismos na doença grave, especialmente em pediatria (Valla et al., 2018b; Marino et al., 2020; Berger et al., 2022).

Os elementos traço zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se) são considerados micronutrientes essenciais e desempenham papéis fundamentais nos sistemas de defesa imune e antioxidante, portanto, estão envolvidos na fisiopatologia da SIRS (Zemrani; Bines, 2020). Esse papel biológico inspirou estudos observacionais que objetivaram associar as concentrações desses elementos com desfechos em populações de pacientes hospitalizados e gravemente doentes. As hipóteses levantadas por esses estudos resultaram em pesquisas de intervenção que investigaram a suplementação de micronutrientes nesses cenários, destacando-se o Se como principal elemento traço investigado. No entanto, essas intervenções demonstraram resultados contraditórios (Gerasimidis et al., 2020; Marino et al., 2020).

Esses resultados contraditórios podem ser explicados pelo metabolismo alterado dos elementos traço durante a fase aguda de doença grave devido à inflamação (Heyland et al., 2005; Berger et al., 2022). O Zn e Se são redistribuídos do compartimento sanguíneo aos tecidos alvos onde são recrutados para vias de sinalização celular e sistema antioxidante, o que resulta em valores séricos e plasmáticos reduzidos (Duncan et al., 2012). Já o Cu é um elemento traço que é transportado na corrente sanguínea ligado a proteínas de fase aguda como a ceruloplasmina o que causa aumento de suas concentrações séricas e plasmáticas com valores elevados durante a inflamação sistêmica (Duncan et al., 2012). Ainda, as tecnologias de suporte à vida como diálise e uso de medicamentos ocasionam em perdas adicionais desses elementos (Marino et al., 2020). Todos esses fatores tornam a avaliação do status desses elementos complexa (Valla et al., 2018b; Gerasimidis et al., 2020).

Em contraponto, já foi evidenciado que as medidas eritrocitárias de elementos traço como Zn e Se na população adulta não são alteradas na presença da inflamação aguda, sugerindo que esse seja um marcador mais representativo do status de adequação (Duncan et al., 2012; Stefanowicz, F. A. et al., 2013; Stefanowicz, F. et al., 2014). Contudo, se por um lado estudos na população adulta são abundantes, por outro, estudos na população pediátrica gravemente doente são escassos. Mesmo assim, já foi demonstrado que em 109 crianças internadas na UTIP com SIRS as concentrações eritrocitárias de Se não foram afetadas pela inflamação (Lopes Júnior et al., 2021; Bezerra de Almeida et al., 2022). Além disso, também foi possível mostrar que o Se eritrocitário esteve associado com a diminuição no logístico de disfunção de órgãos pediátrico (PELOD 2) (Lopes Júnior et al., 2021).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Existe uma escassez de estudos utilizando medidas eritrocitárias de elementos traço. Dessa forma, não é claro quais fatores inerentes a UTIP e ao paciente pediátrico gravemente doente podem estar associados com esses valores no momento da internação na presença de uma resposta inflamatória sistêmica aguda.

O que a literatura nos mostra é que micronutrientes como Zn, Cu e Se desempenham um papel importante na defesa imunológica durante a SIRS. Porém, não há evidências suficientes que corroborem a associação entre as concentrações séricas/plasmáticas de micronutrientes com desfechos nutricionais e clínicos na população alvo. Ainda, as concentrações séricas/plasmáticas são as medidas mais comumente utilizadas para avaliar o status desses micronutrientes. No entanto, essas medidas apresentam influência do processo inflamatório,

gravidade da doença e idade. Dessa forma, em pacientes que apresentam uma resposta inflamatória aguda de magnitude variada na UTIP, já foi recomendado o uso de medidas eritrocitárias, visto que essas permanecem estáveis durante o processo inflamatório. Contudo, foi observada uma escassez de estudos sobre a associação das concentrações eritrocitárias de elementos traço, especialmente de Zn, Cu e Se, com a morbidade em pacientes pediátricos gravemente doentes com sepse.

### 1.1.1 Originalidade

A originalidade do presente estudo é embasada na lacuna do conhecimento reportada por profissionais e pesquisadores da área. Apesar de o Zn, Cu e Se exercerem um papel biológico na sepse, resultados de estudos observacionais que demonstram associações entre esses elementos e desfechos importantes não são comprovados pelos estudos de intervenções clínicas (Dao et al., 2017; Berger; Ben-Hamouda, 2020; Gerasimidis et al., 2020; Marino et al., 2020). Isso pode ser explicado pelo uso de medidas em soro e plasma para avaliar os elementos traço, o que pode gerar resultados enviesados pela presença da inflamação (Gerasimidis et al., 2020). Portanto, diretrizes recentes aconselham avaliar o status de micronutrientes por métodos multimodais, visando evitar diagnósticos incorretos de deficiências ou realizar avaliações intracelulares (e.g., concentrações de eritrócitos) (McMillan; Maguire; Talwar, 2019; Gerasimidis et al., 2020; Berger et al., 2022).

### 1.1.2 Relevância

É evidente a escassez de estudos que investiguem o papel dos elementos traço eritrocitários em pacientes pediátricos gravemente doentes, especialmente em condições como a SIRS e sepse. Este é um dos fatores responsáveis pela ausência de valores de referência e pontos de corte para diagnóstico de deficiência de Zn, Cu e Se nessa população. Da mesma forma, não há diretrizes para a oferta de micronutrientes na população de pacientes pediátricos gravemente doentes, portanto na prática clínica se utilizam os valores recomendados para crianças saudáveis ou valores extrapolados da população adulta saudável por algoritmos matemáticos (Mehta et al., 2017; Gerasimidis et al., 2020; Berger et al., 2022). Destaca-se ainda que até o momento não foram identificados estudos na literatura que tenham investigado o papel do Zn e Cu eritrocitários em pacientes pediátricos criticamente enfermos com sepse.

Com esta Tese, pretende-se investigar o papel dos elementos traço, em especial do Zn, Cu e Se eritrocitários em desfechos clínicos de pacientes pediátricos gravemente doentes com SIRS e sepse, avaliando a magnitude da inflamação e os fatores associados às concentrações desses elementos. Dessa forma, espera-se que os resultados, em conjunto com outros importantes trabalhos que existem sobre o tema, possam formar uma metodologia mais clara de avaliação do status desses elementos traço para o efetivo planejamento de intervenções e protocolos nutricionais.

A presente tese intitulada “Associação das concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se com desfechos clínicos em pacientes pediátricos gravemente doentes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica” está inserida na Linha de Pesquisa II: Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional do PPGN-UFSC e no Grupo de Pesquisa em Nutrição Baseada em Evidências para a Prática Clínica (INTEGRATE). O grupo realiza pesquisas com crianças gravemente doentes desde 2010 e já teve pesquisas resultando em publicações em periódicos, trabalho em congressos acadêmicos, trabalhos de conclusão de curso, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Adicionalmente, a presente tese foi construída de forma multidisciplinar, em parceria com o Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), fomentando a interação entre pesquisadores de ambas as universidades federais do Brasil. Além de discussões produtivas, os dados utilizados na presente tese foram advindos do projeto intitulado “Disfunção endotelial e estado nutricional relativo ao Se em pacientes pediátricos durante a fase aguda da resposta inflamatória sistêmica”, coordenado pelo professor Heitor Pons Leite e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [número 13/25801–6]. Por fim, o professor Heitor Pons

---

Leite, que apresenta extenso histórico de pesquisas com pacientes pediátricos gravemente doentes e terapia nutricional enteral e parenteral, coorientou a presente tese.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 RESPOSTA METABÓLICA À DOENÇA GRAVE

O paciente gravemente doente é caracterizado como um indivíduo que se encontre em qualquer condição que represente um risco de vida. Incluindo-se a cirurgia de alta complexidade, politrauma, isquemias, comprometimento cardiovascular, ou qualquer outra doença aguda que leve à necessidade de cuidado intensivo, sendo a UTI o local apropriado para esse cuidado (Moltu et al., 2021). Por sua vez, a UTIP é destinada à internação de pacientes criticamente enfermos com idade entre 1 mês e 18 anos (Frankel et al., 2019).

As maiores taxas de admissão na UTIP ocorrem no primeiro mês de vida, e crianças de 0 a 4 dias de vida apresentam maior gravidade da doença (Crow et al., 2018). Ainda, as doenças cardíacas e insuficiência respiratória estão associadas com as taxas de mortalidade na UTIP, juntamente com infecções, traumatismos, distúrbios neurológicos e doenças onco-hematológicas (Campos-Miño; Sasbón; Dessauer, 2012).

Frente a uma lesão, cirurgia ou doença, o paciente desenvolve uma série de alterações metabólicas envolvendo uma resposta neuro-imuno-endócrina na tentativa de retomar a homeostase no organismo (Preiser et al., 2014). O componente neuroendócrino é desencadeado em uma região localizada próximo ao hipotálamo, ao núcleo paraventricular e ao *locus coeruleus*. Quando um estressor é detectado e sinalizado ao sistema nervoso central uma resposta será desencadeada, resultando na ativação do SNS, do eixo hipotálamo-hipófise e, posteriormente, a ativação de processos inflamatórios (Preiser et al., 2014).

O componente inflamatório é parcialmente regulado no nível do sistema nervoso central, via citocinas e mediadores inflamatórios. A resposta imune compreende uma resposta imune inata e uma resposta imune específica. Esta última resposta é subdividida em componentes mediados por células humorais, incluindo a liberação de anticorpos e citocinas. Essas citocinas podem prejudicar algumas funções fisiológicas do corpo. Por exemplo, o TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a IL-6 desempenham papéis essenciais nas alterações metabólicas associadas à sepse (Preiser et al., 2014).

Com base nas diferenças observadas em pacientes em diferentes estágios da doença grave, foram definidas três fases: a fase aguda (podendo durar de horas a dias), estável e de recuperação da doença. As alterações da SIRS ocorrem durante a fase aguda (Preiser et al., 2014; Joosten; Van Puffelen; Verbruggen, 2016).

Visto que os mecanismos de defesa do hospedeiro variam de acordo com o estágio da doença, isso implica que cada fase necessita de cuidados específicos (Mira et al., 2017). Na fase aguda predomina o hipermetabolismo. Os mediadores pró-inflamatórios regulam os elevados níveis de cortisol e hormônios regulatórios (catecolaminas e glucagon) que causam a quebra de proteína muscular e a lipólise para fornecer aminoácidos livres e ácidos graxos como substrato para os tecidos vitais (Preiser et al., 2014).

Durante a resposta imunológica aguda, pode ocorrer um fenômeno envolvendo uma resposta exagerada do organismo caracterizado como a SIRS (Toliver-Kinsky et al., 2018; Chakraborty; Burns, 2021).

O primeiro conceito de SIRS surgiu em agosto de 1991, pela American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) durante a conferência de consenso de definições de sepse, realizada em Chicago, Illinois, com o objetivo de estabelecer um grupo padrão de parâmetros clínicos que poderiam ser usados para identificar rapidamente indivíduos com SIRS e sepse em qualquer ambiente clínico. Nessa mesma conferência, foi definida também a condição de MODS, caracterizada pela disfunção de um ou mais órgãos em pacientes criticamente enfermos associada à perda da homeostase com iminente necessidade de intervenções de suporte à sobrevivência (Chakraborty; Burns, 2021).

Esses critérios são utilizados até hoje, dessa forma os critérios para o diagnóstico de SIRS incluem: i) temperatura corporal acima de 38 ou abaixo de 36 °C; ii) frequência cardíaca maior que 90 bpm; iii) frequência respiratória maior que 20 incursões respiratórias/minuto (taquipnéia) ou pressão parcial de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) menor que 32 mmHg; iv) contagem de leucócitos superior a 12.000 ou inferior a 4.000 /microlitros ou mais de 10% de formas jovens de neutrófilos (Singer et al., 2016).

Somente em 2005 foram criados pela primeira vez critérios específicos para a população pediátrica, sendo

estabelecida a exigência da presença adicional de contagem de leucócitos ou temperatura alteradas, visto que o ritmo cardíaco e frequência respiratória alterados são mais comuns em crianças (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020).

Em conferências subsequentes foram estabelecidas atualizações dos critérios citados acima e sugerida a utilização de biomarcadores da resposta inflamatória como a PCR e a procalcitonina (Dellinger et al., 2008).

O progresso nas tecnologias de suporte a vida e no conhecimento teórico evidenciaram limitações nos critérios de SIRS e sepse. Além de serem inespecíficos, observou-se a falta na capacidade de distinguir entre uma resposta benéfica do hospedeiro de uma resposta patológica (que possivelmente contribui para a disfunção de órgãos); inabilidade de distinguir entre etiologia infecciosa e não infecciosa puramente com base na definição; falta de peso para cada critério (por exemplo, febre e frequência respiratória elevada têm exatamente o mesmo peso que leucocitose ou taquicardia pela definição de SIRS); incapacidade de prever disfunção de órgãos (Chakraborty; Burns, 2021).

Considerando essas questões, a ESICM e a Sociedade de Medicina Intensiva (SCCM, do inglês *Society for Critical Care Medicine*) formaram um grupo de trabalho em 2016 para propor a Sepsis-3, uma nova definição de sepse para adultos. A definição revisada abandonou o uso dos critérios SIRS para identificar a sepse ao invés de uma definição mais ampla que inclui qualquer disfunção de órgãos com risco de vida induzida por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (Singer et al., 2016).

Embora o diagnóstico e rastreamento da sepse possa ser feito utilizando alguns critérios como os sinais vitais, sintomas relacionados à infecção, e até os critérios para SIRS, Quick Sequential Organ Failure Score (qSOFA) ou Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), o National Early Warning Score (NEWS) ou o Modified Early Warning (MEWS), o uso desses fatores sem a confirmação da infecção não é recomendado por diretrizes atuais (Evans et al., 2021).

Em 2024 foi publicada uma nova definição de sepse em pediatria, que da mesma forma como foi definida para adultos, agora desaconselha o uso do termo SIRS para definir pacientes com sepse sem confirmação de infecção, e o abandono do termo sepse grave, sendo os pacientes classificados com sepse ou choque séptico (Schlapbach et al., 2024).

Atualmente então, é recomendada a definição conforme proposto pela SCCM, chamada de Phoenix Sepsis Score (Tabela 1).

Tabela 1 – Critério para definição de sepse - Phoenix Sepsis Score<sup>a</sup>.

Variáveis	0 Pontos	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Respiratórias, 0-3 pontos	PaO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> ≥400 or SpO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> ≥292 <sup>b</sup>	PaO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> <400 em qualquer suporte respiratório ou SpO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> <292 em qualquer suporte respiratório <sup>b,c</sup>	PaO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> 100-200 e VMI ou Spg:FiO <sub>2</sub> 148-220 e VMI <sup>b</sup>	PaO <sub>2</sub> :FiO <sub>2</sub> <100 and VMI or Spg:FiO <sub>2</sub> <148 and VMI <sup>b</sup>
Cardiovasculares, 0-6 pontos	Sem medicamento vasoativo <sup>d</sup> Lactate <5 mmol/L <sup>e</sup>	1 Ponto cada (até 3) 1 Medicamento vasoativo <sup>d</sup> Lactato 5-10.9 mmol/L <sup>e</sup>	2 Pontos cada (até 6) ≥2 medicamentos vasoativos <sup>d</sup> Lactato ≥11 mmol/L <sup>e</sup>	
Baseadas em idade <sup>f</sup>	Pressão arterial média, mm Hg <sup>g</sup>			
<1 m	>30	17-30	<17	
1 to 11 m	>38	25-38	<25	
1 to 2y	>43	31-43	<31	
2 to <5 y	>44	32-44	<32	
5 to <12 y	>48	36-48	<36	
12 to 17 Y	>51	38-51	<38	
Coagulação (0-2 pontos) <sup>h</sup>	Plaquetas ≥ 100 × 10 <sup>3</sup> 1/μL Razão internacional normalizada ≤1.3 D-dimer ≥2 mg/L FEU Fibrinogênio ≥100 mg/dL	1 Ponto cada (máximo 2 pontos) Plaquetas <100 × 10 <sup>3</sup> 1/μL Razão internacional normalizada >1.3 D-dimer >2 mg/L FEU Fibrinogênio <100 mg/dL		
Neurológicas (0-2 pontos) <sup>i</sup>	Escore da escala de coma Glasgow > 10; pupilas reativas <sup>j</sup>	Escore da escala de coma Glasgow ≥10 <sup>j</sup>	Pupilas fixas bilateralmente	
Critério Phoenix				
Sepse	Suspeita de infecção e critério Phoenix			
Choque séptico	Sepsis Score ≥2 pontos Sepse com ≥1 ponto(s) cardiovasculares			

<sup>a</sup> O escore pode ser calculado na ausência de algumas variáveis (e.g., mesmo que o nível de lactato não seja medido e não sejam usados medicamentos vasoativos, um escore cardiovascular ainda pode ser determinado pela pressão arterial). Espera-se que exames laboratoriais e outras medidas sejam obtidos a critério da equipe médica com base no julgamento clínico. Variáveis não medidas não contribuem com pontos para a pontuação. As idades não são ajustadas para prematuridade e os critérios não se aplicam a hospitalizações durante o parto, neonatos cuja idade pós-concepcional é inferior a 37 semanas ou aqueles com 18 anos de idade ou mais.

<sup>b</sup> A razão SpO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> só é calculada se SpO<sub>2</sub> for 97% ou menos.

<sup>c</sup> A disfunção respiratória de 1 ponto pode ser avaliada em qualquer paciente que receba oxigênio, com alto fluxo, pressão positiva não invasiva ou suporte respiratório invasivo, e inclui uma relação PaO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> menor que 200 e uma relação SpO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> menor de 220 em crianças que não estão recebendo VMI. Para crianças que recebem VMI com PaO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> menor que 200 e SpO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> menor que 220, ver critérios para 2 e 3 pontos.

<sup>d</sup> Os medicamentos vasoativos incluem qualquer dose de epinefrina, norepinefrina, dopamina, dobutamina, milrinona e/ou vasopressina (para choque).

<sup>e</sup> O intervalo de referência de lactato é de 0,5 a 2,2 mmol/L. O lactato pode ser arterial ou venoso.

<sup>f</sup> A idade não é ajustada para prematuridade e os critérios não se aplicam a hospitalizações por nascimento, crianças cuja idade pós-concepcional seja inferior a 37 semanas ou com 18 anos ou mais.

<sup>g</sup> Use preferencialmente a PAM medida (arterial invasiva, se disponível, ou oscilométrica não invasiva) e, se a PAM medida não estiver disponível, uma PAM calculada (1/3 x sistólica + 2/3 x diastólica) pode ser usada como alternativa.

<sup>h</sup> Faixas de referência variáveis de coagulação: plaquetas, 150 a 450 ×10<sup>3</sup>/L; Dímero-D, <0,5 mg/L FEU; fibrinogênio, 180 a 410 mg/dL. O intervalo de referência do INR é baseado no tempo de protrombina de referência local.

<sup>i</sup> O subescore de disfunção neurológica foi validado pragmaticamente em pacientes sedados e não sedados, e naqueles que receberam ou não suporte de VMI.

<sup>j</sup> A pontuação da Escala de Coma de Glasgow mede o nível de consciência com base na resposta verbal, ocular e motora (variação de 3 a 15, com uma pontuação mais alta indicando melhor função neurológica).

Fonte: Traduzido e adaptado de Schlapbach et al. (2024)

Em resumo, a SIRS está presente em quase todos os pacientes sépticos, embora nem todos os pacientes com SIRS sejam sépticos. Exceções a essa ideia foram descritas por Kaukonen et al. (2015), que sugeriram que existem subgrupos de pacientes hospitalizados que não preenchem os critérios de SIRS na admissão, mas progredem para infecção grave, disfunção de múltiplos órgãos e óbito. Esse estudo com aproximadamente 109.000 pacientes sépticos, demonstrou que um em cada oito pacientes não preenchia dois ou mais critérios de SIRS. (Kaukonen et al., 2015). Por isso, nos últimos anos, o desenvolvimento de índices laboratoriais como a PCR e procalcitonina para identificar esses subgrupos de pacientes tem ganhado interesse da comunidade científica e profissionais da área (Chakraborty; Burns, 2021).

Mais de 50 % das mortes em crianças menores de cinco anos são causadas por infecções incluindo pneumonia, diarreia e malária, sendo que todas essas podem resultar em sepse. Portanto, a sepse pode ser considerada um fator chave nas fatalidades em pacientes pediátricos criticamente enfermos (Souza, D.; Machado, 2019).

Entre 1995 e 2005, houve aumento de 81 % no número de casos pediátricos de sepse grave registrados nos EUA. Naquele país, em 2005, houve 75.000 internações por sepse devido a uma incidência relatada de 0,89 por 1.000 crianças menores de 20 anos (Hartman et al., 2013). No Brasil, houve um aumento progressivo do número de casos de sepse nas UTIs de 19,4 % do total de internações em 2010 para 25,2 % em 2016 (Lobo et al., 2019). O aumento da sobrevida de pacientes de alto risco, como recém-nascidos de extremo baixo peso e crianças com doenças crônicas complexas, pode ser responsável pelo aumento das internações por sepse (Wheeler et al., 2011; Souza, D.; Machado, 2019; Weiss; Nicolson; Naim, 2020).

De acordo com dados do censo da Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) de 2016, o número de UTIs adultas era 1813. Dessas, 229 instituições, incluindo uma amostra de 794 pacientes, a prevalência de sepse foi de 29,6 % e a letalidade geral de 55 %. A mortalidade na Região Sudeste foi de 51,2 %, ou seja, inferior à das demais regiões (Centro-Oeste, 70 %; Nordeste, 58,3 %; Sul, 57,8 %; e Norte, 57,4 %) (Lobo et al., 2019). Outro estudo brasileiro multicêntrico incluindo 21 UTIPs da América Latina reportou mortalidade devido a sepse em crianças gravemente doentes de 14,2 % (Souza, D. C. de et al., 2016).

De acordo com o estudo Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies não houve diferença na mortalidade relacionada à sepse entre países em desenvolvimento e países desenvolvidos (23 % a 29 %) (Weiss et al., 2015). Os fatores associados à mortalidade por sepse incluem o diagnóstico tardio, internação hospitalar tardia, e baixa aderência às diretrizes de tratamento (Han et al., 2003; Ninis et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Wolfler et al., 2008; Inwald et al., 2009; Santhanam et al., 2009; Jaramillo-Bustamante et al., 2012; Wang, 2014).

### 2.1.1 Fisiopatologia da sepse

A patogênese da SIRS em nível molecular pode ser explicada de maneira generalizada de duas formas. Quando a etiologia do insulto inicial for traumatismo, queimadura, procedimento cirúrgico derivado de traumatismo, pancreatite aguda, isquemia aguda, intoxicação por abuso de substâncias, entre outros, o organismo humano libera Padrões moleculares de dano (DAMPs). E quando o insulto for por uma infecção (bacteriana, virulenta, fúngicas) ou choque tóxico por exotoxinas ou endotoxinas, caracteriza-se a sepse, ocorrendo a liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Marik, 2018; Toliver-Kinsky et al., 2018).

Um tipo de PAMP inclui a molécula de lipopolissacarídeos (LPS), liberada por bactérias gram-negativas, ativa a resposta imune inata ao ligar-se ao receptor Receptor do tipo *tool* (TLR-4) nos macrófagos liberando mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 (Sagy; Al-Qaqa; Kim, 2013; Preiser et al., 2014; Marik, 2018).

A ativação de enzimas oxidases e desacoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias causam um excesso de EROs mitocondrial. Além disso, as EROs ativam o fator de necrose tumoral  $\kappa$  B que por sua vez estimula a transcrição adicional de mediadores pró-inflamatórios (Marik, 2018). Portanto, ainda que a liberação de citocinas nessa fase seja com propósito de defesa imunológica, ela pode desencadear a cascata inflamatória que resulta em falência reversível ou permanente de órgãos-alvo e com possível progressão ao óbito (Chakraborty; Burns, 2021). Adicionalmente, nesse cenário pode ocorrer a falha na resposta anti-inflamatória

compensatória (do inglês *compensatory anti-inflammatory response - CARS*), ou ainda, a imunossupressão (Sagy; Al-Qaqa; Kim, 2013).

Uma das hipóteses para a etiologia da disfunção de órgão é a baixa perfusão microvascular, em que os tecidos alvo não estariam recebendo a irrigação sanguínea necessária. Mas outra hipótese importante é que como consequência do processo inflamatório e produção excessiva de EROs, ocorre a disfunção mitocondrial (Berger, 2020). A mitocôndria é uma organela celular que, além de gerar energia na forma de ATP, regula a concentração intracelular de cálcio, e é essencial para a sinalização celular, o tônus vascular e sistemas de defesa antioxidante. As mitocôndrias estão envolvidas na função de alguns hormônios, sendo por exemplo o local de produção para o cortisol. Uma função essencial da mitocôndria é a ativação para vias de morte celular na presença de excesso de EROs. Em um cenário de estresse descompensado, a oxigenação nos tecidos decai e a capacidade de produção de ATP pela mitocôndria não atinge as demandas necessárias (Mantzaris; Tsolaki; Zakyntinos, 2017; McClave et al., 2019).

Em estado de homeostase, a mitocôndria possui sistemas de autorregulação que auxiliam na remoção de organelas danificadas. Porém, esses sistemas, somados às disfunções estruturais e funcionais durante a doença grave exacerbam as sequelas clínicas do excesso de EROs (McClave et al., 2019).

O dano se torna cíclico, visto que o comprometimento funcional e estrutural da mitocôndria causado por excesso de EROs leva ao aumento na produção de EROs. Com a apoptose mitocondrial resultante, o extravasamento de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial para o meio extracelular, os quais atuam como DAMP, provocam a exacerbação da resposta inflamatória e queda da função mitocondrial (McClave et al., 2019).

## 2.2 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL NO PACIENTE PEDIÁTRICO GRAVEMENTE DOENTE

A avaliação do estado nutricional do paciente pediátrico gravemente doente deve incluir uma combinação de métodos como medidas antropométricas e marcadores laboratoriais, podendo incluir ainda o diagnóstico de, ou marcadores de gravidade da doença, magnitude da inflamação e risco nutricional (Mehta et al., 2013). É recomendado que todos os pacientes internados sejam avaliados nas primeiras 48 horas de internação na UTIP para identificar a desnutrição prévia a internação (Valla et al., 2015; Bechard; Mehta, 2017).

Recentemente a ESPGHAN, publicou uma nova definição de desnutrição associada à doença (do inglês *disease-associated undernutrition – DAU*) para incorporar fatores importantes inerentes à doença e ao estado nutricional que afetam os desfechos e o crescimento na população pediátrica hospitalizada (Hulst et al., 2022).

A avaliação do risco nutricional, a não ser confundida com a avaliação do estado nutricional, é uma etapa importante e tem por objetivo identificar pacientes em risco nutricional e que tem maior probabilidade de melhor prognóstico clínico com a terapia nutricional precoce, no entanto destaca-se que a internação na UTIP em si já torna o paciente em risco nutricional (Valla et al., 2018a; Tume et al., 2019). Apesar disso, dentre 19 instrumentos de avaliação nutricional para pacientes pediátricos hospitalizados identificados em uma revisão sistemática, nenhum foi validado para a população de pacientes internados na UTIP (Ventura et al., 2022a).

Em pacientes com menos de 2 anos (24 meses) é recomendado que sejam aferidos os parâmetros antropométricos como peso, estatura/comprimento, circunferência média do braço (CMB) e circunferência cefálica (Mehta et al., 2017; Tume et al., 2020). Com essas medidas deve-se calcular o escore-z para os indicadores de peso-para-idade (P/I), peso-para-estatura (P/E), e índice de massa corporal-para-idade (IMC/I) (Mehta et al., 2017; Tume et al., 2020). E o diagnóstico de desnutrição pelas medidas antropométricas deve seguir os pontos de corte estabelecidos pelas curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2007). É recomendado a classificação em “leve ou em risco de desnutrição” quando z-scores apresentar  $< -1$  desvio padrão; “desnutrição moderada” quando z-scores entre  $-2$  e  $-3$ ; e, “desnutrição grave” quando z-scores  $< -3$  desvios padrão. A cronicidade da desnutrição pode ser classificada como “desnutrição aguda” quando



a duração é inferior a 3 meses, geralmente avaliada por P/I, P/E e IMC/I; ou “desnutrição crônica”, com duração mínima de 3 meses e avaliada por P/I (Mehta et al., 2013; Becker et al., 2015).

Adicionalmente aos parâmetros antropométricos, o uso de marcadores laboratoriais pode complementar a avaliação do estado nutricional do paciente pediátrico gravemente doente. Os marcadores mais comuns na prática clínica incluem a PCR, a albumina sérica e a pré-albumina. Embora esses marcadores tenham sido associados a desfechos como maior tempo de internação e maior tempo em ventilação mecânica, independente da inflamação, não avaliam (ou não são marcadores) do estado nutricional na vigência de inflamação sistêmica (Bharadwaj et al., 2016).

Ainda, é necessário levar em consideração a gravidade da doença dos pacientes internados na UTIP. Existem modelos atualmente que apontam a gravidade da doença e o risco de mortalidade para essa população, o índice de mortalidade pediátrica (PIM) é um deles, o qual tem a versão atualizada Índice de mortalidade pediátrica atualizado (PIM 2) (Slater et al., 2003). Para o cálculo do PIM 2 utiliza-se dez variáveis clínicas da admissão na UTIP (Slater et al., 2003). Outro escore utilizado para estimar a gravidade da doença por meio da avaliação da disfunção de órgãos é o PELOD 2, o qual elabora um escore logístico de disfunção de órgãos na população pediátrica (Leteurtre et al., 2013).

Por fim, a identificação precoce de desnutrição pode garantir o planejamento adequado da terapia nutricional e prevenir a deterioração do estado nutricional durante a internação e garantir melhor prognóstico (Colombo; Pellicoli; Bonanomi, 2016; Valla et al., 2018a).

### 2.3 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO

A avaliação do estado nutricional de elementos traço como Zn, Cu e Se, é complexa e depende da inflamação. Em primeiro lugar, não está estabelecido para a população de pacientes pediátricos gravemente doentes, valores de referência para concentrações plasmáticas e séricas desses elementos traço (Marino et al., 2020).

Recentemente foi proposto um modelo de cálculo de z-score e gráficos de percentil para idade de alguns elementos traço e vitaminas em população pediátrica. O estudo foi realizado com uma amostra de 244 controles saudáveis em comparação com 34 pacientes pediátricos com Doença de Crohn e 55 pacientes com Doença Celíaca, e foram gerados gráficos para Zn, Cu, Se, magnésio (Mg), vitaminas B1, B2 e B6, com base nas concentrações plasmáticas e eritrocitárias (Fify et al., 2022). Embora essas curvas forneçam um ponto de partida para a investigação do status de elementos traço e vitaminas na população pediátrica, destaca-se que pacientes com doenças inflamatórias crônicas como a doença celíaca e de Crohn, são distintos de pacientes previamente hígidos que internam na UTIP com doença grave aguda e SIRS, por sepse ou outras causas.

Por isso, é recomendado para o paciente pediátrico hospitalizado o uso de métodos multimodais para avaliação dos micronutrientes, incluindo métodos de inquéritos alimentares para avaliação da ingestão dietética, análise clínica incluindo a gravidade da doença e sinais e sintomas de deficiências de micronutrientes e a avaliação dos micronutrientes com base em parâmetros laboratoriais que levem em consideração a inflamação (Gerasimidis et al., 2020).

Ainda, as análises das concentrações plasmáticas ou séricas de micronutrientes são as mais comumente utilizadas, porém raramente refletem o status real dos elementos traço e vitaminas, pois estas são influenciadas pela resposta inflamatória sistêmica (Duncan et al., 2012; Ghashut et al., 2016; Gerasimidis et al., 2020). Enquanto as concentrações plasmáticas de Zn e Se tendem a diminuir drasticamente na inflamação aguda, as concentrações de Cu tendem a aumentar devido à sua ligação a proteínas de fase aguda (Cvijanovich et al., 2009). Em pacientes saudáveis com baixos níveis plasmáticos de Zn as concentrações eritrocitárias desse micronutriente se mantiveram relativamente inalteradas, enquanto há uma escassez de estudos que esclareçam a resposta de Cu eritrocitário (Baer; King, 1984; Stefanowicz, F. et al., 2014; Marino et al., 2020). Conforme as concentrações eritrocitárias reduzem observa-se aumento na deficiência, sugerindo que

as medidas eritrocitárias são reflexo da ingestão progressiva e estado de adequação (Stefanowicz, F. A. et al., 2013; Stefanowicz, F. et al., 2014).

Não há diretrizes estabelecidas para a oferta de micronutrientes para pacientes pediátricos gravemente doentes. No entanto, a diretriz de micronutrientes da ESPEN de 2022 para pacientes gravemente doentes adultos, recomenda que as medidas plasmáticas de Zn, Cu e Se sejam aferidas em conjunto com a medida de PCR para contabilizar a gravidade da inflamação nesses valores, e quando possível utilizar a medida em eritrócito ou usar marcadores de função, como as metaloproteínas para o Zn, a ceruloplasmina para o Cu e a GPx e selenoproteínas para o Se (Berger et al., 2022). Portanto, é necessário buscar na literatura quais são os métodos mais utilizados para avaliar Zn, Cu e Se na população com doença grave, especialmente a pediátrica.

## 2.4 ARTIGO 1

Neste capítulo, será apresentado o primeiro artigo publicado dessa tese que contém a revisão sistemática elaborada para embasar a originalidade e relevância e que tem como objetivo principal descrever as concentrações de Zn, Cu e Se em pacientes criticamente enfermos, incluindo adultos e crianças, com SIRS de acordo com a literatura científica atual. Como objetivo secundário, também foram descritos os achados dos estudos em relação a associações de Zn, Cu e Se com desfechos como a disfunção de órgãos e a mortalidade.

Silveira TT, Stefenon DO, Júnior EL, Konstantyner T, Leite HP, Moreno YMF. Assessment of trace elements in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome: A systematic review. *J Trace Elem Med Biol.* 2023 Jul;78:127155. doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127155. Epub 2023 Mar 15. PMID: 36948044.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar fatores associados às concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se na admissão e seu papel moderador na associação entre inflamação e a disfunção de órgãos em pacientes pediátricos com sepse.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em pacientes pediátricos com sepse:

- Descrever as concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se na admissão;
- Investigar a associação de clusters magnitude da resposta inflamatória com a disfunção de órgãos, tempo de internação, tempo de ventilação mecânica e mortalidade;
- Investigar associação entre indicadores clínicos, nutricionais e inflamatórios com as concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se na admissão;
- Investigar o papel moderador de Zn, Cu, e Se eritrocitários na admissão na associação entre inflamação e a disfunção de órgãos, tempo de internação, tempo de ventilação mecânica e mortalidade.

## 4 MÉTODOS

Na seção 4.1 está descrita a metodologia do estudo de base que originou o banco de dados analisado no presente estudo. Na seção 4.2 estão descritos os métodos de tratamento do banco de dados e análises estatísticas que foram utilizadas para responder aos objetivos da tese.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO DE BASE

Trata-se de um estudo observacional prospectivo com pacientes pediátricos gravemente doentes com sepse, realizado com dados secundários proveniente do projeto intitulado “Disfunção endotelial e estado nutricional relativos ao Se em pacientes pediátricos durante a fase aguda da resposta inflamatória sistêmica” do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria da UNIFESP, realizado na UTIP do Hospital Geral de Itapeperica da Serra-HGIS no estado de São Paulo.

#### 4.1.1 Participantes

No estudo original o tamanho da amostra foi mensurado com base em um dos efeitos estudados, estimando-se um tamanho amostral de 108. Foram incluídas todas as crianças admitidas na UTIP durante os 18 meses de coleta que apresentassem diagnóstico de SIRS, Sepse, Sepse Grave, Choque Séptico e Falência Orgânica Múltipla de acordo com os critérios da American College of Critical Care Medicine – ACCM (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020). Foram excluídos pacientes com menos de 1 mês de vida; que receberam transfusão sanguínea antes da coleta das amostras biológicas; pacientes com doença crônica (renal, hepática, cardíaca, onco-hematológica e imunodeficiências) e aqueles com internação prévia no período anterior a três meses da avaliação.

#### 4.1.2 Processo de coleta de dados

O HGIS é um hospital geral de nível secundário, com 205 leitos e é administrado pelo SECONCI em parceria com a Secretaria de Estado da Saúde, e fica localizado a oeste da região metropolitana de São Paulo-SP, na cidade de Itapeperica da Serra. A UTIP é classificada como Tipo II, contando com 6 leitos para pacientes com idade inferior a 18 anos. A média mensal de admissão nessa UTIP é de 20 pacientes e dos quais 60% apresentam sepse grave e/ou choque séptico de diferentes etiologias. A coleta de dados foi realizada nos anos de 2014 a 2016 e teve duração total de 18 meses.

#### 4.1.3 Características clínicas e demográficas

Os dados referentes às características clínicas e demográficas dos pacientes internados na UTIP foram coletados em prontuário, sendo os seguintes: idade, sexo, data de admissão na UTIP, procedência, hipótese diagnóstica de internação, gravidade da doença, uso de VM, duração de VM, data da alta na UTIP e mortalidade em 28 dias ou alta.

A gravidade da doença na admissão foi avaliada pelo PIM 2 (Slater et al., 2003), e a gravidade da disfunção de órgãos na admissão pelo PELOD 2 (Leteurtre et al., 2013). O PELOD 2 também foi avaliado diariamente ao longo da internação e para cada variável do PELOD 2 foi registrado o valor mais anormal em cada dia, gerando o logístico de disfunção de órgãos pediátrico diário (dPELOD 2) (Leteurtre et al., 2015).

#### 4.1.4 Avaliação do estado nutricional

A avaliação antropométrica, incluindo o peso em gramas e o comprimento ou estatura em cm, foi aferida pela equipe do serviço no momento da admissão. As medidas de peso e estatura, ou comprimento, foram utilizadas para calcular o Índice de Massa Corporal (IMC), onde o peso, expresso em quilogramas, é dividido pela estatura ao quadrado em metros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

As curvas de crescimento da OMS (WHO, 2006) foram utilizadas para avaliar os dados de crianças a partir de cinco anos, com os resultados descritos em *escore-z* para os índices antropométricos de estatura-para-idade (E/I), P/I, IMC/I. A desnutrição aguda foi classificada de acordo com o P/I (<-2 *z-score*) em crianças menores de 2 anos, e com o IMC/I (<-2 *z-score*) em crianças maiores de 2 anos (Becker et al., 2015). A desnutrição crônica (pregressa) seguiu o critério de Waterlow, de acordo com o percentual de adequação do indicador estatura/comprimento-para-peso (E/C/P) (<80 %) (WHO, 2014).

#### 4.1.5 Marcadores laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue periférico com scalp, em tubos de 4 mL contendo anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (do inglês Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) para análises de plasma e eritrócito, e em tubos secos para análises de soro. Foram coletadas amostras em 24, 48 e 72 horas após a admissão na UTIP por profissionais treinados do serviço hospitalar. As amostras foram centrifugadas (4 °C por 15 min a 2.500 rpm) e o plasma e eritrócitos foram alíquotados em tubos tipo eppendorf e armazenados em freezer –80 °C dentro da primeira hora da coleta para posterior análise. O hemograma foi analisado pelo sangue total, de acordo com protocolo do laboratório de análises hospitalar. Os parâmetros registrados incluem: hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%).

#### 4.1.6 Avaliação de zinco, cobre e selênio eritrocitários

As amostras para determinação de Zn, Cu e Se eritrocitários foram coletadas nas primeiras 24 h a partir da admissão. As amostras foram primeiramente digeridas por via úmida ácida, ou seja, em tubos de vidro pirex contendo as amostras onde foram adicionados 5 mililitros de ácido nítrico 68 % P.A. (MERCK®) e mantidos em repouso durante a noite. Em seguida a digestão foi realizada em bloco digestor com temperatura inicial de 50 °C, que foi aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150 °C, a fim de eliminar as substâncias orgânicas. A seguir, foram acrescidos 5 mL de HCL 1,2 N para reduzir o Se presente na forma VI para forma IV, e as amostras ficaram sob aquecimento por duas horas a temperatura de 100 °C. Após este procedimento essas soluções foram diluídas para 25 mL com água deionizada e submetidas à leitura. A leitura das concentrações de Zn, Cu e Se foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (modelo Z5000, Hitachi, Tokio, Japão). Os resultados foram expressos em µg/L e posteriormente ajustados pela concentração de hemoglobina (Hb) e expressos em µg/g<sub>Hb</sub>.

#### 4.1.7 Concentração da proteína C-reativa, procalcitonina e lactato

As concentrações séricas de PCR foram analisadas por turbidimetria e expressas em mg/L, e de lactato sérico pelo método colorimétrico e expressas em mmol/L. Os níveis de procalcitonina plasmática foram determinados por ELISA (Kit PCT ELISA - SEA689Hu, USCN, Wuhan, China), com 98 % de precisão, uma faixa de detecção de 31,2–2 000 pg/mL e uma precisão intra-ensaio (coeficiente de variação, %) de 7,6 %, e expresso em ng/mL.

## 4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de estatística descritiva e testes de associação foram executados no Stata 13.0 (Stata Corporation). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, histogramas e coeficientes de variabilidade. Valores de *p* <0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

#### 4.2.1 Descrição das concentrações eritrocitárias de elementos traço

Para responder ao objetivo específico 1 da tese, foi feita a descrição das concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se.

Constatada a assimetria dos dados, as variáveis quantitativas foram relatadas como mediana e intervalo Interquartil (IIQ). As variáveis categóricas foram relatadas como frequências absolutas e proporções.

O estado nutricional dos elementos traço eritrocitários para Zn, Cu e Se foi avaliado usando os gráficos de percentis dependentes da idade desenvolvidos por Fify et al. (2022) na versão R 4.02. O código R e informações adicionais podem ser encontrados em <https://doi.org/10.5525/gla.researchdata.1221> (Fify et al., 2022). Para classificar o estado nutricional foi utilizada a terminologia recomendada pela Sociedade Europeia de Nutrição Enteral e Parenteral (ESPEN), na qual depleção representa a redução de algo em grande quantidade de forma que não reste o suficiente. Durante a depleção não são evidentes os sinais e sintomas clínicos de deficiência (Berger et al., 2022).

#### 4.2.2 Associação da magnitude da inflamação com desfechos clínicos

Para responder ao objetivo específico 2 da tese, ou seja, criar clusters para classificar os pacientes de acordo com a magnitude da resposta inflamatória sistêmica e avaliar a associação com desfechos, a amostra foi agrupada em clusters por meio do método *k*-means derivado de técnicas de machine learning.

Para entender melhor a magnitude da resposta inflamatória sistêmica, um método de clustering por *k*-means foi usado para separar os pacientes em clusters com base em marcadores de inflamação como PCR, PCT e lactato. O agrupamento *k*-means requer que as variáveis utilizadas no algoritmo sejam normalizadas e que sua correlação não seja superior a 0,9 (Blashfield; Aldenderfer, 1988). Portanto, o maior valor para cada uma das variáveis de PCR, PCT e lactato dos primeiros 3 dias na UTIP foi transformado em log e posteriormente testado para correlação. Esse tipo de clustering visa dividir *N* observações em *k* clusters, sendo necessário que o pesquisador determine o hiperparâmetro (*k*) para o agrupamento inicial. Assim, um *k* de 20 foi definido empiricamente (Nakamura et al., 2020). Após avaliar a soma dos quadrados dentro do cluster (WSS) e a Redução Proporcional do Erro (PRE-Test) (Figura 1), um número de 4 clusters foi considerado ideal para esta amostra (Makles, 2012).

As diferenças nas características basais entre os clusters de magnitude da resposta inflamatória sistêmica foram analisadas pelo teste Qui-Quadrado e Exato de Fisher, teste de Kruskal-Wallis com teste post hoc de Dunn e teste de tendência quando aplicável.

O efeito da magnitude da resposta inflamatória sistêmica foi avaliado em desfechos que incluíram disfunção de órgãos (dPELOD 2), tempo de permanência na UTIP em dias, tempo de VM em dias e mortalidade. Além disso, a internação crônica na UTIP foi definida como permanência  $\leq 13$  dias (Ventura et al., 2022b). Para cada variável incluída no cálculo do score PELOD 2, o valor mais anormal em cada dia durante a internação na UTIP foi utilizado para calcular o score dPELOD 2 (Leteurtre et al., 2015). A partir do score dPELOD 2 durante a permanência na UTIP foi definida a presença de MODS utilizando um ponto de corte  $\leq 7$  (Simanjuntak et al., 2020). A presença de choque hipotensivo foi definida de acordo com o Consenso Internacional de Sepse (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020).

Os métodos de Kaplan-Meier foram usados para exibir curvas de sobrevida para tempo de VM e tempo até a alta da UTIP. O teste de log-rank foi realizado para comparar duas curvas de sobrevida. A análise do tempo até o evento foi avaliada usando modelos de riscos proporcionais de Cox para analisar o efeito da magnitude elevada da resposta inflamatória em ambos os resultados. A variável evento foi definida como em ventilação mecânica ou não e alta viva ou censurada pelo tempo de alta viva da UTIP. Dessa forma, os pacientes que faleceram não foram incluídos na análise do tempo de alta da UTIP com vida. Os modelos ajustados incluíram idade, PIM 2 e desnutrição no modelo multivariável de Cox. Foram estimadas as chances de risco (HRs) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Além disso, uma análise de subgrupo foi feita para avaliar o efeito

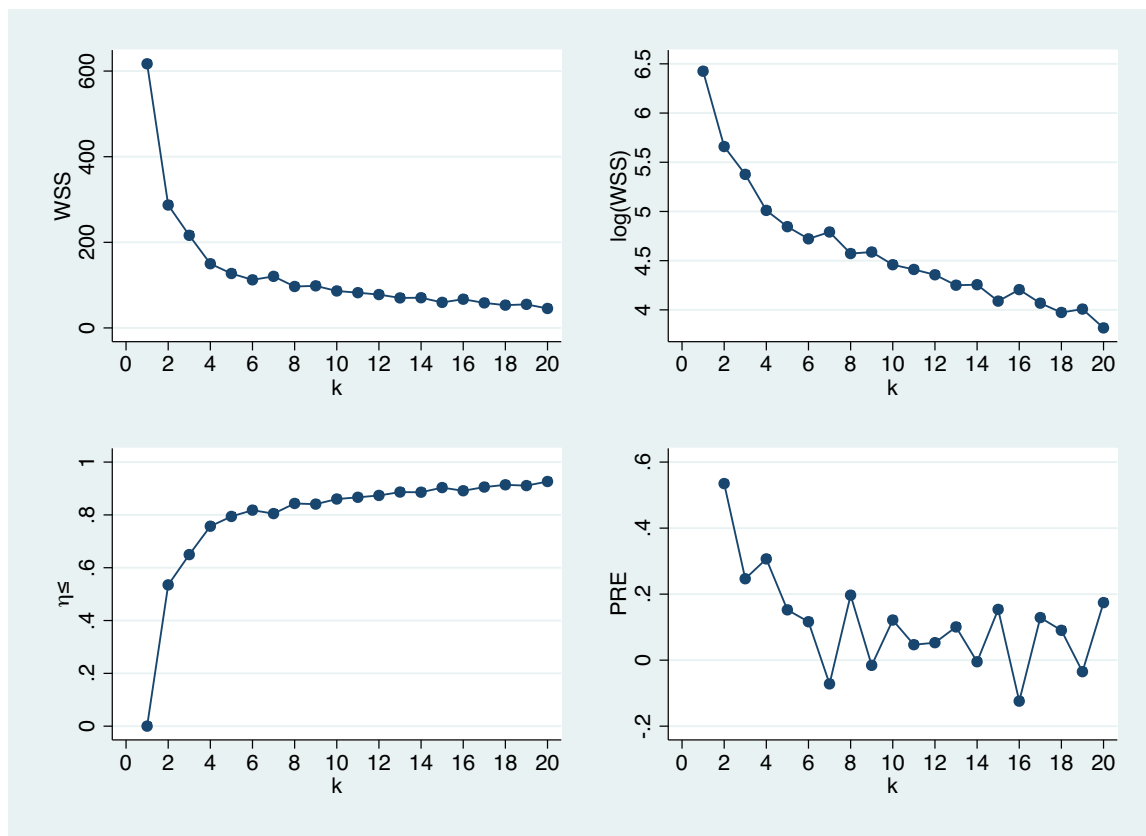


Figura 1 – Parâmetros para avaliação e decisão do número de clusters ( $k$ ) por  $k$ -means clustering.

da magnitude elevada da resposta inflamatória na permanência na UTIP e dias em VM de acordo com o diagnóstico de desnutrição crônica, sendo ajustada por idade, PIM 2 e presença de choque hipotensivo.

A associação entre a magnitude dos clusters de inflamação e dPELOD 2 foi avaliada por regressão de Poisson, bruta e ajustada para idade e PIM 2, e expressa como coeficiente de razão de risco de incidência (IRR) e IC 95%.

#### 4.2.3 Associação das concentrações eritrocitárias com fatores admissionais

Respondendo ao objetivo específico 3, para investigar a associação dos fatores de admissão com as concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se, foram definidos como desfechos as concentrações eritrocitárias, como variáveis contínuas, expressas em nmol/g<sub>Hb</sub>. Foram feitas análises de regressão linear bruta e ajustada para desnutrição crônica e gravidade da doença (representada pelo PIM 2). Os resultados foram apresentados em coeficiente  $\beta$  e seus respectivos IC 95%.

#### 4.2.4 Concentrações eritrocitárias de zinco, cobre e selênio na associação entre inflamação e desfechos clínicos

Para responder o objetivo específico 4, o papel moderador das concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se na associação entre inflamação e magnitude da inflamação, foi investigado por meio de análise de interação no Stata 13.

Para visualizar o papel moderador entre Zn, Cu e Se eritrocitários e o desfechos de disfunção de órgãos, foi criado um Grafo Acíclico Direto (DAG). Esse foi construído usando o software Dagitty (Textor et al., 2016).

Foi feita uma análise de regressão linear entre a inflamação (representada pelas variáveis de exposição PCR, PCT, lactato e cluster de magnitude da inflamação) e a disfunção de órgãos (representada pelo escore dPELOD 2, variável de desfecho) com teste de interação moderada. No caso, foram realizadas 12 regressões

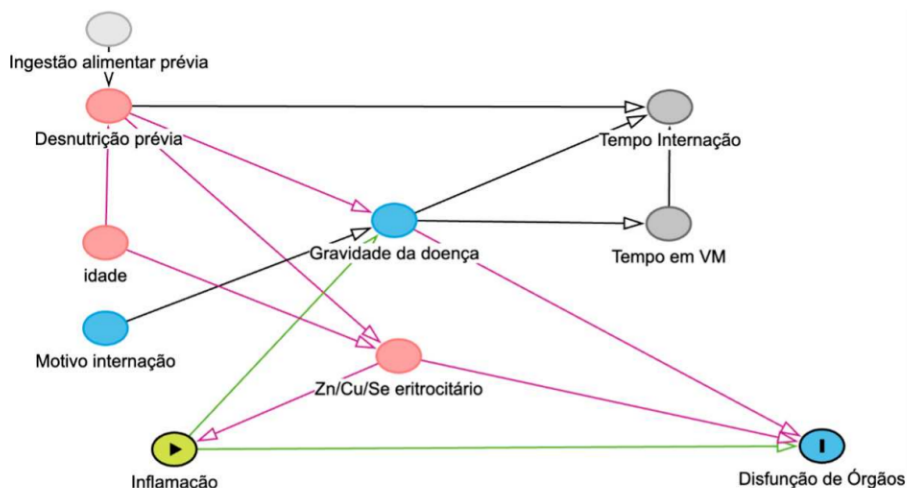


Figura 2 – Modelo teórico de associação entre inflamação e disfunção de órgãos, e moderação das concentrações eritrocitárias de Zn, Cu e Se.

Nota: Legenda: Botão de play - variável exposição; Botão de stop - variável desfecho; Círculos azuis - variáveis ancestrais do desfecho; Círculos rosas - variáveis ancestrais do desfecho e exposição; Círculos cinzas - variáveis não observadas/coletadas; Linhas rosas - caminhos com viés; Linhas verdes - caminhos causais ou caminhos que contêm variáveis mediadoras.

lineares, uma para interação entre cada elemento traço sobre cada variável de exposição e a respectiva variável de desfecho. O modelo genérico de interação está representado na Figura 3.

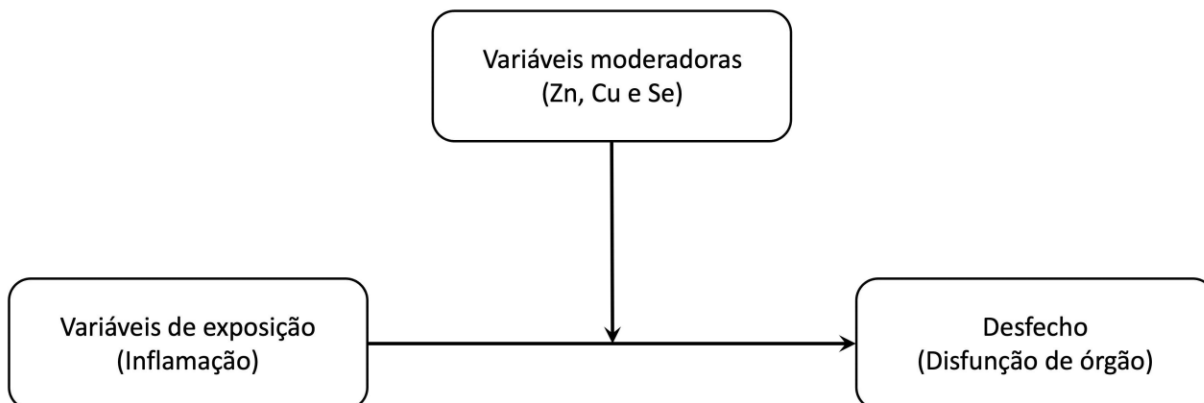


Figura 3 – Modelo genérico representativo do papel moderador das concentrações eritrocitárias de zinco, cobre e selênio na associação entre marcadores inflamatórios e magnitude da inflamação e a disfunção de órgãos.

As análises foram ajustadas por idade conforme modelo teórico apresentado na Figura 3 e resultados do manuscrito 1 que demonstraram associação entre concentrações eritrocitárias de Cu e Se e faixas etárias.

### 4.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP (CAAE: 21778614.2.0000.5505, Número do Parecer: 638.805) Anexo A. Os responsáveis pelos pacientes foram informados sobre os objetivos, métodos e delineamento da pesquisa, e após, convidados a participar de maneira voluntária, assinando o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Nos casos de menores de idade capacitados, eles foram convidados a assinar o termo de assentimento livre esclarecido (TALE).

Esse estudo foi conduzido seguindo as recomendações da Resolução n 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que rege pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos. Essa considera que toda pesquisa implica



em riscos aos participantes, entendendo, em seu item II.22 – risco da pesquisa como a “possibilidade de danos à dimensão física, intelectual, psíquica, moral, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente” (Brasil, 2012). Visando minimizar os riscos, o anonimato dos participantes foi assegurado por meio da retirada da identificação na ficha de coleta de dados após o encerramento da coleta e tabulação dos dados. As informações coletadas foram arquivadas em local seguro, sob a responsabilidade do grupo de pesquisa, por um período de cinco anos, e posteriormente incinerados.

## 5 RESULTADOS

## 5.1 MANUSCRITO 1

**Title:** Use of *k*-means cluster analysis in critically ill children with systemic inflammatory response syndrome.

**Authors:** Taís Thomsen Silveira, M.Sc<sup>1</sup>; Luna Dias de Almeida Oliveira, M.Sc<sup>1</sup>; Tiago Rodrigues de Lima, PhD<sup>2</sup>; Daniela Hauschild, Ph.D.<sup>1</sup> Heitor Pons Leite, Ph.D.<sup>3</sup> and Yara Maria Franco Moreno<sup>1,\*</sup>, Ph.D.

<sup>1</sup> Graduate Program in Nutrition, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.

<sup>2</sup> Center of Health and Sports Sciences, University of Santa Catarina State, Santa Catarina, Brazil.

<sup>3</sup> Discipline of Nutrition and Metabolism, Department of Pediatrics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author:

Yara Maria Franco Moreno – Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. CEP: 88040-900.

Phone: +55 (48) 3721-2215

E-mail: yara.moreno@ufsc.br

Category of study: clinical study.

## IMPACT

- SIRS criteria do not uniformly classify patients according to magnitude of inflammation;
- *k*-means clustering can identify subgroups of critically ill children with SIRS based on the magnitude of inflammation using multiple inflammation markers, including serum CRP, PCT, and lactate. This study emphasizes the role of the magnitude of the systemic inflammatory response as expressed by the clusters in predicting the duration of PICU stay in critically ill children;
- Grouping patients based on inflammatory biomarkers could lead to better personalized treatment and monitoring of disease progression, ultimately resulting in improved patient outcomes.

## ABSTRACT

**Background:** The degree of SIRS can vary among patients, and there is presently no dependable means to evaluate this in clinical settings. This study aimed to describe the clustering of children according to the magnitude of inflammation and its association with clinical outcomes. The hypotheses were that children with SIRS have different magnitudes of inflammation and that this is associated with clinical outcomes. **Methods:** In a southeastern Brazilian hospital, 105 children with SIRS admitted to the PICU were clustered using the highest serum levels of CRP, PCT, and lactate in the first 72 h of PICU. **Results:** Four clusters were identified and labeled as low (n=13), mild (n=30), moderate (n=36), and high (n=26) inflammation, with different levels of CRP and PCT. Children in the high inflammation cluster had a higher organ dysfunction score, and lower probability of discharge from the PICU. In the sensitivity analysis, children with septic shock in the high inflammation cluster were less likely to be discharged from the PICU. **Conclusions:** Children with SIRS present with different inflammation magnitudes resulting in four clusters. A high inflammation cluster is associated with longer PICU stay and organ dysfunction.

## INTRODUCTION

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is a potentially life-threatening condition that affects critically ill children (Chakraborty; Burns, 2021). The magnitude of inflammation in SIRS can vary widely among patients, and no reliable method currently exists to assess its severity in clinical practice (Surbatovic

et al., 2013). Commonly used severity of illness scores used in the pediatric intensive care unit (PICU), such as the updated pediatric index of mortality (PIM 2) and pediatric logistic organ dysfunction (PELOD 2), do not specifically evaluate the magnitude of inflammation (Slater et al., 2003; Leteurtre et al., 2013).

In recent years, there has been an increasing interest in using biomarkers to assess the severity of illness and inflammation in patients with SIRS. Acute phase reactants such as C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) have shown promise for evaluating the clinical course of sepsis and predicting outcomes (Rey et al., 2007; Li, G. et al., 2019). However, the use of individual biomarkers has limitations, and a combination of biomarkers has been recommended to better evaluate the complexity of SIRS (Pierrakos et al., 2020).

CRP and PCT are non-specific acute phase reactants that increase during infection and tissue injury (Markanday, 2015). They exhibit distinct kinetics, with PCT concentration starting to rise as early as 2 hours after the onset of sepsis, peaking at 12 hours, and returning to normal within 48-72 hours due to its half-life of approximately 24 hours. In contrast, CRP concentration begins to rise after 12 hours and reaches its peak at 48 hours (Pepys; Hirschfield, 2003). However, interpretation of CRP levels within the first 48 hours should be approached with caution due to variations related to the time of sampling (Davidson et al., 2013).

In addition to CRP and PCT, serum lactate concentration is another biomarker that plays a crucial role in assessing the severity of SIRS (Nolt et al., 2018; Ivashkiv, 2020). However, it is not a specific marker of sepsis as it is elevated in different forms of shock (Vincent; Bakker, 2021; Li, X. et al., 2022). Lactate levels change more slowly and are not acute-phase reactants. Elevated lactate levels can indicate tissue hypoxia but can also be influenced by factors such as impaired liver metabolism and inhibition of pyruvate dehydrogenase 4. Serum lactate concentration has also been shown to be a prognostic marker for organ dysfunction and patient survival in critically ill adults and children (Bakker et al., 1996; Ryoo et al., 2018; Jaiswal et al., 2020).

Given the limitations of using isolated biomarkers, alternative approaches are needed to accurately evaluate the magnitude of inflammation in patients with SIRS (Mearelli et al., 2018; Pierrakos et al., 2020). *k*-means clustering, a machine learning technique, has demonstrated potential in grouping patients based on similarities in their clinical and laboratory features, extracting valuable information from electronic medical records (EMRs) in the PICU setting (Williams; Ghosh; Wetzel, 2018). Notably, *k*-means clustering has been successfully applied to analyze CRP values, aiding in the identification of persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome (Nakamura et al., 2020). To date, no studies using *k*-means clustering to identify magnitude of inflammation in children with SIRS were found in the literature. The use of cluster analysis to identify distinct patient groups may offer improved precision over clinical classification, thereby guiding therapeutic decisions more effectively (Rollán-Martínez-Herrera et al., 2022).

Our aims were to explore the potential of *k*-means clustering in identifying the magnitude of inflammation in previously healthy, critically ill children with SIRS and to evaluate its impact on length of PICU stay, length of mechanical ventilation (MV) and organ dysfunction. Our hypotheses are that children with SIRS have different magnitudes of inflammation, and that the clinical outcomes are associated with the cluster of magnitude of inflammation.

## METHODS

### Study design and settings

This study is a secondary analysis of 105 patients from a prospective cohort study conducted in the PICU of a hospital in southeastern Brazil. The detailed methodological description was previously reported elsewhere (Lopes Júnior et al., 2021). The study entitled “Endothelial Dysfunction and Selenium Status in Children with Acute Systemic Inflammatory Response” was approved by the research ethics committee of the Universidade Federal de São Paulo (HSC2007 0713H) in May 7th of 2014, and is registered at <https://www.clinicaltrials.gov> (NCT02619344). The study was conducted in accordance with ethical standards and followed the terms stated

in the Helsinki Declaration of 1975. All participants signed an informed consent/assent form for participation in the study. The data were collected between August 2014 and May 2016.

### Participants

Children with SIRS (sepsis, severe sepsis, septic shock, or multiple organ failure) were eligible for inclusion (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005). Patients aged <1 month, with chronic disease (kidney, liver, cardiac, onco-hematologic, and immunodeficiency), with blood transfusion before the first blood collection or previous hospitalization before 3 months of admission were excluded.

### Clinical characteristics

To evaluate illness severity and mortality risk, the PIM 2 was recorded on admission and the percentage probability of death was calculated (Slater et al., 2003). The PELOD 2 score was calculated on admission (Leteurtre et al., 2013) and daily during PICU stay daily pediatric logistic organ dysfunction (dPELOD 2) (Leteurtre et al., 2015).

Anthropometric parameters of weight and height were measured within 72 h of PICU admission. The weight-for-age (W/A), height-for-age (H/A), and body mass index-for-age (BMI/A) z-scores were calculated using the World Health Organization (WHO) Anthro or Anthro-Plus software (WHO, 2006, 2007). Acute undernutrition was defined as a W/A <- 2 z-score for patients aged < 2 years and a BMI/A <- 2 z-score for patients aged  $\leq$  2 years (Becker et al., 2015). Chronic undernutrition was defined as a H/A <-2 z-score (WHO, 2014).

### Inflammatory biomarkers

CRP, PCT, and lactate concentrations were analyzed on days 1, 2, and 3 after admission to the emergency department or PICU (Lopes Júnior et al., 2021).

### Magnitude of inflammation cluster

A  $k$ -means clustering was used to separate the patients into clusters based on the inflammatory biomarkers CRP, PCT, and lactate. The variables were log-transformed and later tested for correlation, all presented a correlation  $>0.9$  and were therefore considered adequate to perform  $k$ -means clustering (Blashfield; Aldenderfer, 1988). A hyperparameter ( $k$ ) for the initial clustering of 20 was empirically defined (Nakamura et al., 2020). The number of clusters was determined by the within-cluster sum of squares (WSS) and Proportional Reduction in Error (PRE-Test) using the elbow method (Makles, 2012). Additional information and Stata syntax are described in the supplemental materials Figure 4. The magnitude of the inflammation cluster was defined as the explanatory variable.

### Outcomes

The primary outcome variable was the length of PICU stay in days. Secondary outcomes included the duration of MV in days and organ dysfunction as measured by the dPELOD 2 score. For each variable, the most abnormal value each day during the PICU stay was used to calculate the dPELOD 2 score (Leteurtre et al., 2015). The dPELOD 2 score was used to categorize the presence of MODS using a cut-off point of  $\leq 7$  (Simanjuntak et al., 2020).

Sepsis and septic shock on admission were defined according to the International Sepsis Consensus (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020). Additionally, prolonged PICU stay was defined as a PICU stay  $\leq 13$  days (Ventura et al., 2022).

## Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Stata® 13.0. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, histograms, and coefficient of variability. Due to asymmetry, all quantitative variables are reported as median and interquartile range (IQR). Categorical variables were reported as absolute frequencies and proportions. Differences in baseline characteristics between clusters of inflammation were analyzed using Fisher's exact test, Kruskal-Wallis' test with Dunn's test, and trend test when applicable.

The associations between the magnitude of the inflammation cluster and PICU length of stay and length of ventilation were evaluated using the Kaplan-Meier method and log-rank test. Cox regression analysis, crude and adjusted for age and PIM 2, were applied, and expressed as hazard ratios (HRs) and confidence interval of 95% (CI 95%). Children who died were censored. The association between the magnitude of inflammation clusters and dPELOD 2 was assessed by Poisson regression, crude and adjusted for age and PIM 2, and expressed as the incidence risk ratio (IRR) coefficient and CI 95%. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Participants' characteristics according to the magnitude of inflammation clusters

One hundred and five children were included, the median age was 25.4 months (IQR = 7.3 – 93.4 months) and 49.5% of the children were under 2 years of age. After the *k*-means clustering analysis, four clusters were identified. Based on significant differences and increases in the inflammatory markers CRP and PCT, the clusters were classified as low (n=13), mild (n=30), moderate (n=36), or high (n=26) inflammation Table 1.

Table 1 (Manuscript 1) - Characterization of patients with criteria for SIRS and the magnitude of inflammation clusters (n=105).

Variables	Total (n=105)	Low inflammation (n=13)	Mild inflammation (n=30)	Moderate inflammation (n=36)	High inflammation (n=26)	p
			n(%) / median [IQR]			
<b>Demographic</b>						
Sex (male)	63 (60)	10 (76.9)	16 (53.3)	20 (55.6)	17 (65.4)	0.455*
Age (months)	25.4 [7.3 – 93.4]	43.2 [3.6 – 80.9]	13.2 [6.3 – 48.9]	22.6 [10.0 – 128.2]	35.9 [12.4 – 101.3]	0.284**
Age (<2years)	52 (49.5)	6 (46.2)	18 (60)	19 (52.8)	9 (34.6)	0.267*
<b>Clinical</b>						
PELOD 2 (at admission)	1.4 [0.9 – 8.5]	0.9 [0.9 – 2.2]	0.9 [0.5 – 3.5]	1.8 [0.7 – 8.5]	2.2 [0.9 – 8.5]	0.222**
PIM 2 (%)	2.2 [1.0 – 4.7]	2.3 [0.7 – 4.6]	1.35 [0.7 – 2.8] <sup>bc</sup>	2.5 [1.2 – 4.3]	3.9 [1.8 – 8.7]	<b>0.005**</b>
<b>Undernutrition<sup>i</sup></b>						
Acute undernutrition	5 (4.76)	4 (31)	1 (39)	0 (15)	0 (0)	NA*
Chronic undernutrition	20 (19)	1 (5)	8 (40)	6 (30)	5 (25)	0.535*
<b>Inflammatory biomarkers</b>						
C-reactive protein (mg/L)	31.2 [5.3 – 88.3]	0.7 [0.4 – 0.9]	5.6 [3.5 – 10.7]	62.4 [41.5 – 106.6]	110.7 [58.6 – 258.2]	<b>0.000**</b>
Procalcitonin (ng/mL)	0.15 [0.07 – 0.05]	0.07 [0.05 – 0.12]	0.08 [0.06 – 0.13]	0.14 [0.07 – 0.23]	1.37 [1.01 – 1.95]	<b>0.000**</b>
Lactate (mmol/L)	1.61 [1.05 – 2.43]	1.61 [1.27 – 4.41]	1.49 [0.99 – 2.39]	1.50 [1.15 – 2.23]	1.99 [1.07 – 2.60]	0.681**
<b>Admission diagnosis</b>						
Respiratory	49 (47)	4 (8)	19 (39)	17 (35)	9 (18)	0.109*
Trauma	24 (23)	4 (17)	6 (25)	8 (33)	6 (25)	0.886*
Surgical	10 (9)	1 (10)	1 (10)	4 (40)	4 (40)	0.451*
<b>Septic Shock</b>	58 (55)	4 (6.9)	12 (20.7)	19 (32.8)	23 (39.6)	<b>0.000*</b>
<b>Mechanical Ventilation (MV)</b>	55 (52)	3 (5.5)	14 (25.5)	19 (34.5)	19 (34.5)	<b>0.025*</b>
<b>Length of MV (days)</b>	6.0 [3.0 – 8.0]	2.0 [1.0 – 6.0]	5.0 [2.0 – 9.0]	8.0 [3.0 – 11.0]	5.0 [3.0 – 7.0]	0.335**
<b>Organ Dysfunction (PELOD 2<sup>ii</sup>)</b>	5.0 [4.0 – 9.0]	4.0 [4.0 – 6.0]	4.0 [4.0 – 7.0]	5.5 [3.5 – 9.0]	6.0 [4.0 – 9.0]	0.241**
<b>MODS</b>	30 (29)	2 (7)	7 (23)	12 (40)	9 (30)	0.520*
<b>Prolonged PICU stay (≥13 days)</b>	11 (10)	0 (0)	4 (36)	2 (18)	5 (45)	0.205*
<b>PICU length of stay (days)</b>	4.0 [2.0 – 9.0]	2.0 [2.0 – 4.0]	3.0 [1.0 – 10.0]	5.0 [2.0 – 10.0]	7.5 [3.0 – 10.0]	<b>0.003**</b>
<b>Mortality</b>	8 (7.6)	0 (0)	2 (25)	2 (25)	4 (50)	0.414*

IQR – Interquartile; MODS – Multiple Organ Dysfunction Syndrome; PICU – Pediatric Intensive Care Unit; PIM 2 – Pediatric Mortality Index 2; PELOD 2 – Pediatric Logistic Organ Dysfunction 2 score; SIRS – Systematic Inflammatory Response Syndrome. \*Chi-square Fisher's exact test; \*\*Kruskal-Wallis. <sup>b</sup>Dunn test, Mild is different from Moderate p = 0.014. <sup>c</sup>Dunn test, Mild is different from High p = 0.002. <sup>i</sup>Defined as W/A < - 2 z-score for patients ≤2 years of age, and as BMI/A < - 2 z-score for patients ≥2 years of age. Chronic undernutrition was defined as H/A < -2 z-score. <sup>ii</sup>Defined as dPELOD 2 score recorded along admission to the PICU.

There were no differences in demographic variables, nutritional status, or PELOD 2 scores between the clusters. Patients in the high inflammation cluster had the highest PIM 2 score ( $p<0.001$ ), prevalence of MV (34,5%,  $p=0.025$ ), and septic shock ( $p<0.001$ ) at admission.

Over half of the children were admitted with septic shock (55%,  $n=58$ ), and 1/3 ( $n=16$ ) were in the low inflammation cluster ( $n=4$ , 6.9%) and mild inflammation cluster ( $n=12$ , 20.7%).

#### Magnitude of inflammation cluster association with clinical outcomes

Children had differences in the time of discharge from the PICU according to the magnitude of the inflammation clusters (log-rank test,  $p<0.001$ ) Figure 1. Children in the high inflammation cluster had a 79% lower probability of discharge from the PICU adjusted for PIM 2 and age (HR 0.21, CI 95%: 0.10 – 0.46;  $p<0.001$ ) than children in the low inflammation cluster Figure 2. Mild (HR 0.36, CI 95%: 0.17 – 0.74;  $p=0.006$ ) and moderate inflammation (HR 0.35, CI 95%: 0.18 – 0.70;  $p=0.003$ ) clusters were also associated with a lower probability of discharge.

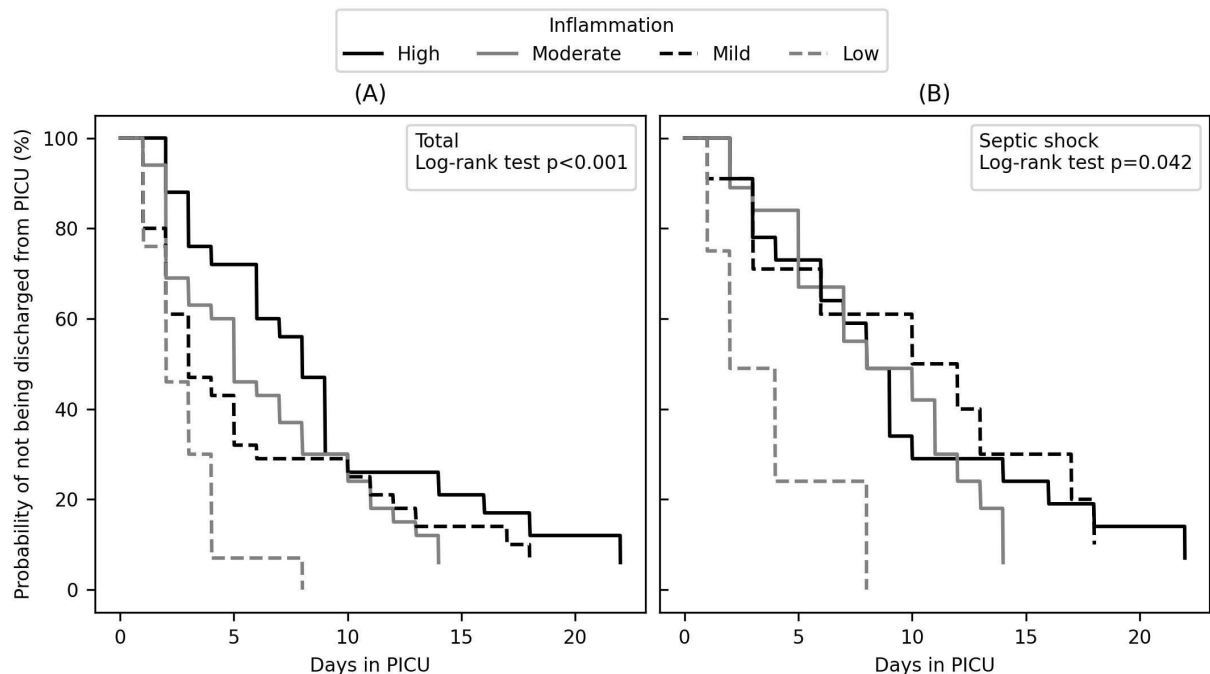


Figure 1 (Manuscript 1) - Kaplan-Meier survival estimate for PICU length of stay in children with SIRS ( $n=105$ ) (A) and septic shock ( $n=58$ ) (B) according to the magnitude of inflammation cluster.

In a sensitivity analysis, children with septic shock ( $n=58$ ), showed a significant difference (log-rank test  $p=0.042$ ) in the probability of discharge between the magnitude of inflammation clusters compared to the low inflammation cluster Figure 1. Compared to the low inflammation cluster, children were less likely to be discharged from the PICU in the mild (HR 0.23, CI 95%: 0.04 – 0.80;  $p=0.02$ ), moderate (HR 0.28, CI 95%: 0.09 – 0.88;  $p=0.03$ ), and high inflammation (HR 0.24, CI 95%: 0.07 – 0.73;  $p=0.012$ ) clusters. Children without septic shock had no difference in the probability of discharge between the clusters Figure 2.

The length of ventilation did not differ according to the magnitude of the inflammation clusters (log-rank test,  $p=0.14$ ).

Organ dysfunction was associated with the magnitude of inflammation. For every unit increase in the magnitude of the inflammation cluster, there was a 13% increase in the dPELOD 2 score (IRR 1.13, CI 95%: 0.04 – 1.22;  $p=0.005$ ) when adjusted for age and PIM 2. This association was dependent on being in



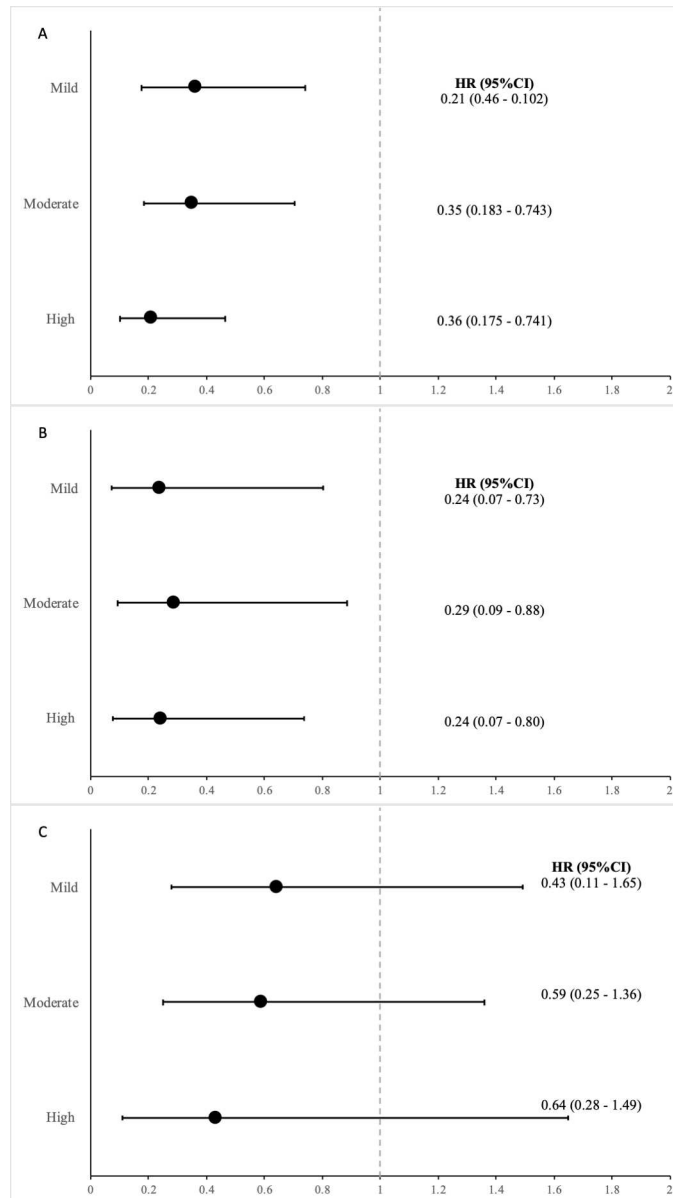


Figure 2 (Manuscript 1) - Cox regression of magnitude of inflammation cluster and probability of PICU discharge in children with SIRS (n=105) (a), septic shock (n=58) (b) and without septic shock (n=47) (c). Children without septic shock had no difference in the probability of discharge between the clusters (c).

the high inflammation cluster versus the low inflammation cluster (IRR 1.41; CI 95%:1.06 – 1.88;  $p=0.018$ ) Figure 3.

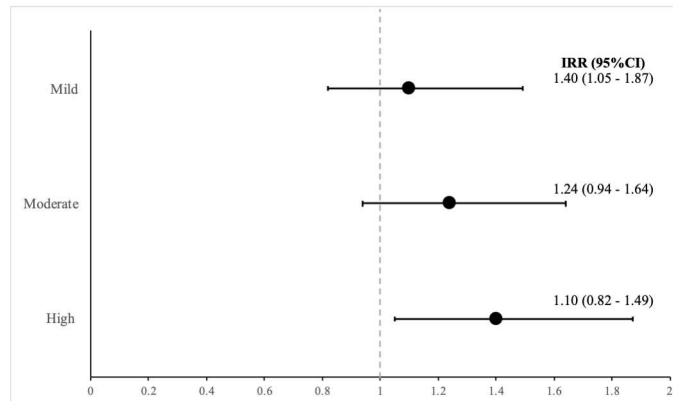


Figure 3 (Manuscript 1) - Poisson regression of magnitude of inflammation clusters and organ dysfunction dPELOD 2 in children with SIRS (n=105). Children in the high inflammation cluster had an increased incidence risk of organ dysfunction compared to the low inflammation cluster.

## DISCUSSION

In this study, four distinct inflammation clusters were identified in critically ill children with SIRS using  $k$ -means clustering analysis based on CRP, PCT, and lactate levels. These clusters were labeled as high, moderate, mild, and low inflammation, respectively. Children in the high inflammation cluster had a lower probability of discharge from the PICU and higher organ dysfunction.

### Cluster identification

The identification of inflammation clusters using CRP, PCT, and lactate levels as biomarkers is based on the rationale that they are widely used in clinical practice to assess the severity of infection and inflammation (Pierrakos et al., 2020), have been used as biomarkers of sepsis in different settings (Robinson; De, 2018; Eschborn; Weitkamp, 2019; Honore et al., 2020) and predictors of sepsis-related mortality (Schuetz et al., 2017; Wang et al., 2022), and have been used to guide antibiotic therapy (Oliveira et al., 2013). Lactate is a biomarker of tissue hypoperfusion (Hernandez; Bellomo; Bakker, 2019) and a prognostic predictor in patients with respiratory disease (Li, X. et al., 2022).

The use of combined biomarkers in algorithms has proven to be useful in intensive care unit (ICU). Mearelli et al. (2018) developed an algorithm using a multivariate clinical logistic regression model and data from five biomarkers (CRP among them), which were used to generate a nomogram and a multiple biomarker score (MBMS). The algorithm was validated using an independent cohort of 716 patients from five Italian ICUs and compared to the usual approach of prescribing antimicrobial therapy at admission. Performance was assessed using negative and positive predictive values, receiver operating characteristic curves, and area under the curve. This algorithm was superior to the usual approach for the diagnosis of sepsis/septic shock. The algorithm was also used to reclassify patients with suspected infection who did not meet the criteria for sepsis or septic shock according to the SIRS criteria (Mearelli et al., 2018). Another study used  $k$ -means clustering and identified 3.0 mg/dL as the CRP cut-off point on day 14 in patients with persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome (PICS) (Nakamura et al., 2020).

### Differences between clusters

Our patient sample consisted of critically ill children without any underlying chronic conditions who presented with SIRS primarily due to infection or trauma. The prevalence of complex chronic conditions (CCC) varies between 45 % and 70 %, and these patients tend to require multiple admissions to the PICU and are at higher risk of nutritional status deterioration, longer PICU stay, and higher PICU mortality (Edwards et al., 2012; Arias López et al., 2020; Ventura et al., 2022).

The PIM 2 was inadequate for discriminating the degree of inflammation among the identified clusters, with the low inflammation cluster exhibiting an equal PIM 2 score relative to the high inflammation cluster. Furthermore, the mild inflammation cluster displayed a significant difference from the moderate and high inflammation clusters, the latter of which demonstrated no significant differences in PIM 2 score.

### Relationship between the magnitude of inflammation clusters and clinical outcomes

There was a significant association between the magnitude of the inflammation clusters and PICU length of stay. Children in the high inflammation cluster had a significantly lower probability of discharge from the PICU than those in other clusters. This suggests that the severity of inflammation is associated with delayed recovery and discharge readiness in critically ill children with SIRS. Potential reasons for this finding include the impact of inflammation on recovery, and therefore, on PICU days (Chakraborty; Burns, 2021).

In a sensitivity analysis, we found that children with septic shock in the high inflammation cluster had a lower probability of discharge than the other clusters. Although the high inflammation cluster had the highest prevalence of septic shock and a lower probability of PICU discharge, 27 % of the children with septic shock were in the low and mild magnitude inflammation clusters. These differences highlight the heterogeneity of the magnitude of the inflammatory response in critically ill children, which may have implications for clinical outcomes.

Organ dysfunction was greater in the high inflammation cluster, as evidenced by the Poisson regression between the clusters and dPELOD 2 score. SIRS was previously reported to be associated with organ dysfunction (Chakraborty; Burns, 2021); however, our study is the first to identify that this association is also dependent on the magnitude of SIRS.

### Strengths and Limitations

The interpretation and generalizability of our findings have certain limitations. These findings may not be generalizable to other populations with chronic diseases or other underlying causes of SIRS. However, this allowed us to focus specifically on the impact of inflammation in critically ill children, without the confounding effects of chronic diseases.

Due to the small sample size, the sensitivity analysis showing an association between the presence of septic shock and PICU discharge did not have enough power to reach a definitive conclusion. Further validation in diverse populations is warranted to confirm the reproducibility of our findings and the clinical relevance of the identified clusters.

### CONCLUSION

Critically ill children with SIRS have different magnitudes of inflammatory response, as evidenced by the clusters found in this study. Moreover, children in the high inflammation cluster had longer PICU length of stay and more organ dysfunction.

By leveraging the combined information from CRP, PCT, and lactate levels, this novel approach may be used to identify the magnitude of SIRS and aid in optimizing therapeutic strategies for these patients. From

a prospective, practical point of view, intensivists should interpret these biomarkers in the context of the individual patient's clinical presentation.

## REFERENCES

- Blashfield, R. K.; Aldenderfer, M. S. The Methods and Problems of Cluster Analysis. **Handbook of Multivariate Experimental Psychology**, Springer, Boston, MA, p. 447–473, 1988. Available from: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5_14)>.
- Bakker, J. et al. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. **American journal of surgery**, Am J Surg, v. 171, n. 2, p. 221–226, 1996. ISSN 0002-9610. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8619454/>>.
- Pepys, M. B.; Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805–1812, 2003.
- Slater, A. et al. PIM2: A revised version of the Paediatric Index of Mortality. **Intensive Care Medicine**, Springer-Verlag, v. 29, n. 2, p. 278–285, 2003. ISSN 03424642.
- Goldstein, B.; Giroir, B.; Randolph, A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 6, n. 1, 2005. ISSN 15297535.
- WHO. Global database on Body Mass Index, 2006.
- Rey, C. et al. Procalcitonin and C-reactive protein as markers of systemic inflammatory response syndrome severity in critically ill children. *eng.* **Intensive care medicine**, v. 33, n. 3, p. 477–484, Mar. 2007. ISSN 0342-4642 (Print).
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. v. 85, p. 660–67, 2007.
- Edwards, J. D. et al. Chronic conditions among children admitted to U.S. pediatric intensive care units. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 7, p. 2196–2203, 2012. ISSN 0090-3493.
- Makles, A. Stata tip 110: How to get the optimal k-means cluster solution. **Stata Journal**, v. 12, n. 2, p. 347–351, 2012. ISSN 1536867X.
- Davidson, J. E. et al. Implementation of the pain, agitation, and delirium clinical practice guidelines and promoting patient mobility to prevent post-intensive care syndrome. **Critical Care Medicine**, Nature Publishing Group, v. 41, 9 SUPPL.1, p. 413–419, July 2013. ISSN 00903493. Available from: <<https://www.nature.com/articles/pr2013124>>.
- Leteurtre, S. et al. PELOD-2: An update of the PEdiatric logistic organ dysfunction score. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 7, p. 1761–1773, July 2013. ISSN 00903493. Available from: <[https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD\\_2\\_\\_An\\_Update\\_of\\_the\\_PEdiatric\\_Logistic\\_Organ.21.aspx](https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD_2__An_Update_of_the_PEdiatric_Logistic_Organ.21.aspx)>.
- Oliveira, L. de et al. Procalcitonin versus C-reactive protein for guiding antibiotic therapy in sepsis: a randomized trial. **Critical care medicine**, v. 41, n. 10, p. 2336–2343, 2013.
- Surbatovic, M. et al. Immunoinflammatory response in critically ill patients: Severe sepsis and/or trauma. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013. ISSN 09629351.
- WHO. **Prevalence of stunting in children ages 0-4 years**. [S.l.: s.n.], 2014. Available from: <[http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0\\_4stunting](http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0_4stunting)>. Visited on: 20 Apr. 2023.

- Becker, P. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Indicators recommended for the identification and documentation of pediatric malnutrition (undernutrition). **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 147–161, 2015. ISSN 19412452.
- Leteurtre, S. et al. Daily estimation of the severity of organ dysfunctions in critically ill children by using the PELOD-2 score. eng. **Critical care (London, England)**, Crit Care, v. 19, n. 1, p. 324, Sept. 2015. ISSN 1466-609X (Electronic). Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369662/>>.
- Markanday, A. **Acute Phase Reactants in Infections: Evidence-Based Review and a Guide for Clinicians**. v. 2. [S.l.]: Oxford University Press, June 2015. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369662/>>.
- Schuetz, P. et al. Serial procalcitonin predicts mortality in severe sepsis patients: Results from the multicenter procalcitonin monitoring SEpsis (MOSES) Study. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 5, p. 781–789, 2017. ISSN 15300293.
- Mearelli, F. et al. Derivation and validation of a biomarker-based clinical algorithm to rule out sepsis from noninfectious systemic inflammatory response syndrome at emergency department admission: A multicenter prospective study. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1421–1429, 2018. ISSN 15300293.
- Nolt, B. et al. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. **Shock**, v. 49, n. 2, p. 120–125, 2018. ISSN 15400514.
- Robinson, P.; De, S. K. How to use Procalcitonin. **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 103, n. 5, p. 257–262, 2018. ISSN 17430593.
- Ryoo, S. M. et al. Lactate Level Versus Lactate Clearance for Predicting Mortality in Patients With Septic Shock Defined by Sepsis-3. **Critical care medicine**, Crit Care Med, v. 46, n. 6, e489–e495, June 2018. ISSN 1530-0293. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29432347/>>.
- Williams, J. B.; Ghosh, D.; Wetzel, R. C. Applying machine learning to pediatric critical care data\*. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 19, n. 7, p. 599–608, 2018. ISSN 19473893.
- Eschborn, S.; Weitkamp, J. H. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of Perinatology**, Springer US, v. 39, n. 7, p. 893–903, 2019. ISSN 14765543. Available from: <<https://doi.org/10.1038/s41372-019-0363-4>>.
- Hernandez, G.; Bellomo, R.; Bakker, J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. **Intensive Care Medicine**, Springer Berlin Heidelberg, v. 45, n. 1, p. 82–85, 2019. ISSN 14321238. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-018-5213-x>>.
- Li, G. et al. Usefulness of RBC distribution width and C-reactive protein to predict mortality in pediatric non-cardiac critical illness. **American Journal of Emergency Medicine**, Elsevier Inc., v. 37, n. 12, p. 2143–2150, 2019. ISSN 15328171. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.01.041>>.
- Arias López, M. D. P. et al. Prevalence of Children with Complex Chronic Conditions in PICUs of Argentina: A Prospective Multicenter Study\*. **Pediatric Critical Care Medicine**, e143–e151, 2020. ISSN 19473893.
- Honore, P. M. et al. Procalcitonin to allow early detection of sepsis and multiple organ failure in severe multiple trauma: Beware of some confounders. **Critical Care**, Critical Care, v. 24, n. 1, p. 2019–2020, 2020. ISSN 1466609X.
- Ivashkiv, L. B. The hypoxia–lactate axis tempers inflammation. **Nature Reviews Immunology**, Springer US, v. 20, n. 2, p. 85–86, 2020. ISSN 14741741. Available from: <<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0259-8>>.

- Jaiswal, P. et al. Early lactate measurements for predicting in-hospital mortality in paediatric sepsis. **Journal of paediatrics and child health**, J Paediatr Child Health, v. 56, n. 10, p. 1570–1576, Oct. 2020. ISSN 1440-1754. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32861227/>>.
- Nakamura, K. et al. C-reactive protein clustering to clarify persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome. **Intensive Care Medicine**, Springer Berlin Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 437–443, 2020. ISSN 14321238. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05851-3>>.
- Pierrakos, C. et al. Biomarkers of sepsis: Time for a reappraisal. **Critical Care**, v. 24, n. 1, 2020.
- Simanjuntak, Y. R. et al. Validation of PELOD-2 score as a predictor of life-threatening organ dysfunction in pediatric sepsis. **Paediatrica Indonesiana**, v. 60, n. 5, p. 227–32, 2020. ISSN 0030-9311.
- Weiss, S. L.; Nicolson, S. C.; Naim, M. Y. Clinical Update in Pediatric Sepsis: Focus on Children With Pre-Existing Heart Disease. eng. **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, Springer Berlin Heidelberg, v. 34, n. 5, p. 1324–1332, May 2020. ISSN 1532-8422 (Electronic). Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6>>.
- Chakraborty, R. K.; Burns, B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. **StatPearls**, StatPearls Publishing, July 2021. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>>.
- Lopes Júnior, E. et al. Association of selenium status with endothelial activation during acute systemic inflammation in children. **Clinical Nutrition ESPEN**, Elsevier Ltd, n. 40, 2021. ISSN 24054577. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.11.007>>.
- Vincent, J. L.; Bakker, J. Blood lactate levels in sepsis: in 8 questions. **Current opinion in critical care**, v. 27, n. 3, p. 298–302, 2021.
- Li, X. et al. Lactate metabolism in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022. ISSN 20593635.
- Rollán-Martínez-Herrera, M. et al. K-Means Clustering for Shock Classification in Pediatric. **Diagnosis**, v. 12, n. 1932, p. 1–10, 2022.
- Ventura, J. C. et al. Admission factors associated with nutritional status deterioration and prolonged pediatric intensive care unit stay in critically ill children: PICU-SCREEN multicenter study. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 46, n. 2, p. 330–338, 2022.
- Wang, G. et al. Lactate/albumin ratio as a predictor of in-hospital mortality in critically ill children. eng. **BMC pediatrics**, BioMed Central Ltd, v. 22, n. 1, p. 725, Dec. 2022. ISSN 1471-2431 (Electronic). Available from: <<https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-022-03787-0>><<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>>.

### **K-means cluster analysis on Stata**

**Step 1 - Identifying data symmetry (variables must have normal distribution, or be log transformed).**

```
sum var1 var2 var3, d
```

if necessary

```
gen logvar newvar = log(originalvar)
```

**Step 2 – Check for correlation.**

According to Blashfield and Aldenderfer (1988), *k*-means analysis must include variables with a correlation score <0.9 (although researchers have the autonomy to decide otherwise accordingly)

```
Pwcorr var1 var2 var3 var4 var5 var6 var7 var8, star(.05)
```

**Step 3 – Identify the number of clusters (*k*).**

When the number of clusters is unknown, a few solutions can be calculated and compared to assist in decision making in relation to the clusters. The most used method has been the elbow/twist method (Kink), which, through the distribution of data in a "scree" graph and calculation of the values of the sum of squares (within-cluster sum of squares - WSS) and the log sum of squares (log WSS) helps in the visual identification of these clusters. An additional criterion that can be used is the coefficient  $n_{\leq}$  (quite similar to  $R^2$  in a regression analysis). Still, another criterion to be used is the proportional error reduction coefficient (PRE) - where the higher the value, the greater the relationship between the data set and the variables that this data set is representing.

- 1) Within-cluster sum of squares - WSS

Figure 4 (Manuscript 1) - Stata syntax of *k*-means clustering.

## 5.2 MANUSCRITO 2

**Title:** Erythrocyte trace element concentrations and its associated admission factors in critically ill children with sepsis.

**Authors:** Taís Thomsen Silveira, M.Sc.<sup>1</sup>; Emílio Lopes Júnior, Ph.D.<sup>2</sup>; Heitor Pons Leite, Ph.D.<sup>1</sup> and Yara Maria Franco Moreno, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.

<sup>2</sup>Discipline of Nutrition and Metabolism, Department of Pediatrics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

**\*Corresponding author:**

Yara Maria Franco Moreno – Federal University of Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. CEP: 88040-900.

Phone: +55 (48) 3721-2215

E-mail: yara.moreno@ufsc.br

Reprints will not be ordered.

## ABSTRACT

**Background:** Trace elements play a significant role in the antioxidant system and inflammatory response, which makes them essential for good health and during a multitude of illnesses. Variables such as age and acute inflammation can affect plasma and serum trace element concentrations in critically ill children with sepsis. Erythrocyte measurements of trace elements are less affected by acute conditions such as sepsis. However, the admission factors associated with erythrocyte trace element concentrations and reference intervals for assessment in this population are not well known. Our aim was to describe erythrocyte trace element status and investigate their association with the admission factors on PICU admission in critically ill children with sepsis. **Methods:** Data were collected from 109 children with sepsis admitted to the PICU of a southeastern Brazilian hospital between August 2014 and May 2016. Demographic data were retrieved from the patient records. Anthropometric parameters, erythrocyte trace elements, serum CRP, PCT, and lactate levels were measured within 72 h of PICU admission. Erythrocyte Zn, Cu and Se status were evaluated by age-dependent centile charts. The association between erythrocyte trace element concentrations and admission factors was conducted using crude and adjusted linear regression. **Results:** In total, 60 % (n = 63) were male, median age of 25.4 [IQR: 7.3;93.4] months. Proportions of children with erythrocyte trace element concentrations under -3 z-score were 29.4 % (n=32) for Zn, 12.0 % (n=13) for Cu and 22.0 % (n=24) for Se. Using a cut-off point of -2 z-score, most children were classified with lower Zn (39.5 %, n=43), while 18.4 % (n=20) had lower Cu and 25.7 % (n=28) had lower Se. Erythrocyte Zn, Cu and Se status was not associated with severity of illness, magnitude of inflammation cluster, septic shock, mechanical ventilation or mortality. Age was inversely associated with erythrocyte Cu and Se, but not with Zn. For children aged one to two years and two to five years, an increase in age represented a decrease in erythrocyte Cu ( $\beta = -0.33$ ; CI 95%: -0.60; -0.05;  $p = 0.02$ ,  $\beta = -0.28$ ; CI 95%: -0.52; -0.03;  $p = 0.02$ , respectively). For children aged five to 10 years and over 10 years, an increase in age represented a decrease in Cu ( $\beta = -0.51$ ; CI 95%: -0.80; -0.22;  $p = 0.001$ ,  $\beta = -0.55$ ; CI 95%: -0.79; -0.29;  $p < 0.001$ , respectively) and Se ( $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.73; -0.06;  $p = 0.02$ ,  $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.68; -0.11;  $p = 0.007$ , respectively) concentration adjusted for chronic undernutrition and severity of illness. **Conclusions:** Erythrocyte trace element concentration on admission to PICU are not affected by magnitude of inflammation. Age must be considered when evaluating erythrocyte trace element status in critically ill children with sepsis.

**Keywords:** trace elements, critical care, children, sepsis



## INTRODUCTION

Zinc (Zn), copper (Cu), and selenium (Se) are essential micronutrients involved in immune and antioxidant defense systems (Zemrani; Bines, 2020), and their potential role in the pathophysiology in critical illnesses has led to observational studies and intervention studies investigating micronutrient supplementation, but contradictory results have been reported (Gerasimidis et al., 2020; Marino et al., 2020).

Plasma and serum trace element concentrations are abnormal during the acute phase of severe illness due to inflammation (Heyland et al., 2005; Berger; Ben-Hamouda, 2020). In the adult population, erythrocyte concentrations of Zn and Se were not affected by acute inflammation, suggesting that erythrocyte concentrations are more representative of trace elements nutritional status than plasma or serum (Duncan et al., 2012; Stefanowicz, F. A. et al., 2013; Stefanowicz, F. et al., 2014). Studies in the critically ill pediatric population with sepsis, demonstrated that erythrocyte Se concentrations were not affected by inflammation (Lopes Júnior et al., 2021; Bezerra de Almeida et al., 2022), and that erythrocyte Se was associated with the decrease in the pediatric logistic organ dysfunction (PELOD 2) (Lopes Júnior et al., 2021).

However, studies examining the function of erythrocyte trace elements in pediatric critically ill patients are scarce, particularly in conditions like sepsis. This is among the reasons for the absence of cutoff points and reference values for the diagnosis of Zn, Cu, and Se deficiencies in this population. Thus, in clinical practice, values suggested for children with good health or values deduced by mathematical algorithms from the healthy adult population are employed (Mehta et al., 2017; Gerasimidis et al., 2020; Berger et al., 2022).

This study aimed to describe the erythrocyte Zn, Cu and Se status and investigate their association with the admission factors on pediatric intensive care unit (PICU) admission in critically ill children with sepsis.

## METHODS

### Study design and settings

This research is a secondary analysis of a larger prospective cohort study that was conducted in the PICU of a southeastern Brazilian hospital. The detailed methodology used for data collection was reported previously (Lopes Júnior et al., 2021). The study received approval from the research ethics committee of the Universidade Federal de São Paulo (HSC2007 0713H) and is registered at <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT02619344). Data collection took place from August 2014 to May 2016.

### Participants

Children were eligible for inclusion if they met the criteria for sepsis as defined by the American College of Critical Care Medicine (Brierley et al., 2009). However, children who had received blood transfusion prior to the first blood draw in the study, or were younger than one month old, or had chronic diseases such as kidney, liver, cardiac, onco-hematologic, or immunodeficiency conditions, or had been previously hospitalized within three months prior to admission, were excluded from the study.

### Clinical and demographic variables

The demographic data, such as age and sex were retrieved from patient records. The updated pediatric index of mortality (PIM 2) was recorded on admission and percentage probability of death was calculated (Slater et al., 2003). The PELOD 2 (Leteurtre et al., 2013) was calculated on admission and daily during PICU stay (daily pediatric logistic organ dysfunction (dPELOD 2)) (Leteurtre et al., 2015).

Anthropometric parameters of weight and height were measured within 72 hours of PICU admission. The weight-for-age (W/A), height-for-age (H/A), weight-for-height (W/H) and body mass index-for-age (BMI/A) z scores were calculated with World Health Organization (WHO) Anthro or Anthro-Plus software (WHO, 2006, 2007). Acute undernutrition was determined as  $W/A < -2$  z-score for patients under 2 years of age, and

as BMI/A < -2 z-score for patients aged 2 years or older (Becker et al., 2015). Chronic undernutrition was defined as H/A < -2 z-score (WHO, 2014).

#### Erythrocyte trace elements

Samples for determination of erythrocyte Zn, Cu and Se were collected in the first 24 h after admission (Lopes Júnior et al., 2021). The results were expressed in  $\mu\text{g/L}$  and later adjusted by the concentration of hemoglobin (Hb) and expressed in  $\text{nmol/g}_{\text{Hb}}$ . Nutritional status for Zn, Cu and Se was assessed using age-dependent centile charts developed by Fify et al. (2022). The term depleted was used as recommended by European Society of Parental and Enteral Nutrition (ESPEN) (Berger et al., 2022), and Zn, Cu and Se were considered to be depleted when z-scores were under -2.

#### Inflammatory biomarkers

Variables used as inflammatory biomarkers included C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT) and lactate concentrations, which were analyzed on days 1, 2, and 3 of admission to the emergency department or PICU (Lopes Júnior et al., 2021).

#### Magnitude of inflammation cluster

The magnitude of inflammation was defined using a k-means clustering based on the inflammatory biomarkers. The number of clusters was determined by the within-cluster sum of squares (WSS) and Proportional Reduction in Error (PRE-Test) using the elbow method (Makles, 2012).

#### Study variables

The primary outcome was the erythrocyte concentration for Zn, Cu and Se on admission. The exposure variables were the demographic, clinical and inflammatory biomarkers variables on admission.

Other clinical variables used to characterize the sample included the need for mechanical ventilation (MV) and the duration of MV in days. Admission diagnosis and septic shock on admission were defined according to the International Sepsis Consensus (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020). Time of PICU stay was assessed in days. Additionally, prolonged PICU stay was defined as  $\geq 13$  days (Ventura et al., 2022).

#### Statistical Analysis

All statistical data analysis were performed by Stata 13.0 (Stata Corporation). Data normality was assessed by the Shapiro-Wilk test, histograms, and the coefficient of variability. Due to asymmetry, all the quantitative variables were reported as median and interquartile range (IQR). Categorical variables were reported as absolute frequencies and proportions.

The erythrocyte trace element status for Zn, Cu and Se were evaluated using the age-dependent centile charts developed by Fify et al. (2022) in R version 4.02. The R code and additional information can be found on <https://doi.org/10.5525/gla.researchdata.1221> (Fify et al., 2022).

The association between admission factors and erythrocyte trace element concentrations was evaluated using crude and adjusted linear regression. Results were expressed as  $\beta$  coefficients and their respective confidence interval of 95% (CI 95%). Differences in magnitude of inflammation cluster, septic shock, MV and mortality according to erythrocyte trace element status were tested by Fisher's exact test. P values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

## Sample characteristics

The sample characteristics for the 109 critically ill children with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) included in this study are presented in Table 1. Most children were male, accounting for 60% of the total. Additionally, almost half of the children were under 2 years old, comprising 49.5% of the sample.

The prevalence of acute undernutrition was of 5 children (4.76%). And 20 (19%), were classified as having chronic undernutrition.

The median CRP level was 31.2 mg/L, median PCT level was 0.15 ng/mL and lactate median level was 1.61 mmol/L.

The most common admission diagnosis among the children in the study was respiratory, accounting for 47% of cases. Trauma was the second most common diagnosis, making up 23% of cases, followed by surgical diagnoses at 9%. Prevalence of septic shock upon admission was 55%. Mechanical ventilation was required for half of the children in the study, totaling 57 cases. The median duration of mechanical ventilation was 5 days.

The median PICU stay duration was 4 days, with an interquartile range of 2 to 9 days. Additionally, 11 children (9.6%) experienced a prolonged PICU stay of 13 days or more. The dPELOD 2 score had a median of 5, with an interquartile range of 4 to 9. The mortality prevalence was 9 (7.9%).

Table 1 (Manuscript 2) - Characterization of critically ill children admitted to the PICU according to demographic and clinical variables.

Study variables	Total (n = 109) n (%) / median [IQR]
<b>Demographic</b>	
Sex (male)	63 (60)
Age (months)	25.4 [7.3;93.4]
Age (<2years)	52 (49.5)
<b>Clinical</b>	
PELOD 2 (at admission)	1.4 [0.9;8.5]
PIM 2 (percent)	2.2 [1.0;4.7]
<b>Undernutrition</b>	
Acute undernutrition	5 (4.76)
Chronic undernutrition	20 (19)
Erythrocyte Zn (nmol/g <sub>Hb</sub> )	387.69 [258.56;490.98]
Erythrocyte Cu (nmol/g <sub>Hb</sub> )	70.77 [45.46;91.06]
Erythrocyte Se (nmol/g <sub>Hb</sub> )	7.16 [4.21;10.00]
<b>Inflammatory markers</b>	
C-reactive protein (mg/L)	31.2 [5.3;88.3]
Procalcitonin (ng/mL)	0.15 [0.07;0.05]
Lactate (mmol/L)	1.61 [1.05;2.43]
<b>Admission diagnosis</b>	
Respiratory	49 (47)
Trauma	24 (23)
Surgical	10 (9)
Septic Shock (on admission)	58 (55)
Mechanical Ventilation (MV)	57 (50)
Time in MV (days)	5 [3;8]
PICU stay (days)	4 [2;9]
Prolonged PICU stay (≥ 13 days)	11 (9.6)
dPELOD 2	5 [4;9]
Mortality	9 (7.9)

Trace element status

The median erythrocyte Zn concentration was 387.69 nmol/g<sub>Hb</sub>. For Cu, the median level concentration was 70.77 nmol/g<sub>Hb</sub>. Lastly, the median concentration of Se was 7.16 nmol/g<sub>Hb</sub>.

The visual inspection of the age-dependent centile charts suggests that higher concentration of Zn and Cu are found in younger critically ill children. Furthermore, it is possible to observe that most of the children are outside the centile bounds Figure 1. In fact, data analysis shows that less than 35% of the sick individuals were within the 2 to 98 centiles for both Cu and Se. For Zn, however, approximately 50% of children were classified within 2 to 98 centiles. In addition, 48 children were above the 98 centile for Se, 15 for Zn, and 53 for Cu.

Zn had the higher prevalence of children with z-score under -3 (29.4%, n=32), followed by Se (22%, n=24) and Cu (12%, n=13) (Table 2).

Admission factors associated with erythrocyte trace elements

Severity of illness (PIM 2), organ dysfunction (PELOD 2), nutritional status as well as inflammatory biomarkers on admission, were not associated with erythrocyte trace element concentrations (Tables 4, 5 and 6).

When comparing children with depleted erythrocyte Zn, Cu and Se with not depleted, there was no significant differences in magnitude of inflammation cluster, septic shock on admission, mechanical ventilation, or mortality (Table 3).

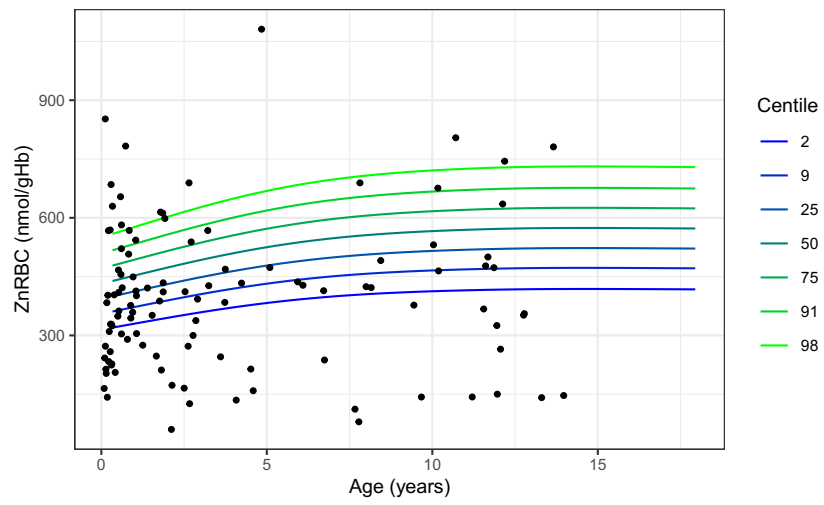
No admission factors were significantly associated with Zn concentrations, and age was the only admission factor associated with Cu and Se concentrations (Figure 2). Crude and adjusted linear regression analyses showed that age increases were associated with a decrease in erythrocyte Cu for children aged one to two years and two to five years ( $\beta = -0.33$ ; CI 95%: -0.60; -0.05;  $p = 0.02$ , and  $\beta = -0.28$ ; CI 95%: -0.52; -0.03;  $p =$

Table 2 (Manuscript 2) - Distribution of critically ill children with sepsis according to erythrocyte Zn, Cu and Se z-scores.

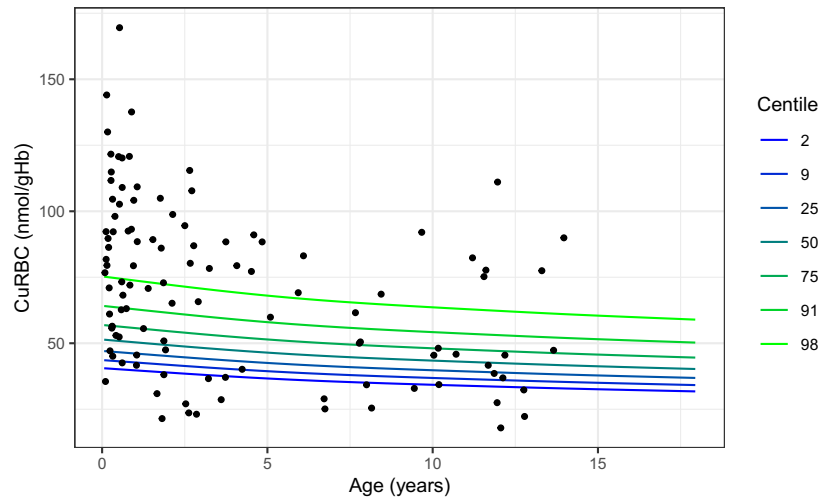
Category	n (%)		
	Zn	Cu	Se
<b>z-score&lt;-3</b>	32 (29.36)	13 (11.93)	24 (22.02)
<b>-3&lt;z-score&lt;-2</b>	11 (10.09)	7 (6.42)	4 (3.67)
<b>-2&lt;z-score&lt;-1</b>	23 (21.10)	4 (3.67)	7 (6.42)
<b>-1&lt;z-score&lt;1</b>	21 (19.27)	20 (18.35)	12 (11.01)
<b>1&lt;z-score&lt;2</b>	6 (5.50)	12 (11.01)	14 (12.84)
<b>2&lt;z-score&lt;3</b>	8 (7.34)	31 (28.44)	19 (17.43)
<b>3&lt;z-score</b>	8 (7.34)	22 (20.18)	29 (26.61)

Table 3 (Manuscript 2) - Differences in magnitude of inflammation cluster, septic shock, mechanical ventilation, and mortality according to erythrocyte Zn, Cu and Se z-scores.

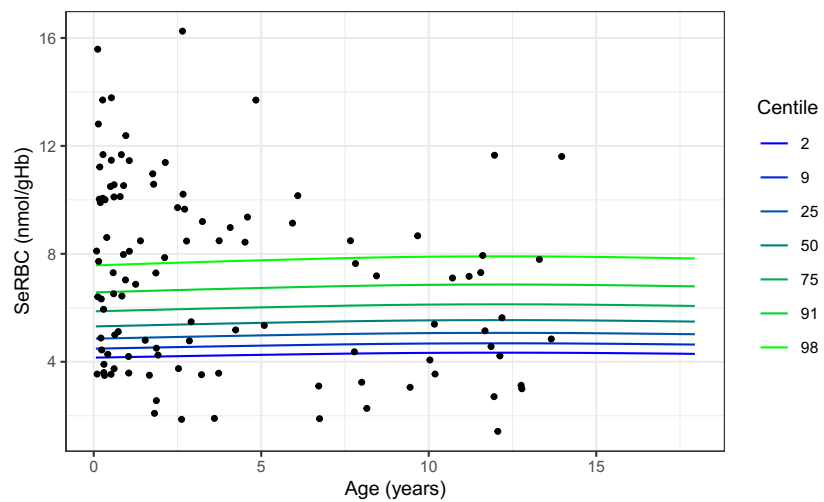
Variable	Zn z-score			Cu z-score			Se z-score		
	<-2	>-2	p	<-2	>-2	p	<-2	>-2	p
<b>Magnitude of inflammation cluster</b>									
Low (n=12)	6	6		3	9		5	7	
Mild (n=29)	8	21	0.281	4	25	0.696	5	24	0.217
Moderate (n=35)	12	23		8	27		12	23	
High (n=26)	13	13		4	22		5	21	
Septic shock	28	33	0.087	12	49	0.442	14	47	0.302
Mechanical ventilation	26	30	0.091	10	46	0.544	12	44	0.204
Mortality	5	4	0.247	3	6	0.213	3	6	0.419



(a)



(b)



(c)

Figure 1 (Manuscript 2) - Age-dependent centile charts of erythrocyte Zn (a), Cu (b) and Se (c) in 105 critically ill children with SIRS. Inserir as abreviações Zn RBC etc.

0.02, respectively). Also, concentrations of Cu ( $\beta = -0.51$ ; CI 95%: -0.80; -0.22;  $p = 0.001$ ,  $\beta = -0.55$ ; CI 95%: -0.79; -0.29;  $p < 0.001$ ) and Se ( $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.73; -0.06;  $p = 0.02$ ,  $\beta = -0.40$ ; CI 95%: -0.68; -0.11;  $p = 0.007$ , respectively) were shown to decrease with increasing age for children aged five to ten and older. Sex was not associated with erythrocyte trace elements concentrations.

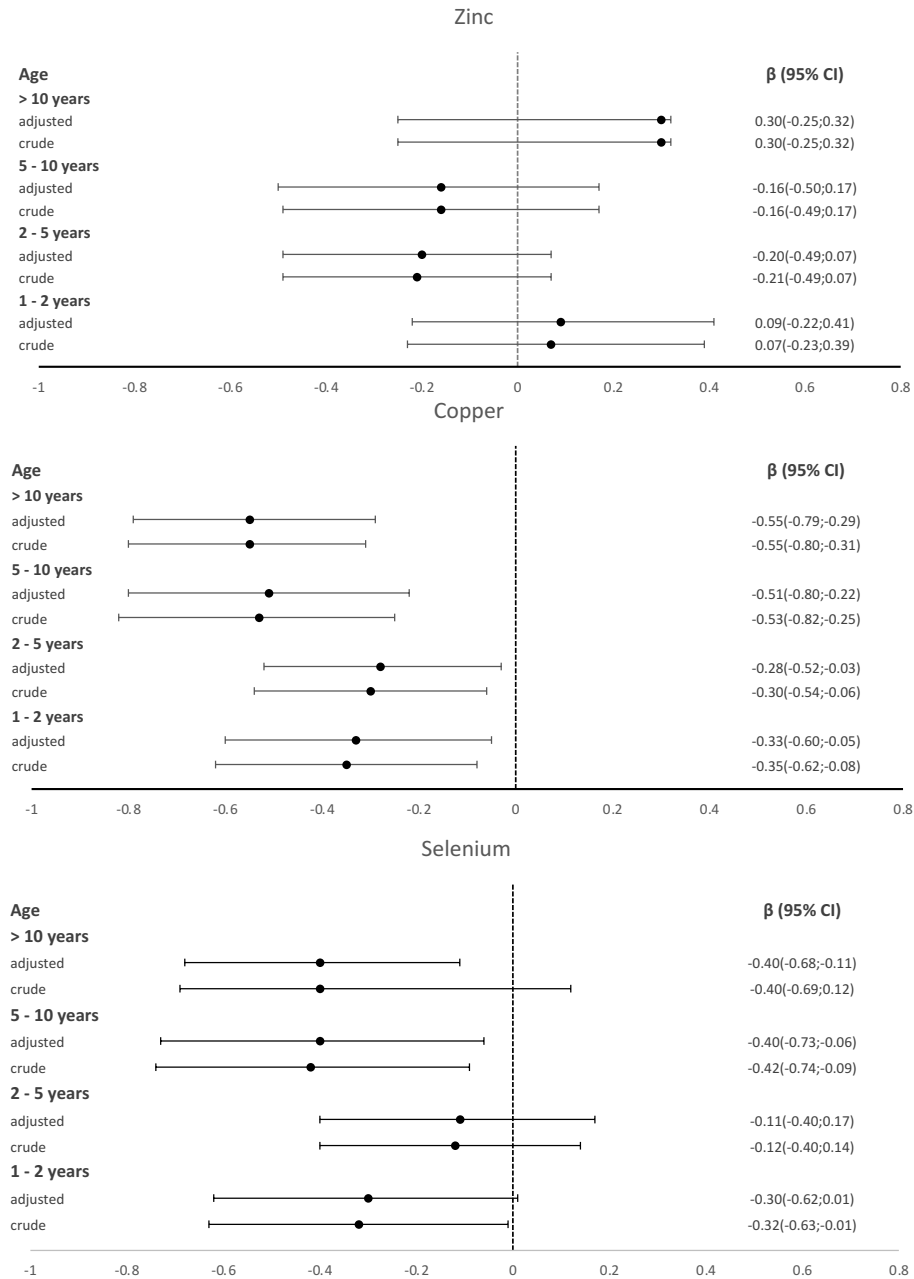


Figure 2 (Manuscript 2) - Association of erythrocyte Zn (a), Cu (b) and Se (c) with age in critically ill children with sepsis.

## DISCUSSION

This study found that children with sepsis had lower erythrocyte Zn status and elevated Cu on admission. The main finding was that age was inversely associated with Cu and Se concentrations after adjustment for chronic undernutrition and severity of illness, however the clinical and inflammatory admission factors were

not associated. These findings contribute to our understanding of the intricate relationship between sepsis in children, trace elements status, and age-related variations in erythrocyte Cu, Se, and Zn concentrations.

Currently there are scarce data on the subject of erythrocyte Zn, Cu and Se concentrations in critically ill children, especially in septic children. There are no report on erythrocyte Zn, but reports regarding Se vary between 31 % (Bezerra de Almeida et al., 2022) in children with sepsis and 8 % (Veldscholte et al., 2024) in critically ill children with systemic inflammatory response. In our study the proportion of children with sepsis and z-score under -2 for Cu was 18.4 % and 25.7 % for Se. These were higher compared to 3 % for Cu and 5 % for Se found by Veldscholte et al. (2024) in a sample of 65 critically ill children. However, the comparison of these results is difficult to make, not only because of the difference in samples, but also due to geographical differences which can impact the availability of micronutrients depending on soil composition.

The magnitude of inflammation and the inflammatory biomarkers on admission were not associated with Zn, Cu and Se. The same was observed in healthy controls and children with Chron's and Coeliac disease (Fify et al., 2022). In critically ill children, Cu and Se concentrations in red blood cell remained stable from admission to day 5 of PICU stay (Veldscholte et al., 2024). These results confirm that trace element concentrations are not influenced by acute inflammation (Berger et al., 2022). Possibly due to the 120 days erythrocytes' lifespan, erythrocyte trace element concentrations could take more time to be affected (Franco, 2012).

In our study, severity of illness (PIM 2) and organ dysfunction (PELOD 2) on admission were not associated with erythrocyte Zn, Cu and Se concentrations. A different study found a weak inverse correlation ( $\rho = -0.157$ ;  $p = 0.026$ ) between serum Zn and PELOD 2 score in 16 critically ill children with sepsis upon admission (Negm et al., 2016). Similarly, plasma Zn and Se were inversely correlated with plasma CRP and PELOD 2 score on day 1 (Veldscholte et al., 2024). However, Zn and Se tend to be naturally reduced in plasma and serum due to inflammation during acute inflammation (Berger et al., 2022). Others have described lower plasma Cu concentrations in critically ill children in association with severe oxidative stress, and that this could be explained by Cu being transported into cells to be used as a coenzyme of superoxide dismutase (Valla et al., 2018).

Linear regression analysis revealed that age was the sole admission factor significantly associated with Cu and Se concentrations, but not Zn, with age-related decreases noted in these trace elements for specific age groups. This is consistent with results presented previously in healthy controls and children with Coeliac disease (Fify et al., 2022). The association of trace elements with age could be related to factors also associated with age, such as dietary intake and absorption, physiological and hormonal changes (Dao et al., 2017).

This study has a few limitations. We did not have information regarding dietary intake or trace element concentrations previous to PICU admission. Our findings must be interpreted cautiously and cannot be generalized to PICU populations, not only because our sample was small, but also because it was composed of children without chronic illness, which is not common in PICU.

## CONCLUSION

A novelty of our study is the description of erythrocyte Zn and Cu concentrations in sepsis. The results suggest that age should be considered when evaluating trace element status in critically ill children with sepsis.

It is essential to note that the relationship between age and trace element concentration is complex and multifactorial. Further research, including longitudinal studies and investigations into the specific mechanisms regulating trace element metabolism in different age groups, would be valuable for a more comprehensive understanding of these dynamics in pediatric populations.

## REFERENCES

Slater, A. et al. PIM2: A revised version of the Paediatric Index of Mortality. **Intensive Care Medicine**, Springer-Verlag, v. 29, n. 2, p. 278–285, 2003. ISSN 03424642.

- Goldstein, B.; Giroir, B.; Randolph, A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 6, n. 1, 2005. ISSN 15297535.
- Heyland, D. K. et al. **Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient**. v. 31. [S.l.: s.n.], 2005. P. 327–337.
- WHO. Global database on Body Mass Index, 2006.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. v. 85, p. 660–67, 2007.
- Brierley, J. et al. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock: 2007 update from the American College of Critical Care Medicine. **Crit Care Med.**, v. 37, n. 2, p. 666–688, 2009.
- Duncan, A. et al. Quantitative data on the magnitude of the systemic inflammatory response and its effect on micronutrient status based on plasma measurements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 1, p. 64–71, Jan. 2012. ISSN 00029165.
- Franco, R. S. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 302–307, 2012.
- Makles, A. Stata tip 110: How to get the optimal k-means cluster solution. **Stata Journal**, v. 12, n. 2, p. 347–351, 2012. ISSN 1536867X.
- Leteurtre, S. et al. PELOD-2: An update of the PEdiatric logistic organ dysfunction score. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 7, p. 1761–1773, July 2013. ISSN 00903493. Available from: <[https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD\\_2\\_\\_An\\_Update\\_of\\_the\\_PEdiatric\\_Logistic\\_Organ.21.aspx](https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD_2__An_Update_of_the_PEdiatric_Logistic_Organ.21.aspx)>.
- Stefanowicz, F. A. et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. eng. **Clinical Nutrition**, Elsevier Ltd, England, v. 32, n. 5, p. 837–842, Oct. 2013. ISSN 02615614. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23391458/>><<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.005>>.
- Stefanowicz, F. et al. Assessment of plasma and red cell trace element concentrations, disease severity, and outcome in patients with critical illness. **Journal of Critical Care**, Elsevier Inc., v. 29, n. 2, p. 214–218, Feb. 2014. ISSN 08839441. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.10.012>>.
- WHO. **Prevalence of stunting in children ages 0-4 years**. [S.l.: s.n.], 2014. Available from: <[http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0\\_4stunting](http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0_4stunting)>. Visited on: 20 Apr. 2023.
- Becker, P. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Indicators recommended for the identification and documentation of pediatric malnutrition (undernutrition). **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 147–161, 2015. ISSN 19412452.
- Leteurtre, S. et al. Daily estimation of the severity of organ dysfunctions in critically ill children by using the PELOD-2 score. eng. **Critical care (London, England)**, Crit Care, v. 19, n. 1, p. 324, Sept. 2015. ISSN 1466-609X (Electronic). Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369662/>>.
- Negm, F. F. et al. Assessment of serum zinc, selenium, and prolactin concentrations in critically ill children. eng. **Pediatric health, medicine and therapeutics**, v. 7, p. 17–23, 2016. ISSN 1179-9927 (Print).
- Dao, D. T. et al. Assessment of micronutrient status in critically ill children: Challenges and opportunities. eng. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1–26, Oct. 2017. ISSN 20726643.



- Mehta, N. M. et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Pediatric Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. eng. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, SAGE Publications Inc., v. 41, n. 5, p. 706–742, July 2017. ISSN 19412444. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28686844>>.
- Valla, F. V. et al. Multiple Micronutrient Plasma Level Changes Are Related to Oxidative Stress Intensity in Critically Ill Children. eng. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 19, n. 9, e455–e463, Sept. 2018. ISSN 15297535.
- Berger, M. M.; Ben-Hamouda, N. Trace element and vitamin deficiency: quantum medicine or essential prescription? **Current opinion in critical care**, v. 26, n. 4, p. 355–362, 2020. ISSN 15317072.
- Gerasimidis, K. et al. Assessment and Interpretation of Vitamin and Trace Element Status in Sick Children: A Position Paper From the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, J Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 70, n. 6, p. 873–881, June 2020. ISSN 15364801. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443051/>>.
- Marino, L. V. et al. Micronutrient status during paediatric critical illness: A scoping review. eng. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, European Society for Clinical Nutrition and Metabolism, v. 39, n. 12, p. 3571–3593, Dec. 2020. ISSN 1532-1983 (Electronic). Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.015>>.
- Weiss, S. L.; Nicolson, S. C.; Naim, M. Y. Clinical Update in Pediatric Sepsis: Focus on Children With Pre-Existing Heart Disease. eng. **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, Springer Berlin Heidelberg, v. 34, n. 5, p. 1324–1332, May 2020. ISSN 1532-8422 (Electronic). Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6>>.
- Zemrani, B.; Bines, J. E. Recent insights into trace element deficiencies: Causes, recognition and correction. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 36, n. 2, p. 110–117, 2020. ISSN 15317056.
- Lopes Júnior, E. et al. Association of selenium status with endothelial activation during acute systemic inflammation in children. **Clinical Nutrition ESPEN**, Elsevier Ltd, n. 40, 2021. ISSN 24054577. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.11.007>>.
- Berger, M. M. et al. ESPEN micronutrient guideline. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 1357–1424, 2022. ISSN 15321983.
- Bezerra de Almeida, C. et al. Erythrocyte and Plasma Selenium in Children with Acute Inflammatory Response. **SSRN Electronic Journal**, v. 74, September, 2022. ISSN 18783252.
- Fify, M. A. et al. Development of age-dependent micronutrient centile charts and their utility in children with chronic gastrointestinal conditions at risk of deficiencies: A proof-of-concept. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 931–936, 2022.
- Ventura, J. C. et al. Admission factors associated with nutritional status deterioration and prolonged pediatric intensive care unit stay in critically ill children: PICU-ScREEN multicenter study. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 46, n. 2, p. 330–338, 2022.
- Veldscholte, K. et al. Plasma and red blood cell concentrations of zinc, copper, selenium and magnesium in the first week of paediatric critical illness. **Clinical Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 543–551, 2024.

Table 4 (Manuscript 2) - Supplementary table 1.

	Zn (nmol/g <sub>Hb</sub> )			
	Crude		Adjusted	
	$\beta$ (CI 95%)	p	$\beta$ (CI 95%)	p
Demographic				
Sex (male)	0.03 (-0.17;0.23)	0.767		
Age				
< 2 years	0.13 (-0.06;0.33)	0.195	0.13 (-0.06;0.33)	0.191
<1 year				
1 - 2 years (n = 15)	0.07 (-0.23;0.39)	0.631	0.09 (-0.22;0.41)	0.574
2 - 5 years (n = 22)	-0.21 (-0.49;0.07)	0.114	-0.20 (-0.49;0.07)	0.15
5 - 10 years (n = 13)	-0.16 (-0.49;0.17)	0.332	-0.16 (-0.50;0.17)	0.328
> 10 years (n = 20)	0.03 (-0.25;0.32)	0.817	0.03(-0.25;0.32)	0.802
Clinical				
PELOD 2 (at admission)	-0.004 (-0.011;0.002)	0.181		
PIM 2 (%)	-0.006 (-0.016;0.003)	0.171		
Undernutrition				
Acute undernutrition	0.01 (-0.30;0.33)	0.925		
Chronic undernutrition	0.13 (-0.12;0.39)	0.32		
Inflammatory markers				
C-reactive protein (mg/L)	-0.01 (-0.06;0.04)	0.703		
Procalcitonin (ng/mL)	-0.06 (-0.14;0.01)	0.107		
Lactate (mmol/L)	-0.03 (-0.19;0.13)	0.693		

Table 5 (Manuscript 2) - Supplementary table 2.

	Cu (nmol/g <sub>Hb</sub> )			
	Crude		Adjusted	
	$\beta$ (CI 95%)	p	$\beta$ (CI 95%)	p
Demographic				
Sex (male)	-0.016 (-0.20;0.17)	0.865		
Age				
< 2 years	0.35 (0.18;0.53)	<0.001	0.35 (0.18;0.53)	<0.001
<1 year				
1 - 2 years (n = 15)	-0.35 (-0.62;-0.08)	0.011	-0.33 (-0.60;-0.05)	0.02
2 - 5 years (n = 22)	-0.30 (-0.54;-0.06)	0.014	-0.28 (-0.52;-0.033)	0.026
5 - 10 years (n = 13)	-0.53 (-0.82;-0.25)	<0.001	-0.51 (-0.80;-0.22)	0.001
> 10 years (n = 20)	-0.55 (-0.80;-0.31)	<0.001	-0.55 (-0.79;-0.29)	<0.001
Clinical				
PELOD 2 (at admission)	-0.004 (-0.01;0.002)	0.206		
PIM 2 (%)	0.002 (-0.006;0.012)	0.529		
Undernutrition				
Acute undernutrition	0.11 (-0.18;0.41)	0.46		
Chronic undernutrition	0.19 (-0.04;0.43)	0.109	0.09 (-0.13;0.32)	0.431
Inflammatory markers				
C-reactive protein (mg/L)	-0.011 (-0.06;0.03)	0.632		
Procalcitonin (ng/mL)	0.04 (-0.03;0.12)	0.271		
Lactate (mmol/L)	-0.11 (-0.27;0.03)	0.119	-0.14 (-0.28;-0.001)	0.05

Table 6 (Manuscript 2) - Supplementary table 3.

	Se (nmol/g <sub>Hb</sub> )			
	Crude		Adjusted	
	$\beta$ (CI 95%)	p	$\beta$ (CI 95%)	p
Demographic				
Sex (male)	0.02 (-0.18;0.23)	0.794		
Age				
< 2 years	0.21 (0.10;0.41)	0.039	0.19 (-0.05;0.40)	0.057
<1 year				
1 - 2 years (n = 15)	-0.32 (-0.63;-0.01)	0.039	-0.30 (-0.62;0.01)	0.057
2 - 5 years (n = 22)	-0.12 (-0.40;0.14)	0.358	-0.11 (-0.40;0.17)	0.437
5 - 10 years (n = 13)	-0.42 (-0.74;-0.09)	0.012	-0.40 (-0.73;-0.06)	0.02
> 10 years (n = 20)	-0.40 (-0.69;0.12)	0.006	-0.40 (-0.68;-0.11)	0.007
Clinical				
PELOD 2 (at admission)	-0.006 (-0.013;0.001)	0.097		
PIM 2 (%)	0.002 (-0.008;0.012)	0.697		
Undernutrition				
Acute undernutrition	0.014 (-0.31;0.34)	0.929		
Chronic undernutrition	0.14 (-0.12;0.40)	0.291		
Inflammatory markers				
C-reactive protein (mg/L)	-0.002 (-0.05;0.05)	0.916		
Procalcitonin (ng/mL)	0.04 (-0.03;0.13)	0.242		
Lactate (mmol/L)	-0.11 (-0.27;0.05)	0.18		

### 5.3 MANUSCRITO 3

**Title:** Do erythrocyte trace element concentrations moderate the effect of inflammation on organ dysfunction in critically ill children with sepsis?

**Authors:** Taís Thomsen Silveira, M.Sc.<sup>1</sup>; Emílio Lopes Júnior, Ph.D.<sup>2</sup>; Heitor Pons Leite, Ph.D.<sup>1</sup> and Yara Maria Franco Moreno, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.

<sup>2</sup>Discipline of Nutrition and Metabolism, Department of Pediatrics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

**\*Corresponding author:**

Yara Maria Franco Moreno – Federal University of Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. CEP: 88040-900.

Phone: +55 (48) 3721-2215

E-mail: yara.moreno@ufsc.br

Reprints will not be ordered.

#### ABSTRACT

**Background:** Zn, Se, and Cu are important micronutrients for immune defense, which impacts clinical prognosis, such as organ dysfunction in critically ill children with sepsis. Therefore, our hypothesis is that erythrocyte Zn, Cu and Se status moderate the association between inflammation and organ dysfunction in critically ill children with sepsis. **Methods:** A secondary analysis of 109 critically ill children with sepsis from a prospective cohort study conducted in the PICU of a hospital in southeast Brazil. Measurements were made of CRP, PCT, and lactate concentrations on the first, second, and third days after admission to the PICU or emergency room. Erythrocyte Zn, Cu, and Se measurements were conducted on samples taken within 24 hours of admission. The magnitude of inflammation was defined using a *k*-means clustering based on the inflammatory biomarkers. The primary outcome was organ dysfunction. The moderating role of erythrocyte concentrations of Zn, Cu and Se in the association between inflammation and magnitude of inflammation was evaluated using interaction analysis. **Results:** Zn status had an interaction in the association between CRP and organ dysfunction ( $\beta = -0.0021$ , CI 95%: -0.004 to -0.0003,  $p = 0.022$ ), and Zn status had an interaction in this association for the moderate magnitude of inflammation cluster ( $\beta = -0.015$ , CI 95%: -0.023 to 0.002,  $p = 0.021$ ). Cu and Se did not show interaction with inflammatory biomarkers or the magnitude of inflammation. **Conclusions:** The increase in Zn erythrocyte concentration may lower the effect of inflammation on organ dysfunction. The hypothesis that Zn, Cu, and Se status moderate the effects of inflammation during sepsis can be further tested in wider data sets.

**Keywords:** trace elements, zinc, critical care, children, sepsis

#### INTRODUCTION

Organ dysfunction is considered an important outcome in intensive care (Carlton et al., 2020). The mitochondrial and cellular damage caused by severe oxidative stress during sepsis lead to impaired oxygen metabolism and apoptosis (McClave et al., 2019; Berger, 2020). The progression of this damage becomes cyclical, with increasing oxidative stress leading to more cellular loss of function, eventually causing Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) (Dessauer et al., 2011; McClave et al., 2019).

The pediatric logistic organ dysfunction (PELOD 2) score was first developed in 1999 and updated in 2013 to assess the severity of organ dysfunction and is widely used in the care of critically ill children (Leteurtre et al., 2013; Simanjuntak et al., 2020; Zhang et al., 2021). By daily collecting the most abnormal value of

the variables used to comprise the PELOD 2 score, the daily pediatric logistic organ dysfunction (dPELOD 2) score can be used to describe organ dysfunction and predict mortality (Leteurtre et al., 2015).

Acute phase reactants such as C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) are inflammatory biomarkers that have shown promise for evaluating the clinical course of sepsis and predicting outcomes (Rey et al., 2007; Li et al., 2019). Serum lactate concentration has also been shown to be a prognostic marker of organ dysfunction and patient survival in critically ill adults and children (Bakker et al., 1996; Ryoo et al., 2018; Jaiswal et al., 2020). However, they should be used in combination to evaluate the severity of inflammation and its impact on outcomes (Pierrakos et al., 2020).

The immune and antioxidant defense systems depend on zinc (Zn), selenium (Se), and copper (Cu) to function properly (Wheeler, 2011; Koekkoek; Van Zanten, 2016). Although these trace elements are among the primary micronutrients involved in the immune system, research on trace elements in patients with sepsis have tended to overlook Cu (Berger, 2020). Despite the potential involvement of micronutrients in organ failure and its associated consequences, there is currently a lack of consensus in the research regarding their benefits (Weiss; Nicolson; Naim, 2020; Evans et al., 2021).

Therefore, our hypothesis is that erythrocyte Zn, Cu and Se status of critically ill children with sepsis upon admission can positively moderate, i.e. reduce, the effect of acute inflammation on organ dysfunction.

## METHODS

### Study design

The subject of this secondary analysis includes 109 critically ill children from a prospective cohort study that was carried out in the pediatric intensive care unit (PICU) of a hospital in the southeast of Brazil (Lopes Júnior et al., 2021). The Federal University of São Paulo (UNIFESP) research ethics committee authorized the study "Endothelial Dysfunction and Selenium Status in Children with Acute Systemic Inflammatory Response" (HSC2007 0713H) on May 7, 2014. It is registered at <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT02619344). The Helsinki Declaration of 1975's guidelines were adhered to, and ethical standards were maintained throughout the investigation. To participate in the study, each participant signed an informed consent/assent form. The data were gathered between August 2014 and May 2016.

### Participants

The inclusion criteria were defined as having sepsis, severe sepsis, septic shock, or multiple organ failure (Goldstein; Giroir; Randolph, 2005; Weiss; Nicolson; Naim, 2020). Individuals younger than one month who had past hospitalizations within three months of admission, blood transfusion 24 hour prior to sample collection or who had chronic diseases (kidney, liver, heart, onco-hematologic, immunodeficiency), were excluded.

### Study variables

Demographic variables were collected from patients' records. Severity of illness was estimated through the updated pediatric index of mortality (PIM 2) recorded on admission and the percentage probability of death was calculated (Slater et al., 2003). The PELOD 2 score was calculated on admission and daily during PICU stay (Leteurtre et al., 2015).

Weight and height were measured within 72 hours of PICU admission. The World Health Organization (WHO) Anthro or Anthro-Plus software was used to calculate the weight-for-age (W/A), height-for-age (H/A), and body mass index-for-age (BMI/A) z-scores (WHO, 2006, 2007). For patients under the age of two years, acute undernutrition was defined as a W/A < -2 z-score, and for patients beyond the age of two years, a BMI/A < -2 z-score (Becker et al., 2015). A H/A < -2 z-score was considered chronic undernutrition (WHO, 2014).

On the first, second, and third days following admission to the emergency room or PICU, CRP, PCT, and lactate concentrations were measured (Lopes Júnior et al., 2021). Erythrocyte Zn, Cu, and Se measurements were made using samples that were taken within the first 24 hours of admission (Lopes Júnior et al., 2021). Values were expressed in .

The magnitude of inflammation was defined using a *k*-means clustering based on the inflammatory biomarkers CRP, PCT, and lactate. The variables were log-transformed and tested for correlation (Blashfield; Aldenderfer, 1988). The hyperparameter (*k*) for the initial clustering was empirically defined as 20 (Nakamura et al., 2020). The number of clusters was determined by the within-cluster sum of squares (WSS) and Proportional Reduction in Error (PRE-Test) using the elbow method (Makles, 2012).

Outcome

The primary outcome was organ dysfunction evaluated as the dPELOD 2 score. For each variable included in the calculation of the PELOD 2 score, the most abnormal value on each day during the PICU stay was used to calculate the dPELOD 2 score (Leteurtre et al., 2015).

Statistical analyses

Descriptive statistics were done using the Stata® software version 13.0. Continuous asymmetric variables were described in median and interquartile range (IQR), categorical variables were presented as absolute frequencies and percentage. For all statistical tests, significance was set as p-values <0.05.

The moderating role of erythrocyte concentrations of Zn, Cu and Se in the association between inflammation and magnitude of inflammation was evaluated through interaction analysis in Stata 13.

To visualize the moderating role of erythrocyte Zn, Cu and Se in the association between inflammation and the outcome of organ dysfunction, the relations were depicted as a Direct Acyclic Graph (DAG) showed in Figure 1. Such graph was built using Dagitty software v.3.0 available online at <http://www.dagitty.net/dags.html> (Textor et al., 2016).

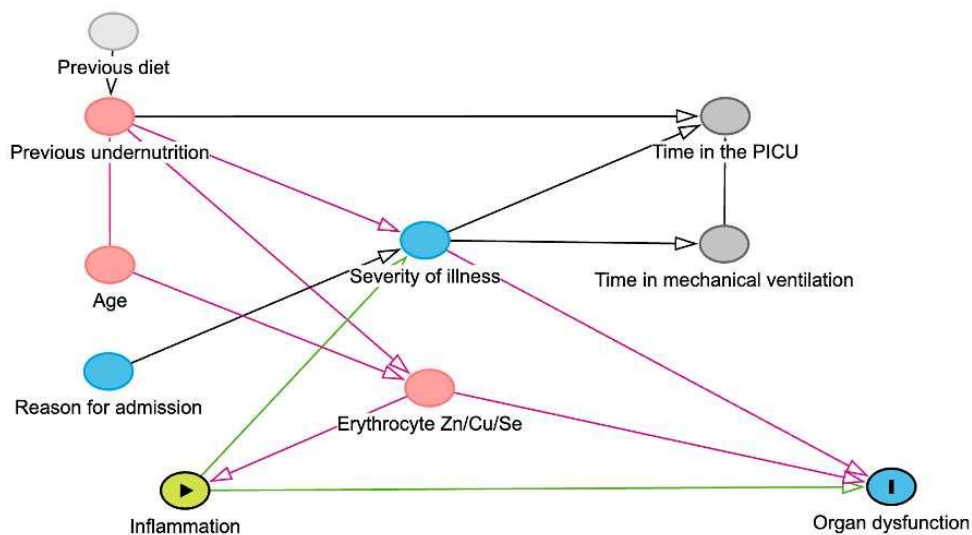


Figure 1 (Manuscript 3) - Directed Acyclic Graph (DAG) of the theoretical model for the linear regression analyses with interaction test. Play button - variable exposure; Stop button - outcome variable; Blue circles - ancestral outcome variables; Pink circles - ancestral outcome and exposure variables; Gray circles - unobserved/collected variables; Pink lines - unobserved/biased paths; Green lines - causal paths or paths that contain mediating variables.

A linear regression analysis was performed between inflammation (represented by the exposure variables CRP, PCT, lactate and inflammation magnitude cluster) and organ dysfunction (represented by the dPELOD

2 score, outcome variable) with an interaction test. In this case, 12 linear regressions were carried out, one for the interaction between each trace element on each exposure variable and the respective outcome variable. The generic interaction model is represented in Figure 2. The analyzes were adjusted by age according to the theoretical model presented in Figure 1. Effect measures are presented as  $\beta$  coefficients and their respective confidence interval of 95% (CI 95%).

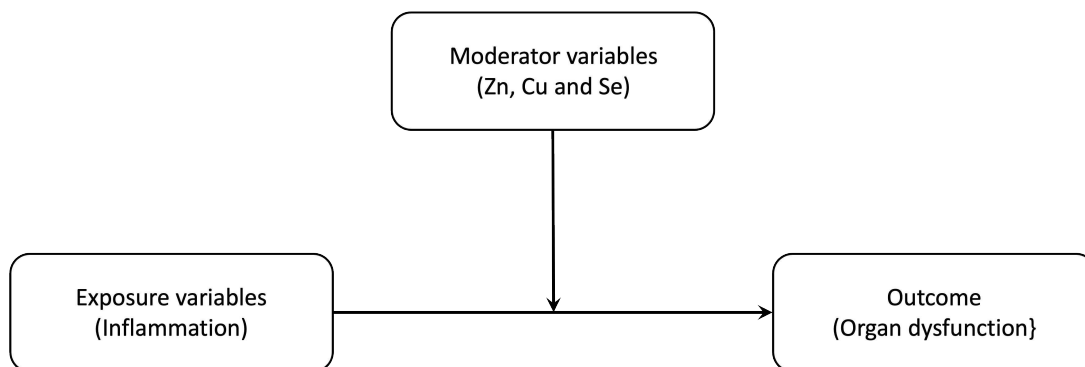


Figure 2 (Manuscript 3) - Generic interaction model for the moderation between exposure variables and outcome.

## RESULTS

### Participants characteristics

Most children were of the male sex (60%) and median age was 25.4 with IQR from 7.3 to 93.4 months Table 1. Zinc levels ranged from 258.56 to 490.98 with a 387.69 nmol/g<sub>Hb</sub> median. The median level for Cu was 70.77 nmol/g<sub>Hb</sub>, ranging from 45.46 to 91.06 nmol/g<sub>Hb</sub>. Lastly, 7.16 nmol/g<sub>Hb</sub> was the median Se level, with IQR of 4.21 to 10.0 nmol/g<sub>Hb</sub>. 31.2 mg/L was the median CRP level, 0.15 ng/mL was the median PCT level, and 1.61 mmol/L was the median lactate level. Most children were in the Moderate magnitude of inflammation cluster (34.5%).

Respiratory conditions accounted for 47% of the children in the study's entrance diagnoses. With 23% of patients, trauma was the second most common diagnosis, followed by surgical diagnoses (9%). Fifty five percent of patients had septic shock at the time of admission. Fifty-seven out of the children in the study (about half) needed mechanical ventilation. The IQR for the dPELOD 2 score was 4 to 9, with a median score of 5.

### Moderation analyses

There was an interaction between Zn and CRP in the association between CRP and organ dysfunction (dPELOD 2). For every increase in the erythrocyte Zn value, there was a decrease of 0.0021 in the effect of CRP on organ dysfunction ( $\beta = -0.0021$ , CI 95%: -0.004 to -0.0003,  $p = 0.022$ ). The other inflammatory biomarkers PCT and lactate did not show an interaction with Zn Table 2.

In the linear regression model using the magnitude of inflammation cluster as the exposure variable, the moderate and high clusters were significantly associated with organ dysfunction and Zn had an interaction in this association for the moderate cluster ( $\beta = -0.015$ , CI 95%: -0.023 to 0.002,  $p = 0.021$ ).

Visual demonstration of the moderating role Zn values had in the association of CRP and magnitude of inflammation cluster with organ dysfunction can be found in Figure 3b.

Erythrocyte Cu was not associated with organ dysfunction and did not show interaction with the inflammatory biomarkers and magnitude of inflammation cluster Table 3.

Table 1 (Manuscript 3) - Characterization of critically ill children admitted to the PICU according to demographic and clinical variables.

Study variables	Total (n = 109) n (%) / median [IQR]
<b>Demographic</b>	
Sex (male)	63 (60)
Age (months)	25.4 [7.3;93.4]
Age (<2 years)	52 (49.5)
<b>Clinical</b>	
PELOD 2 (at admission)	1.4 [0.9;8.5]
PIM 2 (%)	2.2 [1.0;4.7]
Undernutrition	
Acute undernutrition	5 (4.76)
Chronic undernutrition	20 (19)
<b>Erythrocyte trace elements (nmol/g<sub>Hb</sub>)</b>	
Zn	387.69 [258.56;490.98]
Cu	70.77 [45.46;91.06]
Se	7.16 [4.21;10.00]
<b>Inflammatory markers</b>	
C-reactive protein (mg/L)	31.2 [5.3;88.3]
Procalcitonin (ng/mL)	0.15 [0.07;0.05]
Lactate (mmol/L)	1.61 [1.05;2.43]
<b>Magnitude of inflammation</b>	
Low	12 (12.4)
Mild	29 (28.6)
Moderate	35 (34.2)
High	26 (24.8)
<b>Admission diagnosis</b>	
Respiratory	49 (47)
Trauma	24 (23)
Surgical	10 (9)
<b>Septic Shock (on admission)</b>	58 (55)
<b>Mechanical Ventilation</b>	57 (50)
<b>dPELOD 2</b>	5 [4;9]
<b>Mortality</b>	9 (7.9)

Note: PELOD 2 – pediatric logistic organ dysfunction 2, dPELOD 2 – daily pediatric logistic organ dysfunction 2, PIM 2 – pediatric index of mortality, Zn – zinc, Cu – copper, Se – selenium, IQR – interquartile range.

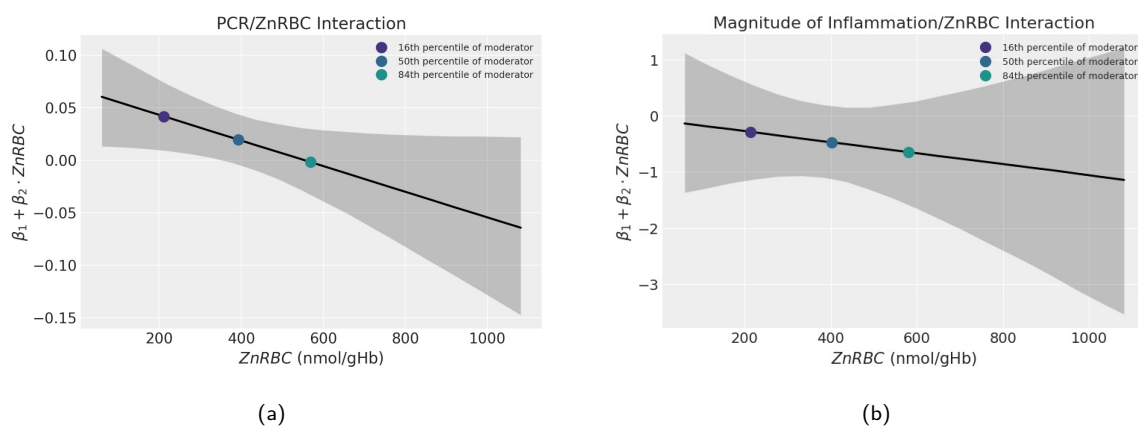


Figure 3 (Manuscript 3) - Spotlight graph showing the moderator effect of CRP (a) and magnitude of inflammation cluster (b) in organ dysfunction as a function of the moderator value (Red blood cell - RBC erythrocyte Zn in nmol/g<sub>Hb</sub>).



Table 2 (Manuscript 3) - Linear regression models for the moderating role of erythrocyte Zn in the association between inflammatory biomarkers and magnitude of inflammation cluster with organ dysfunction, adjusted for age (months).

<b>CRP#Zn Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>CRP</b>		1.077	0.270	1.884	0.009
<b>Zn</b>	0.08	0.006	-0.001	0.013	0.090
<b>CRPxZn</b>		-0.021	-0.004	-0.0003	0.022
<b>PCT#Zn Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>PCT</b>		0.912	-0.402	2.225	0.172
<b>Zn</b>	0.07	-0.001	-0.008	0.005	0.636
<b>PCTxZn</b>		-0.001	-0.004	0.002	0.587
<b>LAC#Zn Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>LAC</b>		2.477	0.175	4.779	0.035
<b>Zn</b>	178	0.000	-0.015	0.015	0.994
<b>LACxZn</b>		0.000	-0.005	0.005	0.948
<b>Inflammation cluster#Zn Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>Mild</b>		2.848	-2.903	8.599	0.328
<b>Moderate</b>		6.389	0.909	11.869	0.023
<b>High</b>		5.871	0.546	11.197	0.031
<b>Zn</b>	124	0.010	0.000	0.020	0.060
<b>MildxZn</b>		-0.008	-0.021	0.005	0.227
<b>ModeratexZn</b>		-0.015	-0.027	-0.002	0.021
<b>HighxZn</b>		-0.010	-0.023	0.002	0.104

CRP – C-reactive protein, PCT – procalcitonin, LAC – lactate, CI – confidence interval.

Erythrocyte Se was significantly associated with organ dysfunction ( $\beta = 0.894$ , CI 95%: 0.040 to 1.748,  $p = 0.040$ ) in the model using CRP as the exposure variable but showed no interaction with CRP and the other inflammatory biomarkers or magnitude of inflammation cluster Table 4.

## DISCUSSION

To evaluate the moderating role of erythrocyte trace elements, the present study tested the interaction of erythrocyte Zn, Cu and Se status in the association between inflammatory biomarkers and the magnitude of inflammation cluster and organ dysfunction. Zn significantly lowered the effect of CRP and magnitude of inflammation cluster on organ dysfunction.

In our study 47% of children were admitted with respiratory conditions, and 57% needed mechanical ventilation, which is in accordance with other reports (Negm et al., 2016; Carlton et al., 2020; Souza et al., 2021). The lungs are commonly the first to be affected in children who develop MODS (Ramírez, 2013). In our study we used the dPELOD 2 score as a measurement of organ dysfunction and found a median of 5, ranging from 4 to 9 points, which is in accordance with previously described for critically ill children (Leteurtre et al., 2015).

Nearly all pediatric patients in the PICU have some form of organ dysfunction, and the more organ dysfunctions a patient has, the higher the death rate (Leteurtre et al., 2015). The progression of organ dysfunction is dependent on the inflammatory response, and how imbalanced the oxidative stress production and antioxidant defense become (Dessauer et al., 2011; Wheeler, 2011; Preiser et al., 2014).

Table 3 (Manuscript 3) - Linear regression models for the moderating role of erythrocyte Cu in the association between inflammatory biomarkers and magnitude of inflammation cluster with organ dysfunction, adjusted for age (months).

<b>CRP#Cu Interaction</b>					
	<b>r2</b>	$\beta$	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>CRP</b>		0.667	-0.346	1.681	0.195
<b>Cu</b>	73	-0.008	-0.053	0.037	0.738
<b>CRPxCu</b>		-0.006	-0.018	0.007	0.393
<b>PCT#Cu Interaction</b>					
	<b>r2</b>	$\beta$	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>PCT</b>		0.867	-0.664	2.399	0.264
<b>Cu</b>	122	-0.034	-0.076	0.007	0.099
<b>PCTxCu</b>		-0.002	-0.022	0.018	0.859
<b>LAC#Cu Interaction</b>					
	<b>r2</b>	$\beta$	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>LAC</b>		0.112	-2.927	3.151	0.942
<b>Cu</b>	218	-0.106	-0.221	0.009	0.071
<b>LACxCu</b>		0.031	-0.010	0.071	0.137
<b>Inflammation cluster#Cu Interaction</b>					
	<b>r2</b>	$\beta$	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>Mild</b>		0.050	-6.183	6.283	0.987
<b>Moderate</b>		3.285	-2.372	8.942	0.252
<b>High</b>		3.995	-2.383	10.372	0.217
<b>Cu</b>	131	-0.007	-0.072	0.058	0.831
<b>MildxCu</b>		-0.002	-0.086	0.081	0.956
<b>ModeratexCu</b>		-0.039	-0.115	0.036	0.304
<b>HighxCu</b>		-0.025	-0.108	0.059	0.556

CRP – C-reactive protein, PCT – procalcitonin, LAC – lactate, CI – confidence interval.

Our results showed that Zn significantly lowered the effect of CRP and of the magnitude of inflammation cluster in organ dysfunction in the adjusted linear regression model. This was expected due to its role in the antioxidant system. Zn and Cu activate superoxide dismutase (SOD), which neutralizes superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radicals in the cytoplasm. Catalase is another antioxidant enzyme that is dependent on Zn and Cu (Wheeler, 2011; Dao et al., 2017; Gammoh; Rink, 2017).

Nonetheless, these findings need to be interpreted considering some limitations. However meaningful the effects of Zn in the association between CRP and magnitude of inflammation were, their effect size was small, and they had a broad confidence interval. This was probably due to a small sample size and means the analysis may be underpowered. However, the study sample comprised of children without chronic illness, which allowed the analysis of children without the possible bias of inadequate trace elements status because of chronic disease.

## CONCLUSION

The preliminary results described in this study show that the increase in erythrocyte Zn concentration may lower the effect of inflammation on organ dysfunction. Additionally, it demonstrates how the hypothesis that Zn, Cu, and Se status moderate the effects of inflammation during sepsis can be further tested. Hopefully, our results can motivate future research to test this hypothesis in a wider data set of patients with a similar profile of acute systemic inflammation.

Table 4 (Manuscript 3) - Linear regression models for the moderating role of erythrocyte Se in the association between inflammatory biomarkers and magnitude of inflammation cluster with organ dysfunction, adjusted for age (months).

<b>CRP#Se Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>CRP</b>		0.894	0.040	1.748	0.040
<b>Se</b>	87	0.036	-0.312	0.383	0.839
<b>CRPxSe</b>		-0.083	-0.183	0.016	0.099
<b>PCT#Se Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>PCT</b>		1.200	-0.366	2.765	0.132
<b>Se</b>	114	-0.369	-0.786	0.048	0.082
<b>PCTxSe</b>		-0.069	-0.269	0.132	0.499
<b>LAC#Se Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>LAC</b>		0.778	-1.805	3.361	0.552
<b>Se</b>	208	-0.714	-1.602	0.173	0.113
<b>LACxSe</b>		0.202	-0.111	0.516	0.204
<b>Inflammation cluster#Se Interaction</b>					
	<b>r2</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>CI 95% (lower)</b>	<b>CI 95% (upper)</b>	<b>p</b>
<b>Mild</b>		1.274	-4.035	6.583	0.635
<b>Moderate</b>		4.372	-0.374	9.118	0.071
<b>High</b>		5.992	0.310	11.674	0.039
<b>Se</b>	145	0.131	-0.332	0.593	0.576
<b>MildxSe</b>		-0.195	-0.854	0.464	0.559
<b>ModeratexSe</b>		-0.543	-1.119	0.033	0.065
<b>HighxSe</b>		-0.531	-1.228	0.166	0.134

CRP – C-reactive protein, PCT – procalcitonin, LAC – lactate, CI – confidence interval.

## REFERENCES

- Blashfield, R. K.; Aldenderfer, M. S. The Methods and Problems of Cluster Analysis. **Handbook of Multivariate Experimental Psychology**, Springer, Boston, MA, p. 447–473, 1988. Available from: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5_14)>.
- Bakker, J. et al. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. **American journal of surgery**, Am J Surg, v. 171, n. 2, p. 221–226, 1996. ISSN 0002-9610. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8619454/>>.
- Slater, A. et al. PIM2: A revised version of the Paediatric Index of Mortality. **Intensive Care Medicine**, Springer-Verlag, v. 29, n. 2, p. 278–285, 2003. ISSN 03424642.
- Goldstein, B.; Giroir, B.; Randolph, A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 6, n. 1, 2005. ISSN 15297535.
- WHO. Global database on Body Mass Index, 2006.
- Rey, C. et al. Procalcitonin and C-reactive protein as markers of systemic inflammatory response syndrome severity in critically ill children. **Intensive care medicine**, v. 33, n. 3, p. 477–484, Mar. 2007. ISSN 0342-4642 (Print).
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. v. 85, p. 660–67, 2007.

- Dessauer, B. von et al. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. eng. **Journal of critical care**, Elsevier Inc., v. 26, n. 1, 103.e1–7, Feb. 2011. ISSN 1557-8615 (Electronic).
- Wheeler, D. S. Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis. eng. **The open inflammation journal**, v. 4, s1, p. 74–81, Oct. 2011. ISSN 1875-0419 (Print).
- Makles, A. Stata tip 110: How to get the optimal k-means cluster solution. **Stata Journal**, v. 12, n. 2, p. 347–351, 2012. ISSN 1536867X.
- Leteurtre, S. et al. PELOD-2: An update of the PEdiatric logistic organ dysfunction score. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 7, p. 1761–1773, July 2013. ISSN 00903493. Available from: <[https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD\\_2\\_\\_An\\_Update\\_of\\_the\\_PEdiatric\\_Logistic\\_Organ.21.aspx](https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2013/07000/PELOD_2__An_Update_of_the_PEdiatric_Logistic_Organ.21.aspx)>.
- Ramírez, M. Multiple organ dysfunction syndrome. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, Mosby, v. 43, n. 10, p. 273–277, Nov. 2013. ISSN 15385442.
- Preiser, J. C. et al. Metabolic response to the stress of critical illness. **British journal of anaesthesia**, v. 113, n. 6, p. 945–954, 2014. ISSN 14716771.
- WHO. **Prevalence of stunting in children ages 0-4 years**. [S.l.: s.n.], 2014. Available from: <[http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0\\_4stunting](http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0_4stunting)>. Visited on: 20 Apr. 2023.
- Becker, P. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Indicators recommended for the identification and documentation of pediatric malnutrition (undernutrition). **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 147–161, 2015. ISSN 19412452.
- Leteurtre, S. et al. Daily estimation of the severity of organ dysfunctions in critically ill children by using the PELOD-2 score. eng. **Critical care (London, England)**, Crit Care, v. 19, n. 1, p. 324, Sept. 2015. ISSN 1466-609X (Electronic). Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369662/>>.
- Koekkoek, W. A.; Van Zanten, A. R. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 31, n. 4, p. 457–474, Aug. 2016. ISSN 19412452. Available from: <<http://doi.wiley.com/10.1177/0884533616653832>>.
- Negm, F. F. et al. Assessment of serum zinc, selenium, and prolactin concentrations in critically ill children. eng. **Pediatric health, medicine and therapeutics**, v. 7, p. 17–23, 2016. ISSN 1179-9927 (Print).
- Textor, J. et al. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package 'dagitty'. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 1887–1894, 2016.
- Dao, D. T. et al. Assessment of micronutrient status in critically ill children: Challenges and opportunities. eng. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1–26, Oct. 2017. ISSN 20726643.
- Gammoh, N. Z.; Rink, L. Zinc in Infection and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017. Available from: <[www.mdpi.com/journal/nutrients%20https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85020872319&doi=10.3390%2Fnu9060624&partnerID=40&md5=2c2fe0064bb7197950e949c86993a80f](http://www.mdpi.com/journal/nutrients%20https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85020872319&doi=10.3390%2Fnu9060624&partnerID=40&md5=2c2fe0064bb7197950e949c86993a80f)>.
- Ryoo, S. M. et al. Lactate Level Versus Lactate Clearance for Predicting Mortality in Patients With Septic Shock Defined by Sepsis-3. **Critical care medicine**, Crit Care Med, v. 46, n. 6, e489–e495, June 2018. ISSN 1530-0293. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29432347/>>.
- Li, G. et al. Usefulness of RBC distribution width and C-reactive protein to predict mortality in pediatric non-cardiac critical illness. **American Journal of Emergency Medicine**, Elsevier Inc., v. 37, n. 12, p. 2143–2150, 2019. ISSN 15328171. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.01.041>>.

- McClave, S. A. et al. Mitochondrial Dysfunction in Critical Illness: Implications for Nutritional Therapy. **Current Nutrition Reports**, Current Nutrition Reports, v. 8, n. 4, p. 363–373, 2019. ISSN 21613311.
- Berger, M. M. Do micronutrient deficiencies contribute to mitochondrial failure in critical illness? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 23, n. 2, p. 102–110, 2020. ISSN 14736519.
- Carlton, E. F. et al. Clinician Accuracy in Identifying and Predicting Organ Dysfunction in Critically Ill Children. eng. **Critical care medicine**, NIH Public Access, v. 48, n. 11, e1012–e1019, Nov. 2020. ISSN 1530-0293 (Electronic). Available from: <[pmc/articles/PMC7959260/%20/pmc/articles/PMC7959260/?report=abstract%20https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7959260/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32861227/)>.
- Jaiswal, P. et al. Early lactate measurements for predicting in-hospital mortality in paediatric sepsis. **Journal of paediatrics and child health**, J Paediatr Child Health, v. 56, n. 10, p. 1570–1576, Oct. 2020. ISSN 1440-1754. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32861227/>>.
- Nakamura, K. et al. C-reactive protein clustering to clarify persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome. **Intensive Care Medicine**, Springer Berlin Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 437–443, 2020. ISSN 14321238. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05851-3>>.
- Pierrakos, C. et al. Biomarkers of sepsis: Time for a reappraisal. **Critical Care**, v. 24, n. 1, 2020.
- Simanjuntak, Y. R. et al. Validation of PELOD-2 score as a predictor of life-threatening organ dysfunction in pediatric sepsis. **Paediatrica Indonesiana**, v. 60, n. 5, p. 227–32, 2020. ISSN 0030-9311.
- Weiss, S. L.; Nicolson, S. C.; Naim, M. Y. Clinical Update in Pediatric Sepsis: Focus on Children With Pre-Existing Heart Disease. eng. **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, Springer Berlin Heidelberg, v. 34, n. 5, p. 1324–1332, May 2020. ISSN 1532-8422 (Electronic). Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6>>.
- Evans, L. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Medicine**, Michael Puskarich, v. 47, n. 11, p. 1181–1247, 2021. ISSN 14321238. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>>.
- Lopes Júnior, E. et al. Association of selenium status with endothelial activation during acute systemic inflammation in children. **Clinical Nutrition ESPEN**, Elsevier Ltd, n. 40, 2021. ISSN 24054577. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.11.007>>.
- Souza, D. C. et al. Prevalence and outcomes of sepsis in children admitted to public and private hospitals in Latin America: a multicenter observational study. por. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 33, n. 2, p. 231–242, 2021. ISSN 1982-4335 (Electronic).
- Zhang, L. et al. Performance of PRISM III, PELOD-2, and P-MODS Scores in Two Pediatric Intensive Care Units in China. eng. **Frontiers in pediatrics**, v. 9, p. 626165, 2021. ISSN 2296-2360 (Print).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dessa tese apresentam ineditismo na descrição das concentrações eritrocitárias de Zn e Cu em crianças com sepse internadas na UTIP. Foi identificada a prevalência de depleção de Zn em quase metade dos pacientes pediátricos com sepse no momento da admissão, enquanto as prevalências de depleção de Cu e Se foram menores.

A utilização do método *k*-means permitiu a identificação de clusters que dividiram a amostra de crianças com sepse de acordo com a magnitude da resposta inflamatória. Visto que a sepse é uma condição heterogênea, metodologias que avaliam a magnitude da inflamação podem ser promissoras para a identificação de crianças em risco, proporcionando melhor planejamento do tratamento. Adicionalmente, estudos longitudinais seriam capazes de avaliar os efeitos da magnitude da inflamação em médio e longo prazo.

A inflamação aguda na admissão não esteve associada com as concentrações eritrocitárias, o que constitui uma contribuição científica importante. Esse achado, em conjunto com as informações disponíveis na literatura, reforça a confiabilidade das medidas eritrocitárias para avaliação de adequação das concentrações de Zn, Cu e Se em pacientes pediátricos com resposta inflamatória sistêmica.

Outra contribuição científica foi a associação das concentrações eritrocitárias de Cu e Se com a idade. Esse achado sugere que a idade deve ser considerada quando avaliado o estado nutricional desses elementos traço na prática clínica.

O Zn apresentou um papel moderador, diminuindo o efeito do biomarcador inflamatório PCR na disfunção de órgãos. O que também ocorreu para crianças do cluster de magnitude da inflamação moderada. Isso evidencia que o estado nutricional do Zn no momento da admissão pode influenciar a progressão da doença grave na disfunção de órgãos em pacientes pediátricos com sepse e resposta inflamatória sistêmica.

A principal contribuição científica da presente tese foi o levantamento de hipóteses para futuras pesquisas. Especificamente, sobre o estado nutricional de Zn, Cu e Se na UTIP, a heterogeneidade da magnitude da inflamação em pacientes com sepse, os fatores associados com o status dos elementos traço e como eles podem ter um papel moderador na resposta inflamatória durante a sepse.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, trata-se de uma tese que utilizou dados secundários. Em contrapartida, foi um estudo exploratório, com metodologias estatísticas inovadoras e robustas. Ainda, a coleta de dados no estudo de base foi realizada por profissionais treinados, seguindo rigor metodológico.

Apesar de não ser possível comparar valores eritrocitários de Zn e Cu com os valores plasmáticos, visto que os valores plasmáticos não foram aferidos, as medidas eritrocitárias de elementos traço foram realizadas utilizando metodologia padrão referência de cromatografia de massas (HPLC-MS). Ainda, vale ressaltar que esses resultados não podem ser transpostos diretamente para a prática clínica, visto que medidas eritrocitárias não fazem parte da rotina dos serviços hospitalares.

Outra limitação é que não há valor de referência para concentrações micronutrientes na população estudada, e algumas variáveis que podem ser associadas às concentrações eritrocitárias não foram coletadas (ex: ingestão alimentar prévia). Porém, as publicações provenientes desse estudo podem instigar outros pesquisadores a investigar pontos de corte e fatores associados às concentrações eritrocitárias de elementos traço.

Por fim, a população do estudo, ou seja, pacientes pediátricos gravemente doentes sem doença crônica e com inflamação sistêmica aguda, possui suas particularidades. Ao mesmo tempo que pode limitar a validade externa dos resultados da presente tese, é um ponto forte que permite a avaliação de uma população que não apresenta um dos principais fatores de risco para deficiência de elementos traço, a doença crônica.

## BIBLIOGRAFIA

- Baer, M. T.; King, J. C. Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 556–570, abr. 1984. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/39/4/556/4691201>>.
- Blashfield, R. K.; Aldenderfer, M. S. The Methods and Problems of Cluster Analysis. **Handbook of Multivariate Experimental Psychology**, Springer, Boston, MA, p. 447–473, 1988. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0893-5_14)>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva, p. 452, 1995.
- Han, Y. Y. et al. Early reversal of pediatric-neonatal septic shock by community physicians is associated with improved outcome. **Pediatrics**, Pediatrics, v. 112, n. 4, p. 793–799, out. 2003. ISSN 1098-4275. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14523168/>>.
- Slater, A. et al. PIM2: A revised version of the Paediatric Index of Mortality. **Intensive Care Medicine**, Springer-Verlag, v. 29, n. 2, p. 278–285, 2003. ISSN 03424642.
- Goldstein, B.; Giroir, B.; Randolph, A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 6, n. 1, 2005. ISSN 15297535.
- Heyland, D. K. et al. **Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient**. v. 31. [S.l.: s.n.], 2005. P. 327–337.
- Ninis, N. et al. The role of healthcare delivery in the outcome of meningococcal disease in children: case-control study of fatal and non-fatal cases. **BMJ (Clinical research ed.)**, BMJ, v. 330, n. 7506, p. 1475–1478, jun. 2005. ISSN 1756-1833. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15976421/>>.
- WHO. Global database on Body Mass Index, 2006.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. v. 85, p. 660–67, 2007.
- Dellinger, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive Care Medicine**, Springer, v. 34, n. 1, p. 17–60, jan. 2008. ISSN 03424642. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-007-0934-2>>.
- Devictor, D.; Latour, J. M.; Tissières, P. Forgoing Life-Sustaining or Death-Prolonging Therapy in the Pediatric ICU. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 3, p. 791–804, 2008. ISSN 00313955.
- Oliveira, C. F. et al. Time- and fluid-sensitive resuscitation for hemodynamic support of children in septic shock: barriers to the implementation of the American College of Critical Care Medicine/Pediatric Advanced Life Support Guidelines in a pediatric intensive care unit in. **Pediatric emergency care**, *Pediatr Emerg Care*, v. 24, n. 12, p. 810–815, dez. 2008. ISSN 1535-1815. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19050666/>>.
- Wolfler, A. et al. Incidence of and mortality due to sepsis, severe sepsis and septic shock in Italian Pediatric Intensive Care Units: a prospective national survey. **Intensive care medicine**, *Intensive Care Med*, v. 34, n. 9, p. 1690–1697, set. 2008. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18500425/>>.
- Cvijanovich, N. Z. et al. Zinc homeostasis in pediatric critical illness. eng. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 10, n. 1, p. 29–34, jan. 2009. ISSN 1529-7535 (Print).

- Inwald, D. P. et al. Emergency management of children with severe sepsis in the United Kingdom: the results of the Paediatric Intensive Care Society sepsis audit. **Archives of disease in childhood**, Arch Dis Child, v. 94, n. 5, p. 348–353, mai. 2009. ISSN 1468-2044. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131419/>>.
- Santhanam, I. et al. GAP between knowledge and skills for the implementation of the ACCM/PALS septic shock guidelines in India: Is the bridge too far? **Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, Indian Society of Critical Care Medicine, v. 13, n. 2, p. 54, abr. 2009. ISSN 1998359X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2772250/>>.
- Kissoon, N. et al. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, *Pediatr Crit Care Med*, v. 12, n. 5, p. 494–503, 2011. ISSN 1529-7535. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21897156/>>.
- Wheeler, D. S. et al. Sepsis in the Pediatric Cardiac Intensive Care Unit. **World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery**, v. 2, n. 3, p. 393–399, 2011. ISSN 21500136.
- Brasil. **RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012**. [S.l.: s.n.], 2012.
- Campos-Miño, S.; Sasbón, J. S.; Dessauer, B. von. Pediatric intensive care in Latin America. **Medicina intensiva**, *Med Intensiva*, v. 36, n. 1, p. 3–10, 2012. ISSN 1578-6749.
- Duncan, A. et al. Quantitative data on the magnitude of the systemic inflammatory response and its effect on micronutrient status based on plasma measurements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 1, p. 64–71, jan. 2012. ISSN 00029165.
- Jaramillo-Bustamante, J. C. et al. Epidemiology of sepsis in pediatric intensive care units: first Colombian multicenter study. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, *Pediatr Crit Care Med*, v. 13, n. 5, p. 501–508, set. 2012. ISSN 1529-7535. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22460772/>>.
- Makles, A. Stata tip 110: How to get the optimal k-means cluster solution. **Stata Journal**, v. 12, n. 2, p. 347–351, 2012. ISSN 1536867X.
- Hartman, M. E. et al. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis\*. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, *Pediatr Crit Care Med*, v. 14, n. 7, p. 686–693, 2013. ISSN 1529-7535. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897242/>>.
- Leteurtre, S. et al. PELOD-2: An update of the PEdiatric logistic organ dysfunction score. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 7, p. 1761–1773, jul. 2013. ISSN 00903493. Disponível em: <[https://journals.lww.com/ccmjournals/Fulltext/2013/07000/PELOD\\_2\\_\\_An\\_Update\\_of\\_the\\_PEdiatric\\_Logistic\\_Organ.21.aspx](https://journals.lww.com/ccmjournals/Fulltext/2013/07000/PELOD_2__An_Update_of_the_PEdiatric_Logistic_Organ.21.aspx)>.
- Mehta, N. M. et al. Defining pediatric malnutrition: A paradigm shift toward etiology-related definitions. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 460–481, 2013. ISSN 01486071.
- Sagy, M.; Al-Qaqa, Y.; Kim, P. Definitions and pathophysiology of sepsis. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 43, n. 10, p. 260–263, 2013. ISSN 15385442.



- Stefanowicz, F. A. et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. eng. **Clinical Nutrition**, Elsevier Ltd, England, v. 32, n. 5, p. 837–842, out. 2013. ISSN 02615614. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23391458/>><<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.005>>.
- Preiser, J. C. et al. Metabolic response to the stress of critical illness. **British journal of anaesthesia**, v. 113, n. 6, p. 945–954, 2014. ISSN 14716771.
- Stefanowicz, F. et al. Assessment of plasma and red cell trace element concentrations, disease severity, and outcome in patients with critical illness. **Journal of Critical Care**, Elsevier Inc., v. 29, n. 2, p. 214–218, fev. 2014. ISSN 08839441. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.10.012>>.
- Wang, Y. [Nutritional screening and assessment in critically ill children]. chi. **Zhonghua er ke za zhi = Chinese journal of pediatrics**, v. 52, n. 2, p. 152–155, fev. 2014. ISSN 0578-1310 (Print).
- Wang, Y. et al. An epidemiologic survey of pediatric sepsis in regional hospitals in China. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, *Pediatr Crit Care Med*, v. 15, n. 9, p. 814–820, nov. 2014. ISSN 1529-7535. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25226498/>>.
- WHO. **Prevalence of stunting in children ages 0-4 years**. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0\\_4stunting](http://www.who.int/entity/ceh/indicators/0_4stunting)>. Acesso em: 20 abr. 2023.
- Becker, P. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Indicators recommended for the identification and documentation of pediatric malnutrition (undernutrition). **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 147–161, 2015. ISSN 19412452.
- Kaukonen, K.-M. et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. **New England Journal of Medicine**, *N Engl J Med*, v. 372, n. 17, p. 1629–1638, abr. 2015. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25776936/>>.
- Leteurtre, S. et al. Daily estimation of the severity of organ dysfunctions in critically ill children by using the PELOD-2 score. eng. **Critical care (London, England)**, *Crit Care*, v. 19, n. 1, p. 324, set. 2015. ISSN 1466-609X (Electronic). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369662/>>.
- Valla, F. V. et al. A training program for anthropometric measurements by a dedicated nutrition support team improves nutritional status assessment of the critically ill child. eng. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 16, n. 3, e82–8, mar. 2015. ISSN 1529-7535 (Print).
- Weiss, S. L. et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. eng. **American journal of respiratory and critical care medicine**, *Am J Respir Crit Care Med*, v. 191, n. 10, p. 1147–1157, mai. 2015. ISSN 1535-4970 (Electronic). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25734408/>>.
- Bharadwaj, S. et al. Malnutrition: Laboratory markers vs nutritional assessment. **Gastroenterology Report**, v. 4, n. 4, p. 272–280, 2016. ISSN 20520034.
- Colombo, J.; Pelliccioli, I.; Bonanomi, E. **Nutritional Status Assessment in Critically Ill Children**. eng. v. 44. [S.l.: s.n.], out. 2016. e1007.
- Ghashut, R. A. et al. The effect of the systemic inflammatory response on plasma zinc and selenium adjusted for albumin. eng. **Clinical Nutrition**, Elsevier Ltd, England, v. 35, n. 2, p. 381–387, abr. 2016. ISSN 15321983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.02.010>><<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25753552/>>.

- Joosten, K.; Van Puffelen, E.; Verbruggen, S. Optimal nutrition in the paediatric ICU. eng. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, Lippincott Williams e Wilkins, v. 19, n. 2, p. 131–137, mar. 2016. ISSN 14736519.
- Pollack, M. M. et al. New Paradigm for Outcomes Assessment. v. 43, April 2015, p. 1699–1709, 2016.
- Singer, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016. ISSN 0098-7484. arXiv: 15334406.
- Souza, D. C. de et al. Epidemiology of Sepsis in Children Admitted to PICUs in South America. eng. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 17, n. 8, p. 727–734, ago. 2016. ISSN 1529-7535 (Print).
- Textor, J. et al. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package 'dagitty'. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 1887–1894, 2016.
- Bechard, L. J.; Mehta, N. M. Nutritional Assessment Must be Prioritized for Critically Ill Children in the PICU. eng. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 4, e464, abr. 2017. ISSN 15300293.
- Dao, D. T. et al. Assessment of micronutrient status in critically ill children: Challenges and opportunities. eng. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1–26, out. 2017. ISSN 20726643.
- Heneghan, J.; Pollack, M. M. Morbidity: Changing the Outcome Paradigm for Pediatric Critical Care. **Pediatr Clin North Am.**, v. 64, n. 5, p. 1147–1165, 2017.
- Mantzaris, K.; Tsolaki, V.; Zakyntinos, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 5985209, 2017. ISSN 19420994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28904739>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5585571>>.
- Mehta, N. M. et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Pediatric Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. eng. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, SAGE Publications Inc., v. 41, n. 5, p. 706–742, jul. 2017. ISSN 19412444. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28686844>>.
- Mira, J. C. et al. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 2, p. 253–262, 2017. ISSN 15300293.
- Pinto, N. P. et al. Long-Term Function after Pediatric Critical Illness: Results from the Survivor Outcomes Study\*. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 18, n. 3, e122–e130, 2017. ISSN 19473893.
- Crow, S. S. et al. A "Fundamentals" Train-the-Trainer Approach to Building Pediatric Critical Care Expertise in the Developing World. eng. **Frontiers in pediatrics**, v. 6, p. 95, 2018. ISSN 2296-2360 (Print).
- Marik, P. E. Vitamin C for the treatment of sepsis: The scientific rationale. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 189, p. 63–70, 2018. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85046156872&doi=10.1016%2Fj.pharmthera.2018.04.007&partnerID=40&md5=b20fe5af363e856b8f9c6e17cfef9979>>.
- Toliver-Kinsky, T. et al. The systemic inflammatory response syndrome. In: TOTAL Burn Care: Fifth Edition. [S.l.: s.n.], 2018. 205–220.e4. ISBN 9780323497428. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613449/>>.
- Valla, F. V. et al. Faltering growth in the critically ill child: prevalence, risk factors, and impaired outcome. eng. **European journal of pediatrics**, v. 177, n. 3, p. 345–353, mar. 2018. ISSN 1432-1076 (Electronic).

- Valla, F. V. et al. Multiple Micronutrient Plasma Level Changes Are Related to Oxidative Stress Intensity in Critically Ill Children. eng. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 19, n. 9, e455–e463, set. 2018. ISSN 15297535.
- Frankel, L. R. et al. Criteria for Critical Care Infants and Children: PICU Admission, Discharge, and Triage Practice Statement and Levels of Care Guidance. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, *Pediatr Crit Care Med*, v. 20, n. 9, p. 847–887, set. 2019. ISSN 1529-7535. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31483379/>>.
- Lobo, S. M. et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: The Brazilian ICUs project. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 1–4, 2019. ISSN 19824335.
- McClave, S. A. et al. Mitochondrial Dysfunction in Critical Illness: Implications for Nutritional Therapy. **Current Nutrition Reports**, *Current Nutrition Reports*, v. 8, n. 4, p. 363–373, 2019. ISSN 21613311.
- McMillan, D. C.; Maguire, D.; Talwar, D. Symposium 2: Nutrient interactions and their role in protection from chronic diseases: Relationship between nutritional status and the systemic inflammatory response: Micronutrients. In: 1. PROCEEDINGS of the Nutrition Society. [S.l.]: Cambridge University Press, fev. 2019. v. 78, p. 56–67. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/relationship-between-nutritional-status-and-the-systemic-inflammatory-response-micronutrients/3E59EF52136C08210A07DBB749C5AF22>>.
- Souza, D.; Machado, F. Epidemiology of Pediatric Septic Shock. **Journal of Pediatric Intensive Care**, Georg Thieme Verlag KG, v. 08, n. 01, p. 003–010, mar. 2019. ISSN 2146-4618.
- Tume, L. N. et al. Priorities for Nutrition Research in Pediatric Critical Care. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 43, n. 7, p. 853–862, 2019. ISSN 19412444.
- Berger, M. M. Nutrition and Micronutrient Therapy in Critical Illness Should be Individualized. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 44, n. 8, p. 1380–1387, 2020. ISSN 0148-6071.
- Berger, M. M.; Ben-Hamouda, N. Trace element and vitamin deficiency: quantum medicine or essential prescription? **Current opinion in critical care**, v. 26, n. 4, p. 355–362, 2020. ISSN 15317072.
- Gerasimidis, K. et al. Assessment and Interpretation of Vitamin and Trace Element Status in Sick Children: A Position Paper From the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v. 70, n. 6, p. 873–881, jun. 2020. ISSN 15364801. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443051/>>.
- Marino, L. V. et al. Micronutrient status during paediatric critical illness: A scoping review. eng. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, *European Society for Clinical Nutrition e Metabolism*, v. 39, n. 12, p. 3571–3593, dez. 2020. ISSN 1532-1983 (Electronic). Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.015>>.
- Nakamura, K. et al. C-reactive protein clustering to clarify persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome. **Intensive Care Medicine**, Springer Berlin Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 437–443, 2020. ISSN 14321238. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05851-3>>.
- Simanjuntak, Y. R. et al. Validation of PELOD-2 score as a predictor of life-threatening organ dysfunction in pediatric sepsis. **Paediatrica Indonesiana**, v. 60, n. 5, p. 227–32, 2020. ISSN 0030-9311.

- Tume, L. N. et al. Nutritional support for children during critical illness: European Society of Pediatric and Neonatal Intensive Care (ESPNIC) metabolism, endocrine and nutrition section position statement and clinical recommendations. eng. **Intensive Care Medicine**, Springer Berlin Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 411–425, mar. 2020. ISSN 14321238. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05922-5>>.
- Weiss, S. L.; Nicolson, S. C.; Naim, M. Y. Clinical Update in Pediatric Sepsis: Focus on Children With Pre-Existing Heart Disease. eng. **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, Springer Berlin Heidelberg, v. 34, n. 5, p. 1324–1332, mai. 2020. ISSN 1532-8422 (Electronic). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6>>.
- Zemrani, B.; Bines, J. E. Recent insights into trace element deficiencies: Causes, recognition and correction. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 36, n. 2, p. 110–117, 2020. ISSN 15317056.
- Chakraborty, R. K.; Burns, B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. **StatPearls**, StatPearls Publishing, jul. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>>.
- Evans, L. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Medicine**, Michael Puskarich, v. 47, n. 11, p. 1181–1247, 2021. ISSN 14321238. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>>.
- Lopes Júnior, E. et al. Association of selenium status with endothelial activation during acute systemic inflammation in children. **Clinical Nutrition ESPEN**, Elsevier Ltd, n. 40, 2021. ISSN 24054577. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.11.007>>.
- Moltu, S. J. et al. Nutritional Management of the Critically Ill Neonate: A Position Paper of the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 73, n. 2, p. 274–289, 2021. ISSN 15364801.
- Berger, M. M. et al. ESPEN micronutrient guideline. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 1357–1424, 2022. ISSN 15321983.
- Bezerra de Almeida, C. et al. Erythrocyte and Plasma Selenium in Children with Acute Inflammatory Response. **SSRN Electronic Journal**, v. 74, September, 2022. ISSN 18783252.
- Fify, M. A. et al. Development of age-dependent micronutrient centile charts and their utility in children with chronic gastrointestinal conditions at risk of deficiencies: A proof-of-concept. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 931–936, 2022.
- Hulst, J. M. et al. A Practical Approach to Identifying Pediatric Disease-Associated Undernutrition: A Position Statement from the ESPGHAN Special Interest Group on Clinical Malnutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 74, n. 5, p. 693–705, 2022. ISSN 15364801.
- ILAS. **Relatório do Programa Nacional de Melhoria de Qualidade de Protocolos de Gerenciamento de Sepse**. [S.l.], 2022. P. 1–9.
- Ventura, J. C. et al. Nutritional screening tool for critically ill children: a systematic review. eng. **Nutrition reviews**, v. 80, n. 6, p. 1392–1418, mai. 2022. ISSN 1753-4887 (Electronic).
- Ventura, J. C. et al. Admission factors associated with nutritional status deterioration and prolonged pediatric intensive care unit stay in critically ill children: PICU-ScREEN multicenter study. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 46, n. 2, p. 330–338, 2022.
- Schlapbach, L. J. et al. International Consensus Criteria for Pediatric Sepsis and Septic Shock. **JAMA**, 2024. ISSN 15383598.

## **ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Disfunção Endotelial e Estado Nutricional Relativo ao Selênio em Pacientes Pediátricos Durante a Fase Aguda da Resposta Inflamatória Sistêmica

**Pesquisador:** Emilio Lopes Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 21778614.2.0000.5505

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 638.805

**Data da Relatoria:** 07/05/2014

#### Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP. 610.329 de 9/4/2014

#### Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 610.329 de 9/4/2014

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP. 610.329 de 9/4/2014

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 610.329 de 9/4/2014

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta de pendencia apontada no parecer inicial

#### Recomendações:

sem recomendações adicionais

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendencia apontada no parecer inicial:

Na metodologia descrita no projeto consta como colaboradores: o Laboratório de Nutrição -

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5539-7162

**Fax:** (11)5571-1062

**E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 638.805

Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo (USP) e do Laboratório de Peso ao Nascer e Desenvolvimento da Disciplina de Nefrologia (UNIFESP-EPM), e não foram apresentados os documentos de ciência das chefias dos laboratórios. Apresentar.

resposta: as duas cartas foram apresentadas de forma adequada

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

SAO PAULO, 07 de Maio de 2014

---

**Assinador por:**  
**José Osmar Medina Pestana**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br