



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

RÉGIS CILIA

**Níveis de Interleucina-8 e Fator de Necrose Tumoral Alfa
em pacientes pediátricos com sepse e choque séptico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre Fisiopatologia em
C Clínica Médica

Orientador(a): Prof. Titular José Roberto Fioretto
Coorientador(a): Profa. Dra. Joelma Gonçalves Martin

**Botucatu
2018**

Régis Cilia

Níveis de Interleucina-8 e Fator de Necrose Tumoral
Alfa em pacientes pediátricos com sepse e choque
séptico

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Fisiopatologia em
Clínica Médica.

Orientador (a): Prof.Dr. José Roberto Fioretto
Coorientador(a): Profa.Dra. Joelma Gonçalves Martin

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cília, Regis.

Níveis de Interleucina 8 e Fator de Necrose Tumoral alfa em pacientes pediátricos sépticos e em choque séptico / Regis Cília. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Roberto Fioretto

Coorientador: Joelma Gonçalves Martin

Capes: 20702000

1. Interleucinas. 2. Fator de necrose tumoral alfa. 3. Septicemia. 4. Pediatria. 5. Choque séptico.

Palavras-chave: Choque séptico ; Fator de Necrose Tumoral alfa ; Interleucina 8 ; Pediatria ; Seps.

"O pensamento escolhe. A Ação realiza. O homem conduz o barco da vida com os remos do desejo e a vida conduz o homem ao porto que ele aspira a chegar"

Emmanuel

Dedico este trabalho a Deus e aos meus espíritos protetores, que me presentearam com essa maravilhosa profissão e que me auxiliam sempre, principalmente nas turbulências.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e ofereço este trabalho,

Aos meus pais, José e Alba, que arduamente trabalharam para que eu me tornasse médico.

À minha esposa, Tatiane, por seu amor e dedicação à nossa família. Sem você, não realizaria este sonho.

Aos meus filhos, Lucca e Theo, pelo exemplo de que maturidade espiritual não se relaciona com idade cronológica. Obrigado por me tornarem um médico melhor.

À minha tia avó, Deda (in memorian), minha primeira inspiração para a adequada escolha de minha profissão.

Aos meus amigos e professores Dr. Mário, Dr. Rossano e Dra. Francisca pelo exemplo de pessoas e profissionais aos quais me inspirei e sempre me inspirarei

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Joelma Gonçalves Martin, por ter me recebido tão bem nos meus primeiros dias de residência médica, por ter me despertado o desejo de ser intensivista, pela enorme paciência e serenidade na condução deste trabalho. Obrigado por ter me oferecido o privilégio de ser seu aluno.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Fioretto, pelo incentivo ao apredizado em medicina intensiva pediátrica, pelo inspiração em ser o melhor dentro de minhas capacidades, pelo exemplo de professor e homem. Obrigado por repartir o seu conhecimento comigo e ajudar-me nesse projeto.

Agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho, em particular:

A equipe da UTI Pediátrica pela participação na elaboração e aplicação do protocolo deste trabalho.

Aos funcionários de Centro de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria, especialmente à Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa, não apenas pelo rigor científico, mas também pela disponibilidade.

A equipe da secretaria do Departamento de Pediatria: Fabiano, Adriana e Paulo.

Ao Dr. Hélio Rubens de Carvalho Nunes, da Equipe de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Resumo

As dificuldades relacionadas ao diagnóstico de sepse particularmente em pediatria indicam a necessidade de se buscar biomarcadores capazes não somente de distinguir as diferentes causas de inflamação, mas também de indicar a gravidade dos pacientes. **Objetivos:** avaliar o comportamento da Interleucina-8 (IL-8) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e sua utilidade em diferenciar crianças com sepse e quadros correlatos. **Métodos:** crianças sépticas foram incluídas prospectivamente e divididas em dois subgrupos: sepse (GS; n=24) e choque séptico (GCS; n=26). IL-8 e TNF- α foram medidas à admissão (T0) e 12 horas mais tarde (T12h). **Resultados:** Os níveis plasmáticos de IL-8 diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta em ambos os grupos, com diminuição significativa tanto no GCS, quanto no GS. No GS, em T0 [GS: 68,5 (4,8 – 412)] e em T12h [GS: 44,9 (4,6 – 229,7)] - p = 0,034. No GCS, em T0 [GCS: 268,8 (17,1 – 508,4)] e em T12h [GCS: 116 (17,5 – 508,4)] - p = 0,001. Também na comparação entre grupos, houve diferença, sendo níveis mais elevados no GCS; em T0: [GS - T0: 68,56 (412,04 – 4,9) vs. GCS - T0: 268,80 (508,36 – 17,1) p=0,008]; em T12h [GS - T12h: 45 (229,72 – 4,6) vs. GCS - T12h: 116,6 (508,4 – 17,5); p=0,005]. Os níveis plasmáticos de TNF- α não diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta e entre os grupos. **Conclusões:** IL-8 parece ser útil no diagnóstico precoce de sepse e choque séptico, sendo relacionada com a gravidade da doença.

Summary

The difficulties related to the diagnosis of sepsis, particularly in pediatrics, indicate the need to look for biomarkers capable not only of distinguishing the different causes of inflammation, but also of indicating the severity of the patients. **Objectives:** To evaluate the behavior of Interleukin-8 (IL-8) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and its usefulness in differentiating children with sepsis and related conditions. **Methods:** septic children were prospectively included and divided into two subgroups: sepsis (GS; n = 24) and septic shock (GCS; n = 26). IL-8 and TNF- α were measured at admission (T0) and 12 hours later (T12h). **Results:** Plasma levels of IL-8 differed statistically between the collection times in both groups, with a significant decrease in both GCS and GS. At GS, at T0 [GS: 68.5 (4.8 - 412)] and at T12h [GS: 44.9 (4.6 - 229.7)] - p = 0.034. In the GCS, at T0 [GCS: 268.8 (17.1-508.4)] and at T12h [GCS: 116 (17.5-508.4)] - p = 0.001. Also in the comparison between groups, there was difference, being higher levels in the GCS; in T0: [GS - T0: 68.56 (412.04 - 4.9) vs. GCS-T0: 268.80 (508.36 - 17.1) p = 0.008]; in T12h [GS - T12h: 45 (229.72 - 4.6) vs. GCS-T12h: 116.6 (508.4-17.5); p = 0.005]. Plasma levels of TNF- α did not differ statistically between collection times and between groups. **Conclusions:** IL-8 seems to be useful in the early diagnosis of sepsis and septic shock, being related to the severity of the disease.

ÍNDICE

	Páginas
1– Introdução	13
2 – Objetivos	23
3 – Pacientes, Material e Métodos	
3.1 – Pacientes, Definições e Monitorização	24
3.2 – Critérios de exclusão.....	26
3.3 – Coleta de sangue e separação do plasma.....	26
3.4 – Método de dosagem de IL-8 e TNF alfa	27
3.5 – Análise estatística	29
4 – Resultados	
4.1 – Inclusão e exclusão dos pacientes	29
4.2 – Comparação dos grupos – Características gerais	30
4.3 – Marcadores Bioquímicos	32
4.3.1 – Fator de Necrose Tumoral Alfa	32
4.3.2 – Interleucina 8	35
5 – Discussão	38
5.1 – Características dos pacientes	40
5.2 – Interleucina 8	40
5.3 – Fator de Necrose Tumoral Alfa	43
5.4 – Limitações e Implicações do Estudo	45
6 – Conclusão	47
7 – Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

A sepse, traduzida inicialmente como “Putrefação”, decomposição de material orgânico (MARK, 2002), atualmente, é definida como disfunção orgânica potencialmente fatal causada por resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, et al., 2016).

Todavia, em detrimento dos recentes avanços no entendimento de sua fisiopatologia e da aplicação de novos recursos terapêuticos, a incidência dos quadros sépticos está aumentando e a taxa de mortalidade permanece elevada, excedendo 50%, na dependência da população avaliada (PRESTERL et al., 1997; ANGUS & WAX 2001; FIORETTO 2003; SHARMA & KUMAR 2003; TETTA et al., 2003; RIVERS et al., 2005; HARTVIG et al., 2006).

A sintomatologia da sepse é inespecífica, o que pode trazer algumas dificuldades, tais como: erro no diagnóstico, particularmente difícil em crianças e idosos; desenvolvimento de cepas microbianas multirresistentes, frente à demora na retirada e maior utilização de antibióticos; e, infelizmente, aumento da mortalidade, devido à demora na instituição da terapêutica já que as alterações clínicas e laboratoriais mais típicas da sepse são tardias, quando já há disfunção orgânica.

A constelação de sinais e sintomas descritos incluiu taquicardia, taquipnéia, aumento da temperatura corporal, contagem anormal de leucócitos no sangue periférico e evidência de disfunção orgânica (FIORETTO JR 2009).

Em 1992, na conferência de consenso, o conceito de “sepse” foi formalmente publicado pelos membros do *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference 1992) para definir a resposta sistêmica à infecção. O produto do trabalho desse

consenso foi a codificação de novas e antigas definições relativas à infecção sistêmica para a população de adultos. Surgiu, então, o conceito de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), que descreve a resposta orgânica comum a uma grande variedade de processos, infecciosos ou não, como trauma, queimadura, pancreatite etc (FIORETTO JR 2009).

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) foi caracterizada pela presença de duas ou mais das seguintes manifestações clínicas: temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; taquicardia (frequência cardíaca [FC] $> 90\text{bpm}$); taquipnéia (frequência respiratória [FR] $> 20\text{rpm}$); alteração na contagem de glóbulos brancos ($> 12.000\text{cels/mm}^3$) ou presença de mais de 10% de células jovens (BONE RC, BALKF RA, CERRA FB, DELLINGER RP, FEIN AM, KNAUS WA et al., 1992).

A aplicação dos critérios estabelecidos pela conferência de consenso de 1992 também encontrou resistências entre os intensivistas de adultos logo depois de sua publicação. Os critérios adotados para definição de SRIS foram considerados muito amplos e não específicos. Havia preocupação de que um grande número de pacientes gravemente enfermos, adultos ou crianças, manifestassem SRIS sem infecção, de forma que indivíduos sem sepse poderiam ser diagnosticados e tratados como estando sépticos, considerando-se os critérios diagnósticos de SRIS adotados pelo consenso (FIORETTO JR 2009).

Em editorial clássico, publicado em 1997, Vincent (VINCENT JL 1997) criticou a legitimação do conceito de SRIS por sensibilidade excessiva, falta de conexão com a fisiopatologia, falta de especificidade e falta de clareza quanto aos benefícios no cuidado de pacientes e à melhoria de pesquisas na área (FIORETTO JR 2009).

Posteriormente, em 2000, o mesmo autor considerou problemático que tanta ênfase tivesse sido dada aos quatro sinais de inflamação descritos inicialmente, o que seria uma tentativa de simplificação de um processo tão complexo como a sepse (VINCENT JL 2000).

Em 2001, nova conferência de consenso foi conduzida pelas sociedades de medicina intensiva dos Estados Unidos e da Europa para rever essas definições (LEVY MM, FINK MP, MARSHALL JC, ABRAHAM E, ANGUS D, COOK D et al., 2001). Esse novo consenso reafirmou a importância do diagnóstico precoce de sepse, utilizando critérios clínicos e laboratoriais, visto que a efetividade de novas estratégias de tratamento está diretamente relacionada à rapidez com a qual o diagnóstico é estabelecido (FIORETTO JR 2009).

Na conferência de consenso, os níveis séricos de proteína C reativa (PCR) e de procalcitonina foram incluídos como critérios diagnósticos de sepse para adultos, entendendo-se que um marcador que seja capaz de distinguir a resposta inflamatória à infecção de outros tipos de inflamação seria de grande utilidade clínica (FIORETTO JR 2009).

Em 2005, foram publicados os resultados da conferência de consenso para as definições de sepse em pediatria sem incluir uma avaliação laboratorial (GOLDSTEIN B, GIROIR B, RANDOLPH A 2005).

Como dito anteriormente, os sinais e sintomas de sepse não são específicos e, algumas vezes, determinam erros de diagnóstico, que já é particularmente difícil em crianças.

Em condições basais, o organismo utiliza mecanismos de defesa imune, locais e inatos específicos, com mínima resposta inflamatória sistêmica, a fim de proteger o epitélio da invasão de micro-organismos para assim manter o equilíbrio interno. A liberação de mediadores inflamatórios

é balanceada simultaneamente por mediadores antiinflamatórios locais (LEVY O 2007).

Eventos pró e antiinflamatórios são continuamente modulados pelo sistema neuroendócrino. A SRIS ocorre quando estes mecanismos falham (MUNFORD RS, PUGIN J 2001).

Os critérios para sepse foram difíceis de serem transpostos para crianças, visto que utilizavam parâmetros específicos de adultos. Logo, para tornar a definição de sepse e dos quadros correlatos mais aplicável para a pediatria, foram propostas alterações nos critérios originais da SRIS, incluindo valores normais de acordo com a idade para frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), pressão arterial (PA) e contagem de células brancas periféricas (HAYDEN WR 1994).

Então, a SRIS em pediatria foi caracterizada pela presença de duas ou mais manifestações clínicas, sendo uma destas, obrigatoriamente, alteração de temperatura corporal ou alteração leucocitária. São quatro as manifestações clínicas consideradas para o diagnóstico: temperatura corporal $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; taquicardia (FC maior do que dois desvio-padrão acima do normal para idade e estimulação externa _ estímulo doloroso ou uso de drogas) ou bradicardia (válida apenas para crianças menores de um ano de idade, definida como FC média menor do que o percentil 10 para a idade, na ausência de estímulo vagal, fármacos beta-bloqueadores ou cardiopatia congênita); taquipnéia (definida como FR média maior do que dois desvios-padrão acima do normal para a idade ou necessidade de ventilação mecânica para um processo agudo, não relacionado à doença neuromuscular ou à anestesia geral); leucocitose (não relacionada ao uso de corticóide) ou leucopenia (sem relação com quimioterapia) ou neutrófilos imaturos representando mais do que 10% dos neutrófilos totais (GOLDESTINE et al., 2005)

A sepse é a causa mais comum de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP). O diagnóstico da sepse pode ser difícil porque os achados clínicos e laboratoriais são semelhantes aos achados presentes em diferentes níveis de gravidade da SRIS causada por doenças infecciosas ou não infecciosas (LANKS et al. 2011).

A progressão das mudanças fisiológicas que ocorrem na sepse em direção à hipoxemia e ao dano tecidual configura o choque séptico (CS). Por isso, é importante que os pediatras tenham instrumentos que permitam o reconhecimento e o diagnóstico precoce da sepse de maneira que medidas efetivas para o tratamento da infecção possam ser rapidamente implementadas (LANKS et al. 2011).

O dilema diagnóstico em diferenciar SRIS não infecciosa de sepse é ainda mais complicado pelo fato de que essas condições podem ter quadro clínico muito similar ao quadro dos processos infecciosos e, frequentemente, predispoem os pacientes a infecções secundárias (LANKS et al. 2011).

Além disso, a distinção entre SRIS não infecciosa e sepse é muito importante do ponto de vista clínico, porque direciona decisões essenciais de tratamento (LANKS et al. 2011).

Igualmente, além de diagnosticar a sepse, os pediatras têm a tarefa de monitorar a resposta do paciente ao tratamento em direção à cura ou à progressão para o CS, falência de múltiplos órgãos e óbito. As definições para essas condições também já foram estabelecidas por grupo de intensivistas pediátricos que focaram primariamente nos parâmetros fisiológicos de bem-estar, como índices hemodinâmicos, saturação de oxigênio sanguíneo e sinais de perfusão de órgãos alvo (LANKS et al. 2011).

Também, seria grande utilidade clínica um marcador que consiga distinguir sepse de infecção localizada e SRIS de causa não infecciosa, já que

que os marcadores tradicionais, como temperatura corporal, FC, FR e contagem de leucócitos são inespecíficos. Por outro lado, os biomarcadores têm o potencial de diagnosticar, monitorar, estratificar e prever o resultado da doença (LANKS et al. 2011).

Uma ampla definição dos biomarcadores foi apresentada em 2001 em um painel de especialistas no National Institute of Health (NIH) (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP 2001). Esse grupo descreveu um biomarcador como “qualquer característica que seja mensurada objetivamente e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, processo patogênico ou como resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica”. Nesse sentido, vários parâmetros clínicos e fisiológicos usados na avaliação da criança hospitalizada poderiam ser considerados biomarcadores (LANKS D. GARCIA PCR. PIVA JP 2011).

Por essas dificuldades é que os participantes do Consenso de Sepsis de 2001 alertaram que, para o diagnóstico de sepsis e situações correlatas, a análise clínica não era suficiente. Tais observações foram confirmadas no consenso de 2005, quando se enfatizou que os problemas de definição de sepsis são indicadores da necessidade de determinação de um marcador, sendo útil focar mediadores bioquímicos capazes não apenas de distinguir a resposta inflamatória à infecção de outros tipos de inflamação, bem como indicar a gravidade e o prognóstico dos pacientes, o que também foi corroborado pelas diretrizes internacionais para tratamento de sepsis grave e choque séptico, em Berlim, no ano de 2012 (DELLINGER RP et al., 2012). Portanto, a compreensão da função dos mediadores bioquímicos na sepsis e quadros correlatos é importante.

Neste contexto, chama atenção as citocinas, que são proteínas mensageiras utilizadas na coordenação de processos biológicos entre

populações celulares. Seu estudo na resposta imune oferece particular interesse não só porque o estabelecimento de uma defesa eficaz depende de perfeita integração entre diversos componentes do sistema imunológico e também porque ao modular processos como proliferação, diferenciação, apoptose, migração, expressão de marcadores e secreção de proteínas de forma altamente específica, sua manipulação oferece inestimáveis oportunidades terapêuticas (GELLER M. SCHEINBERG M 2015).

A comunicação por citocinas é um processo complexo que se inicia por sua secreção em resposta a um estímulo celular e segue por transmissão do sinal por meio de ligação a receptores específicos até o núcleo das células-alvo. Este sinal pode ainda ser modulado segundo a distribuição e constituição do receptor, ou pelas moléculas intermediárias que traduzem o sinal da membrana ao núcleo (GELLER M. SCHEINBERG M 2015).

Na sepse e no choque séptico, produtos e toxinas bacterianas ativam células do sistema imunológico para sintetizar mediadores pró-inflamatórios e citocinas reguladoras antiinflamatórias (SHARMA & KUMAR 2003). Para que a defesa contra a infecção se inicie de maneira eficaz é necessária a participação de citocinas com função fundamentalmente pró-inflamatória, como por exemplo: Interleucina-8; fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); Interleucina-1(IL-1); Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-12 (IL-12) (CHIZZONITE et al., 1998; DINARELLO, 2000; GOLDMANN et al., 2005; MIZUNO et al., 2005).

A IL-6 é a maior estimulante da síntese de proteínas hepáticas, como a PCR. Além das citocinas anteriormente citadas, há a liberação de fator de ativação plaquetária e de interferon-gama (IFN gama). Essas últimas, por sua vez, podem ativar os macrófagos, leucócitos e células endoteliais, perpetuando o processo (LIVINSTON et al., 1995; FIORETTO 2003). A estimulação

produzida pelo TNF- α , IL-6 (FIORETTO 2008) e outras citocinas determina a liberação de procalcitonina (PCT), que amplia o processo inflamatório (MEISNER 2000; MARISCALCO 2003; SAUER et al., 2003, FIORETTO 2007). A resposta pró-inflamatória inicial é controlada por moléculas antiinflamatórias, receptores específicos de algumas citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12 e IL-13) e pelos receptores específicos para IL-1, TNF e IL-18 (GOLDIE et al., 1995; GOGOS et al., 2000; EMMANUILIDIS et al., 2002; MARTIN JG 2012).

Em condições fisiológicas, todas essas moléculas comportam-se como imunomoduladoras e, portanto, limitam o efeito potencialmente deletério da reação inflamatória. Em condições patológicas, a resposta antiinflamatória pode ser insuficiente para antagonizar a atividade inflamatória, ou ao contrário, ser inibidora do sistema imune, deixando o hospedeiro à mercê da infecção.

Na sepse, além do processo inflamatório, das alterações da coagulação, do sistema complemento, dos sistemas de ativação de contato e apoptose, há o envolvimento de cerca de 178 biomarcadores, dos quais a proteína C reativa e procalcitonina foram os mais estudados e, comprovadamente, classificados como muito úteis na abordagem do paciente pediátrico séptico (PIERRAKOS C, VINCENT JL 2010).

Em vista da importância do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 8 (IL-8) no sistema imunológico e dos poucos trabalhos envolvendo tais citocinas, estabelecer suas respectivas dosagens em pacientes pediátricos sépticos tornou-se instigante.

O TNF- α foi isolado pela primeira vez por Carswell et al., em 1975, na tentativa de identificar os fatores de necrose tumoral responsáveis pela necrose do sarcoma Meth A (CARSWELL et al., 1975).

O TNF- α tem várias funções na imunopatologia humana, desde produzir inflamação, proliferação e diferenciação celular, tumorigênese, replicação viral e até induzir a morte celular por apoptose (PLUMEETHAN et al., 2012).

Em modelos clínicos de sepse, a administração do TNF- α causa hipotensão, ativação da cascata de coagulação e disfunção orgânica, confirmando a sua função de mediador na fase aguda (PLUMEETHAN et al., 2012). In vivo, observou-se aumento nos níveis de TNF- α após estimulação com endotoxinas em voluntários saudáveis e também em pacientes com choque séptico causado por bacteremia gram-positiva e gram-negativa (PLUMEETHAN et al., 2012).

Há poucos estudos acerca do comportamento do TNF- α em crianças em choque séptico.

Nos últimos cinco anos, quatro estudos fizeram menção ao TNF- α e sepse/choque séptico em crianças (XU J et al., 2012; XU J et al., 2013; CHEN DH et al. 2011; PHUMEETHAN S et al., 2012), sendo que três dos estudos citaram relação positiva entre aumento do nível desse biomarcador e a sepse. Já, um dos estudos, realizado em crianças tailandesas, não constatou relação entre aumento dos níveis do TNF- α e sepse/choque séptico (PHUMEETHAN S et al., 2012)

XU J et al., em 2012, discriminaram choque séptico por bactérias gram-negativas de gram-positivas utilizando citocinas pró-inflamatórias e observaram aumento dos níveis de TNF- α em pacientes com choque séptico, principalmente por bactérias gram-negativas. No ano seguinte, XU J et al. relataram o desenvolvimento de um sistema de pontuação de citocinas para avaliar a gravidade do choque séptico em pacientes oncológicos, evidenciando aumento significativo dos níveis de TNF- α

naqueles com elevado índice de mortalidade, avaliado pelo Índice Pediátrico de Mortalidade (score PIM).

Em agosto de 2011, também na China, Chen DH et al., avaliaram o significado do receptor Toll like-4 (TLR4) em crianças com sepse grave e sugeriram que as alterações de expressão do TLR4 associadas às citocinas pró inflamatórias, dentre elas o TNF- α , seria útil como parâmetro preditivo para diagnóstico precoce e avaliação da gravidade da sepse.

Esses estudos indicam que os conhecimentos a respeito da participação do TNF- α ainda são insuficientes.

Outra citocina de interesse nos quadros de infecções graves é a IL-8.

A IL-8 é produzida, principalmente, por monócitos e macrófagos e, em menor quantidade, por fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos. Seus estímulos normalmente são a IL-1, TNF- α e fator de necrose tumoral gama. Em contrapartida, pode ser inibida por corticosteroides e ciclosporina A (BAGGIOLINI M et al., 1994).

A principal ação da IL-8 é o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (ZWAHLEN R et al., 1993). Particularmente, frente a processos infecciosos, a IL-8 apresenta papel principal no âmbito do direcionamento migratório e ativação de células, tais como neutrófilos (DANIEL et al., 2005). Já é conhecido o seu papel na resposta do hospedeiro a infecções como pneumonia e sepse (REMICK DG, 2005). Em vista do papel biológico desta interleucina e a praticidade da realização de sua dosagem, há estudos realizados para demonstrar a utilidade potencial da IL-8 no diagnóstico precoce de infecções bacterianas sistêmicas, particularmente em neonatos (HARRIS MC et al., 2005).

Assim como com o TNF- α , são escassos os trabalhos acerca do comportamento da IL-8 em crianças sépticas e/ou em choque séptico fora do período neonatal.

Nos últimos cinco anos, somente três trabalhos citaram a relação entre IL-8 e pacientes sépticos e/ou em choque séptico. Dois dos trabalhos mencionaram uma relação positiva entre aumento do nível da IL-8 e sepse/choque séptico (KAPLAN & WONG, 2011; WONG HR, 2012). Um único trabalho não considerou relação positiva entre o referido biomarcador e as doenças em questão (CALFEE CS et. al., 2010).

O trabalho norte-americano, de março de 2011, de Kaplan e Wong, sugeriu que a IL-8 pode ser utilizada para estratificar crianças com choque séptico com alta chance de sobrevida com tratamento habitual.

Em maio de 2012, Wong HR, em trabalho realizado também nos Estados Unidos, citou a IL-8 como marcador relevante em crianças com choque séptico. Entretanto, em outro estudo americano, realizado em junho de 2010, de Calfee CS et. al., foi citado que a IL-8 não é eficaz para estratificar pacientes em choque séptico dependentes de vasopressor.

Portanto, frente aos escassos trabalhos acerca dos níveis de TNF alfa e IL-8 e, principalmente, para identificar e, conseqüentemente, instituir o tratamento precocemente no paciente pediátrico com sepse/choque séptico, esse trabalho visa determinar o comportamento do TNF alfa da IL-8 em crianças em sepse e/ou choque séptico.

2 – Objetivos

Os objetivos do estudo foram:

- 1- Estudar o comportamento dos níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α em crianças com diagnóstico de sepse ou choque séptico;
- 2- Determinar o valor destes mediadores no diagnóstico dos quadros sépticos;
- 3 - Verificar se IL-8 e TNF- α são indicadores de gravidade dos pacientes, sendo capazes de discriminar crianças com diagnóstico de sepse daquelas com choque séptico.

3 .Pacientes, Materiais e Métodos

3.1 Pacientes, Definições e Monitorização

No período consecutivo de janeiro de 2004 a dezembro de 2005, crianças de 28 dias a 14 anos de idade, admitidas na UTI-Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu com diagnóstico de sepse ou choque séptico, foram incluídas prospectivamente no estudo.

A UTI-Pediátrica tem sete leitos e está inserida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, hospital terciário de referência da região centro-sul do Estado de São Paulo (DIR 11), atendendo uma média de 25 pacientes por mês. A unidade conta com equipe multidisciplinar composta por enfermeiros, fisioterapeutas e médicos devidamente treinados, sendo todos os médicos diaristas e 100% dos plantonistas titulados em medicina intensiva. Além disso, a unidade é credenciada pela Associação de Medicina Intensiva Brasileira como Centro Formador de Intensivistas Pediátricos.

Os pacientes foram acompanhados por meio de um protocolo que continha dados de identificação, idade, diagnósticos de entrada e saída, foco primário de infecção, horário do diagnóstico de sepse/choque séptico, volume hídrico administrado, drogas vasoativas utilizadas, os critérios para definição de sepse, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos, culturas solicitadas e os germes isolados.

Sepse foi definida de acordo com os critérios estabelecidos pela Conferência de Consenso de 2001, publicada em 2003 (LEVY et al., 2003),

associada à inclusão de valores normais de acordo com a idade para algumas variáveis biológicas, segundo HAYDEN (1994) e GODSTEIN et al. (2005).

SRIS em pediatria foi caracterizada pela presença de duas ou mais manifestações clínicas, sendo, obrigatoriamente, uma destas alteração de temperatura corporal ou alteração leucocitária. São quatro manifestações clínicas: temperatura corporal $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; taquicardia (FC maior do que dois desvio-padrão acima do normal para idade e estimulação externa – estímulo doloroso ou uso de drogas) ou bradicardia (válida apenas para crianças menores de um ano de idade, definida como FC média menor do que o percentil 10 para a idade, na ausência de estímulo vagal, fármacos beta-bloqueadores ou cardiopatia congênita); taquipnéia (definida como FR média maior do que dois desvios-padrão acima do normal para a idade ou necessidade de ventilação mecânica para um processo agudo, não relacionado à doença neuromuscular ou à anestesia geral); leucocitose ou leucopenia ou neutrófilos imaturos representando mais do que 10% dos neutrófilos totais (GOLDESTINE et al. 2005).

Choque séptico foi definido como sepse associada à disfunção cardiovascular. Disfunção cardiovascular foi caracterizada quando, apesar da administração intravenosa de 40 mL/kg de salina isotônica, em uma hora, algum dos seguintes parâmetros estava presente: Hipotensão, PA menor do que o percentil cinco para a idade ou Pressão Arterial Sistólica menor que dois desvios padrão do normal para a idade OU necessidade de droga vasoativa (Dopamina $> 5 \mu\text{g/kg/min}$; ou Dobutamina, Epinefrina ou Norepinefrina em qualquer dose) para manter PA normal, OU dois dos seguintes itens: acidose metabólica sem causa aparente (Déficit de Base maior que -5mEq/L); aumento do lactato arterial (maior que duas vezes o limite superior da normalidade);

oligúria (débito urinário menor que 0,5 mL/kg/h); perfusão periférica lenta (> 5 segundos); diferencial entre temperatura central e periférica maior que 3°C.

Seguindo estas definições, os pacientes foram distribuídos em dois grupos de estudo, à admissão: Grupo Seps (GS) e Grupo Choque Séptico (GCS). A classificação dos pacientes em seps e choque séptico foi realizada pelo médico diarista e reavaliada por todo o grupo em duas visitas gerais durante a semana

3.2 – Critérios de exclusão

Foram excluídas crianças com doenças inflamatórias sistêmicas crônicas, doenças neurológicas degenerativas, imunodeficiência primária ou adquirida, aquelas em uso de corticoterapia, antiinflamatórios não hormonais e antibióticos por mais de 24 horas, as vítimas de traumatismo e queimaduras e as crianças em pós-operatório. Também foram excluídas as crianças que na adequação do diagnóstico às novas definições não preencheram os critérios de seps ou choque séptico.

3.3 - Coleta de sangue e separação do plasma

A primeira coleta de sangue para a determinação dos níveis dos mediadores bioquímicos foi realizada em tempo inferior a oito horas do diagnóstico clínico das síndromes, para avaliar sua utilidade como forma de diagnosticar seps, sendo este momento considerado o tempo zero (T0) de avaliação. Passadas 12 horas da primeira coleta, nova amostra foi obtida

(tempo 12 horas – T 12h). Os resultados das análises bioquímicas não foram disponibilizados para os médicos diaristas.

Para a determinação dos níveis plasmáticos de IL-8 e de TNF alfa foram coletados sangue em cateter posicionado em veia central, sendo, no T0, 5 mL e 3 mL de sangue no T12h. Após a coleta, o sangue foi imediatamente colocado sob refrigeração e, em prazo não superior a oito horas, o material foi centrifugado para dosagem dos mediadores no plasma.

3.4 – Método de ELISA para dosagens de IL-8 e TNF- α

As dosagens de IL-8 e TNF- α foram realizadas utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay), por meio do sistema *Duo Set* (R&D Systems, Minneapolis, USA). Resumidamente, 100 μ L do padrão e amostras foram adicionados a 96 alvéolos de microplacas, as quais foram incubadas durante duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens das placas e, logo após, adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção e avidina conjugada com peroxidase (Pharmingen®), diluídos a 1:250 em PBS (solução salina tamponada com fosfato) e 10 % de BSA (Sigma® - soro albumina bovina). O tempo de incubação foi de uma hora à temperatura ambiente, seguida de nova lavagem. Após este período, foi adicionado o substrato para revelação da reação. O tampão utilizado foi o citrato-fosfato pH=4,9, adicionado de TMB (Pharmingen®-Tetrametilbenzidina) 0,1mg/mL e 2 μ L de H₂O₂ a 30% para cada 10% de tampão. O tempo de revelação foi de 30 minutos e a solução de bloqueio utilizada foi H₂SO₄ 2N. A determinação da densidade óptica da amostra foi obtida utilizando o leito de microplacas com comprimento de onda fixado em 450nm. A dose mínima detectável foi de 2,34 pg/mL e os

coeficientes de variação entre-ensaio e intra-ensaio foram de 8% e 3,6%, respectivamente.

A sensibilização das placas de 96 alvéolos foi realizada conforme o procedimento estabelecido pelo fabricante. Resumidamente, microplacas (TTP- Immunomaxi) foram sensibilizadas pela adição de 100µL de anticorpo monoclonal anti-IL-6 (Pharmingen®) previamente diluído 1:250 em tampão carbonato-bicarbonato, pH=9,4. O período de incubação foi de 18 horas a 4°C. Após este período a placa foi lavada quatro vezes com PBS adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBST). Para eliminação de reações não-específicas, as placas foram tratadas com 200µL/alvéolo da solução PBS pH=7,0 adicionada de 10% de BSA seguido de nova incubação de duas horas à temperatura ambiente e lavadas com PBST, após a realização deste procedimento.

3.5 – Análise Estatística

Os grupos sepse e choque séptico foram comparados quanto à idade e sexo dos pacientes e foco primário de infecção à admissão. Os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α foram comparados nos dois momentos de avaliação (T0 e T12h) dentro de cada grupo e entre os grupos de estudo.

Como as variáveis estudadas não apresentaram aderência à distribuição normal das probabilidades, foram utilizados testes não paramétricos para análise dos dados e as medidas descritivas expressas pela mediana e semi-amplitude total.

Para comparar os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α nos dois tempos de avaliação e entre grupos foi utilizada a análise de medidas repetidas em grupos independentes (STREINER & NORMAN 1994).

Todas as conclusões foram discutidas no nível de 5% de significância

4 – Resultados

Os grupos sepse e choque séptico foram comparados quanto à idade e sexo dos pacientes e foco primário de infecção à admissão. Os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α foram comparados nos dois momentos de avaliação (T0 e T12h) dentro de cada grupo e entre os grupos de estudo.

4.1 – Inclusão e exclusão dos pacientes

Dos 689 pacientes admitidos na UTI Pediátrica durante o período do estudo, 59 pacientes preencheram os critérios diagnósticos de Sepse (GS) e 65 de Choque Séptico (GCS).

Do GS foram excluídos 35 pacientes (2 por uso de antibióticos por mais de 24 horas; 4 em pós-operatório; 2 por doença neurológica degenerativa e 23 por volume insuficiente de soro) e, do GCS, 39 pacientes foram excluídos (12 por uso de antibióticos há mais de 24 horas; 3 por doença inflamatória crônica em atividade; 2 por doença neurológica degenerativa; 2 por uso prolongado de corticóides; 3 por óbito antes da coleta do material e 17 por volume insuficiente de soro).

Logo, foram estudados 50 pacientes, sendo 24 do GS e 26 do GCS.

A figura 1 ilustra o fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes.

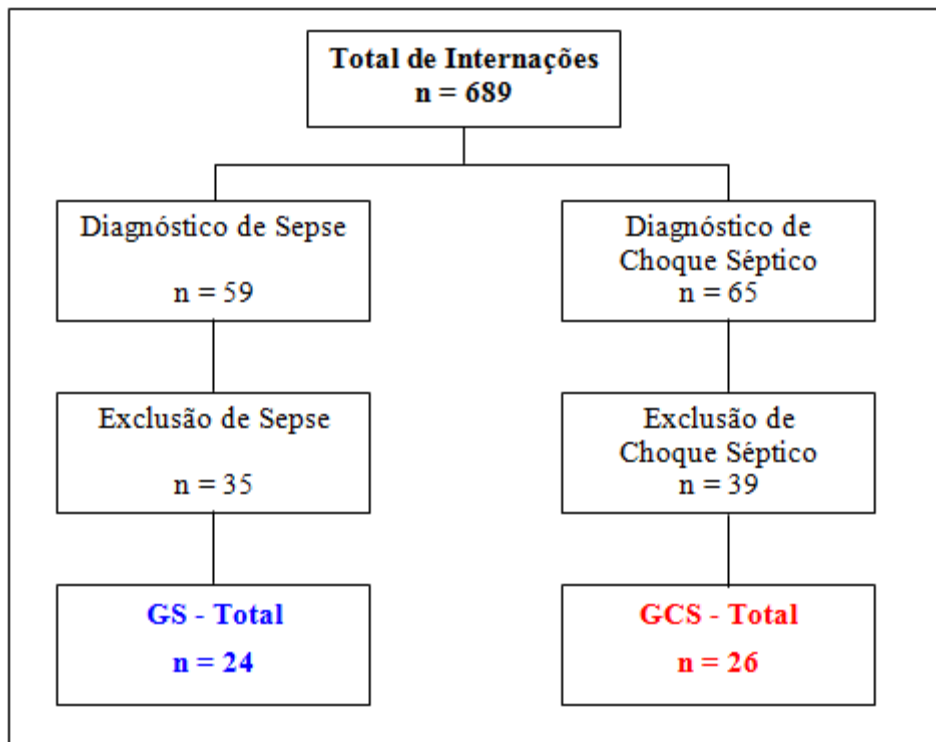


Figura 1 – Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes.

n = número de pacientes; GS = grupo sepsis; GCS = grupo choque séptico.

4.2 - Comparação dos grupos – Características gerais

Os grupos não diferiram estatisticamente quanto à idade (**GS**: mediana = 17 meses e variação de 2 a 139; **GCS**: mediana = 17 meses e variação de 1,5 a 204; $p > 0,05$) e sexo (masculino – **GS** = 14; **GCS** = 14 - $p > 0,05$ e feminino – **GS** = 10; **GCS** = 12 - $p > 0,05$).

Os pulmões foram o foco primário de infecção na maioria dos pacientes do GS [pulmão: 19 (79,2%); sistema nervoso central: 1 (4,2%); gastrointestinal: 3 (12,5%); urinário: 1 (4,2%); $p < 0,05$ comparando pulmão com os demais]. No GCS houve predomínio tanto do foco pulmonar como do gastrointestinal [pulmão: 8 (30,8%); gastrointestinal: 8 (30,8%); sistema nervoso central: 4 (15,4%); cutâneo: 2 (7,7%); infecção corrente sanguínea: 2 (7,6%); hepático: 1 (3,8%); indeterminado: 1 (3,8%)], como apresentado na Figura 2.

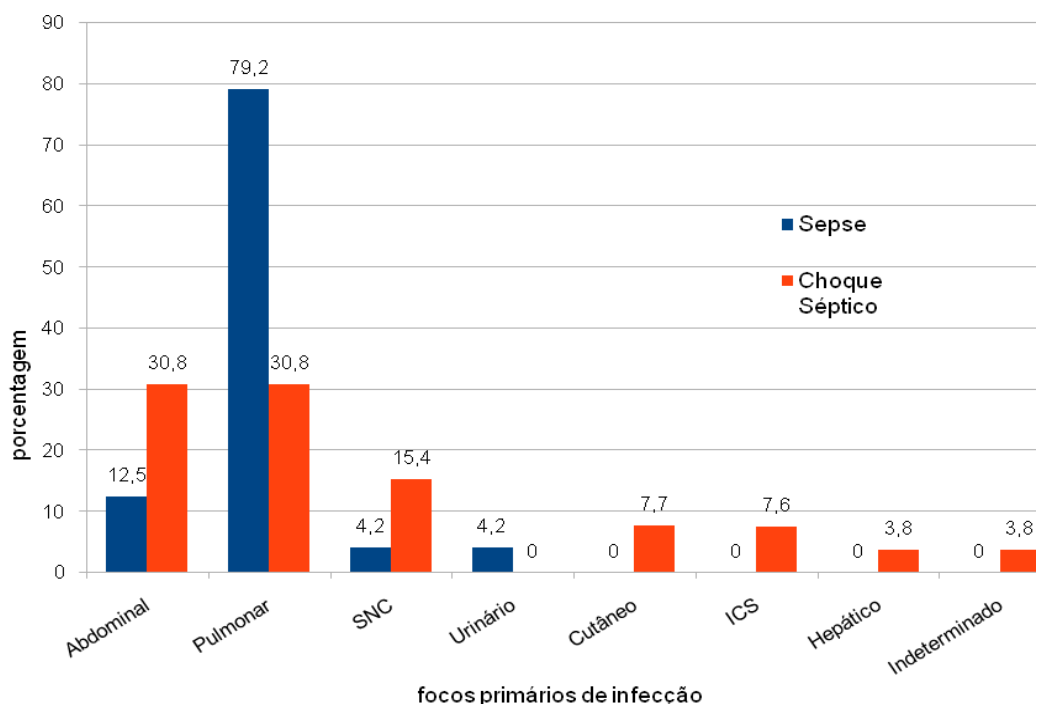


Figura 2 – Comparação dos grupos sepse (em barras azuis) e choque séptico (em barras vermelhas) quanto aos focos de infecção. SNC = Sistema Nervoso Central; ICS = Infecção de corrente sanguínea.

4.3 – Marcadores Bioquímicos

4.3.1 – Fator de Necrose Tumoral Alfa

Comparação entre os momentos de coleta

Os níveis plasmáticos de TNF- α não diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta em ambos os grupos: GS, em T0 [13,3 (1,0 – 586,3)] e em T12h [10,4 (0,5 – 792,3)] - $p = 0,277$ (figura 3, painel A); GCS, em T0 [19,2 (0,3 – 242,7)] e em T12h [18,6 (0,1 – 276,6)] - $p = 0,144$. (figura 3, painel B).

Comparação entre os grupos

Os níveis plasmáticos de TNF- α não diferiram estatisticamente entre os grupos no momento T0 [GS - T0: 13,36 (586,33 – 1,0) vs. GCS - T0: 19,21 (242,66 – 0,32); $p=0,793$ (figura 4, painel A). No momento T12h, igualmente, não houve diferença estatística significativa entre os grupos [GS – T12h: 10,44 (792,3 – 0,6) vs. GCS – T12h: 18,61 (276,6 – 0,08) – $p=0,946$]. (figura 4, painel B)

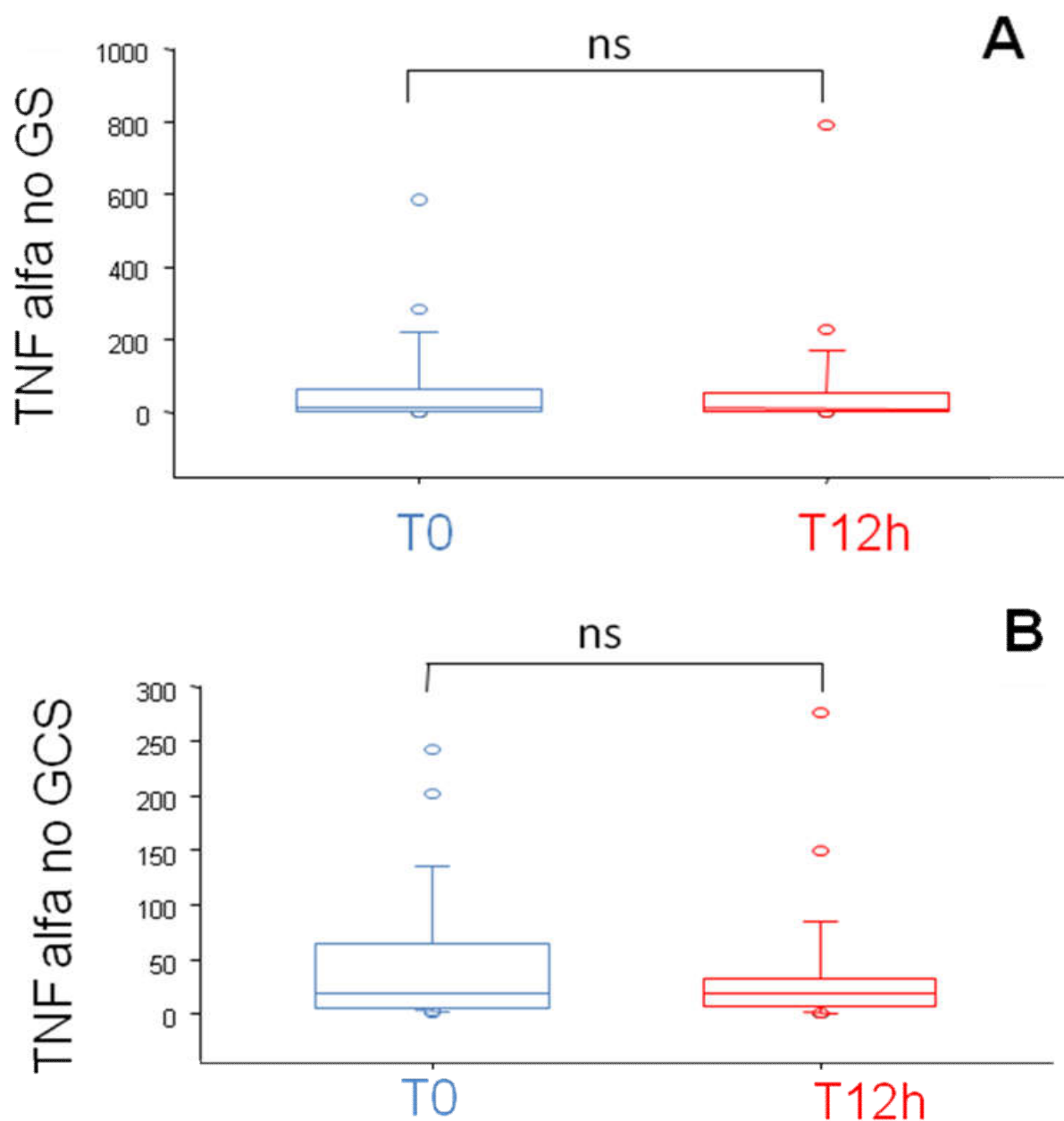


Figura 3 - Representação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF alfa; pg/mL) relativos aos tempos zero (T0) e 12 horas (T 12h) de avaliação para o grupo sepse (GS – Painel A) e grupo choque séptico (GCS – Painel B) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos vazios representam os valores individuais. ns: não significante (Análise de Medidas Repetidas).

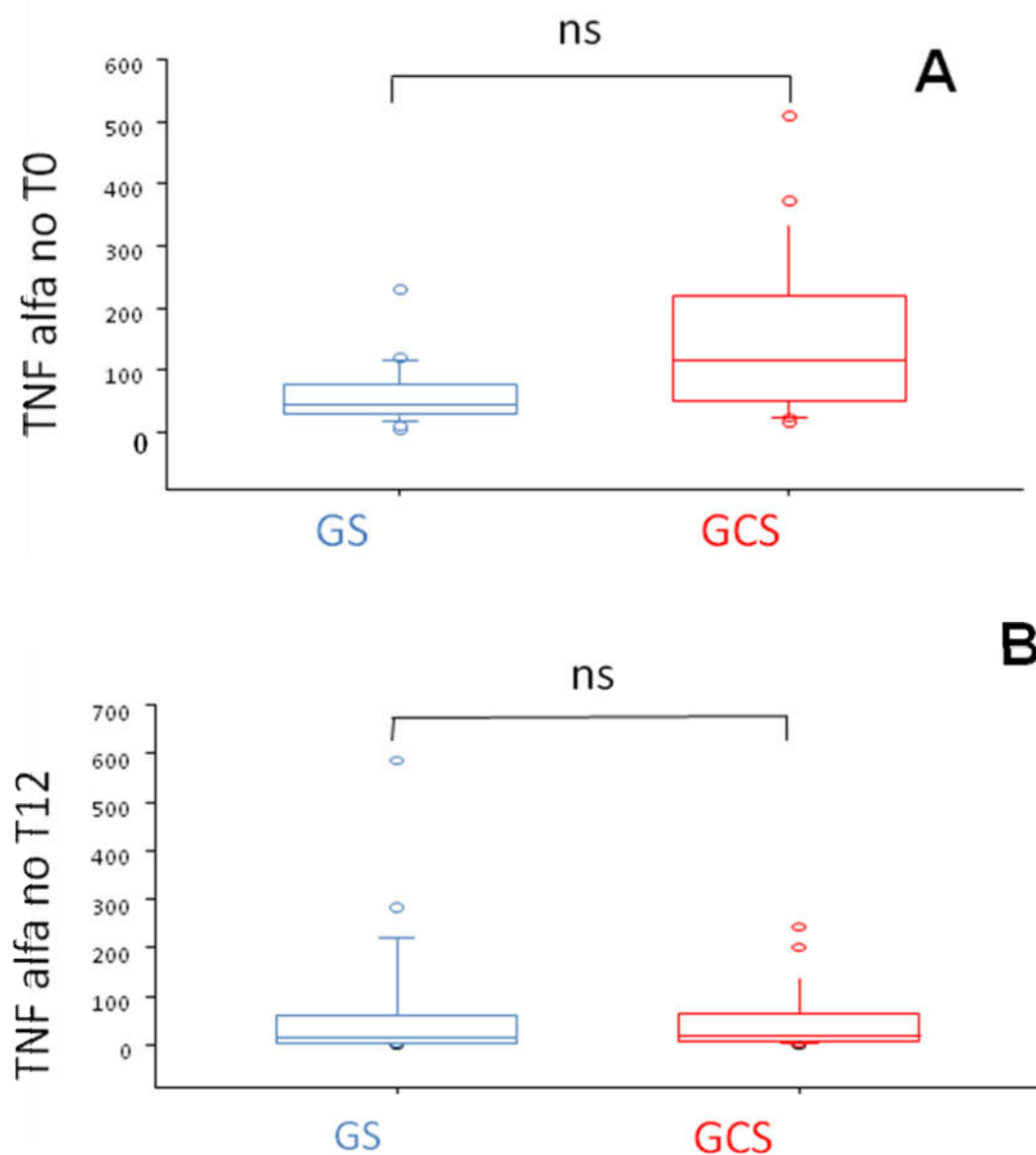


Figura 4 - Representação dos níveis de Fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa; pg/mL) relativos aos grupos sepse (GS) e choque séptico (GCS) de avaliação para o tempos zero (T0 – Painel A) e 12 horas (T 12h – Painel B) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos vazios representam os valores individuais. ns: não significante (Análise de Medidas Repetidas).

4.3.2 – Interleucina 8

Comparação entre os momentos de coleta

Os níveis plasmáticos de IL-8 diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta em ambos os grupos, com diminuição significativa tanto no GCS, quanto no GS. No GS, em T0 [GS: 68,5 (4,8 – 412)] e em T12h [GS: 44,9 (4,6 – 229,7)] - $p = 0,034$ (figura 5, painel A)). No GCS, em T0 [GCS: 268,8 (17,1 – 508,4)] e em T12h [GCS: 116 (17,5 – 508,4)] - $p = 0,001$. (figura 5, painel B).

Comparação entre os grupos

Os níveis plasmáticos de Interleucina-8 foram significativamente mais elevados no GCS [GS - T0: 68,56 (412,04 – 4,9) vs. GCS - T0: 268,80 (508,36 – 17,1); $p=0,008$ (figura 6, painel A) tanto no T0 quanto no [GS – T12h: 45 (229,72 – 4,6) vs. GCS – T12h: 116,6 (508,4 – 17,5); $p=0,005$. (figura 6, painel B).

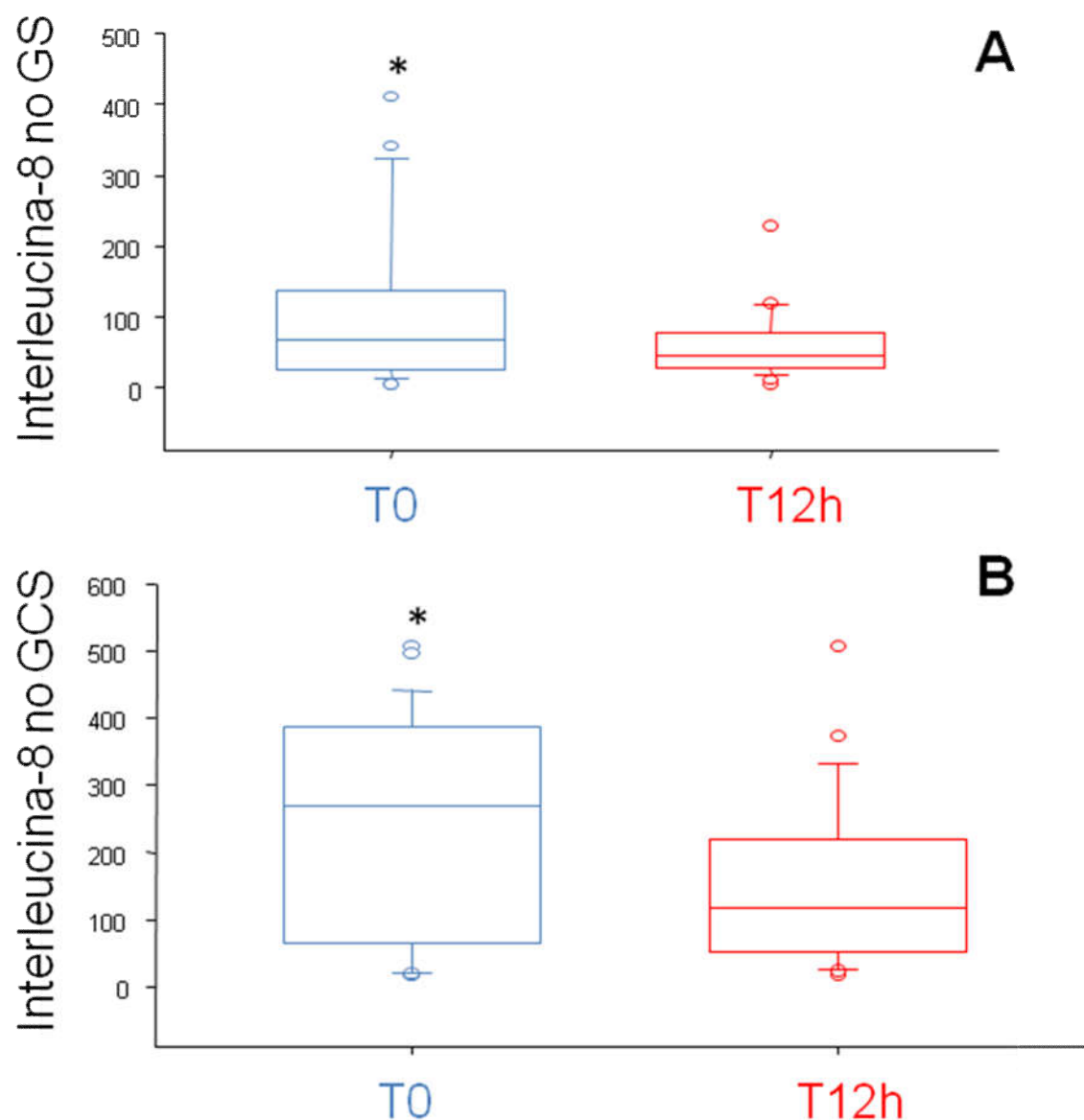


Figura 5 - Representação dos níveis de interleucina-8 (IL-8; pg/mL) relativos aos tempos zero (T0) e 12 horas (T 12h) de avaliação para o grupo sepse (GS – Painel A) e grupo choque séptico (GCS – Painel B) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos vazios representam os valores individuais. *: $p < 0,05$.

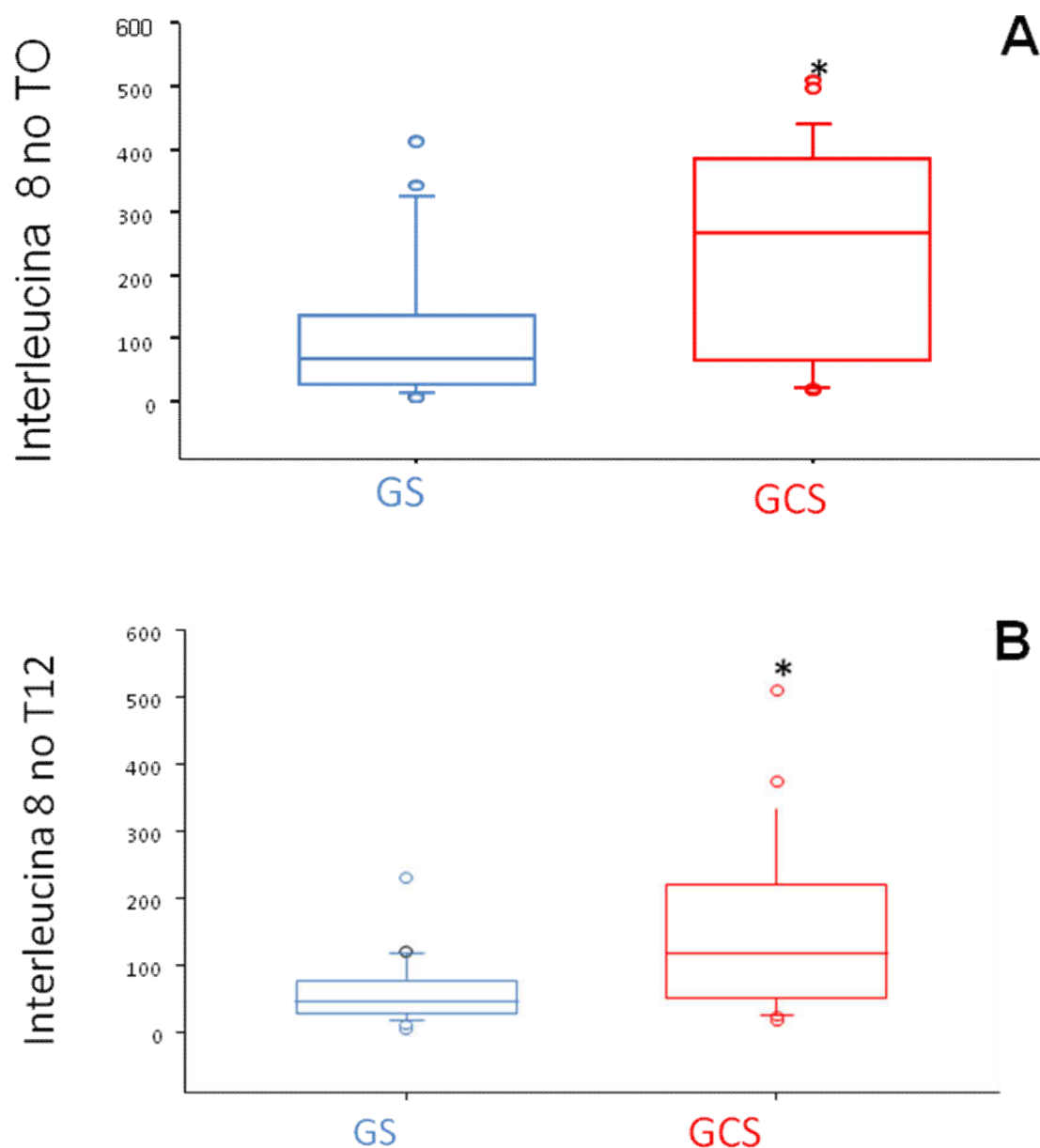


Figura 6 - Representação dos níveis de interleucina-8 (IL-8; pg/mL) relativos aos grupos sepse (GS) e choque séptico (GCS) de avaliação para o tempo zero (T0 – Painel A) e 12 horas (T 12h – Painel B) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos vazios representam os valores individuais. *: $p < 0,05$. (Análise de Medidas Repetidas).

5 - Discussão

A sepse e o choque séptico constituem-se em grandes desafios para a medicina intensiva, estando entre as maiores causas de morbidade e óbito nas modernas unidades de tratamento intensivo (CASADO-FLORES et al., 2003). Recentes estimativas indicam que há mais de 750.000 casos de sepse nos Estados Unidos por ano e cerca de 200.000 desses casos evoluem para óbito (CHANG-LEE et al., 2007 ANGUS & WAX, 2001, RHODES A et al., 2016, DAVIS AL et al., 2017). Há necessidade prioritária de identificação precoce de pacientes com alto risco de evolução para o óbito por meio de pronta análise laboratorial ou de prova clínica consistente de rápida realização. Entretanto, muitos desses pacientes, inicialmente, encontram-se em serviços de emergência e podem ter o diagnóstico de sepse atrasado em função das investigações iniciais habituais (STREHLOW et al., 2006).

O diagnóstico de sepse é difícil, pois os sinais clínicos frequentemente se sobrepõem a outras situações clínicas não infecciosas causadoras de resposta inflamatória sistêmica. Por esta razão, vários estudos têm focado a utilização de protocolos pré-estabelecidos com o objetivo de reduzir a letalidade pela melhora do diagnóstico e do tratamento de crianças (CARCILLO et al., 2002; PARKER et al., 2004) e de adultos (DELLINGER et al., 2004) com quadros sépticos.

Na condução dos doentes sépticos, a identificação/diagnóstico precoce da infecção é o elemento que tem o maior impacto sobre o curso clínico, tratamento e sobrevida dos pacientes. Tanto é assim que, em 2004, DELLINGER et al. publicaram o *Surviving Sepsis Campaign* e, posteriormente, RIVERS et al., em 2005, relataram a importância das

primeiras seis horas de atendimento e das primeiras 24 horas de internação, respectivamente, *golden hour* e *silver day*. Estes protocolos alertaram para o fato de que o diagnóstico deve ser realizado o mais cedo possível.

Como descrito anteriormente, os primeiros sinais clínicos de sepse não são, habitualmente, típicos ou específicos. Consequentemente há a necessidade de se encontrar mediadores confiáveis da resposta inflamatória à infecção.

Nesse contexto, a determinação de biomarcadores em diagnóstico, monitorização e estratificação de crianças sépticas em medicina intensiva pediátrica é muito importante (KAPLAN JM and WONG HR 2011).

Em vista da importância do diagnóstico precoce de sepse, da PCT e da PCR já terem sido incluídas entre os critérios diagnósticos de sepse em adultos e, também, em razão da escassez de estudos em pediatria que tenham avaliado mediadores de infecção grave, objetivamos estudar o comportamento dos níveis plasmáticos de TNF alfa e IL-8 em crianças com sepse/choque séptico.

No presente estudo, a maior frequência dos pulmões como foco primário de infecção seguiu a tendência atual de a insuficiência respiratória aguda ser a principal causa de admissão em nossa unidade (CARPI 2003; FERRARI & FIORETTO 2003). Sendo assim, observamos que o referido foco primário foi o de maior prevalência em ambos os grupos. Merece destaque, também, o foco gastrointestinal, que esteve presente em número relevante no GCS, na mesma proporção que o foco pulmonar.

5.1 - Características dos pacientes

Estimativa acurada da incidência da sepse é obviamente difícil devido aos problemas relacionados com a definição do quadro, heterogeneidade das populações avaliadas e tipos de hospitais (ANGUS & WAX, 2001). No entanto, há descrição de aumento de incidência de sepse em adultos (SHARMA & KUMAR, 2003). No presente estudo, a prevalência de sepse e dos quadros correlatos foi de 18 %.

A idade e o sexo dos nossos pacientes não diferiram de relatos de outros autores (HATHERILL et al., 2000; CASADO-FLORES et al., 2003; ARKADER et al., 2005), refletindo as características da população atendida pela UTI-Pediátrica (FIORETTO et al., 1993; PAIVA et al., 2006). Da mesma forma, a maior frequência dos pulmões como foco primário de infecção seguiu a tendência atual de a insuficiência respiratória aguda ser a principal causa de admissão em nossa unidade (FERRARI & FIORETTO, 2003; FIORETTO et al., 2004). Já o foco gastrointestinal, apresentou-se na mesma proporção do foco pulmonar em pacientes do grupo Choque Séptico, o que pode estar relacionado ao atendimento especializado de pacientes com doença gastrointestinal pelo serviço de Gastreenterologia Pediátrica, referência na região.

5.2 – Interleucina 8

Segundo ZWAHLEN R et.al. (1993), a principal ação da IL-8 é o estímulo migratório das células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando aumento da expressão de moléculas de adesão por células

endoteliais. Particularmente, frente a processos infecciosos, a IL-8 apresenta papel principal no âmbito do direcionamento migratório e ativação de células, tais como neutrófilos (DANIEL et al., 2005). REMICK DG (2005) citou que o papel da IL-8 já é conhecido na resposta do hospedeiro a infecções como pneumonia e sepse. Em vista do papel biológico desta interleucina e a praticidade da realização de sua dosagem, há estudos realizados para demonstrar a utilidade potencial da IL-8 no diagnóstico precoce de infecções bacterianas sistêmicas, particularmente em neonatos (HARRIS MC et. al., 2005). Entretanto, em crianças sépticas, depois do período neonatal, há poucos estudos envolvendo os níveis séricos dessa interleucina.

Em 2004, HORISBERGER T et al. (2004) não observaram diferença significativa entre o grupo de doentes e o grupo controle em trabalho que objetivou avaliar a eficácia diagnóstica de G-CSF (fator estimulador de colônias leucocitárias) e interleucina-8 no diagnóstico de infecção bacteriana de recém-nascidos e crianças criticamente doentes.

BENTLIN MR et al. (2007), em trabalho realizado na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas de Botucatu, demonstraram que a IL-8 na urina dos prematuros em sepse tardia é um método diagnóstico preciso e viável.

WONG HR et al. publicaram três trabalhos nos quais abordaram a IL-8: a) em 2008, foram dosados os níveis séricos de IL-8 de crianças em choque séptico e observou que níveis inferiores a 220 pg/mg obtidos nas primeiras 24h da admissão determinam alta probabilidade de sobrevivência (WONG HR et al. 2008); b) em 2012, foi publicado resumo da literatura que avaliou a associação de genes e estudos de expressão de citocinas envolvidas na sepse e choque séptico de crianças, sendo constatado que a IL-8 foi importante marcador no choque séptico (WONG HR et al. 2012); c) em 2014,

estabeleceram uma plataforma, denominada PERSEVERE, utilizando as concentrações séricas das citocinas CCL3, IL-8, HSPA1B, GZMB, MMP8 dosadas nas primeiras 24h de admissão, que constatou de forma confiável a probabilidade de mortalidade de pacientes pediátricos em choque séptico (WONG HR et al. 2014).

No ano de 2014, BENKOE et al. (2014) avaliaram retrospectivamente os níveis de IL-8 em recém-nascidos (RNs) com diagnóstico de Enterocolite Necrosante (NEC) que foram submetidos a tratamento clínico e cirúrgico e constataram que os RNs tratados cirurgicamente apresentaram níveis médios de IL-8 significativamente superiores aos tratados clinicamente, inferindo-se que tal dosagem é importante na tomada de decisões em relação a realizar ou não cirurgia nesses pacientes.

Já em 2015, MIN ZHOU et al. (2015), em estudo realizado com RNs, demonstraram que a IL- 8 apresenta precisão moderada para diagnosticar sepse neonatal, sendo fundamental a associação de manifestações clínicas e demais exames laboratoriais.

Em nosso estudo, demonstramos que os níveis plasmáticos de IL-8 diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta em ambos os grupos e, ao compararmos os dois grupos em ambos os momentos, também detectamos diferenças significativas. No grupo sepse, os níveis plasmáticos de IL-8 diminuíram significativamente de T0 para T12h. O mesmo comportamento foi observado no grupo choque séptico.

Esse decréscimo nos valores de IL-8 de T0 para T12h pode ser explicado pela cinética dessa citocina pró-inflamatória. Segundo, SCHULTZ C et al, em 2002, em trabalho realizado com recém-nascidos (RNs) a termo e prematuros, o fenômeno denominado imunoparalisia, configura a queda dos

níveis IL-8 em adultos e RNs três horas após estimulação com lipopolissacarídeo.

Acerca da comparação entre os grupos, observamos que em T0 os níveis plasmáticos de IL-8 foram significativamente mais elevados no GCS que no GS, fato que se manteve no momento T12h. Quando comparamos os valores de IL-8 nos grupos sepse e choque séptico podemos observar que os valores no GCS foram significativamente mais elevados do que os valores do GS, o que poderia nos fazer inferir que a IL-8 pode ser utilizada como marcador de maior gravidade, sendo capaz de diferenciar crianças com choque séptico daquelas com sepse. Infelizmente, não há dados na literatura para permitir discussão com nossos resultados em crianças com sepse depois do período neonatal.

5.3 – Fator de Necrose tumoral alfa

Segundo PLUMEETHAN et al. (2012), o TNF- α tem várias funções na imunopatologia humana, desde produzir inflamação, proliferação e diferenciação celular, tumorigênese, replicação viral e até induzir a morte celular por apoptose. Em modelos clínicos de sepse, a administração do TNF- α causa hipotensão, ativação da cascata de coagulação e disfunção orgânica, confirmando a sua função de mediador na fase aguda (PLUMEETHAN et al., 2012). In vivo, observou-se aumento nos níveis de TNF- α após estimulação com endotoxinas em voluntários saudáveis e também em pacientes com choque séptico causado por bacteremia gram-positiva e gram negativa (PLUMEETHAN et al., 2012).

Assim como com a IL-8, há poucos estudos acerca do comportamento do TNF- α em crianças em choque séptico.

HASSET S. et al. (2006) publicaram estudo realizado em recém-nascidos que constatou que o TNF- α , liberado após infecções, pode suprimir as respostas de monócitos a agentes bacterianos.

Em 2009, KUMAR S e RIZVI M (2009), estudaram a associação dos níveis de TNF- α , detectado por imunoensaio enzimático, em pacientes pediátricos sépticos por diversos agentes etiológicos e constataram que em culturas positivas, em geral, e em infecções por gram positivos, em particular, houve aumento significativo nos nível sérico de TNF- α .

Em oposição aos nossos resultados, em 2013, XU XJ et al. (2013) avaliaram um sistema de pontuação que envolvia a dosagem de quatro citocinas, IL-6, IL-10, TNF- α e interferon gama, pelo método de matriz de citometria, em pacientes oncológicos pediátricos em Choque Séptico e constataram bom desempenho para estabelecer gravidade da doença e predição de mortalidade.

Também em 2013, XU XJ et al. (2013), avaliaram a capacidade de citocinas inflamatórias discriminar choque séptico por bactérias Gram positivas e Gram negativas em pacientes oncológicos pediátricos, sendo constatado que IL-6, IL-1 e TNF- α foram significativamente mais elevados no choque séptico causado por bactérias gram negativas, sendo importante para adequação dos antibióticos usados na terapêutica desse perfil de pacientes.

Em nosso estudo, demonstramos que os níveis plasmáticos de TNF- α não diferiram estatisticamente entre os momentos de coleta em ambos os grupos e, também, comparando-se os dois grupos nos dois momentos.

5.4 - Limitações e Implicações do Estudo

Algumas limitações deste estudo merecem consideração. A utilização de critérios clínicos para o diagnóstico pode ter introduzido um viés de classificação dos pacientes. No entanto, como as dosagens não foram disponibilizadas à equipe, visto que foram analisadas bem depois das avaliações clínicas, os médicos assistentes não foram influenciados pelos mesmos, fazendo com que a falta de um padrão-ouro de diagnóstico não compromettesse nossos resultados. Também, a influência de diferentes classes de antibióticos sobre os níveis de TNF- α e de IL-8 não pode ser desprezada, assim como a influência do tipo de disfunção orgânica, bem como o foco primário de infecção, uma vez que no GCS houve concomitância entre os sítios pulmonar e gastrointestinal como sítio primário de infecção.

Outro dado importante a se considerar é a relação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Sabe-se que, muitas vezes, a evolução de quadros infecciosos para quadros graves pode não ser relacionada somente às citocinas pró-inflamatórias, mas também ao desequilíbrio das citocinas anti-inflamatórias. Consequentemente, seria interessante se contrapuséssemos citocinas antiinflamatórias às dosagens da IL-8.

Outra limitação a ser considerada é a questão dos agentes etiológicos envolvidos com os processos infecciosos pois agentes diferentes podem causar estímulos diferentes. Entretanto esta análise não pode ser feita em decorrência de possuímos poucos resultados de cultura com o isolamento do agente em questão.

Portanto, seria muito mais fácil se houvesse um teste laboratorial capaz de detectar a presença de infecção grave. Entretanto, o corpo humano é

extremamente complexo e, embora, a IL-8 possa ser um marcador biológico útil de infecção, não podemos considerá-lo “o” marcador.

Sendo assim, a confiabilidade de um marcador biológico para sepse/choque séptico depende da precisão do diagnóstico clínico, que deve ser perseguida intensamente pelo aprimoramento das definições clínicas, principalmente em pacientes pediátricos.

6. Conclusões

1- Os níveis plasmáticos de IL-8 permitem diferenciar sepse de choque séptico, sendo maiores os níveis plasmáticos nos pacientes com choque séptico, correlacionando-se diretamente com a gravidade da doença. Em ambas as patologias, houve decréscimo nos valores de IL-8 depois de 12 horas da primeira análise.

2- Os níveis plasmáticos de TNF alfa não permitem a diferenciação de sepse e choque séptico à admissão e não se correlacionam com a gravidade dos pacientes.

7. Referências Bibliográficas

- Ayres SM. SCCM's New Horizons Conference on Sepsis and Septic Shock. Crit Care Med 1985; 13:864-866.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med. 1992 Jun;20(6):864-74.
- Angus DC & Wax RS. Epidemiology of sepsis: An update. Crit Care Med 2001; 29: S109-S116.
- Arkader R, Troster EJ, Lopes MR, et al. Procalcitonin does discriminate between sepsis and systemic inflammatory response syndrome. Arch Dis Child 2006; 91: 117-120.
- Baggiolini M1, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. Adv Immunol. 1994; 55:97-179.
- Balk, RA & Bone RC. The septic syndrome: definition and clinical implications. Crit Care Clinics 1989; 5:1.
- Benkoe T et. al. Interleukin-8 predicts 60-day mortality in premature infants with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2014 Mar;49(3):385-9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.05.068.
- Bentlin MR et. al. Is urine interleukin-8 level a reliable laboratory test for diagnosing late onset sepsis in premature infants?J Trop Pediatr. 2007 Dec;53(6):403-8. Epub 2007 Jun 27.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001 Mar;69(3):89-95.

- Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, et al. Sepsis syndrome: A valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989; 17:389-393.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: the AACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *Chest* 1992; 101: 1644.
- Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1989 May;17(5):389-93.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-55.
- Calfee CS et. al. Plasma interleukin-8 is not an effective risk stratification tool for adults with vasopressor-dependent septic shock. *Crit Care Med*. 2010 Jun; 38(6):1436-41.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666.
- Carcillo JA, Fields AI, and Task Force Committee Members. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Crit Care Med* 2002; 30:1365-1378.
- Davis AL, Carcillo JA, Aneja RK. American College of Critical Care Medicine Clinical Practice Parameters for Hemodynamic Support of Pediatric and Neonatal Septic Shock. *Crit Care Med* 2017; 45:1061–1093.
- Carpi MF. Efeito imediato e prolongado da administração precoce de óxido nítrico inalatório em crianças portadoras de síndrome do desconforto

- respiratório agudo. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, 2003.
- Casado-Flores J, Blacon-Quirós A, Asensio J, et al. Serum procalcitonin in children with suspected sepsis: A comparison with C-reactive protein and neutrophil count. *Pediatr Crit Care Med* 2003; 4:190-195.
- Chang-Lee C, Ying Chen S, Lin Tsai C, et al. Prognostic value of mortality in emergency department sepsis score, procalcitonin, and C-reactive protein in patients with sepsis at the emergency department. *Shock* 2007; 0:1-7.
- Chen DH et. al. The level and clinical significance of Toll-like receptor 4 in children with severe sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2011 Aug; 23(8):475-7.
- Chizzonite R, Gubler U, Magram J, et al. Interleukin-12. *Cytokine* 1998; 183:203.
- Daniel et al. Strong inflammatory cytokine response in male and strong anti-inflammatory response in female kidney transplant recipients with urinary tract infection. *Transpl Int*. 2005 Feb; 18(2):177-85.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Campanha de sobrevivência à sepse. Diretrizes internacionais para tratamento de sepse grave e choque séptico. 2012; 580-637.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Campanha de sobrevivência à sepse. Diretrizes internacionais para tratamento de sepse grave e choque séptico. 2012; 580-637.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118:503-508.
- Emmanouilidis K, Weighardt H, Matevossian E, et al. Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high

serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome. *Shock* 2002; 18: 301 -305.

Emmanouilidis K, Weighardt H, Matevossian E, et al. Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome. *Shock* 2002; 18: 301 -305.

Ferrari GF & Fioretto JR. Insuficiência respiratória aguda. In: Manual de terapia intensiva pediátrica. Fioretto JR ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2003:233-248.

Fioretto JR. Choque Séptico. In: Manual de Terapia Intensiva Pediátrica. Fioretto JR ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003: 115-140.

Fioretto, JR. Marcadores inflamatórios na criança grave. Editora Artmed. PROTIPED 2009; 1(3) 107.

Fioretto, JR. Marcadores inflamatórios na criança grave. Editora Artmed. PROTIPED 2009; 1(3) 108.

Fioretto, JR. Marcadores inflamatórios na criança grave. Editora Artmed. PROTIPED 2009; 1(3) 109.

Fioretto JR. Choque Séptico. In: Manual de Terapia Intensiva Pediátrica. Fioretto JR ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003: 115-140.

Fioretto JR, Martin JG, Kurokawa CS, et al. Interleukin-6 and procalcitonin in children with sepsis and septic shock. *Cytokine* 43, 2008:160-164.

Fioretto JR, Borin FC, Bonatto RC, et al. Procalcitonin in children with sepsis and septic shock. *J Pediatr*.2007;83(4):323-328.

Geller M. Scheinberg M. Diagnóstico e Tratamento das Doenças Imunológicas. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015; (3) 12.

- Gogos CA, Drosou E, Skoutelis A, et al. Pro versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 181:176-180.
- Goldmann O, Chhatwai GS and Medina E. Contribution of Natural Killer cells to the pathogenesis of septic shock induced by *Streptococcus pyogenes* in mice. *J Infect Dis* 2005; 191:1280-1285.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005 Jan;6(1):2-8.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:2-8.
- Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA* 1995; 274:172-177.
- Hayden WR. Sepsis terminology in pediatrics. *J Pediatr* 1994; 124: 657-658
- Harris MC et al. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr*. 2005 Oct;147(4):462-8.
- Hartvig T, Kurt MD, Peter MSc, et al. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med* 2006; 34: 2596–2602.
- Hassett S, Moynagh P, Reen D. TNF-alpha is a mediator of the anti-inflammatory response in a human neonatal model of the non-septic shock syndrome. *Pediatr Surg Int*. 2006 Jan;22(1):24-30.

- Hatherill M, Tibby SM, Sykes K, et al. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C-reactive protein and leukocyte count. *Arch Dis Child* 1999; 81: 417-421.
- Horisberger T et. al. G-CSF and IL-8 for early diagnosis of sepsis in neonates and critically ill children - safety and cost effectiveness of a new laboratory prediction model: study protocol of a randomized controlled trial. *Crit Care*. 2004 Dec;8(6):R443-50. Epub 2004 Oct 19.
- Kaplan JM, Wong HR. Biomarker discovery and development in pediatric critical care medicine. *Pediatr Crit Care Med*. 2011 Mar; 12(2):165-73.
- Kumar S and Rizvi M. Prognostic serum tumor necrosis factor- α in paediatric patients with sepsis. *J Infect Dev Ctries*. 2009 Jul 1;3(6):437-41.
- Lanks D. Garcia PCR. Piva JP. Marcadores inflamatórios em sepse e choque séptico. Editora Artmed. PROTIPED 2011; 3(2) 71.
- Lanks D. Garcia PCR. Piva JP. Marcadores inflamatórios em sepse e choque séptico. Editora Artmed. PROTIPED 2011; 3(2) 74.
- Lanks D. Garcia PCR. Piva JP. Marcadores inflamatórios em sepse e choque séptico. Editora Artmed. PROTIPED 2011; 3(2) 75.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1250-6).
- Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:379-90.
- Livinston DH, Mosenthal AC, and Deitch EA. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horiz* 1995; 3:257-266.

- Mariscalco MM. Is plasma procalcitonin ready for prime time in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2003; 4:118-119.
- Martin JG, Kurokawa CS, Carpi MF, Bonatto RC, et al. Interleucina-12 em crianças com sepse e choque séptico. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2012; 24(2):130-136.
- Mark PE. Definition of sepsis: Not quite time to dump SIRS. *Crit Care Med* 2002; 30:706-708.
- Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care*. 2005 Oct;11(5):473-80.
- Meisner M. Biochemistry. In: Meisner M ed. Procalcitonin (PCT): A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2000: 15-45.
- Min Zhou, Shupeng Cheng, Jialin Yu, and Qi Lu. Interleukin-8 for Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127170.
- Mizuno K, Takahashi HK, Twagaki H, et al *Immunology Letters* 2005; 101: 168–172.
- Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Amj Respir crit care Med*. 2001;163:316-21.
- Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Amj Respir crit care Med*. 2001;163:316-21.
- Paiva BSR, Fioretto JR, Paiva CE, et al. Cateterização venosa central em crianças internadas em unidade de terapia intensiva pediátrica. *Rev Paul Pediatr* 2006; 24:35-41.

- Parker MM, Hazelzet JA, and Carcillo JA. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Pediatric considerations. Crit Care Med 2004; 32 (Suppl): S591-S594
- Pelinka LE, Sendova K, Mauritz W, et al. Quantitative versus semiquantitative procalcitonin measurement. Eur J Trauma 2003; 2:81-84
- Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care, 14 (1) (2010), p. R15.
- Phumeetham S. et. al. Genetic association study of tumor necrosis factor-alpha with sepsis and septic shock in Thai pediatric patients. J Pediatr 2012; 88(5):417-22.
- Presterl E, Staudinger T, Pettermann M, et al. Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with sepsis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 825-832.
- Remick DG. Interleukin-8. Crit Care Med. 2005 Dec;33(12 Suppl):S466
- Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, et al. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taken an advantage of a window of opportunity. CMAJ 2005; 9: 1054-1065.
- Rhodes A et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* DOI 10.1007/s00134-017-4683-6.
- Sauer M, Tiede K, Fuchs D, et al. Procalcitonin, C-reactive protein, and endotoxin after bone marrow transplantation: identification of children at high risk of morbidity and mortality from sepsis. Bone Marrow Transp 2003 (31):1137-1142.
- Schultz C et al. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infant. Pediatric Res. 2002 Mar;51(3):317-22.

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 February 23; 315(8): 801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
- Sharma S & Kumar A. Septic shock, multiple organ failure, and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:199-209.
- Strehlow MC, Emond SD, Shapiro NI, et al. National study of emergency department visits for sepsis, 1992-2001. *Ann Emerg Med* 2006; 48:326-331.
- Tetta C, Bellomo R and Ronco C. Artificial organ treatment for multiple organ failure, acute renal failure, and sepsis: Recent new trends. *Artif Organs* 2003; 27: 202-213.
- Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you... *Crit Care Med*. 1997 Feb;25(2):372-4.
- Vincent JL. Procalcitonin: THE marker of sepsis? *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4):1226-8.
- Wong HR. Genetics and genomics in pediatric septic shock. *Crit Care Med*. 2012 May; 40(5):1618-26
- Wong HR et. al. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug 1;178(3):276-82.
- Wong HR. Testing the prognostic accuracy of the updated pediatric sepsis biomarker risk model. *PLoS One*. 2014 Jan 29;9(1):e86242.
- Xu XJ et. al. A multiplex cytokine score for the prediction of disease severity in pediatric hematology/oncology patients with septic shock. *Cytokine*. 2013 Nov; 64(2):590-6

- Xu XJ et. al. Inflammatory cytokine measurement quickly discriminates gram-negative from gram-positive bacteremia in pediatric hematology/oncology patients with septic shock. .Intensive Care Med. 2013 Feb; 39(2):319-26
- Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. Int Rev Exp Pathol. 1993; 34:27-42.