

Jamil Pedro de Siqueira Caldas

**Marcadores de estresse oxidativo e de
inflamação no sangue de cordão umbilical de
recém-nascidos pré-termo de muito baixo
peso e hemorragia peri e intraventricular**

CAMPINAS

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE INFLAMAÇÃO
NO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS
PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO E HEMORRAGIA PERI E
INTRAVENTRICULAR**

Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Pediatria.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C126m Caldas, Jamil Pedro de Siqueira, 1965 -
Marcadores de estresse oxidativo e de
inflamação no sangue de cordão umbilical de
recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso e
hemorragia peri e intraventricular. / Jamil Pedro de
Siqueira Caldas. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Sérgio Tadeu Martins Marba
Coorientador : Maria Marluce dos Santos Vilela
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estresse oxidativo. 2. Interleucina-6. 3.
Glutathione. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5.
Recém-nascido I. Marba, Sergio Tadeu Martins.
II. Vilela, Maria Marluce dos santos. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Oxidative stress and inflammatory markers in umbilical blood cord
and peri and intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants

Palavra-chave em inglês:

Oxidative stress

Interleukin-6

Glutathione

Reactive oxygen species

Newborn

Área de concentração: Pediatria

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Sergio Tadeu Martins Marba [Orientador]

Maria Marluce dos Santos Vilela

Francisco Paulo Martins Rodrigues

Ruth Guinsburg

Mônica Aparecida Pessoto

Izilda Rodrigues Machado Rosa

Data da defesa: 15-12-2011

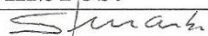
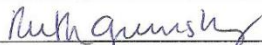
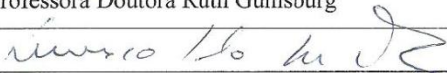
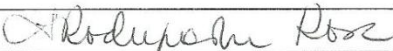
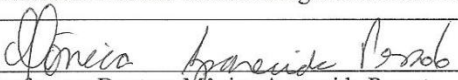
Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Aluno: Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sérgio Tadeu Martins Marba

Co-orientador (a): Maria Marluce dos Santos Vilela

Membros:

Professor Doutor Sérgio Tadeu Martins Marba

Professora Doutora Ruth Guinsburg

Professor Doutor Francisco Paulo Martins Rodrigues

Professora Doutora Izilda Rodrigues Machado Rosa

Professora Doutora Mônica Aparecida Pessoto

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/12/2011

DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS E IRMÃOS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA, pelo apoio constante e sempre valioso em todos os momentos do trabalho.

À professora Dra. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA, pelo apoio laboratorial.

Ao colega e amigo LUÍS EDUARDO DE FIGUEIREDO VINAGRE, pela colaboração na realização das ecografias e discussão das imagens.

Às biólogas, CAROLINA AYUMI BRAGHINI E TAÍS NITSCH MAZZOLA, sem as quais este trabalho não teria sido levado adiante.

Aos médicos e amigos da Divisão de Neonatologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM-UNICAMP, pelo apoio incessante na realização do estudo: ADRIANA SAYURI IHA, ANDRÉA ELIANA LOVATO CASSONE, ANA CRISTINA PINTO, FERNANDA DE CASTRO MILLEN, GISELE MARAFON LOPES DE LIMA, JUSSARA DE LIMA E SOUZA, KATHYUSCIA DANTAS ARAUJO, LÚCIA HELENA LEITE BUENO, MARIA OTÍLIA NUNES BIANCHI, MÔNICA APARECIDA PESSOTO, PATRÍCIA PALERMO BRENELLI, PRISCILA COIMBRA GONÇALVES ROMA, ROSELI CALIL, SÍLVIA MARIA MONTEIRO COSTA, STEFÂNIA LUCIZANI PACÍFICO, TARITA DE LOSSO DA SILVEIRA BUENO.

Aos docentes da Divisão de Neonatologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM-UNICAMP – ABIMAEI ARANHA NETTO, FRANCISCO MEZZACAPPA FILHO, IZILDA RODRIGUES MACHADO ROSA, MARIA APARECIDA MARQUES DOS SANTOS MEZZACAPPA.

A Sra. SIRLEI SIANI MORAES, pelas avaliações estatísticas.

Ao DEPARTAMENTO DE TOCGINECOLOGIA do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, CAISM-UNICAMP, pela coleta das amostras de sangue umbilical.

**Este projeto foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP**

	<i>Pág.</i>
LISTA DE ANEXOS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo Geral.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. SUJEITOS E MÉTODOS	45
3.1. Desenho do estudo.....	47
3.2. Tamanho da amostra.....	47
3.3. Seleção dos sujeitos.....	47
3.4. Variáveis e conceitos.....	481
3.5. Coleta de dados.....	54
3.6. Exames e testes.....	54
3.7. Instrumentos para coleta de dados.....	56
3.8. Acompanhamento dos sujeitos.....	56
3.9. Processamento e análise dos dados.....	56
3.10. Aspectos éticos.....	57
3.11. Local e dinâmica do desenvolvimento do estudo.....	57
3.12. Financiamento do estudo.....	58
4. RESULTADOS.....	59
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. ANEXOS.....	103

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1	Dosagem de interleucina-6..... 83
Anexo 2	Dosagem de glutatona reduzida..... 84
Anexo 3	Dosagem de intermediários reativos do oxigênio..... 86
Anexo 4	Ficha de coleta de dados..... 88
Anexo 5	Termo de consentimento livre e esclarecido..... 91
Anexo 6	Artigo em publicação relacionado ao estudo..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CAN	corticosteróide antenatal
CRIB	<i>Clinical Risk Index for Babies</i>
dl	Decilitro
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>EnzymeLinked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>et al</i>	e outros (as)
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
GR	glutathiona reduzida
HPIV	hemorragia peri e intraventricular
IC	intervalo de confiança
IL-1β	interleucina-1 beta
Il-6	interleucina-6
Il-8	interleucina-8
mEq/l	miliequivalente por litro
MG	Miligramma
ml	Mililitros
N	número de casos
nMol/l	nanomol por litro
O₂	oxigênio molecular
OR	<i>odds ratio</i> – razão de chance
p	p valor
PIG	pequeno para idade gestacional
PCR	proteína C-reativa
pg	Picogramma
RL	radical livre
RN	recém-nascido
RNPT	recém-nascido pré-termo

RL	radical livre
ROI	<i>reactive intermediaries of oxygen</i> - intermediários reativos do oxigênio
ROIB	<i>reactive intermediaries of oxygen</i> - intermediários reativos do oxigênio – dosagem basal
ROIS	<i>reactive intermediaries of oxygen</i> - intermediários reativos do oxigênio – dosagem estimulada
RR	risco relativo
SNAPPE	<i>Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension</i>
TAS	<i>total antioxidant status</i> – capacidade antioxidante total
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTI	unidade de terapia intensiva
°C	grau Celsius
%	Porcentagem
-	Menos
=	igual a
>	maior que
<	menor que
≥	maior ou igual a
≤	menor ou igual a
®	marca registrada

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Distribuição dos recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso com HPIV segundo a hora de vida no momento do diagnóstico.....	43
Tabela 2 Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a ocorrência de HPIV.....	44
Tabela 3 Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a idade gestacional.....	45
Tabela 4 Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a gravidade da HPIV.....	46
Tabela 5 Distribuição das variáveis maternas de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer segundo a ocorrência de HPIV.....	47
Tabela 6 Distribuição de HPIV em RN pré-termo de muito baixo peso ao nascer, segundo o uso materno antenatal de corticosteróide.....	49
Tabela 7 Distribuição de formas graves de HPIV em RN pré-termo de muito baixo peso ao nascer, segundo o uso materno antenatal de corticosteróide.....	50
Tabela 8 Distribuição das variáveis de parto segundo a ocorrência de HPIV em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.....	51
Tabela 9 Distribuição das variáveis neonatais segundo a ocorrência de HPIV em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.....	52
Tabela 10 Análise de regressão múltipla – modelo final.....	54
Tabela 11 Análise de regressão múltipla – 2º modelo.....	55
Tabela 12 Modelo de regressão múltipla ajustada.....	56



RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a associação entre marcadores de estresse oxidativo e de inflamação ao nascimento e o desenvolvimento de hemorragia peri e intraventricular (HPIV) em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer (RNPTMBP). Estudo de coorte envolvendo todos os RNPTMBP nascidos no CAISM-UNICAMP entre maio de 2009 a outubro de 2010. Excluíram-se aqueles dos quais não se obteve a amostra de sangue, os com malformação grave do sistema nervoso central e os que morreram antes de seis horas de vida. A coleta de sangue de cordão umbilical foi realizada diretamente da placenta ainda implantada, tendo sido dosados a produção basal e estimulada de intermediários reativos de oxigênio (ROI) por leucócitos polimorfonucleares e o níveis séricos de glutathiona reduzida (GR) e interleucina-6 (IL-6). A HPIV foi diagnosticada por ecografia transfontanelar seriada – 6, 12, 24 e 72 horas de vida e com 7 e 28 dias de vida; classificada segundo Papile *et al.* (1978). Dados maternos, do parto e do RN foram considerados como variáveis independentes de controle. A distribuição dos acometidos por HPIV foi dada por frequência. Os valores de ROI, GR e IL-6 foram expressos como mediana e percentis 25 e 75. As variáveis categóricas foram avaliadas por teste de qui-quadrado ou Fisher, e teste de Mann-Whitney para comparação das medianas de ROI, GR e de IL-6 entre os RNs com e sem HPIV. Análise múltipla por regressão logística foi realizada utilizando as variáveis que apresentaram nível de significância $\geq 0,2$ na análise univariada. Para as variáveis contínuas, procedeu-se à categorização de peso ao nascimento $\geq 1.000\text{g}$ e $< 1.000\text{g}$ e idade gestacional < 30 semanas e ≥ 30 semanas, e para os valores de CRIB e SNAPPE II e de ROI, GR e IL-6, o limite de corte foi obtido por meio da curva ROC. Nível de significância aceito foi de 0,05. Nasceram 138 RNMBP no período e, ao excluir-se 13 crianças, obtiveram-se dados de 125 RNs. A HPIV ocorreu em 15 RNs (12,0%), sendo 8 com graus I ou II e 7 com graus III ou IV. 46,6% dos casos foram diagnosticados até 24 horas de vida. Na análise univariada, mostraram-se estatisticamente significativos: ciclo completo de betametasona, duas ou mais doses de betametasona, trabalho de parto, idade gestacional, peso ao nascer, CRIB e SNAPPE II elevados, pneumotórax, hipernatremia. As medianas de ROI basal foram mais elevadas no grupo com HPIV ($p=0,045$) e não houve diferenças estatisticamente significativas para as medianas de ROI estimulado, GR ou IL-6. Na análise multivariada, o ROI basal não se constituiu um

fator de risco independente para desenvolvimento de HPIV, permanecendo o CRIB (OR 6,21 IC 95% 1,78-21,74) ou SNAPPE II (OR 3,68 IC 95% 1,05-12,82) como fatores de risco e o uso de duas ou mais doses de betametasona como fator protetor (OR 0,23 IC 95% 0,01-0,93). Em conclusão, o ROI basal esteve associado à HPIV, mas não de forma independente, e o ROI estimulado, a GR e a IL-6 não foram preditivos independentes do desenvolvimento de HPIV em RNPTMBP.



ABSTRACT

This study evaluated the relationship between four laboratorial tests of oxidative stress and inflammatory markers and the development of intraventricular and periventricular hemorrhage (IVH) in very low birth weight infants (VLBW) - less than < 1.500 g at birth. Cohort study accomplished in a neonatal intensive care at CAISM-UNICAMP, from May 2009 to October 2010. Infant with severe brain malformations, death before 6 hours of life and those whose umbilical blood samples weren't obtained were excluded. Basal and under stimulation production of reactive intermediaries of oxygen (BROI and SROI), reduced glutathione (RG) and interleukin-6 (IL-6) were evaluated from umbilical blood. IVH was diagnosed by serial transfontanellar brain ultrasonography and classified according to Papile *et al* (1978). It was made at 6,12, 24, 72 hours of life and 7 and 28 days of life. Maternal factors, labor and delivery characteristics, and neonatal parameters were considered control independent variables and they were expressed in frequency. BROI, SROI, RG and Il-6 levels were expressed in medians and 25 and 75 percentiles. Chi-square or Fisher tests were used to determine the association of categorical variables and IVH. Mann-Whitney test were used to compare IVH and non-IVH groups and laboratorial markers medians. Univariate analysis was performed to identify differences between the IVH and non-IVH groups. Those variables in which the univariate analysis was demonstrated as $p \geq 0.2$ were entered into a stepwise logistic regression model. Continuous variables were categorized: birth weight $\geq 1000g$ and $< 1000g$, gestational age < 30 weeks and ≥ 30 weeks. For CRIB, SNAPPE II, BROI, SROI, RG and IL-6 values cut-off values determined by ROC curve were used. Significance level accepted was $p < 0,05$. 138 eligible newborns were assessed and 125 VLBW were evaluated. IVH incidence was 12.0% (15 /125), and severe forms - grades III and/or IV- were present at 46%. About one half of lesions were observed at the first 24 hours of life. At univariate analysis it was shown statistical significance to presence of antenatal complete course, use of two or more doses of betamethasone, presence of labor, lower gestational age, smaller birth weight, elevated values of CRIB and SNAPPE II and occurrence of pneumothorax and hypernatremia. BROI medians were higher in IVH group than in control ($p=0,045$) but there weren't statistical differences to SROI, RG and IL-6 medians. In multivariate analysis, BROI were not associated significantly associated to IVH, and CRIB values OR 6.21 (IC95% 1.73-22.22) and SNAPPE II values OR 3.68 (IC95% 1.05-12.82) were considered as risk factors,

and two doses of antenatal steroids OR 0.23 (IC 95% 0.01 – 0.93), as a protective factor. In conclusion, SROI, IL-6 and RG were not predictive to IVH occurrence in very low birth weight newborns. BROI values were associated to IVH but it was not an independent predictive factor.



1- INTRODUÇÃO

A HEMORRAGIA PERI E INTRAVENTRICULAR E SUA IMPORTÂNCIA

A hemorragia peri e intraventricular (HPIV) permanece como uma doença de alta incidência em recém-nascidos pré-termo, especialmente naqueles com peso de nascimento menor que 1.500 g e com idade gestacional menor que 34 semanas. Dependendo do grau, a doença está relacionada com o desenvolvimento de hidrocefalia pós-hemorragica, a anormalidades graves do neurodesenvolvimento, a necessidade de terapias de reabilitação especializadas e elevado custo social (1-4).

Fanaroff *et al.* (5) apresentaram os resultados de um levantamento nacional nos Estados Unidos (*National Institute of Child Health & Human Development Neonatal Research Network*), o qual englobou 18.153 recém-nascidos de muito baixo peso, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002, em 16 instituições norte-americanas. Constatou-se que a HPIV foi incidente em 27% das crianças, assim distribuídas: 11% para o grau I, 4% para o grau II, 7% para o grau III e 5% para o grau IV.

Stoll *et al.* (6), no período de 2001 a 2007, ao avaliarem a evolução durante a internação de 9.575 RNs pré-termo extremos com idade gestacional variando entre 22 e 28 semanas e peso ao nascer entre 401-1.500g, encontraram uma taxa de HPIV de 32%, dos quais 19% do total nas formas graves, apresentando a doença uma relação inversa à idade gestacional.

No CAISM-UNICAMP, no período de 1991 a 2005, foram avaliados em um estudo 1.381 recém-nascidos pré-termo de peso menor que 1.500 g ao nascer. O trabalho demonstrou uma incidência de 20,9% de HPIV (7).

Embora haja uma tendência à diminuição da incidência da HPIV, a doença permanece como um problema neonatal significativo uma vez que tem se observado um aumento na taxa de sobrevivência de recém-nascidos extremamente prematuros, os mais atingidos pela doença (3).

O local de origem mais comum do sangramento cerebral no recém-nascido pré-termo é a matriz germinativa, localizada na cabeça do núcleo caudado, na região subependimária periventricular. A matriz germinativa é um importante sítio de proliferação

dos precursores neuronais, os quais, entre a 10^a e a 20^a semana de idade gestacional, começam a migrar em direção ao local permanente do córtex. No terceiro trimestre, esse local também produz os precursores de oligodendrócitos e de astrócitos (4).

A matriz é irrigada por um rico leito vascular, necessário para responder à alta demanda metabólica das células em franca proliferação no local. Ela atinge sua proliferação máxima por volta de 34 semanas de gestação e involui à medida que o feto se aproxima da maturidade. A densidade e a porcentagem da área vascular dessa região são significativamente maiores do que nas substâncias cinzenta e branca em todas as idades gestacionais (8).

Apesar da riqueza vascular, a irrigação da matriz germinativa é composta por vasos estruturalmente bastante imaturos, constituídos por capilares, ou estruturas semelhantes a capilares, e veias subependimárias com características únicas. Estudos demonstraram que a HPIV é primariamente de origem venosa. Trabalhos realizados em recém-nascidos humanos entre 23 e 40 semanas de gestação mostram que as veias subependimárias são extremamente finas e constituídas basicamente de endotélio. Além disso, os componentes da lâmina basal são imaturos, há uma ausência de pericitos e o espessamento só ocorre de modo importante após 36 semanas de gestação (4;9-11).

Várias alterações na matriz, especialmente aquelas ligadas ao fluxo sanguíneo cerebral, podem determinar o sangramento nesse local. Estudos feitos em animais demonstraram que a HPIV pode ser provocada por indução de fenômenos de hipoperfusão e reperfusão tecidual (12-14). O controle do fluxo sanguíneo cerebral envolve complexos mecanismos metabólicos, químicos e neuronais. Nos recém-nascidos pré-termo, em geral, a autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral encontra-se alterada, ou seja, eles não têm a habilidade de manter um fluxo relativamente constante quando há variação de pressão de perfusão. Isso leva à isquemia na matriz germinativa, podendo ocorrer uma rotura vascular no momento da reperfusão (3-4;15).

A maioria das HPIVs ocorre nos primeiros três dias de vida, especialmente nas primeiras 24 horas, com maiores chances de progressão para formas mais graves do que quando acontecem mais tardiamente. A HPIV costuma ser rara após o 4^o e o 5^o dia de vida,

independentemente da idade gestacional, e estudos em animais demonstraram que, apesar de não haver alteração na densidade vascular da matriz nos primeiros quatro dias de vida, ocorre um aumento das proteínas da matriz extracelular nesse período, às quais promovem uma maior integridade estrutural dos vasos, proporcionando uma menor susceptibilidade à rotura (4;16-17).

Alterações hemodinâmicas ao nascimento e nas primeiras horas de vida têm sido implicadas no desenvolvimento da HPIV por interferir direta ou indiretamente no fluxo sanguíneo cerebral. Entre tais situações, apontadas como fatores de risco para a doença, podem ser citados: parto vaginal, índice baixo de Apgar, necessidade de reanimação em sala de parto, baixo fluxo sistêmico nas primeiras 24 horas de vida, desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório, aspiração de cânula traqueal, descompensação do canal arterial, ocorrência de pneumotórax, entre outros. Por outro lado, o uso antenatal de corticosteroide exerce efeito protetor (18-21).

HPIV E INFLAMAÇÃO

Nas últimas décadas, surgiram evidências da associação da HPIV com processos inflamatório-infecciosos intrauterinos. Damman e Leviton (22) demonstraram que, entre os recém-nascidos pré-termo cuja placenta apresentou qualquer grau de inflamação, houve um maior risco de eles apresentarem HPIV (26,5 x 12% - OR de 2,6 - IC 95% de 1,9-3,5). Outros estudos encontraram resultados semelhantes em relação à associação entre corioamnionite histológica e HPIV (23-24).

O mecanismo pelo qual a corioamnionite leva à lesão do sistema nervoso central está relacionado às citocinas; no entanto, o modo como elas provocam a lesão hemorrágica ainda não foi elucidado. Citocinas produzidas pela placa coriônica e pela membrana amniótica, bem como as sintetizadas pelo próprio feto, em resposta à infecção, ganham a circulação sistêmica e atingem o sistema nervoso central por meio de dois mecanismos: passagem livre pela barreira hematoencefálica, mesmo intacta, ou por alterar a permeabilidade desta (25-26). No endotélio da matriz germinativa, tais citocinas poderiam provocar lesão diretamente e desencadear o sangramento (22). Além disso, Lee *et al.* (27) demonstraram que a corioamnionite (com ou sem funisite) está associada

significativamente ao desenvolvimento de hipotensão no primeiro dia de vida em recém-nascidos pré-termo (OR 5,14 - IC95% 1,51-17,50). Como a hipotensão e sua correção estão associadas a fenômenos de hipoperfusão-reperfusão, a ocorrência de HPIV poderia ser explicada por esse mecanismo.

Várias citocinas têm sido apontadas como mediadoras da lesão inflamatória relacionada à corioamnionite. Heep *et al.* (28) avaliaram a influência dos níveis de interleucina-6 (IL-6) sérica na ocorrência de HPIV em RNs menores de 28 semanas. As medidas foram feitas no sangue do recém-nascido em até 12 horas de vida pós-natal. Após a análise de regressão multivariada, eles observaram que níveis elevados (> 100 pg/ml) de IL-6 e tratamento vasopressor foram associados significativamente com a ocorrência de HPIV grave - OR de 8,94 e IC 95% de 3,1 - 25,7, $p=0,0001$ para IL-6 e OR de 6,25 e IC 95% de 2,04-19,1, $p=0,0001$ para o tratamento com catecolaminas.

Tauscher *et al.* (29) avaliaram a ocorrência de HPIV em RNs pré-termo em relação à corioamnionite histológica e níveis de citocinas no cordão umbilical. A lesão placentária foi mais comum naqueles com HPIV (14/20 x 31/86, $p=0,006$) e também foi mais elevada a mediana dos níveis séricos de Il-1 β (2,6,x 0,3 pg/ml; $p<0,001$), de Il-6 (89,2 x 2,7 pg/ml; $p< 0,001$) e de IL-8 (286,5 x 62,3 pg/ml; $p<0,001$). Os níveis das citocinas foram significativamente mais elevados nos casos de corioamnionite demonstrada histologicamente.

Kassal *et al.* (30) também demonstraram níveis mais elevados de Il-6, medidos no sangue do cordão umbilical ao nascimento, em recém-nascidos pré-termo que desenvolveram HPIV posteriormente. A mediana do grupo com hemorragia (22/67) foi de 87 pg/ml contra 0 no grupo sem HPIV ($p=0,007$).

NATUREZA DOS RADICAIS LIVRES E HPIV

O oxigênio tem um papel primordial no complexo processo de evolução da vida na Terra, sendo o oxigênio molecular (dioxigênio - O₂) utilizado pelos organismos aeróbicos nas vias responsáveis pela respiração celular para gerar energia a partir da adenosinatrifosfato. Além disso, as vias metabólicas e biossintéticas que utilizam o elemento químico estão envolvidas em um grande número de funções fisiológicas,

incluindo o controle do tono vascular e a defesa contra microrganismos e células neoplásicas, e são responsáveis pelos sinais de transdução em receptores de membrana (31-32).

A maior parte do oxigênio consumido pelas células e tecidos, aproximadamente 95%, é reduzida à adenosina trifosfato na mitocôndria. Porém, os 5% restantes são liberados como intermediários reativos do oxigênio (ROI – *reactive intermediaries of oxygen*) ou radicais livres (RL) derivados do oxigênio, especialmente sob a forma de radicais superóxido e hidroxil e peróxido de hidrogênio (31;33).

Os RL derivados do oxigênio são os mais importantes nos sistemas vivos e a adição de um ou mais elétrons ao oxigênio molecular gera o íon superóxido, o qual pode ser considerado o ROI primário, capaz de interagir com outras moléculas e gerar outros RL secundários, igualmente reativos (33-34).

As espécies reativas de oxigênio têm um papel duplo, senão paradoxal, nos sistemas biológicos. Fisiologicamente, elas são essenciais para os mecanismos complexos de controle da respiração celular, no desenvolvimento embrionário, na sinalização intracelular e na defesa contra microrganismos invasores. Por outro lado, quando há superprodução e/ou diminuição dos sistemas de neutralização, elas têm um grande potencial de provocar dano (31-32;35).

Os organismos aeróbicos desenvolveram sistemas de defesas integradas para controle do excesso de radicais livres. Neles estão incluídos sistemas enzimáticos como a superóxido-dismutase, a catalase e a glutathione-peroxidase, e compostos não enzimáticos representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), pelo tocoferol (vitamina E), pela vitamina A e pela glutathione (32;34;36).

O balanço entre a produção e a neutralização dos RL é chamado , nos sistemas biológicos de “regulação redox”; ele serve para proteger o meio interno das lesões oxidativas (33).

Como produto do desbalanço entre o aumento de produção e a diminuição da neutralização de radicais livres, ocorrerá acúmulo de espécies reativas de oxigênio, levando

à oxidação de lipídios, proteínas, polissacarídeos e dano ao DNA tais como modificações nas bases, fragmentação nas hélices e indução de fatores pró-apoptose (33;37).

Os recém-nascidos, especialmente os pré-termo, são especialmente susceptíveis à ação do RL. Isso se deve às seguintes razões: imaturidade estrutural e funcional de vários órgãos; alta taxa de crescimento celular e tecidual com alto consumo energético; mecanismos homeostáticos ainda em desenvolvimento e imaturidade do sistema antioxidante, o qual só se completará o desenvolvimento no primeiro ano de vida (32;38).

No final da gestação a termo normal ocorre um aumento da produção de antioxidantes, bem como um aumento crescente da passagem transplacentária de antioxidantes não enzimáticos. No nascimento prematuro, além de haver menor disponibilidade de sistemas antioxidantes, ocorre um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Além disso, não há aumento da resposta antioxidante diante da agressão oxidativa presente ao nascimento, o que leva a uma maior susceptibilidade à injúria por RL (38).

No período perinatal, várias condições expõem o RN, especialmente o pré-termo, à ação de RL. Entre tais condições podem ser citadas: exposição à hiperoxemia e à hipoxemia, ocorrência de fenômenos de isquemia-reperfusão, ativação de macrófagos e aumento do metabolismo de prostaglandinas nos quadros de infecção-inflamação (32;35;39).

Virtualmente todos os componentes moleculares celulares e teciduais são potencialmente vulneráveis à ação dos RL. O cérebro é particularmente susceptível ao dano oxidativo devido à sua alta taxa metabólica, praticamente de natureza aeróbica, e à sua alta concentração de ácidos graxos polinsaturados nas membranas celulares, e que são um excelente alvo para a ação dos RL (40).

O trabalho de parto e o nascimento em si estão associados com um aumento da atividade oxidativa, medido através de produtos derivados da peroxidação lipídica. Em crianças normais a termo, em até 72 horas, os níveis desses metabólitos diminuem e, ao mesmo tempo, aumentam a produção dos sistemas antioxidantes não enzimáticos. Em recém-nascidos pré-termo, a redução da atividade oxidativa não ocorre antes de uma

semana de vida, sendo os valores de alfa-tocoferol inferiores aos das crianças a termo, o que indica maior predisposição a doenças oxidativas (41-42).

A glutatona, que é um tripeptídeo, faz parte de um dos mais importantes sistemas antioxidantes intracelulares, produzida no citoplasma de praticamente todas as células vivas, especialmente pelo fígado e hemácias. Ela é capaz de neutralizar a maioria das formas de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito, bem como capaz de regenerar as vitaminas C e E para as suas formas ativas (35;43). Os níveis de glutatona no sangue de cordão umbilical de RNPT ao nascimento excedem os de crianças a termo. No entanto, ocorre uma rápida queda nos níveis nos primeiros dias de vida, possivelmente como consequência do estresse oxidativo crescente pós-natal (43).

De um modo especial, recém-nascidos pré-termo são bastante susceptíveis ao desenvolvimento de doenças secundárias à injúria oxidativa. Há aproximadamente 30 anos, ficou evidente que uma série de doenças comuns nos recém-nascidos tinha uma base fisiopatológica relacionada ao desbalanço oxidativo: são provocadas por uma produção aumentada de radicais livres e/ou estão associadas a um sistema antioxidante deficiente. Inicialmente foram incluídos a displasia broncopulmonar, a retinopatia da prematuridade e a enterocolite necrosante; posteriormente, houve evidências do mesmo mecanismo na lesão da substância branca cerebral (leucomalácia periventricular), na hipertensão pulmonar, na manutenção do canal arterial patente e na hemorragia peri e intraventricular (44-48).

Em trabalhos experimentais realizados em cachorros recém-nascidos (modelo experimental de hemorragia intraventricular), Ment et al, (14;49-50) demonstraram que o bloqueio da produção de radicais livres por meio de drogas, como o etansilato e a indometacina, ou com a utilização de superóxido-dismutase, tinha um efeito profilático no aparecimento de HPIV após injúria de reperfusão (hipotensão hipovolêmica).

O uso da vitamina E como substância neuroprotetora, especialmente com a finalidade de evitar a HPIV, tem sido relatado desde a década de 1980 (51). Em revisão por metanálise, Brion *et al.* (52) encontraram uma redução significativa da ocorrência de HPIV, inclusive nas suas formas graves, com a suplementação de vitamina E para RNs pré-termo.

No entanto, o uso de doses altas de alfa-tocoferol esteve associado a um risco aumentado de sepse, o que inviabilizou o uso clínico da intervenção.

Drury *et al.* (53) correlacionaram as concentrações séricas de malondialdeído, indicador de peroxidação lipídica, e TAS, capacidade antioxidante total do plasma - medido por concentrações conjuntas de bilirrubina, albumina, tocoferol, ascorbato e urato - com a evolução clínica de 25 RNs com medianas de peso de 1.076 g e de idade gestacional de 28 semanas. Os autores não encontraram associação entre os marcadores e a ocorrência de HPIV.

Rogers *et al.*(54) testaram a associação entre a evolução clínica de RNs pré-termo em relação aos níveis séricos umbilical da capacidade antioxidante total. Do total de 41 RNs com medianas de idade gestacional de 31 semanas e de peso de 1.515 g, houve apenas quatro casos de HPIV, e sem correlação positiva com o marcador.

CORTICOSTEROIDES, ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E HPIV

O uso antenatal de corticosteroide tem sido recomendado para gestantes de risco de trabalho de parto prematuro antes de 34 semanas de gestação (55). Revisões sistemáticas demonstraram que o seu uso está associado a uma redução global da morte neonatal - RR 0,69 IC95% 0,58-0,81, a um menor risco de desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório - RR 0,66 IC95% 0,59-0,73, e a uma diminuição do risco de enterocolite necrosante - RR 0,46 IC95% 0,29-0,74, e de HPIV -RR 0,54 IC 95% 0,43-0,69. Importante ressaltar ainda que os estudos sobre o uso de esteróide antenatal demonstraram não haver aumento de risco materno de corioamnionite ou sepse puerperal (56).

Os mecanismos pelos quais os esteróides exercem essa função protetora são múltiplos, tanto anatômicos como aqueles relacionados à influência do medicamento sobre os sistemas enzimáticos.

A ação de corticosteroides sobre a produção de espécies reativas de oxigênio tem sido demonstrada em vários trabalhos. Dandona *et al.* (57) demonstraram, em indivíduos adultos, que uma injeção única de hidrocortisona (100 ou 300 mg) foi suficiente para

provocar uma diminuição significativa da produção de RL derivados do O₂, alcançando um valor mínimo entre 2 e 8 horas, e retorno ao normal em 24 horas após a administração.

Em trabalho realizado com recém-nascidos pré-termo de ovelhas que receberam betametasona no período antenatal, o uso do esteróide promoveu a redução da produção de peróxido de hidrogênio, da Il-6 e da capacidade de fagocitose. Tais efeitos foram todos tempo-dependentes, e ao final de sete dias após a aplicação, já não mais ocorriam (58).

Em relação à estrutura cerebral, em trabalho experimental realizado com coelhos recém-nascidos pré-termo e com amostras de tecido cerebral de recém-nascidos pré-termo humanos, falecidos nas primeiras 72 horas de vida, Balabh *et al.* (59) e Vinukonda *et al.* (60) demonstraram que o uso antenatal de betametasona suprimiu os níveis de fator de crescimento endotelial vascular e aumentou os do fator de crescimento transformante beta. Isso resultou em inibição da angiogênese, rearranjo dos neovasos e aumento da cobertura de pericitos, os quais contribuem para estabilização da matriz germinativa e menor propensão ao rompimento.

PROPOSTA DO ESTUDO

Durante a revisão da literatura sobre HPIV e avaliação de radicais livres de oxigênio e/ou determinação de antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, não foi encontrado nenhum estudo que avaliou a produção de ROI e a associação de marcadores oxidativos com marcadores inflamatórios, estando o campo aberto para investigação.

A melhora na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no dano oxidativo e/ou inflamatório ajudará no estabelecimento de alvos em potencial para redução ou mesmo prevenção das consequências danosas da ação dos RLs (32).

Assim, o estudo foi idealizado com o intuito de avaliar a associação da produção de radicais intermediários do oxigênio e dos níveis da glutathiona reduzida e da IL-6 no sangue de cordão como fatores de risco ao desenvolvimento de HPIV.



2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação entre marcadores de estresse oxidativo e de inflamação ao nascimento e o desenvolvimento de hemorragia peri e intraventricular em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Verificar a associação entre a produção de intermediários reativos do oxigênio por leucócitos polimorfonucleares do cordão umbilical e a ocorrência de HPIV.
- 2- Verificar a associação entre os níveis de glutathiona reduzida no sangue de cordão umbilical e a ocorrência de HPIV.
- 3- Verificar a associação entre os níveis séricos de interleucina-6 no cordão umbilical e a ocorrência de HPIV



3- SUJEITOS E MÉTODOS

45

Sujeitos e métodos

3.1. Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectivo.

3.2. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com o nível sérico umbilical de IL-6 como marcador de desenvolvimento de HPIV em recém-nascidos de muito baixo peso, uma vez que não havia, à época do início da coleta de dados, nenhum estudo com avaliação de intermediários reativos do oxigênio ou da glutatona no desenvolvimento de HPIV. No estudo de Heep *et al.* (28), os níveis de IL-6 foram categorizados em ≤ 100 pg/ml e > 100 pg/ml, tendo sido observada uma incidência de HPIV de 38% no grupo com IL-6 ≤ 100 pg/ml e de 63% no grupo com IL6 > 100 pg/ml. Foi considerado um nível de significância de 5% e uma proporção esperada de HPIV nessa categorização de 4 para 3.

Considerando um nível de significância de 5%, um poder do teste de 80%, e uma taxa de incidência de HPIV no CAISM-UNICAMP de 20%, o tamanho da amostra mínimo calculado foi de $n = 125$.

3.3. Seleção dos sujeitos

Foram selecionados todos os recém-nascidos vivos pré-termo menores de 37 semanas de gestação, com peso de nascimento menor que 1.500 g, nascidos no Hospital de Mulher Prof. Doutor José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de 1^o de maio de 2009 a 31 de outubro de 2010.

Critérios de exclusão

- 1- Não obtenção da coleta de sangue do cordão umbilical
- 2- Não autorização da mãe ou responsável para a coleta de sangue do cordão umbilical. No caso de parto de urgência, em que não houve possibilidade de

contato adequado com a mãe, o sangue de cordão foi colhido, tendo o termo sido obtido posteriormente.

- 3- Malformação grave do sistema nervoso central, como acrania, impedindo a realização da ultrassonografia cerebral.
- 4- Óbito neonatal antes de seis horas de vida, impossibilitando a realização da primeira ultrassonografia cerebral.

3.4. Variáveis e conceitos

3.4.1 Variável dependente

Hemorragia peri e intraventricular: definida como a presença de hiperecogenicidade na região peri e/ou intraventricular diagnosticada pela ultrassonografia cerebral transfontanelar. Foram admitidas duas categorias: presente e ausente.

Os graus da HPIV foram classificados de acordo com Papile *et al.* (61):

- grau I: hemorragia restrita à matriz germinativa;
- grau II: hemorragia intraventricular sem dilatação ventricular;
- grau III: hemorragia intraventricular com dilatação ventricular;
- grau IV: hemorragia parenquimatosa.

Em relação à gravidade da HPIV, a doença foi posteriormente categorizada em leve quando presentes os graus I e/ou II e grave quando presentes os graus III e/ou IV. No caso de terem sido encontrados graus diferentes em cada hemisfério cerebral, foi considerada a forma mais grave.

3.4.2 Variáveis independentes

1- Nível de intermediários reativos de oxigênio (ROI): dosagem da produção de radicais intermediários de oxigênio de leucócitos polimorfonucleares no sangue do cordão umbilical, na forma basal e no modo estimulado. Valores expressos em $\text{nMol} \times 10^6$ células.

2- Nível de glutathiona reduzida (GR): dosagem do nível de glutathiona eritrocitária no sangue de cordão umbilical. Valores expressos em mg% (em relação ao hematócrito).

3- Nível de interleucina-6 (IL-6): dosagem do nível sérico de IL-6 no sangue de cordão umbilical. Valores expressos em pg/ml.

3.4.3 Variáveis independentes de controle

Variáveis maternas

1- Idade: idade em anos completos de vida referida pela paciente no momento do parto. Foi avaliada como variável contínua na análise univariada e, para categorização na análise múltipla, foram admitidas duas categorias: maior ou igual a 18 anos e menor de 18 anos.

2- Primiparidade: refere-se ao fato de a mulher apresentar-se em trabalho de parto pela primeira vez, excetuando-se os casos de abortos anteriores. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

3- Doença hipertensiva: considerada quando constatado qualquer estado hipertensivo na atual gravidez, com nível de pressão diastólica superior a 90 mmHg em mais de uma medida, independentemente de sua classificação (crônica, doença específica da gestação ou ambas). Foram admitidas duas categorias: sim e não.

4- Corticoterapia antenatal: uso de corticosteroide sistêmico (betametasona) pela mãe entre 24 e 34 semanas de gestação com a finalidade de acelerar a maturidade fetal (62). Foram consideradas duas categorias: presente e ausente.

5- Ciclo completo de corticoterapia antenatal: denominou-se ciclo completo aquele em que a gestante recebeu duas doses de 12 mg de betametasona em intervalo de 24 horas. O ciclo incompleto ocorreu quando a gestante recebeu apenas uma dose de betametasona (55). Foram consideradas duas categorias: presente e ausente.

6- Número de doses de betametasona: foram admitidas três categorias: nenhuma dose, uma dose e duas ou mais doses.

Variáveis de parto

1- Trabalho de parto: corresponde a contrações uterinas regulares com duração de pelo menos 30 segundos em intervalos de 10 minutos, associadas à dilatação e ao esvaecimento do colo uterino. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

2- Parto vaginal: refere-se ao modo vaginal de término do trabalho de parto, com expulsão do feto via vaginal. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

3- Apresentação fetal: correlacionada ao polo fetal que se insinuou no estreito superior da bacia no momento do parto. Foram admitidas duas categorias: cefálica e pélvica.

4- Sofrimento fetal agudo: considerado quando houve alteração nos batimentos cardíacos fetais, tais como desacelerações tipo II, bradicardia ou desaparecimento do foco fetal, independentemente de estar relacionada ao trabalho de parto. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

5- Infecção materna: foi considerada quando a mãe apresentou umas das situações a seguir, ocorrendo em até 48 horas antes do nascimento do RN: infecção do trato urinário comprovada por urocultura, pneumonia, corioamnionite ou sepse. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

6- Corioamnionite clínica: combinação variável de febre materna (temperatura axilar $\geq 38^{\circ}$ C) e/ou útero sensível ao toque e/ou taquicardia fetal/materna e/ou leucograma materno alterado e/ou fisometria (63) Foram admitidas duas categorias: sim e não.

7- Gemelaridade: foram admitidas duas categorias: sim e não.

Variáveis neonatais

1- Peso ao nascer: peso obtido ao nascimento. Foi considerado como RN de muito baixo peso aquele com peso ao nascimento menor que 1.500 g (64). Foi avaliada como variável contínua na análise univariada e, para categorização na análise múltipla, foram admitidas duas categorias: maior ou igual a 1.000 g e menor de 1.000 g.

2- Idade gestacional: medida em semanas inteiras e obtida preferencialmente a partir da data da última menstruação materna, ou determinada por ultrassonografia obstétrica precoce (realizada antes de 20 semanas) ou, na ausência desses elementos, obtida pelo método estimativo de New Ballard (65). Foi avaliada como variável contínua na análise univariada e, para categorização na análise múltipla, foram admitidas duas categorias: maior que 30 semanas e menor que 30 semanas.

3- Sexo: foi definido por masculino e feminino.

4- Apgar de primeiro minuto: corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com um minuto de vida (66). Foram admitidas duas categorias: maior que 7 ou menor ou igual a 7.

5- Apgar de quinto minuto: corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com cinco minutos de vida (66). Foram admitidas duas categorias: maior que 7 ou menor ou igual a 7.

6- Reanimação em sala de parto: uso de oxigênio sob pressão positiva (por máscara ou por tubo traqueal), associado ou não à massagem cardíaca ou ao uso de drogas para a recuperação cardiorrespiratória do recém-nascido em sala de parto. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

7- Pequeno para idade gestacional: o RN foi classificado como pequeno para a idade gestacional (PIG) quando o peso de nascimento ficou abaixo do percentil 10 na classificação do peso do recém-nascido de acordo com a idade gestacional, tendo sido usada como padrão a curva de crescimento fetal de Alexander *et al.* (67). Foram admitidas duas categorias: sim e não.

8- Assistência respiratória: correspondeu a qualquer tipo de tratamento ao qual o recém-nascido tenha sido submetido visando fornecer oxigenoterapia em consequência de um distúrbio respiratório. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

9- Surfactante: definido quando o recém-nascido recebeu surfactante exógeno no modo profilático ou de resgate, independentemente do número de doses recebidas. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

10- Sepsis neonatal: reação inflamatória sistêmica à infecção, comprovada por cultura, ou clinicamente suspeita quando houve alteração clínica compatível com a doença e associada à alteração do leucograma e/ou da proteína C-reativa. Foram consideradas duas categorias: sim e não.

11- Choque: definido como disfunção cardiovascular, determinado por hipotensão de acordo com a idade, necessidade de expansão volumétrica e de droga vasoativa para manter

a pressão arterial normal, oligúria, acidose metabólica, enchimento capilar prolongado (68). Foram consideradas duas categorias: sim e não.

12- CRIB - *Clinical Risk Index for Babies*: escore de avaliação de gravidade do recém-nascido, aplicado com 12 horas de vida (69). Foi avaliado como variável contínua na análise univariada e, para categorização na análise múltipla, foram admitidas duas categorias: maior ou igual a 5 e menor que 5.

13- SNAPPE-II- *Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, Version II*: escore de avaliação da gravidade do recém-nascido, aplicado com 24 horas de vida (70). Foi avaliado como variável contínua na análise univariada e, para categorização na análise múltipla, foram admitidas duas categorias: maior ou igual a 22 e menor que 22.

14- Pneumotórax: escape aéreo na cavidade pleural, hipertensivo ou não. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

15- Hipernatremia: nível sérico de sódio ≥ 150 mEq/l. Foram admitidas duas categorias: sim e não.

Com o intuito de realizar uma avaliação mais precisa das variáveis neonatais categóricas como fatores de risco para HPIV, elas foram avaliadas tomando-se em consideração a relação delas com o tempo de detecção da HPIV. Só foram considerados os dados – presentes ou ausentes – até o momento da detecção da doença pela ultrassonografia seriada, conforme descrito adiante. Em caso de não haver desenvolvimento da HPIV avaliaram-se as variáveis até o sétimo dia de vida.

3.5. Coleta de dados

Os dados foram colhidos dos prontuários das mães e dos recém-nascidos, arquivados no Serviço de Arquivo Médico do CAISM.

Do prontuário materno foram retiradas as seguintes informações: idade, paridade, doença hipertensiva, corticoterapia antenatal (tipo de esteróide, número de doses, intervalo entre as doses), trabalho de parto, tipo de parto, apresentação fetal, sinais de sofrimento fetal agudo, infecção materna, corioamnionite clínica e gemelaridade.

Do prontuário do recém-nascido foram retiradas as seguintes informações: peso ao nascer, idade gestacional, sexo, valores de Apgar de 1º e 5º minutos, necessidade de reanimação em sala de parto, estado nutricional, assistência respiratória, uso de surfactante, sinais de sepse e choque, índices de CRIB e SNAPPE II, presença de pneumotórax e hipernatremia.

3.6. Exames e testes

3.6.1- Ultrassonografia cerebral transfontanelar: os RNs foram submetidos à ultrassonografia cerebral com 6, 12, 24 e 72 horas de vida e com 7 e 28 dias de vida, tendo sido utilizada a fontanela anterior como janela acústica, à beira do leito na unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal. O aparelho utilizado foi o ecógrafo Xario® (Toshiba®) com transdutor de 5 MHz.

Todos os exames foram feitos pelo aluno pesquisador nos tempos determinados pelo protocolo do estudo, com impressão das imagens e cópias dos exames gravados em *CD-rom*, todos revistos pelo pesquisador principal. Em caso de dúvida, um terceiro neonatologista do serviço, com ampla experiência na realização de ultrassonografia cerebral, foi convidado a emitir um parecer sobre o resultado do exame. As cópias das imagens em fotografia e em formato digital estão armazenadas em arquivo digital.

O objetivo da realização da ultrassonografia seriada foi avaliar a presença de variáveis neonatais associadas ou não com a HPIV em determinado período estudado. A avaliação aos 28 dias de vida foi feita para verificar a ocorrência de dilatação ventricular secundária às formas graves da HPIV.

3.6.2- Coleta de sangue do cordão umbilical: no momento do parto, após o nascimento do RN, e antes da dequitação da placenta, foi colhido sangue do cordão umbilical por punção dos vasos umbilicais, constituindo-se em amostra mista, arterial e venosa. A seguir, o material foi distribuído em três frascos, sendo dois com anticoagulante e um contendo oxalato de silício. As amostras foram encaminhadas imediatamente ao laboratório do Centro de Pesquisas em Pediatria (CIPED) para pronto processamento.

Dosagem de IL-6

As amostras colhidas em frascos secos contendo oxalato de silício foram submetidas a 10 minutos de centrifugação a 2.200 rpm. O soro obtido foi congelado a -80°C até a realização do ensaio pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA, conforme orientações do fabricante - Duo Set, R & D Systems, EUA (anexo 1). Os resultados foram expressos em pg/ml.

Avaliação de glutatona reduzida

A concentração de glutatona reduzida nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria através do método de Beutler *et al.* (71), modificado por Penna (72), cujo princípio baseia-se no fato de que todos os compostos não proteicos sulfidrílicos dos eritrócitos permanecem estáveis devido à presença de glutatona e de que eles possuem a capacidade de reduzir o 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico - DTNB), composto dissulfídico, originando um cromóforo amarelado cuja densidade óptica pode ser determinada por espectrofotometria a 412 nanômetros. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas (anexo 2). Os resultados foram expressos em mg% em relação ao hematócrito.

Análise da produção de intermediários reativos do oxigênio

A concentração de intermediários reativos do oxigênio pelos granulócitos foi determinada por citometria de fluxo em amostra de sangue total colhidas em frascos contendo EDTA (73). De cada paciente, estudou-se a liberação dos intermediários reativos do oxigênio pelos polimorfonucleares de duas formas: uma espontânea (ou basal), com os leucócitos incubados apenas em solução de Hanks, e outra estimulada, com os leucócitos

incubados em forbol-miristato acetato. Os resultados foram expressos em nmol de superóxido/10⁶células/tempo de incubação (anexo 3).

3.7. Instrumentos para coleta de dados

As informações sobre as variáveis e os resultados de testes e exames foram registradas na ficha de estudo (anexo 4).

3.8. Acompanhamento dos sujeitos

Os recém-nascidos submetidos à ultrassonografia cerebral foram acompanhados pelo pesquisador durante toda a internação, até a alta hospitalar ou o óbito.

3.9. Processamento e análise dos dados

Os dados contidos na ficha de estudo foram revisados manualmente a fim de detectar erros de seleção ou preenchimento. Posteriormente, eles foram digitados e codificados em um arquivo, em microcomputador, por meio do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 15.0 for Windows.

Análise dos dados

A distribuição dos acometidos por HPIV foi dada por frequência.

Os valores da produção dos intermediários reativos do oxigênio e dos níveis sanguíneos de glutathione e de interleucina-6 foram expressos como mediana e percentis 25 e 75.

Os testes de qui-quadrado ou de Fisher foram utilizados para comparação da ocorrência de HPIV em relação às variáveis categóricas.

Para comparação das medianas de ROI, GR e de IL-6 entre os RNs com e sem HPIV foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A análise de regressão logística múltipla passo a passo, com adaptação para cálculo da razão de incidência, foi realizada utilizando as variáveis que, na análise univariada,

apresentaram nível de significância $\geq 0,2$. Para as variáveis contínuas, procedeu-se à categorização de peso ao nascer $\geq 1.000\text{g}$ e $< 1.000\text{g}$ e idade gestacional < 30 semanas e ≥ 30 semanas. Para os valores de CRIB e SNAPPE II e de ROI, GR e IL-6, o limite de corte foi obtido através do ponto de maximização na curva ROC.

O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

3.10. Aspectos éticos

Foram observados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (1990), tendo sido cumprida a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi obtida a aprovação da mãe e/ou pai do recém-nascido para a coleta do sangue do cordão umbilical e para realização da ultrassonografia cerebral transfontanelar, por meio do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme o modelo no anexo 5.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, sob o parecer número 971/2008.

3.11. Local e dinâmica de desenvolvimento do estudo

A coleta de sangue se realizou no Centro Obstétrico do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, da Universidade Estadual de Campinas. A unidade de internação – UTI neonatal - fica no mesmo prédio; trata-se de um serviço de atendimento de nível terciário pertencente à rede do Sistema Único de Saúde que cobre uma região metropolitana de aproximadamente 3.000.000 de habitantes.

O aluno pesquisador realizou reuniões com toda a equipe de médicos assistentes, docentes e residentes de neonatologia da unidade com o intuito de explicar o projeto. Uma vez que os partos ocorreram a qualquer momento do dia, o pesquisador ficou ao alcance por telefone celular para ser avisado de todo nascimento em potencial de recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. Ele se dirigia ao centro obstétrico do CAISM-UNICAMP para recolher as amostras de sangue colhidas pela equipe de obstetrícia e separá-las em frascos

apropriados. Isso feito, ele encaminhava pessoalmente as amostras até o Centro de Pesquisas em Pediatria (CIPED) e acionava o profissional responsável para a preparação das amostras e análise dos marcadores. Programava então a realização seriada das ultrassonografias cerebrais de acordo com o horário de nascimento.

Além disso, antes do nascimento da criança, o termo de consentimento era obtido pelo pesquisador, desde que a mãe não estivesse em franco trabalho de parto. Caso contrário, as amostras eram colhidas e então os pais eram consultados a respeito da pesquisa e, em caso de recusa, as amostras seriam desprezadas.

O CIPED é um centro de pesquisa em pediatria pertencente ao Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e conta com equipamentos para dosagem dos exames realizados no estudo. Os frascos contendo anticoagulante para dosagem de ROI e glutatona foram processados imediatamente e o soro do frasco seco destinado para dosagem de Il-6 foi separado e congelado a -80° C para processamento posterior.

3.12. Financiamento do estudo

O estudo foi financiado pelo Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – projeto número 08/57405-4.



4- RESULTADOS

Durante o período de estudo, de maio de 2009 a outubro de 2010, foram elegíveis 138 crianças nascidas na maternidade do CAISM-UNICAMP, com peso ao nascer inferior a 1.500 gramas. Destas, 13 recém-nascidos não foram inclusos. Em 12 crianças não foi possível a coleta de sangue umbilical e, dessas, duas apresentaram HPIV (16,66%), sendo uma com grau I e outra apresentou grau III, detectadas pelo protocolo de rotina de ultrassonografia cerebral do serviço. Um RN foi excluído pois, apesar de sido colhido o sangue de cordão umbilical, ele morreu com menos de 6 horas de vida, impossibilitando a realização da ultrassonografia.

Permaneceram para a análise do estudo 125 crianças, ou seja, 90,57% do número de RNs de muito baixo peso nascidos vivos no período. O número de mães foi de 111, pois houve 14 gestações múltiplas, sendo 11 duplas e três triplas. Como o critério de entrada no estudo foi o peso de nascimento, nem todos os gemelares dessas gestações foram incluídos, pois em sete situações o peso de nascimento de um dos gemelares foi superior ao limite de 1.500g. Não houve nenhuma recusa materna em participar do estudo.

Das 125 crianças estudadas, 15 apresentaram HPIV (12,00%), sendo seis delas com grau I, duas com grau II, quatro com grau III e três com grau IV. A forma leve da doença – graus I e II - ocorreu em oito ocasiões (53,33%) e a forma grave - graus III e IV em sete RNs (46,66%). A taxa de HPIV no grupo não incluído foi semelhante ao grupo estudado – 16,6% x 12,0% - $p=0,342$.

Em relação à temporalidade da ocorrência da HPIV, quatro casos (26,67%) dos casos já foram diagnosticados com seis horas de vida, e quase a metade (46,6%) já pôde ser demonstrada pela ultrassonografia com até 24 horas de vida. Relevante dizer que, dos quatro casos de hemorragias diagnosticadas com seis horas de vida, três eram grau IV e uma grau I, à qual evoluiu para grau III com 24 horas de vida (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso com HPIV segundo a hora de vida no momento do diagnóstico

Horas de vida	HPIV N (%)*
6	4 (26,67)
12	0
24	3 (20,00)
72	8 (53,33)
168	0
Total	15 (100)

* casos novos diagnosticados

Houve 14 óbitos entre a população estudada e quatro desses RNs (28,57%) apresentaram as formas graves da doença (três RNs apresentaram grau III e um com grau IV). Todos os óbitos, exceto três, ocorreram após 72 horas de vida. Um caso de óbito precoce foi de um RN com 7 horas de vida, mas que já apresentava lesão hemorrágica parenquimatosa grave e difusa. Os outros dois casos, óbitos com 31 e 43 horas de vida, respectivamente, não apresentavam HPIV com 24 horas de vida e a necropsia não evidenciou lesão hemorrágica do sistema nervoso central.

Dilatação ventricular ou hidrocefalia pós-hemorrágica ocorreu em cinco casos (33,33%), todos secundárias às formas graves da HPIV (três RNs com grau IV e um RN com grau III), sendo observado que uma criança foi submetida a procedimento de derivação do líquido cefalorraquidiano.

Na avaliação dos marcadores observou-se que a produção basal de intermediários reativos de oxigênio apresentou mediana estatisticamente mais elevada no grupo que apresentou HPIV ($p=0,045$). No entanto, a produção estimulada de ROI não apresentou diferença estatística. Os valores de mediana da glutatona e de IL-6 também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem HPIV (Tabela 2).

Tabela 2- Valores de ROI basal e estimulado, glutatona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a ocorrência de HPIV

	HPIV				p*
	Presente	N	Ausente	N	
ROIB	0,50 (0,4-0,6)	14	0,40 (0,4-0,5)	84	0,045
ROIest.	38,65(17,15 – 66,70)	14	39,60(18,60-138,25)	85	0,355
GR	67,25(56,71-78,315)	13	71,03(63,37-80,83)	87	0,337
IL-6	24,34(14,424-72,153)	14	34,20(13,987-62,581)	107	0,903

Valores em mediana (p25-p75)

ROIB = ROI basal ;ROI est. =ROI estimulado -valores em $nMolx10^6$ cel

GR=glutatona reduzida - valores em mg%

Il-6=interleucina-6 - valores em pg/ml

* teste de Mann-Withney

O poder amostral para a variável ROI basal foi alto – 87,70%; para o modo estimulado, o valor foi menor, de 63,10%. Em relação ao poder amostral para a glutathiona e IL-6, os valores do poder amostral foram baixos, com valores de 11,50% e 5,00%, respectivamente.

Avaliou-se a produção dos marcadores em relação à idade gestacional, categorizada em < e \geq 30 semanas, e não se observou diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos de idade gestacional, conforme a tabela 3.

Tabela 3- Valores de ROI basal e estimulado, glutathiona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a idade gestacional.

	Idade gestacional				p*
	< 30 semanas	N	\geq 30 semanas	N	
ROIB	0,4	55	0,4	43	0,551
ROIest	27,15	56	46,66	43	0,149
GR	70,25	55	69,52	45	0,127
IL-6	34,20	65	31,86	56	0,331

Valores em mediana
 ROIB=ROI basal - ROIest=ROI estimulado- valores em $nMol \times 10^6$ cel – GR-glutathiona reduzida -valores em mg% - IL-6 =interleucina-6-valores em pg/ml
 * teste de Mann-Withney

Quando avaliamos os valores de mediana dos marcadores em relação ao desenvolvimento de HPIV grave comparados com os valores no grupo sem a doença, não houve diferença estatística significativa nos marcadores (Tabela 4).

Tabela 4- Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo a gravidade da HPIV

	HPIV				p*
	Ausente	N	Grave	N	
ROIB	0,40	7	0,50	84	0,088
ROIest	39,60	7	46,10	85	0,740
GR	71,03	7	70,25	87	0,773
IL-6	34,20	7	44,65	107	0,324

Valores em mediana

ROIB= ROI basal –ROIest=ROI estimulado-valores em nMolx106 cel. GR=glutaciona reduzida – valores em mg% . IL-6=interleucina-6-valores em pg/ml

*teste de Mann-Withney

Na análise das variáveis de controle, em relação às características maternas observou-se que nenhuma das variáveis estudadas mostrou associação significativa com a ocorrência de HPIV no recém-nascido (Tabela 5).

Tabela 5- Distribuição das variáveis maternas de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer segundo a ocorrência de HPIV

	HPIV		p
	Presente (15)	Ausente (110)	
Idade anos (mediana)	28	26	0,879*
Idade < 18 anos	0	8 (7,22)	0,594&
Primiparidade	7 (46,66)	56 (50,90)	0,757 #
Doença hipertensiva	5 (33,33)	53 (48,18)	0,279#

Variáveis categóricas expressas em N(%).

* teste de Mann-Whitney

teste de qui-quadrado

& teste de Fisher

Em relação ao uso antenatal de betametasona, observou-se que 92 das 111 mães (82,88%) receberam a medicação, sendo que 103 delas (82,60%) receberam o ciclo completo.

No tocante à ocorrência de HPIV em relação ao uso de corticosteroide pela mãe durante a gestação, observou-se que não houve associação significativa quando se considerou a presença ou ausência do uso do medicamento (10/15 *versus* 93/110 - p=0,1395).

No entanto, quando se avaliou o uso do corticosteroide segundo o número de doses utilizadas pela mãe, observou-se que o uso do ciclo completo e a utilização de duas ou mais doses de betametasona foram mais frequentes no grupo sem HPIV, em todas as suas formas

avaliadas em conjunto, bem como na ocorrência de HPIV grave, conforme mostram as tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Distribuição de HPIV em RN pré-termo de muito baixo peso ao nascer, segundo o uso materno antenatal de corticosteroide

	HPIV		p
	Presente (15)	Ausente (110)	
CAN*	10 (66,66)	93 (84,54)	0,139 ^{&}
Nº doses			
0	5 (33,33)	17(15,45)	
1	5 (33,33)	11(10,00)	
>=2	5 (33,33)	82(74,54)	0,003[#]
Ciclo completo [†]	5 (50,00)	82 (88,17)	0,017^{&}

* CAN=corticosteroide antenatal N^o = número
Variáveis categóricas expressas em N(%)

teste de qui-quadrado

& teste de Fisher

† o número de casos nessa variável foi de 10 no grupo HPIV presente e 93 no grupo HPIV ausente.

Tabela 7 – Distribuição de formas graves de HPIV em RN pré-termo de muito baixo peso ao nascer, segundo o uso materno antenatal de corticosteroide

	HPIV		p
	Grave (7)	Ausente (110)	
CAN*	6 (85,71)	93 (84,54)	1,000 ^{&}
Nº doses			
0	1(14,28)	17 (15,45)	
1	4 (57,16)	11 (10,00)	
>=2	2 (28,56)	82 (74,55)	0,001 [#]
Ciclo completo [†]	2 (33,33)	82 (88,18)	0,009 ^{&}

Variáveis expressas em N(%) – N^o =número

* CAN=corticosteroide antenatal

teste de qui-quadrado

& teste de Fisher

[†] o número de casos nessa variável foi de 6 no grupo HPIV presente e 93 no grupo HPIV ausente

Em relação às variáveis relacionadas ao parto, apenas o fato de a mãe ter entrado em trabalho de parto, finalizado ou não em parto vaginal, foi associado à ocorrência de HPIV (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição das variáveis de parto segundo a ocorrência de HPIV em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer

	HPIV		p
	SIM (15)	NÃO (110)	
Trab. de parto	10 (66,67)	39 (35,45)	0,020[#]
Parto vaginal	6 (40,0)	20 (18,19)	0,083 ^{&}
Ap. cefálica	11(73,33)	82(74,55)	1,000 ^{&}
Sof. fetal agudo	2 (13,33)	40 (36,37)	0,076 [#]
Infecção materna	4 (26,67)	14 (12,73)	0,229 ^{&}
Corioamnionite	3 (20,0)	7 (6,36)	0,100 ^{&}
Gemelaridade	2 (13,33)	33 (30,0)	0,230 ^{&}

Todas as variáveis estão expressas em N(%)

sof=sufrimento

teste de qui-quadrado

& teste de Fisher

Em relação às variáveis de controle relacionadas ao recém-nascido, observou-se que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem HPIV para a idade gestacional, peso ao nascer, valores de CRIB e SNAPPE II e ocorrência de pneumotórax e hipernatremia. Verificou-se ainda uma tendência de ocorrência de choque ser mais comum no grupo com HPIV (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição das variáveis neonatais segundo a ocorrência de HPIV em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer

	HPIV		p*
	Presente (15)	Ausente (110)	
Peso ao nascer g	870 (680-990)	1042,50 (855-1290)	0,017
Peso ao nascer <1.000g	12 (80,0)	48 (43,64)	0,008
Id. gest. sem	27 (25-31)	29(28-32)	0,014
Id. gest.< 30 sem.	11 (73,33)	69 (62,72)	0,166
Sexo masculino	9 (60,0)	58 (52,73)	0,783
Apgar 1º minuto <7	6 (40,0)	39 (35,46)	0,730
Apgar 5º minuto <7	2 (13,33)	7 (6,37)	0,294
Reanimação	7 (46,67)	42 (38,19)	0,527
PIG	11 (73,33)	61 (55,46)	0,188
Assistência respiratória	15(100)	84 (76,37)	0,039
Surfactante	13 (86,67)	58 (52,72)	0,341
Choque	4 (26,67)	10 (9,09)	0,065
CRIB	6(2-8)	1 (1-4)	0,0009
CRIB ≥ 5	9 (60,0)	20 (18,19)	0,001
SNAPPE II	26 (17-46)	17 (8-30)	0,016
SNAPPE II≥22	11 (73,33)	41 (37,28)	0,007
Pneumotórax	4 (26,67)	2 (1,81)	0,001
Hipernatremia	4 (26,67)	5 (4,55)	0,012

Id. = idade gest = gestacional PIG =pequeno para idade gestacional

As variáveis categóricas estão apresentadas em frequência N(%) - As variáveis contínuas estão apresentadas como mediana e percentis 25 e 75 -

* teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas e testes de qui-quadrado ou Fisher para as variáveis categóricas

Para a análise multivariada escolhemos as variáveis categóricas com nível de significância de $p \leq 0,20$. Foram avaliadas, então, as variáveis: uso de corticosteroide, número de doses de corticosteroide, ciclo completo, trabalho de parto, parto vaginal, sofrimento fetal agudo, corioamnionite, estado nutricional FIG, assistência respiratória, sepse, choque, pneumotórax e hipernatremia.

Entre as variáveis contínuas, adotando o mesmo critério de nível de significância de $p \leq 0,2$ na análise univariada, foram avaliados: peso ao nascer, idade gestacional e valores de CRIB, SNAPEE II e ROI basal. Deste modo, as dosagens de glutatona e de IL-6 não foram avaliadas no modelo final de regressão multivariada pois já não apresentaram diferença estatística no modelo univariado.

O resultado final da análise múltipla mostrou que o CRIB permaneceu como variável independente como fator de risco de HPIV OR 6,21 (IC 95% 1,78-21,74) e o uso de duas doses de corticosteroide antenatal como fator protetor OR 0,23 (IC 95% 0,01-0,93). Como o SNAPPE II também é avaliador de gravidade de RNs refizemos a análise, retirando a variável CRIB, e o SNAPPE II aparece como fator de risco - OR 3,68 e IC 95% de 1,05-12,82 (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise de regressão múltipla – modelo final

Variável	OR	IC 95%	p
CRIB	6,21	1,73 - 22,22	0,001
Corticosteroide 2 doses x 0	0,23	0,01 – 0,93	0,046
SNAPPE II*	3,68	1,05 – 12,82	0,017

OR odds ratio IC intervalo de confiança
*análise com a retirada da variável CRIB

Uma vez que a dosagem de ROI não apareceu no modelo final, realizamos a análise multivariada sem a inclusão das variáveis relacionadas ao uso de corticosteroide, e verificamos que o apenas o CRIB aparece como fator independente novamente, com o mesmo OR acima. A retirada das variáveis relacionadas ao uso materno de corticosteroides na análise deveu-se ao fato de tal medicação poder promover supressão da produção de radicais livres de oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares, e, portanto, poder interferir na análise dos dados.

A fim de verificar se o ROI basal permanecia como fator de risco para HPIV foram realizados outros modelos de regressão ajustados incluindo as variáveis dose de corticosteroide, peso de nascimento, idade gestacional, trabalho de parto, tipo de parto, estado nutricional PIG, choque, sepse neonatal e ROI basal. O uso de duas doses de corticosteroide manteve-se como fator independente de proteção contra HPIV e o peso de nascimento <1.000g mostrou-se um fator de risco independente. O ROI basal permaneceu sem significância estatística (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise de regressão múltipla – 2º modelo

Variável	OR	IC 95%	p
dose corticosteroide 2x 0	0,167	0,039 – 0,718	0,009
Peso <1.000g	4,487	1,093 – 18,424	0,037

OR *odds ratio* IC intervalo de confiança

Controlando a variável ROI Basal no mesmo modelo anterior, observa-se que o corticosteroide desaparece como fator de proteção, mantendo-se o peso de nascimento como fator de risco independente, e o ROI aparece também como fator de risco, porém sem significância estatística OR 2,906 IC 95% 0,859 – 9,827 p=0,0862 (Tabela 12).

Tabela 12 – Modelo de regressão múltipla ajustada*

Variável	OR	IC 95%	p
ROI basal	2,906	0,859 – 9,827	0,086
Peso <1.000g	4,711	1,194 – 18,591	0,026

OR *odds ratio* IC intervalo de confiança

* controle: ROI



5.DISSCUSSÃO

O estudo envolveu a população de recém-nascidos de maior risco de desenvolvimento de HPIV, quer seja, os RNs pré-termo com peso ao nascer menor que 1.500 g. Adotamos o critério peso de nascimento como fator de inclusão no trabalho, pois, embora a prematuridade em si seja o fator principal de risco para a doença, visto que a matriz germinativa desaparece com o progresso da gestação para o termo, a definição da idade gestacional pode não ser exata devido às incertezas dos métodos de aferição.

Sabemos que, ao adotar o peso de nascimento como critério de inclusão, deixamos de incluir RNs com peso maior, mas igualmente, ou até mesmo mais imaturos, e, portanto, também de risco de apresentarem HPIV e que não seriam incluídos no trabalho. Redes de pesquisas estrangeiras e nacionais, como a Rede Vermont (*Vermont Oxford Network*) e a Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais, também adotam o peso de nascimento como critério de inclusão. Isso facilita a comparação de dados entre as diversas unidades (5-6;74).

O estudo conseguiu uma alta taxa de inclusão, aproximadamente 90% das crianças de muito baixo peso nascidas no período, tendo sido a taxa de HPIV nos pacientes não inclusos semelhante ao do grupo estudado, de forma que isso não influenciou os resultados da pesquisa.

Optamos pela realização de ultrassonografia cerebral nas primeiras horas vida, pois os fatores de risco perinatais e neonatais precoces são bastante importantes na origem da HPIV; além disso, a doença pode estar presente nas primeiras seis horas de vida. Tal fato foi demonstrado no estudo, pois quase a metade dos casos de hemorragia ocorreu até 24 horas de vida, inclusive com as formas graves da doença. Paneth *et al.* (75) encontraram dados semelhantes; em seu estudo, 34 a 44% dos casos de HPIV ocorreram no primeiro dia de vida, boa parte presente em ultrassonografias realizadas por volta de 4 horas de vida.

Além do aspecto diagnóstico, a realização de ultrassonografia precoce, efetuada de forma seriada, permitiu que selecionássemos mais adequadamente os fatores de riscos neonatais presentes em dado momento e estabelecêssemos sua relação com o diagnóstico da doença. Boa parte dos trabalhos que avaliaram os fatores de risco para a HPIV considerou a ocorrência da doença em até sete dias de vida, não sendo possível precisar qual fator realmente foi determinante na gênese da doença (76).

No tocante à análise dos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação estudados, observamos que a produção basal de radicais intermediários de oxigênio por leucócitos polimorfonucleares de cordão umbilical esteve significativamente aumentada nos RNs que

posteriormente desenvolveram HPIV, com um poder amostral elevado (87%). Tal fato implica que os leucócitos apresentavam um potencial de ativação importante já ao nascimento e poderiam participar de eventos relacionados a dano oxidativo.

Estudos demonstraram que, em RNs a termo, normais, a produção de ânions superóxidos por leucócitos polimorfonucleares de cordão foi significativamente maior quando o parto era vaginal, comparado com amostras de sangue de RNs cujas mães foram submetidas a parto cesárea, sem trabalho de parto. Isso sugere que a ativação leucocitária faz parte dos mecanismos da parturição e do processo de nascimento normais. Porém, no trabalho de parto prematuro, essa ativação leucocitária no feto poderia provocar dano celular tecidual, tanto pela intensidade da reação como pela imaturidade funcional (77-78).

O único estudo que avaliou a produção de RLs e doenças oxidativas do RN foi realizado por Perrone *et al.* (79). Os autores avaliaram a produção basal e estimulada de ânions superóxidos em 168 RNPT, de idade gestacional variando entre 24-32 semanas. Na avaliação em conjunto de doenças oxidativas neonatais relacionadas ao estresse oxidativo - HPIV, enterocolite necrosante, displasia broncopulmonar e retinopatia da prematuridade -, os autores não encontraram diferenças na produção de ânion superóxido por leucócitos de sangue umbilical. No entanto, os autores não comentam os dados em relação à HPIV isoladamente, pelo pequeno número de casos.

De modo interessante, Koenig *et al.* (80) demonstraram que leucócitos polimorfonucleares de cordão umbilical de RNs a termo provenientes de gestações sem intercorrências, sobreviventes por mais de 24 horas em cultura, ou seja, que não evoluíram para morte celular por apoptose natural, apresentaram produção de ROI mais intensa que células equivalentes de adultos, concluindo que a permanente produção de radicais livres de O₂ sugere que essas células poderiam ser potentes indutores de lesão tecidual. Strauss e Snyder (81) encontraram resultados semelhantes, com uma produção maior ou igual de ânions superóxidos por RNs a termo, comparados a sua mãe e a adultos controles. A maior produção foi tanto basal como estimulada; também foi maior a velocidade de ativação dos neutrófilos obtidos nas primeiras 24 horas de vida.

Embora tenhamos estudado a produção de RLs de oxigênio em leucócitos, outras linhagens celulares também podem gerar radicais livres. Zweier *et al.* (82) estudaram células endoteliais de aorta humana e demonstraram que tais células, quando submetidas a períodos de hipóxia seguidos por reoxigenação, tornam-se potentes geradoras de íons

superóxido, os quais, ao reagirem com o ferro presente no meio, produzem o radical hidroxil, bastante reativo e capaz de produzir morte celular. Fica assim, em aberto, a possibilidade de lesão do endotélio da matriz germinativa por radicais livres do oxigênio, produzidos localmente, provocando a rotura endotelial e a hemorragia.

Nesse sentido, Lackmann *et al.* (83) estudaram a concentração de enzimas antioxidantes relacionadas ao ferro em um grupo de RNs pré-termo asfisiados que posteriormente desenvolveram HPIV – sete RNs e dez controles. O sangue foi colhido dentro das primeiras 12 horas de vida, antes do aparecimento da HPIV. Os autores encontraram níveis mais baixos de enzimas antioxidantes relacionadas ao ferro - transferrina e ceruloplamina - e aumento da saturação de transferrina, o que, em conjunto, poderia provocar uma sobrecarga de ferro iônico. Estes achados sugerem que a peroxidação lípidica de membrana celular no cérebro, catalisada pelo ferro, durante a reoxigenação após a asfixia, poderia estar envolvida na patogênese da HPIV.

Chua *et al.* (84) submeteram filhotes pré-termo de coelho, não deprimidos, ao nascer, a um ambiente com 100% de oxigênio por uma hora, e induziram artificialmente o aparecimento de HPIV com injeção intraperitoneal de glicerofosfato. As taxas de HPIV no grupo exposto ao oxigênio e naquele em que os animais permaneceram em ar ambiente foram semelhantes; porém, no grupo que recebeu O₂ suplementar, houve aumento da expressão gênica de fatores responsáveis pela proliferação vascular da matriz germinativa e aumento da síntese de radicais livres. Os autores especulam que o uso de oxigênio a 100% por 1 hora não aumentou a incidência de HPIV, porém tal fato não pode ser extrapolado para RNs humanos. Além disso, a asfixia ao nascimento pode determinar outros componentes fisiopatogênicos não avaliados no estudo. Outro aspecto apontado pelos autores é que não se pode afirmar que a exposição contínua a altas concentrações do O₂ e aos RLs gerados não pode aumentar as chances de dano cerebral.

A produção estimulada de ROI não se mostrou diferente nos dois grupos. Tal fato leva-nos a argumentar que a produção do grupo que apresentou HPIV já estava no seu máximo, ou, como se trata de estimulação artificial *in vitro*, que isso talvez não reflita as complexas condições de estímulos biológicos *in vivo*. Em estudo realizado com leucócitos polimorfonucleares de RNs a termo, demonstrou-se que, após sua estimulação com N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, a geração de radicais superóxidos aumentou significativamente, mas não houve aumento suplementar

quando, ao meio de cultura, foi adicionado IL-10 ou dexametasona. Além disso, observa-se que as funções dos neutrófilos se alteram, à medida que migram da circulação para os tecidos (85-86).

Dois aspectos do estudo podem vir de encontro com esses resultados *in vitro*. O primeiro diz respeito ao efeito do uso do corticosteroide sobre a produção de radicais livres do oxigênio, uma vez que o uso antenatal de betametasona no estudo foi expressivo, tendo uma parcela significativa das mães recebido duas ou mais doses ou a forma completa do ciclo. Clinicamente, o uso antenatal de esteróides está associado à diminuição significativa da HPIV, e a supressão da produção de RLs do oxigênio poderia ser um dos seus mecanismos fisiopatológicos de proteção, embora não tenha sido possível demonstrá-lo, visto que a produção basal elevada de ROI não se mostrou um fator de risco independente para a doença, mesmo quando as variáveis relacionadas ao uso materno de betametasona foram retiradas da análise.

Outro aspecto refere-se à gravidade dos RNs englobados pelo estudo. O fato de o grupo com HPIV apresentar maiores valores de CRIB e SNAPPE implica maior gravidade clínica nas primeiras 12-24 horas de vida. Tais escores são indicativos de gravidade de doença em RNPT e eles têm sido associados ao risco de mortalidade e de ocorrências neonatais importantes como HPIV, doença pulmonar crônica e retinopatia da prematuridade (87).

O fato de se tratar de crianças com evolução clínica mais grave poderia implicar maior possibilidade de produção de estímulos oxidativos, tais como hipóxia, hipotensão arterial, necessidade de reanimação, uso de oxigênio suplementar, nutrição celular inadequada por falência circulatória, entre outros, de modo que seria possível que isso favorecesse uma estimulação *in vivo* da produção de RL maior do que aquela medida no estudo experimentalmente, ao nascimento.

Chien *et al.* (88), ao estudar uma coorte canadense de 3.778 RNPT, demonstraram que a incidência de HPIV grave aumentou significativamente com o aumento dos valores de SNAP II, escore semelhante ao utilizado no nosso estudo. Os autores apontam ainda que tais valores foram preditivos da ocorrência da doença, independentemente da idade gestacional e de outros fatores de risco perinatal. Damman *et al.* (89) demonstraram que os RNPT menores de 28 semanas de gestação que apresentavam os valores elevados de SNAPPE II nas primeiras 12 horas de vida tinham 1,5 vezes mais risco de desenvolver HPIV se os valores eram maiores que 45.

Guzmán Cabañas *et al.* (90) avaliaram dados de 10.009 RNs de muito baixo peso da Rede Neonatal Espanhola (*Red Neonatal Española SEN 1500*), observando que os valores da mediana do CRIB foram significativamente mais elevados nos RNs com HPIV grave - 6 versus 1 - $p < 0,001$ e RR 1,24 e IC 95% de 1,22 – 1,27. Em relação à sua capacidade diagnóstica, o CRIB foi um bom preditor de HPIV grave, com um valor de área sobre a curva ROC de 0,790, desempenho comparável à idade gestacional e melhor que o peso ao nascer, cujos valores de área sobre a curva foram de 0,735 e 0,802, respectivamente.

Em relação à glutatona, não se observou diferenças nos valores encontrados no sangue de cordão entre os grupos. Estudos demonstraram que, à medida que a gestação atinge o termo, os níveis sanguíneos do sistema antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, elevam-se gradativamente e agem como fator protetor para a hiperóxia relativa que se segue ao nascimento. Dessa forma, a baixa reserva do sistema antioxidante não enzimático ao nascimento prematuro expõe o RN a um maior risco de lesão oxidativa (38;91).

Como não houve diferença nos grupos quanto aos valores da glutatona, e como o grupo com HPIV apresentou maior produção de ROI e maior gravidade clínica posterior, talvez essa ausência na diferença na produção da enzima represente um risco, pois tais RNs não conseguiriam inativar uma maior produção de radicais livres diante de uma situação de estresse.

Embora no nosso estudo não tenhamos avaliado outros sistemas antioxidantes, Vento *et al.* (92) avaliaram o comportamento das enzimas antioxidantes em RNs pré-termo de idade gestacional ≤ 28 semanas e observaram que, no grupo que recebeu ciclo completo de corticoterapia antenatal, a taxa de HPIV grave foi significativamente menor quando comparada com o grupo que não recebeu nenhuma ou apenas uma dose. - 21,6% x 55,0%, $p < 0,01$. Além disso, o grupo que recebeu betametasona apresentou níveis mais elevados, em sangue de cordão e com 24 horas de vida, de catalase e superóxido-dismutase. Para as enzimas do sistema glutatona, os valores de sangue de cordão foram semelhantes nos grupos com e sem esteróide. Porém, os valores sanguíneos dessas enzimas se elevaram significativamente com 24 horas de vida no grupo que recebeu betametasona. De modo significativo, houve uma correlação positiva desses resultados para o sexo feminino, sugerindo ter este maior proteção contra a injúria oxidativa. Os autores sugerem, assim, que

os RNPT submetidos ao uso antenatal de betametasona são mais capazes de enfrentar com sucesso as consequências da exposição pós-natal às espécies reativas de oxigênio. Contudo, os autores não correlacionam os achados com os desfechos clínicos das crianças.

O baixo poder do teste para a glutatona encontrado no presente trabalho, no entanto, impede generalizações para um efeito protetor ou não.

Os níveis séricos de IL-6 não se mostraram diferentes nos grupos com e sem HPIV. Tal resultado poderia se justificar pela baixa incidência de corioamnionite clínica na população (8%), e não termos disponíveis os dados de avaliação anatomopatológica das placentas e membranas amnióticas. A forma clínica da corioamnionite constitui uma minoria dos casos de corioamnionite comprovada histologicamente ou por cultura de tecidos; além disso, o seu diagnóstico é bastante variável, dependente da interpretação da equipe obstétrica atendente (63).

Outro fator importante a ser observado é que o tratamento antimicrobiano efetivo prévio nas mães quando acometidas de processo infeccioso pode ter reduzido os níveis fetais das citocinas, uma vez que elas possuem meia-vida curta (93-95).

A incidência elevada de doença hipertensiva na amostra (46,4%), resultando em interrupção da gestação por essa causa, pode também explicar a falta de associação dos marcadores de inflamação e HPIV. Experimentalmente, Kauma *et al.* (96) demonstraram que a placenta de mulheres hipertensas produzia menores quantidades de IL-6 quando comparada com a placenta de gestantes normotensas. Ancel *et al.* (97), ao avaliarem as causas das interrupções das gestações prematuras, observaram que RNs filhos de mães hipertensas apresentaram menor risco de lesão cerebral grave - definida por HPIV graus III e IV e/ou leucomalácia periventricular cística - do que as crianças nascidas de trabalho de parto prematuro sem causa aparente ou após rotura precoce e prolongada de membranas, provavelmente porque o primeiro grupo estava menos exposto à infecção pré-natal.

E por fim, o uso de corticosteroide antenatal poder alterar a produção placentária de IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa, como demonstrado em cultura de células placentárias (98). Arad *et al.* (95) também mostraram que os níveis séricos em cordão umbilical de IL-6 eram significativamente diferentes de acordo com o uso materno de betametasona. Em nosso estudo houve índice expressivo de mães com uso antenatal de betametasona – 84%, que foi acima da média de uso de 64% no período de 2005 a 2008 (74).

Dados da literatura têm mostrado que a presença de níveis elevados de IL-6 no RN está associada ao desenvolvimento de HPIV (28-30;99).

A população estudada por Heep *et al.* (28) incluiu apenas os RNs abaixo de 28 semanas de gestação, os quais são os de maior risco de desenvolvimento de HPIV, tendo a coleta da IL-6 ocorrido nas primeiras 12 horas de vida, quando já poderia ter havido maior produção da citocina, caso a ativação inflamatória tivesse ocorrido imediatamente antes do nascimento. O trabalho de Tauscher *et al.* (29) evidenciou uma associação significativa dos níveis séricos da IL-6 e HPIV, mas os autores correlacionam a HPIV com dados de corioamnionite demonstrada histologicamente, cuja incidência é superior àquela da corioamnionite clínica.

No estudo desenvolvido por Kassal *et al.* (30), utilizou-se sangue de veia umbilical, mas a taxa de incidência de HPIV foi superior a do nosso trabalho – 22 casos em 69 RNs (32%). Nesse estudo, curiosamente, a mediana dos valores de IL-6 no grupo controle foi zero. Os autores comentam que um tamanho amostral de 65-70 sujeitos seria suficiente para se observar um efeito moderadamente grande da resposta inflamatória fetal no desenvolvimento de HPIV. No entanto, não houve cálculo do tamanho amostral.

Bhandari *et al.* (99), em estudo que envolveu 116 RNs pré-termo, com idade gestacional entre 23 e 34 semanas, encontraram uma taxa de HPIV de 25%. Os níveis de IL-6 em amostra de sangue de cordão umbilical foram significativamente mais elevados no grupo que desenvolveu HPIV – 12,4 pg/ml *versus* 201,2 pg/ml. Importante salientar que, no estudo, as dosagens foram feitas em pacientes selecionadas, aquelas onde havia suspeita obstétrica de corioamnionite, às quais, pelo protocolo do serviço, eram submetidas à amniocentese. Na avaliação final do estudo, ao se proceder a análise de regressão, utilizando as variáveis clínicas e fazer-se a correção para a idade gestacional, os níveis de IL-6 não foram preditivos, independentemente, da ocorrência de HPIV.

O fato de aproximadamente 65% dos RNs da pesquisa terem idade gestacional menor que 30 semanas não justifica os baixos valores de IL-6, pois a mediana no grupo de idade gestacional maior foi semelhante. No entanto, o baixo poder da amostra (5%) não permite extrapolar esses resultados. Provavelmente o número de casos não foi suficiente para avaliar essa resposta, uma vez que o cálculo amostral foi realizado considerando uma incidência de HPIV de 20%, quando na realidade ela foi de 12%.

No presente estudo, apenas as variáveis clínicas apareceram como fatores preditivos da ocorrência de HPIV. Mesmo sob análise controlada, os níveis de ROI permaneceram apenas como tendência de risco, sem significado estatístico. Os escores de gravidade (CRIB e SNAPPE II) permaneceram como fatores de risco independentes e o uso antenatal de duas ou mais doses de corticosteroide como fator protetor.

O uso antenatal de corticosteroide tem sido associado à redução da incidência de HPIV. Estudo caso-controle realizado no Brasil por Meneguel et al. (20) demonstrou efeito protetor do CAN na ocorrência de formas graves de HPIV – 12 x 33% com RR 0,28 e IC 95% de 0,10-0,77.

Em revisão sistemática, realizada por Roberts e Dalziel (56), sobre o uso antenatal de corticosteroide para aceleração da maturidade fetal em gestantes com risco de nascimento prematuro, foi observada uma redução significativa na incidência de HPIV, considerando-se todas as formas da doença - RR 0,54 IC 95% de 0,43-0,69 - com 13 estudos e 2.872 RNs, bem como na prevenção de formas graves - RR 0,28 IC 95% de 0,16-0,50 – com cinco estudos e 572 RNs. No entanto, a proteção não foi observada quando o nascimento ocorreu antes de 24 horas da administração da 1ª dose (RR 0,54 IC95% 0,21 – 1,36), tendo, porém, sendo observada quando o nascimento se deu antes de 48 horas da 1ª dose - RR 0,26 IC 95% 0,09 – 0,75.

A HPIV é uma doença multifatorial grave, devendo ser despendidos esforços a fim de que sejam esclarecidos mecanismos de sua origem, e que medidas de prevenção possam ser tomadas, garantindo uma sobrevivência livre de sequelas ao RN pré-termo. Acreditamos que o nosso trabalho tenha contribuído com uma pequena parcela nesse sentido, sendo necessária a realização de mais estudos para avaliar a relação dos mediadores de estresse oxidativo e da resposta inflamatória fetal no desenvolvimento da HPIV.



6- CONCLUSÕES

1- a produção basal de intermediários reativos do oxigênio em sangue de cordão umbilical foi estatisticamente mais elevada nos RNs que desenvolveram HPIV, porém, na análise múltipla, os níveis de ROI basal não se apresentaram estatisticamente como um fator de risco independente para HPIV.

2- Os níveis de glutathiona reduzida em sangue de cordão umbilical não se associaram à ocorrência de HPIV.

3- Os níveis de interleucina-6 em sangue de cordão umbilical não se associaram à ocorrência de HPIV.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitelaw A. Intraventricular haemorrhage and posthaemorrhagic hydrocephalus: pathogenesis, prevention and future interventions. *Semin Neonatol.* 2001 Apr;6(2):135-46.
2. Ment LR, Allan WC, Makuch RW, Vohr B. Grade 3 to 4 intraventricular hemorrhage and Bayley scores predict outcome. *Pediatrics.* 2005 Dec;116(6):1597-8.
3. Bassan H. Intracranial hemorrhage in the preterm infant: understanding it, preventing it. *Clin Perinatol.* 2009 Dec;36(4):737-62.
4. Volpe JJ. Intracranial hemorrhage: germinal matrix-intraventricular hemorrhage of the premature infant. In: Volpe JJ. *Neurology of the Newborn.* 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 517-88.
5. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR *et al.* Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Feb;196(2):147.e1-8.
6. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC *et al.* Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* 2010 Sep;126(3):443-56.
7. Marba ST, Caldas JP, Vinagre LE, Pessoto MA. Incidence of periventricular/intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants: a 15-year cohort study. *J Pediatr (Rio J).* 2011 Nov;87(6):505-11.
8. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatr Res.* 2010 Jan;67(1):1-8.

9. Ghazi-Birry HS, Brown WR, Moody DM, Challa VR, Block SM, Reboussin DM. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1997 Feb;18(2):219-29.
10. Anstrom JA, Brown WR, Moody DM, Thore CR, Challa VR, Block SM. Subependymal veins in premature neonates: implications for hemorrhage. *Pediatr Neurol.* 2004 Jan;30(1):46-53.
11. Folkert R. Germinal matrix hemorrhage:destroying the brain´s building blocks. *Brain.* 2011; 134:1261-3.
12. Pasternak JF, Groothuis DR, Fischer JM, Fischer DP. Regional cerebral blood flow in the newborn beagle pup: the germinal matrix is a "low-flow" structure. *Pediatr Res.* 1982 Jun;16(6):499-503.
13. Goddard-Finegold J, Michael LH. Cerebral blood flow and experimental intraventricular hemorrhage. *Pediatr Res.* 1984 Jan;18(1):7-11.
14. Ment LR, Stewart WB, Duncan CC. Beagle puppy model of intraventricular hemorrhage: ethamsylate studies. *Prostaglandins.* 1984 Feb;27(2):245-56.
15. Lou HC. On the pathogenesis of germinal layer hemorrhage in the neonate. *APMIS Suppl.* 1993;40:97-102.
16. Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip AG, Schneider K, Katz KH *et al.* Risk period for intraventricular hemorrhage of the preterm neonate is independent of gestational age. *Semin Perinatol.* 1993 Oct;17(5):338-41.

17. Kadri H, Mawla AA, Kazah J. The incidence, timing, and predisposing factors of germinal matrix and intraventricular hemorrhage (GMH/IVH) in preterm neonates. *Childs Nerv Syst.* 2006 Sep;22(9):1086-90.
18. Wells JT, Ment LR. Prevention of intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Early Hum Dev.* 1995 Aug 18;42(3):209-33.
19. Perlman JM. The relationship between systemic hemodynamic perturbations and periventricular-intraventricular hemorrhage- a historical perspective. *Semin Pediatr Neurol.* 2009 Dec;16(4):191-9.
20. Meneguel JF, Guinsburg R, Miyoshi MH, de Araujo Peres C, Russo RH, Kopelman BI *et al.* Antenatal treatment with corticosteroids for preterm neonates: impact on the incidence of respiratory distress syndrome and intra-hospital mortality. *Sao Paulo Med J.* 2003 Mar 5;121(2):45-52.
21. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Hemodynamic and antecedent risk factors of early and late periventricular/intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics.* 2003 Jul;112(1 Pt 1):33-9.
22. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res.* 1997 Jul;42(1):1-8.
23. de Felice C, Toti P, Laurini RN, Stumpo M, Picciolini E, Todros T *et al.* Early neonatal brain injury in histologic chorioamnionitis. *J Pediatr.* 2001 Jan;138(1):101-4.

24. Ogunyemi D, Murillo M, Jackson U, Hunter N, Alperson B. The relationship between placental histopathology findings and perinatal outcome in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003 Feb;13(2):102-9.
25. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD e tal. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol.* 1996 Jan;64(1):37-43.
26. Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 2000 Jan;10(1):113-26.
27. Lee HC, Lyndon A, Blumenfeld YJ, Dudley A, Gould JB. Antenatal steroid administration for premature neonates in California. *Obstet Gynecol* 2011;117:603–9.
28. Heep A, Behrendt D, Nitsch P, Fimmers R, Bartmann P, Dembinski J. Increased serum levels of interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003 Nov;88(6):F501-4.
29. Tauscher MK, Berg D, Brockmann M, Seidenspinner S, Speer CP, Groneck P. Association of histologic chorioamnionitis, increased levels of cord blood cytokines, and intracerebral hemorrhage in preterm neonates. *Biol Neonate.* 2003;83(3):166-70.
30. Kassal R, Anwar M, Kashlan F, Smulian J, Hiatt M, Hegyi T. *Brain Dev.* 2005 Oct;27(7):483-7. Umbilical vein interleukin-6 levels in very low birth weight infants developing intraventricular hemorrhage.

31. Thannickal VJ. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 May;40(5):507-10.
32. Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Oct;23 Suppl 3:63-5.
33. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007. p.1-29..
34. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
35. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn-a 30-year perspective. *Biol Neonate.* 2005;88(3):228-36.
36. Berger HM, Molicki JS, Moison RMW, van Zoeren-Grobbe D. Extracellular defence against stress in the newborn. *Semin Neonatol.* 1998; 3:183-90.
37. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010 Aug;15(4):186-90.
38. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010 Aug;15(4):191-5.
39. Saugstad OD. Therapy in free radical disease in the newborn. *Curr Obstet Gynecol.* 2000; 10:103-8.

40. Folkerth RD. Neuropathologic substrate of cerebral palsy. *J Child Neurol.* 2005 Dec;20(12):940-9.
41. Huertas JR, Palomino N, Ochoa JJ, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Battino M *et al.* Lipid peroxidation and antioxidants in erythrocyte membranes of full-term and preterm newborns. *Biofactors.* 1998;8(1-2):133-7.
42. Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev.* 2001 Nov;65 Suppl:S75-81.
43. Rook D, Te Braake FW, Schierbeek H, Longini M, Buonocore G, Van Goudoever JB. Glutathione synthesis rates in early postnatal life. *Pediatr Res.* 2010 Apr;67(4):407-11.
44. Kelly FJ. Free radical disorders of preterm infants. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):668-78.
45. Rodrigues FPM. Estresse oxidativo e patologías neonatais: análise da peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total do plasma e atividade da superóxido-dismutase e glutathione-peroxidase no eritrócito de recém-nascidos a termo e prematuros [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2000.
46. O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Feb;6(1):169-76.
47. Dani C, Cecchi A, Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* 2004 Aug;56(4):381-94.

48. Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *NeoReviews*. 2007; 8 (12): e522-31.
49. Ment LR, Stewart WB, Duncan CC. Beagle puppy model of intraventricular hemorrhage. Effect of superoxide dismutase on cerebral blood flow and prostaglandins. *J Neurosurg*. 1985 Apr;62(4):563-9.
50. Ment LR, Stewart WB, Ardito TA, Huang E, Madri JA. Indomethacin promotes germinal matrix microvessel maturation in the newborn beagle pup. *Stroke*. 1992 Aug;23(8):1132-7.
51. Chiswick ML, Johnson M, Woodhall C, Gowland M, Davies J, Toner N *et al*. Protective effect of vitamin E (DL-alpha-tocopherol) against intraventricular haemorrhage in premature babies. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Jul 9;287(6385):81-4.
52. Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD003665.
53. Drury JA, Nycyk JA, Baines M, Cooke RW. Does total antioxidant status relate to outcome in very preterm infants? *Clin Sci (Lond)*. 1998 Feb;94(2):197-201.
54. Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000 Jun;154(6):544-8.

55. Miracle X, Di Renzo GC, Stark A, Fanaroff A, Carbonell-Estrany X, Saling E. Guideline for the use of antenatal corticosteroids for fetal maturation. *J Perinat Med.* 2008;36(3):191-6.
56. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2006 Issue 3, Art No CD004454.
57. Dandona P, Thusu K, Hafeez R, Abdel-Rahman E, Chaudhuri A. Effect of hydrocortisone on oxygen free radical generation by mononuclear cells. *Metabolism.* 1998 Jul;47(7):788-91.
58. Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH. Antenatal betamethasone changes cord blood monocyte responses to endotoxin in preterm lambs. *Pediatr Res.* 2004 May;55(5):764-8.
59. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. *Pediatr Res.* 2004 Jul;56(1):117-24.
60. Vinukonda G, Dummula K, Malik S, Hu F, Thompson CI, Csiszar A, Ungvari Z, Ballabh P. Effect of prenatal glucocorticoids on cerebral vasculature of the developing brain. *Stroke.* 2010 Aug;41(8):1766-73.
61. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1.500 gm. *J Pediatr.* 1978 Apr;92(4):529-34.

62. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion No. 402: Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Obstet Gynecol.* 2008 Mar;111(3):805-7.
63. Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis: important factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology.* 2011;99:177-87.
64. World Health Organization – Health Bulletin [homepage on the Internet]. Basel, Switzerland: World Health Organization; c2005. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/annexes-pr-pdf>. Acesso em 21.08.2005.
65. Ballard, J.K.; Khoury, J.C. Wedig, K.; Eilers-Walsmon, B.L.; Lipp, R. New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991; 119(3): 417-23.
66. Apgar, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg*, 32: 260-7, 1953.
67. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States National Reference for Fetal Growth. *Obst & Gynecol* 1996;87:163-16.
68. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organs dysfunctions in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, 6(1): 2-8, 2005.
69. The International Neonatal Network. The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. *Lancet.* 1993 Jul 24;342(8865):193-8.

70. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001 Jan;138(1):92-100.
71. Beutler, E (Ed). *Red Cell Metabolism*. New York: Churchill Livingstone, 1986. 126 p.
72. Penna SP. Níveis de glutatona reduzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio [Dissertação - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;1995.
73. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 1998 Oct 1;219(1-2):187-93.
74. Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais. [homepage na Internet]. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.redeneonatal.fiocruz.br>. Acesso em 15/10/2011.
75. Paneth N, Pinto-Martin J, Gardiner J, Wallenstein S, Katsikiotis V, Hegyi T *et al.* Incidence and timing of germinal matrix/intraventricular hemorrhage in low birth weight infants. *Am J Epidemiol.* 1993 Jun 1;137(11):1167-76.
76. Gleissner M, Jorch G, Avenarius S. Risk factors for intraventricular hemorrhage in a birth cohort of 3721 premature infants. *J Perinat Med.* 2000;28(2):104-10.

77. Ambruso DR, Stork LC, Gibson BE, Thurman GW. Increased activity of the respiratory burst in cord blood neutrophils: kinetics of the NADPH oxidase enzyme system in subcellular fractions. *Pediatr Res.* 1987 Feb;21(2):205-10.
78. Buonocore G, Gioia D, De Filippo M, Picciolini E, Bracci R. Superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes in whole blood of newborns and mothers during the peripartal period. *Pediatr Res.* 1994 Nov;36(5):619-22.
79. Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Longini M, Marzocchi B, Proietti F *et al.* Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Hum Dev.* 2010 Apr;86(4):241-4.
80. Koenig JM, Stegner JJ, Schmeck AC, Saxonhouse MA, Kenigsberg LE. Neonatal neutrophils with prolonged survival exhibit enhanced inflammatory and cytotoxic responsiveness. *Pediatr Res.* 2005; 57: 424–429.
81. Strauss RG, Snyder EL. Activation and activity of the superoxide-generating system of neutrophils from human infants. *Pediatr Res.* 1983; 17:662-4.
82. Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem.* 1994 Sep 30; 269(39): 24156-162.
83. Lackmann GM, Hesse L, Töllner U. Reduced iron-associated antioxidants in premature newborns suffering intracerebral hemorrhage. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):407-9.

84. Chua CO, Vinukonda G, Hu F, Labinskyy N, Zia MT, Pinto J *et al.* Effect of hyperoxic resuscitation on propensity of germinal matrix haemorrhage and cerebral injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010 Aug;36(5):448-58.
85. Citarella BV, Miskolci V, Vancurova I, Davidson D. Interleukin-10 versus dexamethasone: effects on polymorphonuclear leukocyte functions of the newborn. *Pediatr Res.* 2009 Apr;65(4):425-9.
86. Coldren CD, Nick JA, Poch KR, Woolum MD, Fouty BW, O'Brien JM, *et al.* Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Dec;291(6):L1267-76.
87. Pollack MM, Koch MA, Bartel DA, Rapoport I, Dhanireddy R, El-Mohandes AA, Harkavy K, Subramanian KN. A comparison of neonatal mortality risk prediction models in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000 May;105(5):1051-7
88. Chien LY, Whyte R, Thiessen P, Walker R, Brabyn D, Lee SK; Canadian Neonatal Network. Snap-II predicts severe intraventricular hemorrhage and chronic lung disease in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol.* 2002 Jan;22(1):26-30.
89. Dammann O, Naples M, Bednarek F, Shah B, Kuban KC, O'Shea TM *et al.* SNAP-II and SNAPPE-II and the risk of structural and functional brain disorders in extremely low gestational age newborns: the ELGAN study. *Neonatology.* 2010;97(2):71-82.
90. Guzmán Cabañas JM, Párraga Quiles MJ, del Prado N, Ruíz MD, García Del Río M, Benito Zaballo F *et al.* Análisis de la utilidad del Clinical Risk Index for Babies por estratos de peso como predictor de muerte hospitalaria y de hemorragia intraventricular grave en la Red Neonatal Española SEN 1.500. *An Pediatr (Barc).* 2009 Aug;71(2):117-27.

91. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Jul;189(1):181-8.
92. Vento M, Aguar M, Escobar J, Arduini A, Escrig R, Brugada M *et al.* Antenatal steroids and antioxidant enzyme activity in preterm infants: influence of gender and timing. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(12):2945-55.
93. Procianoy RS, Silveira RC. The role of sample collection timing on interleukin-6 levels in early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 2004 Sep-Oct;80(5):407-10.
94. Lam H, Ng PC. Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology.* 2008; 40(2):141–8.
95. Arad I, Bar-Oz B, Ergaz Z, Nir A, Barak V. Interleukin-6 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide cord blood levels in premature infants: correlations with perinatal variables. *Isr Med Assoc J.* 2010 Jul;12(7):419-23.
96. Kauma SW, Wang Y, Walsh SW Preeclampsia is associated with decreased placental interleukin-6 production. *J Soc Gynecol Investig.* 1995 Jul-Aug;2(4):614-7.
97. Ancel PY, Marret S, Larroque B, Arnaud C, Zupan-Simunek V, Voyer M *et al.* Are maternal hypertension and small-for-gestational age risk factors for severe intraventricular hemorrhage and cystic periventricular leukomalacia? Results of the EPIPAGE cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Jul;193(1):178-84.

98. Xu B, Makris A, Thornton C, Hennessy A. Glucocorticoids inhibit placental cytokines from cultured normal and preeclamptic placental explants. *Placenta*. 2005 Sep-Oct;26(8-9):654-60.
99. Bhandari V, Buhimschi CS, Han CS, Lee SY, Pettker CM, Campbell KH, *et al.* Cord blood erythropoietin and interleukin-6 for prediction of intraventricular hemorrhage in the preterm neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 May;24(5):673-9.



8- ANEXOS

ANEXO 1

DOSAGEM DE INTERLEUCINA-6

As amostras colhidas em frascos secos contendo oxalato de silício foram submetidas a 10 minutos de centrifugação a 2.200 rpm. O soro obtido foi congelado a -80°C até a realização do ensaio pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA (Duo Set, R & D Systems, EUA).

Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, com amostras e diluições do padrão recombinante do Kit. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção da amostra, conjugados à biotina. A incubação ocorreu com uma solução de estreptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e tendo havido a parada com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita em 450nm.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão, com gráfico de dispersão, na qual a variável X foi a densidade óptica obtida nas leituras e Y, a concentração das citocinas. A equação da figura foi adquirida através de uma linha de tendência polinomial, que só foi aceita se r^2 for maior que 0,95 no programa Microsoft Excel versão 2003 (Microsoft Corporation, EUA).

ANEXO 2

DOSAGEM DE GLUTATIONA ⁽⁷¹⁻⁷²⁾

Reagentes necessários:

- Ácido metafosfórico:

Sigma, n° de catálogo: M6288

Ácido metafosfórico.....1,67g

Água destilada qsp.....100ml

A solução é válida por, no máximo, 20 dias. Manter protegido da luz.

- Solução de citrato de sódio:

Citrato de sódio.....1g

Água destilada qsp.....100ml

- 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) DTNB:

Sigma, n° de catálogo: D8130

DTNB.....20mg

Solução de citrato de sódio qsp.....100ml

- Solução de Na₂HPO₄ 0,3M:

Na₂HPO₄.....2,13g

Água destilada qsp.....50ml

Procedimento:

Coleta-se 1ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante EDTA para a realização do ensaio.

Em um tubo de poliestireno colocar 1,8ml de água ultra-pura gelada. Em seguida, adicionar 0,2ml de sangue total e 2ml de ácido metafosfórico. Homogeneizar por inversão, aguardar cinco minutos para que a amostra precipite e filtrar em novo tubo cônico com papel de filtro Whatman n° 1, de diâmetro de 125 mm. Aliquotar 1ml do filtrado em outro tubo e adicionar 4ml de Na₂HPO₄. Posteriormente transferir 1ml deste preparado para duas cubetas, adicionando a uma delas 100uL de DTNB. Preparar o controle negativo (branco) com 0,5ml de ácido metafosfórico e 1,25ml de água ultra-pura. Colocar 1 ml desta solução em outro tubo cônico e adicionar 4ml de Na₂HPO₄. Colocar 1ml desta solução em duas cubetas, adicionando a uma delas 100uL de DTNB. As soluções de branco são usadas para

zerar o espectrofotômetro. Analisar as absorvâncias das quatro amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412nm.

Cálculo:

DO1: Densidade óptica da solução do paciente sem a adição de DTNB

DO2: Densidade óptica da solução do paciente com a adição de DTNB

$$\% \text{ Glutathiona mg} = \frac{(DO2 - DO1) \times 31040}{\text{Hematócrito}}$$

ANEXO 3

DOSAGEM DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO POR CITOMETRIA DE FLUXO ⁽⁷³⁾

Reagentes necessários:

- Phorbol-12-myristate-13- acetate (PMA)

Solução estoque: concentração 1mg/ml, diluída em etanol ou DMSO. Manter congelada a -80°C.

- Dihydrorodamine (DHR)

Solução estoque: concentração 1mg/ml, diluída em N,N dimetilformamida ou DMSO.

Manter congelada a -20°C.

- PBS

NaCl.....8g

Na₂HPO₄.....1,15g

KH₂PO₄.....0,2g

KCl.....0,2g

Água destilada qsp.....1L

- Solução de lise de hemácias

NH₄Cl.....8,2g

KHCO₃.....1g

EDTA 4Na.....37mg

Água destilada qsp.....1L

- Solução de lavagem

Azida sódica.....0,1g

Soro fetal bovino inativado.....1ml

PBS qsp.....100ml

Procedimento:

Foi coletado 1ml de sangue em tubo com EDTA para a realização do ensaio. Todas as etapas de adição de reagentes foram realizadas em gelo. Em quatro tubos cônicos próprios à citometria de fluxo (poliestireno com capacidade de 5ml), pipetar 100uL de sangue total homogeneizado. A seguir, preparar a solução de uso de PMA (10µg/ml) a partir da solução estoque na concentração 1mg/ml, diluindo 5uL da solução estoque em 495uL de PBS.

Adicionar 1, 2 ou 4 μL desta solução de PMA aos tubos. O quarto tubo será o controle negativo de estímulo, sem a adição de PMA. Após agitação em vórtex, incubar a 37°C por 10 minutos em banho-maria.

Em seguida, preparar a solução de uso de di-hidro-rodamina ($10\mu\text{g/ml}$) a partir da solução estoque na concentração 1mg/ml , diluindo 5 μL da solução estoque em 495 μL de PBS. Adicionar 2 μL desta solução a cada tubo cônico, agitando em vórtex. Incubar a 37°C por 5 minutos em banho-maria.

Após a incubação, lavar uma vez em PBS, centrifugando por 5 minutos a 2200 rpm. Descartar o sobrenadante, usando pipeta Pasteur. Ressuspender as células com agitação manual leve. Adicionar 3 a 4 ml de solução de lise e incubar a 37°C por 7 minutos em banho-maria. Em seguida, centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm. Descartar novamente o sobrenadante, agitar em vórtex e ressuspender as células em 0,5ml de tampão de lavagem fazer leitura por citometria de fluxo.

ANEXO 4

FICHA DE COLETA DE DADOS

Número do caso

Nome da mãe HC

Nome do RN HC

Data nasc.: / / horário

Dados da Mãe

Idade escolaridade paridade

Ant. prematuridade () sim () não () nsa

HAC () sim () não duração:

DHEG () sim () não duração:

Hellp síndrome: () sim () não duração.....

Eclâmpsia: () sim () não

ITU () sim () não época: Uro

Outra doença:

Corticóide antenatal sim () não () tipo:

nº de doses: tempo última dose em relação ao parto em horas:

Dados do Parto

Trabalho de parto () não () sim Duração do TP.....

Tempo de bolsa rota () intraparto duração.....horas

Aspecto líquido claro () meconial () hemorrágico () purulento ()

Febre anteparto () sim () não

Taquicardia materna () sim () não taquicardia fetal () sim () não

Hemograma anteparto Leuc /ml (%B- % segm) () NSA

Estreptococo b - triagem () positivo () negativo () não possui

Antibiótico periparto () sim () não

Tipo: duração anteparto:

Corioamnionite () () não

Sangramento () DPP () PP () outro () não

Gemelaridade () sim () não

Monitorização

BCF () normal () alterado (bradi/taquicardia sustentada)

Dopplerfluxometria () normal () alterada:() AU () VU() ACM () DV

Apresentação () cefálica () pélvica

Parto () vaginal () cesárea

Indicação da cesárea

() SFA () SFC reagudizado () Mal controle pressórico mãe () scto materno ()
pélvico+primigesta () iterativa

Anestesia () locorregional () epidural () raqui () geral () sem

Dados do RN

Peso g PC cm

Sexo () masculino () feminino () indeterminado

IG amenorréia eco precoce NB Capurro

Apgar 1º min 5º min 10º min

Reanimação () sim () não () nsa

Tipo reanimação () nsa () O₂ inal () BM VPP () TOT VPP

() droga

Tempo reanimação () nsa

Micro-hematócrito cordão

Estado nutricional () AIG () PIG

Morbidade na internação

Choque () sim () não

Assistência respiratória

() sim () não

Tipo de Assistência respiratória

() capuz () CPAP () VM

Surfactante () sim () não () nsa () mais de uma dose

() tempo vida 1ª dose

Pneumotórax () sim () não

Hipernatremia () sim () não () nsa

Sepse () sim () não

Hemo positiva hemo negativa

Punção lombar () sim () não

Menigite () sim () não

PCR: md/dl

CRIB:

SNAPPE II:

ALTA

() casa () óbito () transferência

Data da alta

Idade dias IG corrigida

Peso g PC

ULTRASSONOGRRAFIA

6 horas de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

12 horas de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

24 horas de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

72 horas de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

7 dias de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

28 dias de vida

Resultado () sem HPIV () HPIV grau

MEDIADORES BIOQUÍMICOS

- Intermediários reativos do oxigênio - ROI basal:
- Intermediários reativos do oxigênio - ROI estimulado:
- Glutathiona reduzida:
- IL-6:

ANEXO 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: Correlação dos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no sangue de cordão umbilical e hemorragia peri e intraventricular precoce em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso

Parabéns pelo nascimento do seu filho. Estamos realizando uma pesquisa com o intuito de investigar o porquê algumas crianças muito prematuras ou de muito baixo peso apresentam hemorragia cerebral nos primeiros dias de vida. Isso pode trazer repercussão para a vida atual e futura do bebê.

Por isso, solicitamos da Sra a autorização para realizar alguns exames no sangue do cordão umbilical do seu bebê. A amostra de sangue será colhida da placenta e portanto não será necessário pegar uma veia do recém-nascido e além disso, normalmente, depois do parto, a placenta é desprezada. Sei que não se concordar isso não mudará em nada o tratamento dado a meu filho na UTI onde ele está internado. Fico ciente também que esses exames não terão o resultado liberado até a alta do meu bebê e nem receberei nenhuma remuneração financeira pela participação.

Os exames a serem feitos após minha autorização são: dosagem de intermediários reativos do oxigênio, intermediários reativos do oxigênio, de glutathione reduzida e de interleucina-6.

Ainda com a finalidade de investigar se meu bebê tem a hemorragia fui informada que serão realizados exames de ultrassonografia cerebral em vários momentos nos primeiros sete dias de vida e na própria incubadora/berço que ele se encontra e que tal exame não oferece risco ao meu filho.

Fui informada que as informações tomadas serão mantidas em sigilo pelo pesquisador responsável e que em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para o doutor Jamil Pedro de Siqueira Caldas nos números 3521-9324 ou 3521-9307.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Jamil Pedro de Siqueira Caldas CRM 67105

Mãe ou responsável do recém-nascido

ANEXO 6 - Artigo submetido ao Jornal de Pediatria e aceito, conforme mensagem do editor em anexo e em processo de publicação

Artigo original – Data de submissão: 18.08.11 - Data de aceite: 11.10.11

Página de rosto

a- Título: Uso materno antenatal de corticosteroide e marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso

b- Título abreviado: Betametasona materna e estresse oxidativo neonatal.

c- Autores Jamil P.S. Caldas, Maria M S Vilela, Carolina A. Braghini, Tais N. Mazzola, Sérgio T.M. Marba.

d- Jamil P.S. Caldas - Neonatologista - Mestre em Pediatria pela FCM-UNICAMP – médico assistente do Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP. jamil_pedro@uol.com.br. Autor do estudo, coleta de dados.

Maria M. S. Vilela - Professora titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). marluce@fcm.unicamp.br. Revisão do texto.

Carolina A. Braghini – bióloga – mestranda em Genética e Biologia Molecular pelo Instituto de Biologia – UNICAMP. ca.ayumi@gmail.com. Elaboração dos exames laboratoriais.

Taís N. Mazzola – bióloga – mestre em Saúde da Criança e do Adolescente – UNICAMP. tanmazzola@yahoo.com.br. Elaboração dos exames laboratoriais.

Sérgio T.M. Marba - Professor Livre-docente do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). sergiomarba@yahoo.com.br. Revisão do texto.

e- Jamil P.S. Caldas - jamil_pedro@uol.com.br.

Maria M.S. Vilela - marluce@fcm.unicamp.br.

Carolina A. Braghini - ca.ayumi@gmail.com

Taís Mazzola - tanmazzola@yahoo.com.br.

Sérgio T.M. Marba - sergiomarba@yahoo.com.br.

f- Todos os autores possuem currículo na plataforma Lattes do CNPq.

g- Jamil P.S. Caldas - Autor do estudo, coleta de dados e elaboração do texto. Doutorando no programa de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Sérgio T.M. Marba - Orientador de tese de doutorado e revisão do texto.

Maria M.S. Vilela – Co-orientadora de tese de doutorado e revisão do texto.

Carolina A. Braghini – realização dos testes laboratoriais.

Taís Mazzola – realização dos testes laboratoriais.

h- Declaração de conflito de interesse: nada a declarar.

i- Instituição - Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP e Centro de Investigação e Pesquisas em Pediatria (CIPED) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

k- Contato – Jamil Pedro de Siqueira Caldas – Rua Major Luciano Teixeira, 31 apto 62 – Bonfim – Campinas – SP – CEP 13070-746. e-mail Jamil_pedro@uol.com.br.

l- Fonte financiadora – FAPESP projeto nº 08/57405-4

m- Contagem total de palavras do texto: 3929

n-Contagem total de palavras do resumo: 248

o- número de tabelas: 3

Uso materno antenatal de corticosteroide e marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso

Resumo

Objetivo: avaliar a associação entre o uso materno antenatal de corticosteroide e os níveis sanguíneos de radicais intermediários de oxigênio (ROI), glutatona reduzida (GR) e interleucina-6 (IL-6) em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.

Metodologia: estudo de coorte. A dosagem foi realizada em sangue de cordão umbilical. A dosagem de ROI por granulócitos foi por citometria de fluxo no estado basal e estimulado; a glutatona por espectrofotometria e a interleucina-6 por *Enzyme Linked Immuno Sorbent*

Assay. Foram considerados dois grupos em relação ao uso de corticosteroide (betametasona) antenatal: uso ou não da medicação e, se presente, se foi de modo completo ou parcial. Variáveis maternas e neonatais foram consideradas para efeito de comparação dos grupos. As variáveis categóricas foram comparadas usando os testes de qui-quadrado ou Fischer e as comparações dos valores dos marcadores sanguíneos foram feitas usando-se o teste de Mann-Whitney.

Resultados: os grupos de corticoterapia foram comparáveis em relação às variáveis maternas e neonatais, exceto a ocorrência de parto vaginal, o qual foi associado significativamente à ausência de uso de corticosteroide antenatal. Os valores de ROI, GR e IL-6 não se mostraram diferentes quando se avaliou a presença ou ausência da administração de esteroide, porém quando o ciclo se fez de modo completo, encontrou-se menores medianas de ROI e IL-6.

Conclusão: a administração de ciclo completo de betametasona à mãe exerceu um efeito supressor sobre a produção basal de ROI e de IL-6 em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso.

Descritores: recém-nascido, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, interleucina-6, glutathione

Keywords: Newborn, oxidative stress, reactive oxygen species, interleukin-6, glutathione

Introdução

O uso antenatal de corticosteroide é uma terapia efetiva e recomendada para gestantes com risco de trabalho de parto prematuro antes de 34 semanas de gestação para amadurecimento pulmonar fetal¹. Revisões sistemáticas demonstraram que o seu uso está associado com uma redução global da morte neonatal, menor risco de desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório, diminuição do risco de enterocolite necrosante e de

hemorragia periintra-ventricular. Além disso, o uso da medicação não aumenta o risco materno de corioamnionite ou de sepse puerperal^{2,3}.

Os mecanismos pelos quais os esteroides exercem essa função protetora no feto/recém-nascido são múltiplos, tanto anatômicos como relacionados à influência sobre sistemas enzimáticos. Um dos efeitos do medicamento é sobre a produção de radicais livres.

Os recém-nascidos, especialmente os pré-termo, são altamente suscetíveis a lesões teciduais e orgânicas por radicais livres, notadamente aqueles derivados do oxigênio, sendo o ânion superóxido o mais importante dos radicais intermediários (ROI) de oxigênio e produzidos em respostas a estímulos hipoxico-isquêmicos ou inflamatórios^{4,5}. Além disso, a gestação em si é um estado fisiológico com aumento da demanda metabólica e aumento das necessidades de oxigênio tecidual e, na eventualidade de anormalidades da gestação, pode ocorrer desbalanço oxidativo e o excesso de radicais livres pode promover dano ao feto, os quais já possuem um sistema de defesa antioxidante deficitário⁶. Neste aspecto, é importante ressaltar que o principal componente antioxidante intracelular, a glutathiona, só apresenta a sua máxima produção no final da gestação⁷.

A ação de corticosteroides sobre a produção de espécies reativas de oxigênio tem sido demonstrada em vários trabalhos experimentais. Dandona *et al.*⁸ demonstraram, em indivíduos adultos, que uma injeção única de hidrocortisona foi suficiente para provocar a diminuição significativa da produção de radicais livres derivados do O₂, alcançando um valor mínimo com 2 e 8 horas, e retorno ao normal em 24 horas após a administração.

Trabalho realizado em recém-nascidos pré-termo de ovelhas que receberam betametasona no período antenatal demonstrou que o esteroide promoveu redução da produção de peróxido de hidrogênio, da interleucina-6 (IL-6) e da capacidade de fagocitose. Tais efeitos foram tempo-dependente e, ao final de sete dias após a aplicação, já não mais ocorriam⁹.

Também tem sido demonstrado nas últimas duas décadas que existe uma relação estreita entre os mediadores do estresse oxidativo e os marcadores bioquímicos de

inflamação, como as interleucinas, e observando-se uma ação recíproca de indução de síntese de radicais livres e mediadores inflamatórios^{5,10}.

No entanto, o efeito de esteroides administrados à mãe na produção de radicais intermediários do oxigênio por leucócitos polimorfonucleares fetais não foi ainda estudado em seres humanos. A melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ação do corticosteroide antenatal é importante no estabelecimento de alvos em potencial para redução ou mesmo prevenção das conseqüências danosas da ação dos radicais livres¹¹.

Deste modo, o objetivo do estudo foi de avaliar a associação entre o uso materno antenatal de corticosteroide e os níveis sanguíneos de radicais intermediários de oxigênio, glutathiona reduzida (GR) e interleucina-6 em recém-nascido pré-termo de muito baixo peso ao nascer.

Metodologia

Estudo de coorte. Foram selecionados todos os recém-nascidos vivos pré-termo com peso de nascimento menor que 1.500 g, nascidos em um centro terciário de atenção neonatal, no período de maio de 2009 a outubro de 2010. Não houve critérios de exclusão para o estudo.

Trata-se de estudo secundário, com coleta de sangue originalmente destinada a projeto de estudo da associação de hemorragia periintraventricular e produção de radicais livres e inflamação intra-uterina. O tamanho da amostra inicial foi de 125 RNs, considerando um poder amostral de 80%. Assim, no presente estudo, foi calculado, posteriormente, o poder da amostra para verificar se o número de RNs foi suficiente para responder ao desfecho proposto.

A coleta de sangue de cordão umbilical foi efetuada no momento do parto, após o nascimento do RN e antes da dequitação da placenta, por punção dos vasos umbilicais, constituindo-se em amostra mista, arterial e venosa. A seguir o material foi distribuído em três frascos, sendo dois com anticoagulante e um tubo seco. As amostras foram encaminhadas imediatamente a um laboratório especializado da instituição para pronto

processamento. Para a dosagem de IL-6 o soro obtido foi congelado a -80°C até a realização do ensaio pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA - *Duo Set*, R & D Systems, EUA. Os resultados foram expressos em pg/ml. A concentração de glutatona reduzida nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria através do método de Beutler *et al.*¹², modificado por Penna¹³ e valores expressos em mg% em relação ao hematócrito. A concentração de radicais intermediários do oxigênio pelos granulócitos foi determinada por citometria de fluxo em amostra de sangue total colhidos em frascos contendo EDTA¹⁴. De cada paciente estudou-se a liberação do ROI pelos polimorfonucleares de duas formas, uma espontânea (ou basal), com os leucócitos incubados apenas em solução de Hanks e outra estimulada, sendo os leucócitos incubados com forbol-miristato acetato. Os resultados foram expressos em nmol de superóxido/ 10^6 células/tempo de incubação.

As características maternas e do RN e as dosagens bioquímicas foram agrupados de acordo com o uso materno de corticosteroide.

Corticoterapia antenatal (CAN) foi definida como o uso de corticosteroide sistêmico (betametasona) pela mãe durante a gestação com a finalidade de aceleração da maturidade fetal. Primeiramente se avaliou o uso ou não do medicamento, independentemente do tempo de uso e do número de doses, e, assim, avaliaram-se dois grupos: “CAN sim” se a mãe recebeu a medicação e “CAN não” se ela não a recebeu. O ciclo completo foi definido quando a gestante recebeu duas doses de 12 mg de betametasona com intervalos de 24 horas e o nascimento da criança ocorreu pelo menos 24 horas após a segunda dose do medicamento, e o ciclo incompleto quando a mãe recebeu as duas doses, porém o parto ocorreu em menos de 24 horas após a segunda dose de betametasona. Deste modo, as mães que receberam apenas uma dose de betametasona foram avaliadas apenas no primeiro agrupamento.

Considerou-se sete dias como o tempo máximo entre a administração do esteroide e o nascimento.

Para efeito de comparação entre os grupos de corticoterapia foram obtidas as seguintes variáveis maternas: idade, doença hipertensiva (específica da gestação e/ou crônica), eclâmpsia, diabetes mellitus, trabalho de parto, tipo de parto, apresentação fetal,

sofrimento fetal agudo, corioamnionite clínica e infecção materna periparto. A corioamnionite clínica foi definida como a presença de febre materna anteparto, sem outro motivo aparente, associada a um dos seguintes sinais: útero sensível ao toque, taquicardia materna e/ou fetal, fisometria, leucocitose¹⁵. A infecção materna periparto foi caracterizada como a presença de quadro infeccioso sistêmico na mãe 48-72 horas antes do nascimento (infecção do trato urinário, pneumonia ou sepse).

Do recém-nascido foram obtidas as variáveis: peso ao nascer, idade gestacional, estado nutricional¹⁶, sexo, valores de Apgar de 1º e 5º minuto e necessidade de reanimação em sala de parto.

A distribuição das variáveis categóricas foi expressa por frequência. Os valores dos níveis séricos dos radicais intermediários do oxigênio, da glutatona e da interleucina-6 foram expressos como mediana e percentis 25 e 75. O teste de qui-quadrado e/ou teste de Fisher, quando necessário, e a razão de risco com intervalo de confiança de 95%, foram utilizados para comparação das variáveis categóricas. Para comparação das medianas de ROI, GR e da IL-6 em relação ao uso antenatal de corticosteroide, bem como para análise das variáveis potencialmente confundidoras, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15.0 for Windows*.

O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa da instituição, sob o parecer número 971/2008.

Resultados

Durante o período de estudo, nasceram na maternidade do CAISM.-UNICAMP, 138 crianças com peso inferior a 1.500 gramas. Não foram inclusos 13 recém-nascidos, pois não foi possível a coleta de sangue. Permaneceram para a análise do estudo 125 crianças (89,92%). O número de mães foi de 111 uma vez que houve 18 gestações múltiplas (15 duplas e três triplas). Como o critério de entrada no estudo foi o peso de nascimento, nem todos os gemelares dessas gestações foram inclusos, pois em sete

situações o peso de nascimento de algum gemelar foi superior ao limite de 1.500g. Não houve nenhum caso de recusa dos pais para autorização de coleta de sangue umbilical.

O corticosteroide utilizado em todas as situações foi betametasona. Observou-se que 92/111 (82,88%) das mães receberam a medicação. Dezesesseis delas (17,4%) receberam apenas uma dose de betametasona antes do nascimento da criança, e 82,60% delas receberam o ciclo completo.

Em relação ao uso ou não de betametasona antenatal, os grupos foram comparáveis entre si e não houve diferenças entre os grupos em relação às variáveis maternas e de parto, exceto a ocorrência de parto vaginal, o qual foi associado significativamente com a ausência de tratamento ($p=0,04$ e razão de risco de 1,549 - intervalo de confiança 95% - 1,048 - 2,288).

Em relação às variáveis neonatais, não houve associação significativa entre o uso antenatal de betametasona e as variáveis avaliadas (Tabela 1). Na análise das variáveis maternas ou neonatais que poderiam alterar os valores dos marcadores, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma delas.

Em relação às dosagens bioquímicas de ROI, GR e IL-6 não foi possível a dosagem em todas as 125 amostras de sangue umbilical devido à coagulação da amostra, impossibilitando a dosagem de ROI e GR, ou hemólise, à qual impossibilitou a dosagem de IL-6. Para análise final, houve dosagem em 98 amostras de ROI basal, 99 dosagens para o ROI estimulado, 100 quantificações de GR e, para IL-6, 121 determinações.

No tocante ao efeito do uso materno antenatal de corticosteroide sobre os níveis sanguíneos dos marcadores, quando se analisou o uso, independentemente do tempo e dose do medicamento, observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas nas medianas dos três testes nos grupos com e sem uso do medicamento. Quando a mãe recebeu o ciclo completo de betametasona, observou-se uma diminuição significativa nos valores de medianas da produção basal de ROI e de IL-6 (Tabelas 2 e 3). Observou-se um alto poder do teste em relação à produção basal de ROI e, quando do uso ciclo completo de CAN, para a produção de IL-6.

Discussão

No presente estudo observou-se um percentual de 83% de mães que receberam betametasona antenatal. Esses dados são superiores às taxas verificadas nos últimos anos na instituição em questão, onde se observou uma média de utilização de 67,5% entre os anos de 2006 a 2009¹⁷. Dados da Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais, entre 2006 e 2010, à época, com oito centros participantes, apontam taxas menores de utilização de corticosteroide antenatal, variando entre 51-57%¹⁷. Tal uso nesta instituição tem sido possível graças ao empenho da equipe de Obstetrícia local em oferecer tal tratamento a toda gestante com possibilidade de parto prematuro antes de 34 semanas de gestação, associado ou não ao uso de tocolíticos¹⁸⁻²⁰.

A opção por definir o ciclo completo como aquele em que há uso de duas doses de betametasona, com intervalo de 24 horas entre elas, e o nascimento ocorrer pelo menos 24 horas após a segunda dose, foi arbitrária. Não existe consenso na literatura quanto ao tempo “ótimo” de ação do medicamento, sendo preconizado que a mãe receba as duas doses de betametasona. Como no nosso estudo avaliamos a ação do medicamento sobre marcadores bioquímicos, e não sobre variáveis clínicas, hipotetizamos que haveria necessidade de um tempo mínimo de ação do mesmo. Como não há nenhuma referência na literatura quanto a esse tempo “ótimo”, estipulamos como 24 horas a linha de corte. Deste modo, as mães que receberam apenas uma dose de betametasona foram incluídas apenas na análise que diferenciou as mães com e sem CAN.

Ao avaliarmos o efeito da administração de betametasona sobre a produção de radicais intermediários de oxigênio, glutathiona e interleucina-6, a ação só foi observada quando ocorreu o ciclo completo. A produção basal de ROI e de IL-6 foram significativamente suprimidas pela administração de betametasona quando a mãe recebeu as duas doses da medicação e o nascimento ocorreu pelo menos 24 horas depois da segunda dose. Isso implica em uma ação tempo-dependente do medicamento.

Tal efeito supressor pode ser considerado positivo na medida em que a medicação suprime parte do estresse oxidativo e inflamatório ao qual o feto está submetido no trabalho

de parto prematuro, de modo a proporcionar uma transição neonatal precoce mais equilibrada e desta forma, menos sujeita a distúrbios hemodinâmicos graves.

O efeito inibidor dos esteroides sobre a produção de ROI não implica em um efeito imunossupressor negativo, mas na realidade, agiria no sentido de imunomodulação, uma vez que intercorrências gestacionais e de parto podem estar associadas a uma ativação excessiva, intensa e prolongada de radicais livres, e conseqüentemente à lesão celular e tecidual. Como demonstrado experimentalmente, o neutrófilo humano fetal é capaz de produção de radicais superóxidos tão eficientemente quanto às células de adultos^{21,22}, e diante de estímulos excessivos, poderiam estar associados à lesão celular e tecidual.

A produção estimulada de ROI não se mostrou estatisticamente diferente nos dois grupos de estudo de corticoterapia. Citarella *et al.* em estudo realizado com leucócitos polimorfonucleares de RN a termo, também demonstraram que, após estimulação com N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, a geração de radicais superóxidos aumentava significativamente, mas não havia aumento suplementar quando, ao meio de cultura, era adicionado IL-10 ou dexametasona²³.

É possível que o aumento da amostra pudesse verificar se esse achado se mantém, uma vez que o poder amostral foi inferior a 80%. Por outro lado, poderemos argumentar que, como se trata de estimulação artificial *in vitro*, isso talvez não reflita às complexas condições de estímulos biológicos *in vivo*. Além disso, as funções dos neutrófilos se alteram, à medida que migram da circulação para os tecidos^{23,24}.

Em relação à produção de glutathiona, não observamos ação supressora da betametasona. Tal efeito pode ser considerado protetor, pois, uma vez que não há diminuição desse sistema neutralizador de radicais livres do oxigênio, e associado a menor produção de radicais superóxidos, haveria menores chances de lesão oxidativa do feto/RN. Além disso, a ausência de supressão se torna benéfica, pois os níveis de glutathiona diminuem rapidamente nos primeiros dias de vida nos RNs pré-termo em decorrência do aumento do estresse oxidativo associado ao nascimento^{25,26}. No entanto, o baixo poder da amostra não permite a extrapolação dos resultados, necessitando-se uma amostra maior para uma avaliação melhor desse efeito.

A IL-6 é considerada a principal citocina envolvida no desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória fetal, definida inclusive pelo nível sérico da citocina e associada à corioamnionite e funisite^{27,28}.

O efeito da betametasona antenatal sobre a produção fetal de IL-6 tem sido pouco estudado. Kavelaars *et al.*²⁹ não encontraram supressão de síntese de IL-6 em células humanas de cordão umbilical de fetos a termo e pré-termo. No entanto, Kramer *et al.*⁹ em trabalhos experimentais com neutrófilos de ovelhas pré-termo demonstraram que a betametasona administrada à mãe produzia supressão na produção de IL-6 horas após 15 horas.

Arad *et al.*³⁰ demonstraram que a medicação administrada a mulheres em trabalho de parto prematuro foi associada a um número menor de RNs com altos níveis de IL-6 (definido como >11 pg/ml).

No nosso estudo houve uma associação significativa entre os níveis séricos umbilicais de IL-6 e o uso do ciclo completo de betametasona pela mãe, o que pode ser explicado por se tratar de efeito *in vivo* e com outros estimulantes associados em ação, não presentes nas condições de cultura celular. Tal efeito pode ser entendido como “benéfico”, pois suprimiria o excesso de mediadores inflamatórios presentes no trabalho de parto prematuro. Metanálise sobre o uso antenatal de esteroides demonstram um efeito protetor na incidência de infecção sistêmica neonatal nas primeiras 48 horas de vida - RR 0,56 IC95% 0,38-0,85².

Uma limitação do estudo é que as análises foram feitas em sangue de cordão umbilical, o que reflete as condições perinatais relacionadas ao nascimento prematuro. Tal desenho de estudo foi feito, pois se pretendeu avaliar os efeitos fetais da betametasona administrada à mãe. No entanto, seria valiosa a comparação dos mesmos marcadores quando avaliados em sangue pós-natal, pois o medicamento ainda exerce graus variáveis de efeitos, e ainda para se verificar o efeito do nascimento e das condições de vida extra-uterina sobre os mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

Outro ponto de limitação do trabalho é que o poder da amostra foi insuficiente para alguns testes, pois o tamanho amostral original foi calculado para o desfecho clínico de hemorragia peri e intraventricular.

Deste modo, o efeito bioquímico do corticosteroide administrado à mãe sobre a produção de radicais intermediários de oxigênio e produção de IL-6 poderia ser o fator determinante na proteção conferida pela medicação na origem de doenças neonatais associados com o estresse oxidativo e inflamação, como a hemorragia peri e intraventricular e distúrbios hemodinâmicos precoces.

Em resumo, a administração de ciclo completo de betametasona à mãe exerceu um efeito supressor sobre a produção basal de ROI e de IL-6 em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso. Deste modo, o estudo serve de base para avaliação do uso antenatal de corticosteroide, dos marcadores estudados e a evolução clínica dos recém-nascidos, especialmente nas doenças decorrentes da ação de radicais livres e inflamação intra-uterina.

Referências bibliográficas

1- Miracle X, Di Renzo GC, Stark A, Fanaroff A, Carbonell-Estrany X, Saling E. Guideline for the use of antenatal corticosteroids for fetal maturation. *J Perinat Med.* 2008;36:191-6.

2- Roberts D, Dalziel S. [Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth.](#) *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;3:CD004454.

3- Mwansa-Kambafwile J, Cousens S, Hansen T, Lawn JE. Antenatal steroids in preterm labour for the prevention of neonatal deaths due to complications of preterm birth. *Int J Epidemiol.* 2010;39:i122-33

4- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P *et al.* Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res.* 2002;52:46-9.

- 5- Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005;88:228-36.
- 6- Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, *et al*. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate*. 2002;81:146-57.
- 7- Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15:191-5.
- 8- Dandona P, Thusu K, Hafeez R, Abdel-Rahman E, Chaudhuri A. Effect of hydrocortisone on oxygen free radical generation by mononuclear cells. *Metabolism*. 1998;47:788-91.
- 9- Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH. Antenatal betamethasone changes cord blood monocyte responses to endotoxin in preterm lambs. *Pediatr Res*. 2004;55:764-8.
- 10- Trindade CE, Rugolo LM. Free Radicals and Neonatal Diseases. *NeoReviews*. 2007;8:e522-31.
- 11- Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23:63-5.
- 12- Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism*. New York: Churchill Livingstone; 1986. 126p.
- 13- Penna SP. Níveis de glutatona reduzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;1995.

- 14- Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods*. 1998;219:187-93.
- 15-Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome. *Neonatology*. 2011;99:177-87.
- 16- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol*. 1996;87:163-8.
- 17- Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais. www.redeneonatal.fiocruz.br. Acesso em 19/07/2011.
- 18- Chien LY, Ohlsson A, Seshia MM, Boulton J, Sankaran K, Lee SK; Canadian Neonatal Network. Variations in antenatal corticosteroid therapy: a persistent problem despite 30 years of evidence. *Obstet Gynecol*. 2002;99:401-8.
- 19- Di Renzo GC, Al Saleh E, Mattei A, Koutras I, Clerici G. Use of tocolytics: what is the benefit of gaining 48 hours for the fetus? *BJOG*. 2006;113:72-7.
- 20- Behrman RE, Butler AS; Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes, eds. *Preterm birth: causes, consequences, and prevention*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2007.
- 21- Newburger PE. Superoxide generation by human fetal granulocytes. *Pediatr Res*. 1982;16:373-6.
- 22- Strauss RG, Snyder EL. Activation and activity of the superoxide-generating system of neutrophils from human infants. *Pediatr Res*. 1983;17:662-4.

- 23- Citarella BV, Miskolci V, Vancurova I, Davidson D. Interleukin-10 versus dexamethasone: effects on polymorphonuclear leukocyte functions of the newborn. *Pediatr Res.* 2009;65:425-9.
- 24- Coldren CD, Nick JA, Poch KR, Woolum MD, Fouty BW, O'Brien JM, *et al.* Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L1267-76.
- 25- Te Braake FW, Schierbeek H, de Groof K, Vermes A, Longini M, Buonocore G, *et al.* Glutathione synthesis rates after amino acid administration directly after birth in preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:333-9.
- 26- Rook D, Te Braake FW, Schierbeek H, Longini M, Buonocore G, Van Goudoever JB. Glutathione synthesis rates in early postnatal life. *Pediatr Res.* 2010;67:407-11.
- 27- Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:194-202.
- 28- Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, *et al.* The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:1124-9.
- 29- Kavelaars A, van der Pompe G, Bakker JM, van Hasselt PM, Cats B, Visser GH *et al.* Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood. *Pediatr Res.* 1999;45:306-12.

30- Arad I, Bar-Oz B, Ergaz Z, Nir A, Barak V. Interleukin-6 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide cord blood levels in premature infants: correlations with perinatal variables. *Isr Med Assoc J.* 2010;12:419-23.

Tabela 1-Distribuição das variáveis maternas e neonatais segundo o uso de corticosteroide antenatal

	CAN		p
	SIM(103)	NÃO(22)	
Idade materna anos	27 (14-44)	22,50(13-42)	0,2701*
Doença hipertensiva	50/103 (48,5)	8/14 (57,1)	0,352&
Eclâmpsia	2 (1,9)	0	1,00&
Diabetes mellitus	7 (6,7)	0	0,352&
Trabalho de parto	36(34,5)	13 (59,1)	0,053
Parto vaginal	16(15,5)	10(45,4)	0,004#
Sof. fetal agudo	37(35,9)	5(22,7)	0,322&
Infecção materna	14(13,6)	4(18,1)	0,521&
Corioamnionite	6(5,8)	4(18,1)	0,074&
Peso ao nascer g mediana (p25-p75)	1010(855-1265)	955(775-1295)	0,726*
Id. gestacional sem mediana (p25-p75)	29(28-32)	29(26-33)	0,782*
Sexo masculino	55(53,4)	12(54,5)	1,00&
Apgar 1º minuto ≥7	70 (67,9)	11(50,0)	0,089#
Apgar 5º minuto ≥7	98(95,1)	18(81,8)	0,052#
Reanimação	36 (34,9)	13(59,0)	0,053&
PIG	45(43,7)	8(36,3)	0,637&

Apr.= apresentação Sof.= sofrimento Id.= idade PIG = pequeno para idade gestacional idade materna e peso ao nascer expressos em mediana

Variáveis categóricas expressas em frequência N(%)

* Teste de Mann-Whitney

& Teste de Fisher

Teste de qui-quadrado

Tabela 2- Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo o uso materno de corticosteroide

	Uso de corticosteroide				p	poder amostral
	Sim		Não			
	Valores	N	Valores	N		
ROI basal	0,4(0,4-0,5)	81	0,5(0,4-0,5)	17	0,2512	0,95
ROI estimulado	33,7(17,75-106,97)	82	74,3(25,4-214,45)	17	0,1086	0,70
Glutaciona	69,31(63,23-80,79)	84	72,45(61,78-81,26)	16	0,9439	0,55
IL-6	34,20(14,12-60,55)	101	30,93(13,26-63,59)	20	0,9750	0,30

Valores expressos em mediana (percentil 25-75)

*Teste de Mann-Withney

Valores de ROI (radicais intermediários do oxigênio) em nMol/10⁶ cel

Valores de glutaciona em mg%

Valores de IL-6 (interleucina-6) em pg/ml

Tabela 3- Valores de ROI basal e estimulado, glutaciona e IL-6 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, segundo o uso do ciclo completo de corticosteroide antenatal

	Ciclo completo				poder amostral	
	Sim		Não			
	Valores	N	Valores	N		
ROI basal	0,40(0,4-0,5)	64	0,50(0,4-0,5)	17	0,0389	0,90
ROI estimulado	28,40(17,15-102,75)	65	41,80(19,90-117,75)	17	0,3749	0,40
Glutaciona	69,52(63,03-81,28)	67	69,10(63,28-76,05)	17	0,9602	0,07
IL-6	30,16(13,89-57,36)	82	54,83(16,12-177,27)	19	0,0243	0,91

Valores expressos em mediana

*Teste de Mann-Withney

Valores de ROI (radicais intermediários do oxigênio) em nMol/10⁶ cel

Valores de glutaciona em mg%

Valores de IL-6 (interleucina-6)em pg/ml