

ROSA JULIANA MADOGGIO

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE INFLAMAÇÃO
EM VIAS AÉREAS E PROGNÓSTICO RESPIRATÓRIO DE
PREMATUROS DE MÃES HIPERTENSAS E NORMOTENSAS**

Orientadora: Prof^a Adjunta Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

Co-orientadora: Cilmary Suemi Kurokawa

**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP
2011**

ROSA JULIANA MADOGLIO

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE INFLAMAÇÃO
EM VIAS AÉREAS E PROGNÓSTICO RESPIRATÓRIO DE
PREMATUROS DE MÃES HIPERTENSAS E NORMOTENSAS**

Orientadora: Prof^a Adjunta Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

Co-orientadora: Cilmary Suemi Kurokawa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Madoglio, Rosa Juliana.

Marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas e
prognóstico respiratório em prematuros de mães hipertensas e normotensas /
Rosa Juliana Madoglio. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Co-orientador: Cilmary Suemi Kurokawa

Capes: 40101150

1. Recém nascido - Doenças. 2. Doenças respiratórias infantis. 3.
Hipertensão na gravidez.

Palavras-chave: Citocinas; Displasia broncopulmonar; Estresse oxidativo; Pré-eclâmpsia; Recém-nascido prematuro.

“O que as vitórias têm de mau é que não são definitivas. O que as derrotas têm de bom é que também não são definitivas.”

(José Saramago)

Dedicatória

A minha mãe Dalva Conde, pelo amor e dedicação a mim durante toda a minha vida, pelos sacrifícios em prol da minha felicidade, pelo apoio nos momentos difíceis. Serei eternamente grata a você.

Agradecimentos

Especiais

A minha imensa gratidão

A minha orientadora Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo, a quem admiro por seus ensinamentos, amizade, liderança, competência e confiança que me fez crescer não só cientificamente, mas também contribuindo na minha formação pessoal. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Cilmary Suemi Kurokawa, por ser exemplo de dedicação, otimismo e determinação. Por ser acessível e conselheira. Muito obrigada.

Agradecimentos

A Deus pela minha existência e pela sua presença constante em minha vida.

Às gestantes e seus filhos, seres indispensáveis para realização deste projeto.

À toda minha família, que sempre me apoiaram e me deram todo carinho.

À querida e amiga Letícia Claudia de Oliveira Antunes, pela ajuda inestimável na realização deste trabalho.

Às amigas Milene Piorowski Almeida de Sá e Adriana Saito pela ajuda incansável na coleta de dados.

Às ex-residentes Betânia, Maira, Josie e Paulinha, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos meus queridos amigos Isabela Venturini e James Venturini que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A querida Prof. Isléia pela contribuição com o inglês.

À toda equipe da Neonatologia, médicos, residentes, docentes, enfermeiros e funcionários que sempre me auxiliaram na realização dessa pesquisa.

Ao coordenador da Pós-Graduação Adriano Dias, pela confiança e oportunidade de desenvolver esse projeto.

À chefe do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia Vera Therezinha Medeiros Borges, por acreditar no valor do projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Pediatria, pela colaboração nas dosagens.

A equipe da Secretaria do Departamento de Pediatria: Adriana, Fabiano e Paulo sempre tão solícitos.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

A todos aqueles não citados, mas que de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho. Muito obrigada

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	Introdução	15
1.1	Síndromes hipertensivas da gestação	15
1.2	Radicais livres e estresse oxidativo	16
1.3	Marcadores Inflamatorios	17
1.4	Displasia Broncopulmonar	18
2	Objetivos	21
3	Métodos	22
3.1	Delineamento da Pesquisa e Tamanho da Amostra	22
3.2	Seleção dos sujeitos, critérios de inclusão e exclusão.....	22
3.3	Dosagens bioquímicas.....	23
3.4	Variáveis do estudo	26
3.5	Análise Estatística	28
4	Resultados	30
5	Discussão	40
6	Conclusão.....	47
7	Referências Bibliográficas.....	48
	Anexos.....	55

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição das mães com síndromes hipertensivas da gestação	32
Figura 2- Concentrações de MDA dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1° e 3° dias de assistência ventilatória	34
Figura 3- Concentrações de NO dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1° e 3° dias de assistência ventilatória	34
Figura 4- Concentrações de IL-8 dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1° e 3° dias de assistência ventilatória	35
Figura 5- Concentrações de MDA dos prematuros no 1° e 3° dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória	36
Figura 6- Concentrações de NO dos prematuros no 1° e 3° dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória	36
Figura 7- Concentrações de IL-8 dos prematuros no 1° e 3° dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória	37
Figura 8- Concentrações de MDA dos prematuros no 1° e 3° dia de vida com relação ao desfecho de interesse	37
Figura 9- Concentrações de NO dos prematuros no 1° e 3° dia de vida com relação ao desfecho de interesse	38
Figura 10: Concentrações de IL-8 dos prematuros no 1° e 3° dia de vida com relação ao desfecho de interesse	38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados demográficos, gestacionais e de nascimento dos grupos estudado	31
Tabela 2. Principais doenças, assistência respiratória e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos estudados	33
Tabela 3. Modelo de regressão logística para variável resposta DBP/óbito	39

RESUMO

Introdução: Estresse oxidativo e inflamação são importantes mecanismos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e das doenças dos prematuros, entretanto, não está estabelecido se o prognóstico de prematuros de mães hipertensas é decorrente de efeito direto da doença materna ou devido à prematuridade. **Objetivo:** Determinar as concentrações de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas de prematuros de mães hipertensas e normotensas nos primeiros 3 dias de vida, investigar a influência do tipo de assistência respiratória e a relação dos biomarcadores com o prognóstico respiratório neonatal. **Método:** Estudo prospectivo com prematuros < 34 semanas, nascidos no serviço e submetidos ao CPAP nasal ou ventilação mecânica no 1º dia de vida, estratificados em 2 grupos: mães hipertensas e mães normotensas. Critério de exclusão: diabetes melito, corioamnioite, malformação, infecção congênita, óbito < 24 horas. No aspirado de vias aéreas, do 1º e 3º dias de vida foram dosados malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO) e interleucina 8 (IL-8). Além dos biomarcadores foram avaliadas variáveis gestacionais, do parto e da evolução neonatal. Desfecho: alta sem displasia broncopulmonar (DBP) ou DBP/morte. Realizada análise estatística uni e multivariada. **Resultados:** Foram estudados 73 prematuros com idade gestacional média de 29 semanas, sendo 32 de mães hipertensas e 41 de normotensas. Nos 2 momentos de avaliação as concentrações de MDA, NO e IL-8 não diferiram entre os prematuros de mães hipertensas e normotensas. Ao comparar os prematuros em ventilação mecânica versus CPAP nasal não houve diferença nos valores de MDA e NO, mas a IL-8 foi maior no 1º dia de ventilação mecânica. Os prematuros que evoluíram com DBP/óbito tiveram maiores níveis de IL-8 nos primeiros 3 dias de vida. A idade gestacional e o uso de ventilação mecânica foram fatores de risco para DBP/óbito. **Conclusão:** Os marcadores de estresse oxidativo em vias aéreas de prematuros nos 1^{os} 3 dias de vida não diferiram em função da hipertensão materna, tipo de assistência respiratória e prognóstico respiratório neonatal. Níveis aumentados de IL-8 ocorreram na ventilação mecânica e nos prematuros com DBP/óbito. Os biomarcadores não foram preditores de DBP/óbito.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; recém-nascido prematuro; displasia broncopulmonar; estresse oxidativo; citocinas,

ABSTRACT

Background: Oxidative stress and inflammation are important mechanisms in the pathophysiology of preeclampsia and neonatal diseases, however, it is unclear whether the outcome of preterm infants of hypertensive mothers is due to a direct effect of maternal disease or to short gestation. **Objective:** To determine the levels of oxidative stress markers and inflammation in the airways of preterm infants of hypertensive mothers and normotensive ones in the first three days of life; to evaluate the influence of the respiratory support and the relationship between the biomarkers and neonatal respiratory outcome. **Method:** A prospective study of inborn preterm infants <34 weeks gestation, requiring nasal CPAP or mechanical ventilation in the first day of life, stratified into two groups: hypertensive mothers and normotensive ones. Exclusion criteria: diabetes mellitus, chorioamnionitis, congenital malformation or infection, death <24 hours. Determination of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and interleukin 8 (IL-8) levels were carried out in airway aspirate samples at the first and third days of life. Gestational, delivery and neonatal data were evaluated. Outcome: discharge without bronchopulmonary dysplasia (BPD) or BPD/ death. Data were analyzed by univariate and multivariate statistical analysis. **Results:** We studied 73 preterm infants, mean gestational age of 29 weeks, 32 infants were born to hypertensive mothers and 41 born to normotensive mothers. There were no differences in the MDA, NO and IL-8 levels between the two groups, in day 1 and day 3. By comparing neonates on mechanical ventilation versus nasal CPAP the concentrations of MDA and NO didn't differ, but the IL-8 was higher in the first day of mechanical ventilation. Preterm infants with BPD / death had higher levels of IL-8 in the first 3 days of life. Gestational age and mechanical ventilation were risk factors for BPD / death. **Conclusion:** The oxidative stress markers in the airways of preterm infants in the first 3 days of life were not related to maternal hypertension, type of respiratory support and neonatal respiratory outcome. Increased levels of IL-8 were associated with mechanical ventilation and BPD / death. The biomarkers were not predictive of BPD / death.

Key words: Preeclampsia; Premature, infant; Bronchopulmonary dysplasia; Oxidative stress; Cytokines.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Síndromes Hipertensivas da Gestação

As síndromes hipertensivas constituem a complicação médica mais frequente da gravidez e a principal causa de morbidade materna, fetal e neonatal, bem como uma indicação frequente para o nascimento prematuro. A incidência das síndromes hipertensivas varia entre 5 a 10% de todas as gestações, com cifras mais elevadas em gestações gemelares, e em mulheres primíparas ou com antecedentes de pré-eclâmpsia. Dentre as síndromes hipertensivas, a pré-eclâmpsia é a manifestação mais importante, responsável por mais de metade dos casos (Barton et al., 2001; Villar et al., 2004; Roberts et al., 2005; Duley, 2009).

A definição mais aceita das síndromes hipertensivas gestacionais foi proposta pelo National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (NHBPEP, 2000), que utilizou como critério diagnóstico de hipertensão, a pressão arterial de 140 / 90 mmHg ou mais, em 2 ocasiões com intervalo de pelo menos 4 horas. O NHBPEP (2000) definiu quatro categorias de hipertensão na gestação:

- Hipertensão arterial crônica: quando se manifesta antes da gravidez ou antes da 20ª semana de gestação ou persiste por mais de 12 semanas após o parto.
- Hipertensão gestacional: aquela que se manifesta após 20 semanas de gestação.
- Pré-eclâmpsia: desenvolvimento de hipertensão após 20 semanas de gestação, associada com proteinúria (≥ 300 mg em urina de 24 horas), em mulher previamente normotensa.
- Pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial crônica: pré-eclâmpsia diagnosticada em mulher previamente hipertensa.

Um aspecto de preocupação obstétrica na pré-eclâmpsia é a possibilidade desta evoluir para formas mais graves, seja a eclâmpsia, ou a Síndrome HELLP (Peracoli & Parpinelli, 2005).

Devido às condições intra-uterinas adversas ou complicações maternas, a gestação complicada pela hipertensão materna com frequência tem que ser interrompida prematuramente, ocasionando elevado índice de mortalidade e morbidade perinatal. Além da prematuridade, outras repercussões para o conceito

incluem: baixo peso ao nascer, restrição do crescimento intra-uterino, sofrimento fetal e maior risco de doenças crônicas (Oliveira et al., 2002; Ferrão et al., 2006).

Durante a gestação normal o estresse oxidativo aumenta, porém é compensado pelo aumento das defesas antioxidantes endógenas. Na pré-eclâmpsia a perfusão sanguínea placentária é inadequada propiciando áreas de isquemia/reperfusão e conseqüentemente o aumento na formação de radicais livres de oxigênio e ativação de neutrófilos (Xiong et al., 2002; Bernardi, 2007). Um aspecto importante é que as alterações detectadas em placentas de gestantes hipertensas também têm sido encontradas no sangue do cordão umbilical, traduzindo a exposição do concepto à condição de estresse oxidativo materno (Chamy et al., 2006).

1.2- Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radicais livres de oxigênio são átomos ou moléculas que contém um elétron altamente reativo não pareado em sua última camada eletrônica, e que são capazes de reagir com outras moléculas, modificando suas estruturas (Andrade Junior et al., 2005).

No metabolismo aeróbico normal ocorre redução do oxigênio molecular. Se houver redução do oxigênio com um número menor de elétrons ao longo da cadeia respiratória, haverá produção de radicais livres, designados espécies reativas de oxigênio (ROS) que incluem o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e outras substâncias igualmente reativas. Outros radicais livres produzidos são as espécies reativas de nitrogênio (RNS), formadas por reações envolvendo o óxido nítrico (NO), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (OONO). A produção desses radicais ocorre por diversos mecanismos, tanto em condições fisiológicas como o metabolismo celular de ácidos graxos e de prostaglandinas, como também em situações de isquemia-reperfusão, hipóxia-hiperóxia e inflamação-infecção (Trindade & Rugolo, 2007).

Em condições normais há equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua eliminação através do sistema antioxidante, que protege a célula antes que o agente cause lesão ou repara a lesão ocorrida. Esse sistema é composto por glutathione reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e as vitaminas C e E (Ferreira & Matsubara, 1997; Trindade & Rugolo, 2007).

Em situações de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante ocorre desequilíbrio entre produção e remoção de ROS/RNS gerando o estresse oxidativo e lesão por radicais livres em vários órgãos e tecidos incluindo: retina, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins, pulmões e sistema nervoso central (Vancini et al., 2005; Perrone et al., 2010).

Muitos marcadores têm sido utilizados para investigar o estresse oxidativo, dentre eles o malondialdeído (MDA) e o óxido nítrico (NO), sendo o MDA um dos produtos secundários da peroxidação lipídica, resultado da reação com o ácido tiobarbitúrico detectada pelo método TBARS (Grotto et al., 2008). O NO resulta da oxidação do aminoácido L-arginina catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Apesar do NO fazer parte dos mecanismos de defesa do organismo ele pode produzir substâncias tóxicas, como o dióxido de nitrogênio e provocar lesão celular. A meia vida do NO é extremamente curta devido a sua instabilidade e toxicidade, sendo rapidamente convertido em nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), os quais são dosados para detecção do NO em amostras biológicas (Dusse, Vieira & Carvalho, 2003; Alvez & Ishiki, 2005).

Considera-se que o estresse oxidativo pode estar envolvido na patogênese de várias doenças no recém-nascido prematuro, tais como retinopatia da prematuridade, enterocolite necrosante, hemorragia periintra-ventricular, leucomalácia periventricular e também a displasia broncopulmonar. Em comparação aos recém-nascidos de termo, os prematuros apresentam menor capacidade antioxidante, o que aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo (Trindade & Rugolo, 2007; Perrone et al., 2010).

Vários estudos têm documentado que o aumento de produtos de oxidação protéica e lipídica em aspirado traqueal de prematuros nos primeiros dias de vida associa-se com evolução pulmonar adversa. (Ramsay et al., 2001; Schok et al., 2001; Collard et al., 2004; Cooke & Drury, 2005).

1.3- Marcadores Inflamatórios

Dentre os marcadores de inflamação destacam-se as citocinas, que tem o importante papel de promover a migração de leucócitos ativando moléculas de adesão e proteínas da matriz extracelular, sendo as citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo início da resposta inflamatória frente à agressão do agente

nocivo. As interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são as principais citocinas pró-inflamatórias (Vento et al., 2006; Volp et al., 2008).

Conforme documentado em amostras de lavado broncoalveolar de recém-nascidos prematuros, nos primeiros dias de vida, a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias ocorre no processo inicial da lesão pulmonar na DBP, precedendo a liberação de neutrófilos e macrófagos (Munshi et al., 1997; Saugstad, 2003; Speer, 2006).

1.4- Displasia Broncopulmonar

À medida em que aumenta a sobrevivência de prematuros de muito baixo peso, cresce a preocupação com a qualidade de vida desses prematuros, pois os recursos necessários para manter adequada função de órgãos imaturos podem causar lesão dos mesmos e os prematuros sobreviventes podem apresentar complicações crônicas dentre as quais a displasia broncopulmonar (DBP) (Cunha et al., 2003; Rugolo, 2005; Tapia et al., 2006).

A incidência da DBP é inversamente proporcional à idade gestacional e peso de nascimento, acometendo cerca de 30% dos prematuros menores que 1000g e 10% dos recém-nascidos entre 1.250 e 1.500g. A doença é rara em prematuros com idade gestacional maior que 34 semanas. (Friedrich et al., 2005; Monte et al., 2005; Walsh et al., 2006).

A DBP foi inicialmente descrita em 1967 por Northway em prematuros com síndrome do desconforto respiratório (SDR) que evoluíram com dependência de oxigênio aos 28 dias de vida, associada a alterações clínicas e radiológicas atribuídas à lesão pulmonar pela ventilação mecânica e oxigênio. Na década de 80 ocorreram dois grandes avanços na assistência perinatal: o incremento no uso de corticóide antenatal e o início do uso de surfactante exógeno em prematuros. Essas duas práticas combinadas acarretaram significativa diminuição da incidência e gravidade da síndrome do desconforto respiratório, bem como aumento na sobrevivência de prematuros (Hack & Fanaroff, 2000; Horbar et al., 2002; Stoelhorst et al., 2005).

Em decorrência dessas mudanças, houve também alteração na fisiopatologia, fatores de risco, quadro clínico e radiológico da displasia broncopulmonar, surgindo nova terminologia: Doença pulmonar crônica e nova DBP. No intuito de unificar a terminologia e padronizar os critérios de definição, em um Consenso de

especialistas foi proposto usar apenas o termo displasia broncopulmonar e definí-la pela necessidade de oxigênio durante 28 dias. Nessa nova definição a gravidade da doença em prematuros menores que 32 semanas deve ser avaliada ao atingir 36 semanas de idade pós-menstrual, sendo considerada DBP leve se nessa idade não for necessário o uso de oxigênio; moderada se o prematuro necessitar de concentração de O₂ abaixo de 30%, e grave se houver necessidade de maior concentração de O₂ ou qualquer forma de assistência ventilatória (Jobe & Bancalari, 2001).

A etiologia da DBP não está totalmente esclarecida, porém considera-se que múltiplos fatores atuem no pulmão imaturo, exposto a varias agressões e ao mesmo tempo com mecanismos de defesa ainda não completamente desenvolvidos. Dentre os fatores de risco para DBP a prematuridade é o principal, pois essa doença representa a resposta de pulmões imaturos à lesão pulmonar aguda provocada pela ventilação mecânica, oxigênio, infecção perinatal e outros fatores de agressão, aliados à reduzida capacidade dos mecanismos de defesa pulmonar, especialmente a menor atividade de enzimas antioxidantes (Bancalari, 2006; Bhering et al., 2007).

Desde sua descrição inicial, a DBP tem sido atribuída à toxicidade do oxigênio, que atualmente se sabe pode induzir a lesão pulmonar pela produção de radicais livres, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio que são tóxicos. Esses metabólitos provocam inibição de proteases e da síntese de DNA, diminuição da síntese de surfactante, peroxidação de lipídios, e atuam como fatores quimiotáticos de células inflamatórias. Além da lesão pelo oxigênio, a ventilação mecânica tem efeito lesivo em pulmões imaturos, devido à expansão pulmonar não uniforme, propiciando lesão por estiramento e resposta inflamatória em vias aéreas de pequeno e médio calibre, com aumento no risco de DBP (Philip, 2009; Hillman et al., 2010).

A infecção perinatal é outro importante fator de risco para a ocorrência de DBP, estando claramente estabelecida a relação entre exposição fetal à corioamnionite e desenvolvimento de DBP. Vários estudos mostram que níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em líquido amniótico e cordão umbilical, indicando resposta inflamatória sistêmica fetal na corioamnionite, estão associados com a ocorrência de DBP (Cunha et al., 2003; Monte et al., 2005; Speer, 2006).

A persistência do canal arterial também pode contribuir para o desenvolvimento da DBP, pois aumenta o fluxo sanguíneo pulmonar e causa edema intersticial,

gerando diminuição da complacência pulmonar e aumento da resistência de vias aéreas, com conseqüente necessidade de ventilação mecânica mais agressiva (Hamrick & Hansmann, 2010).

Em qualquer dessas situações de risco para DBP, a inflamação têm papel fundamental, provocando liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas quimiotáticas, como a interleucina 8, interleucina 10 e fator de necrose tumoral alfa (Jobe & Bancalari, 2001).

Considerando que as síndromes hipertensivas da gestação representam uma das principais causas de nascimentos prematuros, sendo os prematuros de alto risco para desenvolver doenças pulmonares e pela importante participação dos mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo na patogênese das doenças do prematuro, surgiu o interesse em desenvolver essa pesquisa visando responder a seguinte questão:

- Os níveis de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas e o prognóstico respiratório diferem em prematuros de mães hipertensas comparados aos de normotensas?

Hipótese do estudo: os níveis de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas são mais elevados nos prematuros filhos de mães hipertensas.

2 – OBJETIVO:

Determinar os níveis de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas de prematuros de mães com síndromes hipertensivas gestacionais (SHG) e de mães normotensas, nas primeiras 72 horas de assistência respiratória, e a relação dos mesmos com o prognóstico respiratório neonatal.

Especificamente:

- Dosar malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO) e interleucina-8 (IL-8) em vias aéreas, no primeiro e terceiro dia de assistência respiratória, em prematuros de mães hipertensas comparados aos de mães normotensas.
- Analisar a influência do tipo de assistência respiratória: ventilação mecânica versus CPAP nasal, nos níveis dos biomarcadores.
- Investigar os fatores de risco para displasia broncopulmonar e/ou óbito e a relação dos biomarcadores com esse desfecho.

3 – MÉTODO

3.1 Delineamento do estudo e tamanho da amostra

Estudo observacional, prospectivo e longitudinal, com prematuros internados na UTI Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de março de 2009 até setembro de 2010, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (Aprovado em 03/11/2008).

O estudo foi delineado para comparação de dois grupos com 30 prematuros em cada grupo. Não foi possível estimar o tamanho do efeito esperado, pois não há estudos na literatura que tenham investigado marcadores de estresse oxidativo em vias aéreas de prematuros de mães hipertensas.

3.2 Seleção dos sujeitos, critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionadas as gestantes com idade gestacional inferior a 34 semanas internadas na enfermaria de obstetrícia ou no pré-parto do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, devido à: trabalho de parto prematuro ou resolução da gestação. As gestantes foram entrevistadas pela pesquisadora, informadas quanto aos objetivos da pesquisa e convidadas a participar, obtendo-se a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I).

Nas gestantes selecionadas foi investigado, a partir dos dados médicos do prontuário materno, a presença ou não de síndromes hipertensivas da gestação diagnosticadas ou confirmadas no serviço, critério esse utilizado para a constituição dos dois grupos de estudo: grupo das hipertensas e grupo das normotensas (controle).

A partir das gestantes elegíveis e que concordaram em participar do estudo foram selecionados os recém-nascidos que internaram na UTI Neonatal e incluídos aqueles que preencheram os seguintes critérios:

- Nascido na Maternidade do HC-FMB, antes de 34 semanas de gestação
- Peso ao nascer menor que 1800g;
- Ausência dos antecedentes maternos de Diabetes melito e de corioamnionite
- Ausência de síndrome genética ou malformações congênitas múltiplas
- Assistência ventilatória iniciada nas primeiras 24 horas de vida

Os recém-nascidos que não permaneceram no mesmo tipo de assistência respiratória até 72 horas de vida foram mantidos no estudo, porém a avaliação dos biomarcadores foi efetuada apenas nas primeiras 24 horas de vida.

Foram excluídos os recém-nascidos que tiveram diagnóstico clínico e/ou sorológico de infecção congênita; bem como os que evoluíram para óbito nas primeiras 24 horas de vida, inviabilizando a primeira avaliação laboratorial.

3.3 Dosagens bioquímicas:

Obtenção das amostras do material biológico de vias aéreas

Amostra de 1,5 ml de aspirado de vias aéreas foi obtida por aspiração traqueal, nos recém-nascidos intubados e por aspiração de nasofaringe naqueles em CPAP nasal. O procedimento foi realizado no momento dos cuidados rotineiros de vias aéreas, conforme padronizado na Unidade.

A aspiração do material biológico de vias aéreas foi realizada em 2 momentos: primeiras 24 horas e terceiro dia de assistência ventilatória, sempre pela mesma fisioterapeuta. Nos casos em que foi administrado surfactante exógeno, a primeira amostra de secreção de vias aéreas foi coletada após 6 horas do uso de surfactante. Para o procedimento de coleta o recém-nascido foi posicionado em supino com a cabeça virada para a esquerda. A seguir foi instilado 1ml soro fisiológico 0,9% através do tubo traqueal nos intubados ou pelas narinas nos recém-nascidos em CPAP nasal, e, imediatamente após foi coletado o aspirado traqueal ou de nasofaringe, por meio de aspiração manual com seringa de 10 ml e sonda nasogástrica nº 06 (Vyas et al., 1999; D'Angio et al., 2002). Nos casos em que não foi recuperado o volume injetado, o procedimento de aspiração foi repetido, sem volume adicional de soro fisiológico. O volume final obtido varia de 40 até 90% do volume instilado (Kwong et al., 1998).

Em cada procedimento os recém-nascidos foram desconectados do suporte ventilatório por aproximadamente 15 segundos. Caso necessário repetir a aspiração, esta foi realizada após um minuto de retorno do paciente ao seu suporte ventilatório para estabilização. Ao final do procedimento a sonda foi lavada com 1ml de soro fisiológico 0,9%. Durante a coleta foram monitorados continuamente: frequência cardíaca, frequência respiratória e saturação periférica de oxigênio (SpO₂). Ao

término da coleta as amostras foram transferidas da seringa para tubos de plástico hermeticamente fechados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. A seguir foram transportadas em recipiente com gelo para o Laboratório de Pesquisa Experimental em Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, onde foram estocadas a - 80° C até o momento das dosagens.

Métodos das dosagens bioquímicas

Como marcadores de estresse oxidativo foram dosados: malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) e como marcador inflamatório a interleucina-8

Dosagem de Malondialdeído (MDA)

A determinação do malondialdeído foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se o kit *TBARS Assay* da Cayman Chemical Company® (Ann Arbor, MI, USA).

O TBARS é um método classicamente utilizado na literatura para identificação de peroxidação lipídica e dosagem de MDA. O princípio do método consiste medição de uma substância rósea produzida em decorrência da interação do MDA com o ácido tiobarbitúrico conforme descrito por Ohkawa et al., 1979. Foram realizadas as seguintes etapas: mistura de 50 µL da amostra e concentrações conhecidas do padrão com 50 mM de SDS (sódio dodecilsulfato), e posterior adição do reagente colorimétrico. Essa mistura foi fervida em banho a 100° C por uma hora para o desenvolvimento da cor rósea, e a seguir a reação foi bloqueada em banho de gelo por 10 minutos. Após esse período 150 µL da solução foi depositada em microplacas de 96 alvéolos para leitura no aparelho Spectra Max 190 (Molecular Devices, CA, USA) leitor de ELISA com filtro de 530nm.

A precisão do método foi de 5,5 - 7,6% intra-ensaio e 5,1 - 5,9% inter-ensaio, com limite mínimo de detecção de 0,15 µM. O intervalo de concentração utilizado foi de 0-50 µM.

Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem do óxido nítrico foi realizada por método colorimétrico utilizando-se *Nitrate/nitrite colorimetric Assay kit* (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, USA).

A quantidade de NO foi determinada pela quantificação total de nitrato e nitrito, que são os metabólitos finais do óxido nítrico. As amostras foram tratadas com nitrato redutase para conversão do nitrato a nitrito, sendo este último quantificado por reação colorimétrica pelo método de Griess (Granger et al., 1996) no qual a concentração de nitrito (cromóforo púrpura) é obtida pela medição colorimétrica da reação em 540 nm. Para a obtenção da curva padrão utilizou-se o padrão de nitrato nas concentrações de 0 a 35 mM.

Esse método tem boa acurácia, com coeficiente de variação inter-ensaio de 3,4% e intra-ensaio de 2,7%, e com limite mínimo de detecção de 2,0 µM.

Dosagem de Interleucina 8 (IL-8)

A dosagem de IL-8 foi realizada por Elisa com anticorpos anti-IL-8 humana específicos para esta citocina. Placas de 96 alvéolos de alta afinidade para moléculas com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos (Nunc-Immuno™ Plates*, Maxsorp, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-8 (BD Pharmingen®, San Diego, CA, USA), diluído concentração de 1:250 em tampão carbonato de sódio 0,1M e pH=9,5. A incubação deste anticorpo para que o mesmo ligar-se a placa foi realizada por um período de 18 horas à 5°C em câmara úmida para evitar evaporação.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas com PBST (salina tamponada com fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 10% de albumina bovina sérica (BSA-Sigma®, USA). Após período de 2 horas de bloqueio à temperatura ambiente, foram feitas 3 lavagens das placas com PBST e posteriormente adicionado um volume de 100µL das amostras foram depositadas em cada orifício e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Ao mesmo tempo a IL-8 recombinante foi diluída nas concentrações de 200 a 3,1 pg/ml em PBS (salina tamponada com fosfato), pH=7,4 (Laborclin™, Pinhais, PR, Brasil) adicionado de 10% de BSA. Sete concentrações de IL-8 recombinante foram usadas

como padrão para obtenção da equação da reta a qual foi utilizada na quantificação de IL-8 das amostras estudadas.

Após a retirada das amostras e IL-8 recombinante presente nas placas, procedeu-se nova lavagem (5 vezes), seguindo-se a adição de anticorpos anti-IL-8 conjugado com biotina. Este anticorpo foi adicionado em conjunto com a estreptoavidina peroxidase (BD Pharmingen[®], San Diego, CA, USA), ambos os reagentes foram diluídos em PBS contendo BSA a 1%. O período de incubação utilizado neste período foi de uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada nova lavagem da placa (7 vezes) e posteriormente adicionado o substrato de tetrametilbenzidina (BD Pharmingen[®], San Diego, CA, USA). O tempo de reação foi de 30 minutos e o bloqueio realizado com H₂SO₄ a 4 N. A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 450 nm.

O limite mínimo de detecção da IL-8 nesse método foi de 3.5 pg/ml com coeficiente de variação inter-ensaio de 8% e intra-ensaio de 5 %.

3.4 Variáveis de estudo:

Foram avaliados os dados clínicos maternos, gestacionais e neonatais, incluindo aspectos demográficos, da evolução clínica e da assistência médica ministrada aos prematuros durante toda a internação, bem como os dados laboratoriais dos recém-nascidos. Os dados clínicos de interesse para o estudo foram obtidos do prontuário do paciente e anotados no protocolo da pesquisa, incluindo:

Dados maternos e gestacionais:

- idade e paridade.
- hipertensão arterial: a presença ou ausência dessa variável foi utilizada como critério para constituição dos dois grupos de estudo. O diagnóstico das Síndromes hipertensivas da gestação (SHG) foi realizado pelos obstetras do Serviço, conforme os critérios propostos pelo NHBPEP (2000) sendo consideradas quatro categorias de hipertensão na gestação: Hipertensão arterial crônica; Hipertensão gestacional; Pré-eclâmpsia; Pré-eclâmpsia superposta à hipertensão crônica.
- gravidade das SHG: caracterizada pela ocorrência de eclâmpsia (presença de convulsão em gestante com pré-eclâmpsia) ou síndrome HELLP (presença de

alteração de enzimas hepáticas, plaquetopenia em gestante com pré-eclampsia), ou uso de sulfato de magnésio (Peracoli & Parpinelli, 2005).

- uso de corticosteróide antenatal: considerado presente quando da utilização de pelo menos uma dose de betametasona, nas 24 horas que antecederam o parto;
- sofrimento fetal: presente ou ausente conforme avaliação obstétrica;
- trabalho de parto prematuro;
- rotura prematura de membranas: considerada presente quando ≥ 12 horas.
- tipo de parto: vaginal ou cesárea, sendo a cesárea classificada em urgente ou eletiva, e conforme a indicação: materna e/ou fetal.

Dados clínicos dos recém-nascidos:

- gênero: masculino e feminino;
- idade gestacional: determinada preferencialmente pela melhor estimativa obstétrica: data precisa da última menstruação (DUM), ou ultrassonografia precoce (antes de 20 semanas de gestação).
- peso de nascimento (g) e adequação do peso para a idade gestacional: conforme critério de Alexander et al., 1996, sendo considerado adequado para a idade gestacional entre o percentil 10 e 90; pequeno para a idade gestacional quando abaixo do percentil 10 e grande para a idade gestacional quando acima do percentil 90;
- reanimação neonatal em sala de parto: considerada presente quando houve necessidade de ventilação com pressão positiva. Nos recém-nascidos reanimados avaliou-se também a necessidade de intubação, massagem cardíaca, uso de drogas;
- boletim de APGAR avaliado no primeiro e quinto minutos de vida.
- boletim de Silvermann – Andersen (BSA): aferido em sala de parto para avaliar a presença e o grau de desconforto respiratório. A nota do BSA ≥ 4 caracterizou desconforto respiratório moderado com necessidade de assistência respiratória.
- Escore SNAP-PE: aplicado nas primeiras 12 horas de vida para avaliar a gravidade dos recém-nascidos, conforme proposto por Richardson et al. 2001.
- morbidade neonatal: investigada a presença de doenças respiratórias agudas e displasia broncopulmonar (definida pela necessidade de oxigênio ≥ 28 dias e pela necessidade de oxigênio com 36 semanas de idade pós-menstrual, conforme proposto por Jobe e Bancalari, 2001); sepse (independente de hemocultura positiva, definida como precoce quando manifesta nas primeiras 72 horas de vida e tardia

após 72 horas); enterocolite necrosante confirmada (a partir do estágio 1B conforme critério de Walsh e Kliegman, 1986); hemorragia peri-intraventricular classificada conforme Papile et al, (1978); retinopatia da prematuridade (considerado qualquer grau da doença diagnosticada entre 4-6 semanas de vida).

- Assistência respiratória: uso de surfactante exógeno, necessidade de ventilação mecânica ou de CPAP nasal nas primeiras 72 horas de vida.

- Tempo de internação: em dias

- Saída: alta ou óbito

Desfechos:

- Displasia broncopulmonar e/ou morte
- Alta sem displasia broncopulmonar

Na avaliação do desfecho de interesse foi considerada a definição de DBP pela necessidade de oxigênio por 28 dias ou mais (DBP-28d).

3.5 Análise Estatística:

A análise descritiva dos dados foi efetuada por meio de tabelas de frequência e associação, sendo as variáveis numéricas apresentadas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentis. Média foi utilizada para variáveis com distribuição simétrica ou normal e a mediana para variáveis com distribuição assimétrica ou não normal. Variáveis categóricas foram expressas pelo número e proporção de eventos.

A comparação entre grupos quanto às variáveis numéricas foi realizada pelo teste t de Student para distribuição normal ou pelo teste de Mann-Whitney para distribuição não normal. Para variáveis categóricas foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Para testar a associação das síndromes hipertensivas da gestação e de outros potenciais fatores de risco com os níveis de biomarcadores, bem como para avaliar a relação dos biomarcadores com a ocorrência de DBP e/ou óbito, foram ajustados modelos lineares generalizados com distribuição gama, por PROC GENMOD, utilizando-se o programa SAS for Windows v.9.2.

Análise multivariada com técnica de regressão logística foi empregada para investigar os fatores de risco para DBP e/ou óbito.

As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

Foram selecionadas 72 gestantes no período entre março de 2009 e setembro de 2010, sendo 31 com Síndromes Hipertensivas da Gestação e 41 normotensas (controle). Dentre as gestantes normotensas, em dois casos os recém-nascidos não foram incluídos devido à presença de corioamnionite materna. Em todos outros casos foram preenchidos os critérios de inclusão dos recém-nascidos. Nesta amostra ocorreram 3 gestações gemelares, sendo uma no grupo das hipertensas e duas do grupo controle, e nesses 3 casos ambos gemelares preencheram os critérios de inclusão, portanto o número de gestantes foi assim distribuído: 31 no grupo das hipertensas e 39 no controle; e o número de recém-nascidos incluídos no estudo foi: 32 no grupo das hipertensas e 41 no grupo controle. Nenhum recém-nascido foi excluído.

Os dados clínicos maternos e dos recém-nascidos nos dois grupos estudados encontram-se nas tabelas 1 e 2.

A tabela 1 apresenta os principais dados maternos, gestacionais e de nascimento, verificando-se algumas diferenças significativas entre os grupos. No grupo das hipertensas a idade média materna foi maior e houve menor proporção de primigestas, de rotura prematura de membranas e de trabalho de parto prematuro, enquanto que a frequência de sofrimento fetal foi maior neste grupo em relação ao controle. Cesariana foi a principal via de nascimento no grupo das hipertensas, sempre em caráter de urgência, com predomínio de indicação materna. Em ambos os grupos a idade gestacional foi bastante baixa, não houve distribuição preferencial quanto ao gênero e foi freqüente a necessidade de reanimação em sala de parto. Recém-nascidos pequenos para idade gestacional (PIG) foram mais freqüentes no grupo das hipertensas, enquanto que os valores medianos do Boletim de Silvermann-Adersen foram maiores no grupo controle.

Tabela 1. Dados demográficos, gestacionais e de nascimento dos grupos estudados.

Variável	Hipertensas (n=31)	Controle (n=39)	Valor de p
Idade (anos) $\bar{x} \pm DP$	27 $\pm$ 7,5	22 $\pm$ 6,6	0,013
Primigestas n (%)	10 (32)	25 (64)	0,016
Sufrimento fetal n (%)	17 (54)	8 (31)	0,006
Rotura prematura membranas n (%)	1 (3)	12 (31)	0,004
Trabalho de parto prematuro n (%)	1 (3)	32 (87)	< 0,001
Corticóide antenatal n (%)	25 (81)	34 (87)	0,520
Cesariana n (%)	28 (90)	12 (30)	< 0,001
Idade gestacional $\bar{x} \pm DP$	29 $\pm$ 2,6	28,4 $\pm$ 2,6	0,147
Peso de nascimento (g) $\bar{x} \pm DP$	1084 $\pm$ 307	1121 $\pm$ 299	0,608
Pequeno p/ idade gestacional n (%)	14 (44)	5 (12)	0,005
Ventilação c/ pressão positiva n (%)	25 (78)	33 (80)	0,965
Intubação traqueal n (%)	14 (44)	21 (51)	0,691
Apgar 1º minuto ≤ 3 n (%)	12 (37,5)	11 (27)	0,472
Apgar 5º minuto ≤ 6 n (%)	7 (22)	9 (22)	0,782
BSA md (P25 - P75)	5 (4 - 6)	6 (5 - 7)	0,035
SNAP-PE (P25 - P75)	22 (15 - 35)	25 (8 - 44)	0,569

BSA = Boletim de Silvermann-Andersen;

SNAP-PE = Score for Neonatal Acute Physiology – Perinatal Extension

Dentre as 31 gestantes hipertensas quatro tiveram hipertensão arterial crônica (HAC), quatro apresentaram hipertensão gestacional (HIG), 19 apresentaram pré-eclâmpsia (PE) e quatro pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial crônica (PE/HAC). Das gestantes com pré-eclâmpsia, seis evoluíram com eclâmpsia e seis com Síndrome HELLP. O sulfato de magnésio foi utilizado no tratamento de oito gestantes.

A Figura 1 mostra a distribuição percentual das diversas formas de síndromes hipertensivas gestacionais nesta amostra.

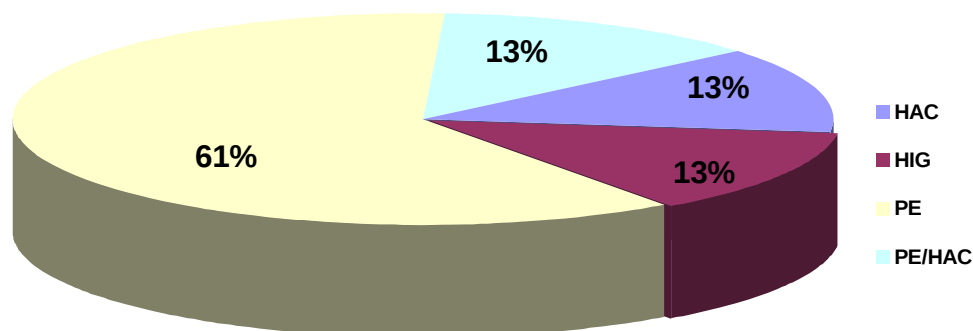


Figura 1: Distribuição das mães com síndromes hipertensivas da gestação.

A morbidade neonatal foi elevada nos dois grupos, mas a mortalidade foi baixa e não houve diferença entre os grupos, como mostra a Tabela 2. A síndrome do desconforto respiratório (SDR) foi a doença mais freqüente na amostra estudada. As medianas e percentís (P25 e P75) da FiO₂ máxima utilizada nas primeiras 72 horas foram de 0,4 (0,3- 0,5) e 0,5 (0,3- 0,6) nos grupos hipertensas e normotensas respectivamente ($p=0,225$); do tempo de uso de oxigênio foram de 7,5 (5- 30) e 18 (7,5- 52) dias ($p=0,064$), e do tempo de internação 30 (21- 53) e 42 (31- 69) dias ($p=0,122$).

Tabela 2. Principais doenças, assistência respiratória e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos estudados.

Variável	Hipertensas (n=32)	Controle (n=41)	Valor de p
S. Desconforto respiratório n (%)	23 (72)	28 (68)	0,941
Pneumonia precoce n (%)	6 (19)	11 (26)	0,595
Uso de surfactante exógeno n (%)	19 (59)	24 (58,5)	0,867
Uso de VM nas 1 ^{as} 72 h n(%)	20 (62,5)	23 (56)	0,755
Uso de CPAP nasal nas 1 ^{as} 72 h n (%)	12 (37,5)	18 (43)	0,755
Sepse precoce n (%)	2 (6)	7(17)	0,283
Sepse tardia n (%)	9 (28)	8 (19,5)	0,559
Enterocolite necrosante n (%)	4 (12,5)	2 (5)	0,394
HPIV graus 3-4 n (%)	5 (16)	8 (19,5)	0,903
Retinopatia da prematuridade n (%)	3 (9)	6 (15)	0,722
Oxigênio aos 28 dias n (%)	10 (31)	16 (39)	0,659
Oxigênio com 36 semanas n (%)	4 (12,5)	9 (22)	0,460
Óbito intrahospitalar n (%)	4 (12,5)	5 (12)	1,000

HPIV = hemorragia periintraventricular

Foram coletadas 155 amostras de aspirado de vias aéreas. O volume recuperado no procedimento de obtenção do material biológico foi de 85% em média.

Os resultados das dosagens dos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação nos prematuros de mães hipertensas comparados aos das normotensas, estão apresentados nas figuras 2 a 4, onde se verifica que nos dois momentos de avaliação as concentrações de malondialdeído, de óxido nítrico e de interleucina 8 não diferiram entre os grupos.

Ao comparar os valores dos 3 biomarcadores no primeiro versus terceiro dia em cada grupo, também não houve diferença significativa.

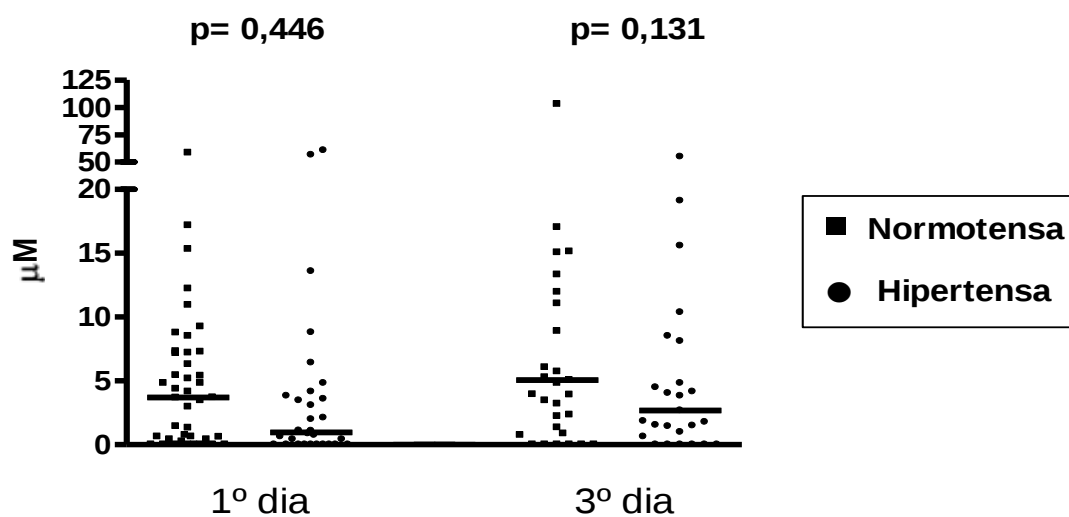


Figura 2- Concentrações de MDA dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1º e 3º dias de assistência ventilatória.

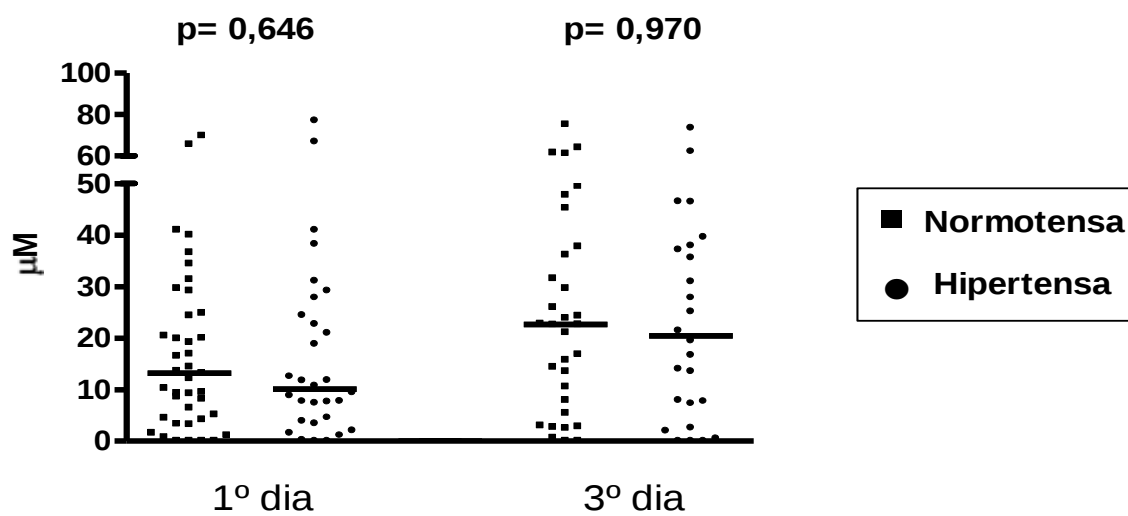


Figura 3- Concentrações de NO dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1º e 3º dias de assistência ventilatória.

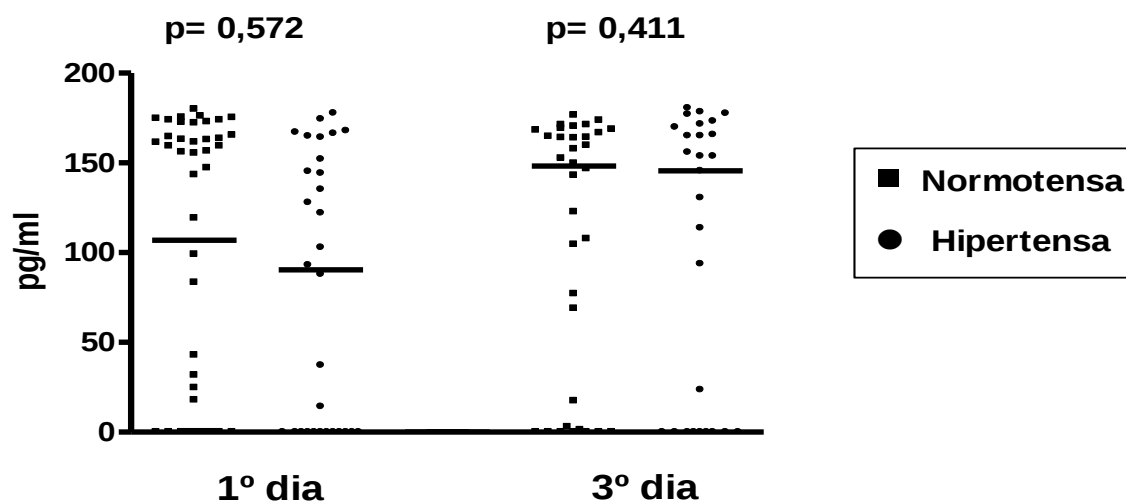


Figura 4- Concentrações de IL-8 dos prematuros de mães hipertensas e normotensas no 1º e 3º dias de assistência ventilatória.

Foram também avaliadas as concentrações dos biomarcadores em função do tipo de assistência ventilatória.

Os níveis de malondialdeído e de óxido nítrico não diferiram entre os 43 prematuros que utilizaram ventilação mecânica e os 20 que receberam CPAP nasal (Figuras 5 e 6). Entretanto as concentrações de interleucina 8 no primeiro dia foram significativamente mais elevadas nos prematuros em ventilação mecânica (Figura 7).

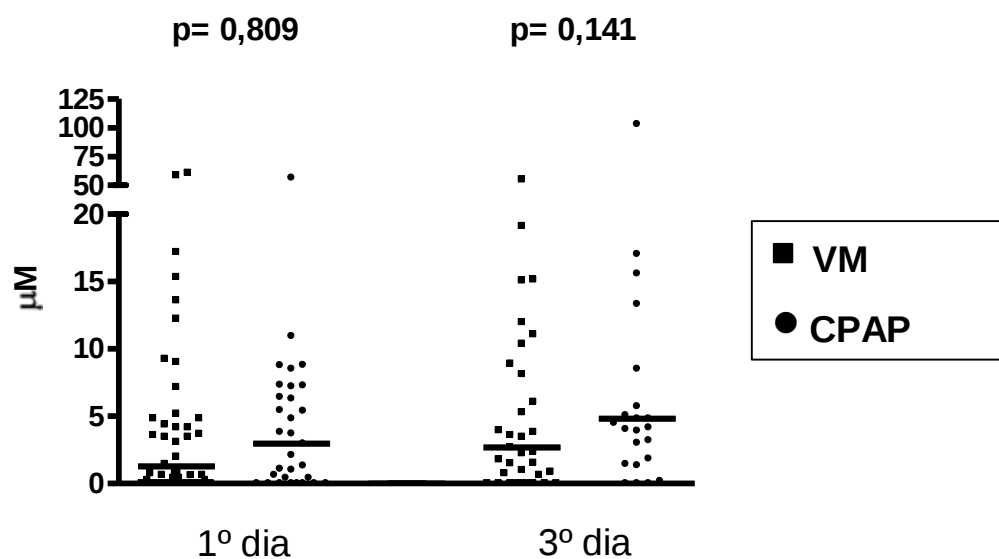


Figura 5- Concentrações de MDA dos prematuros no 1º e 3º dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória.

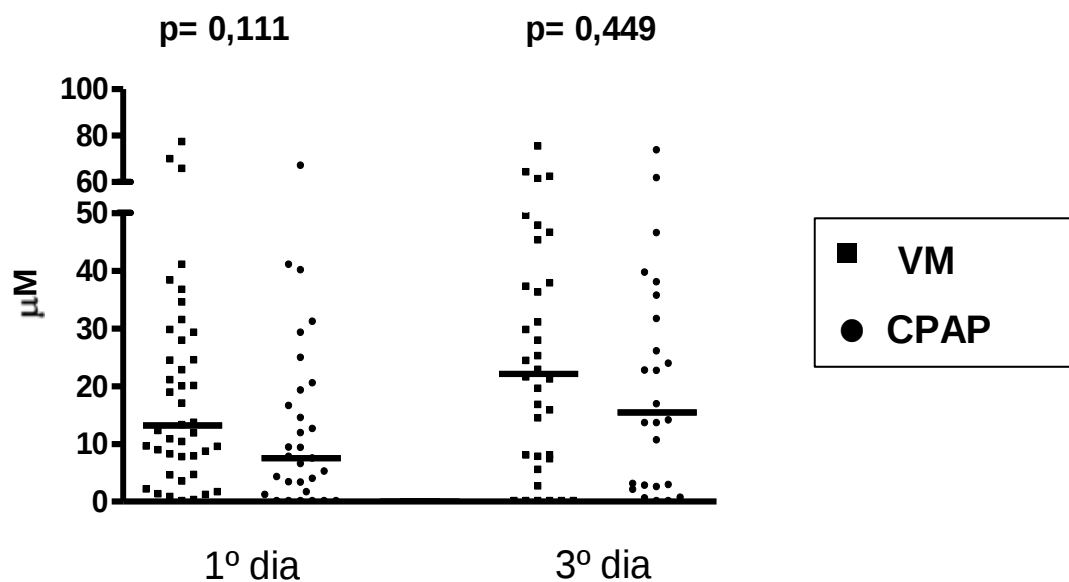


Figura 6- Concentrações de NO dos prematuros no 1º e 3º dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória.

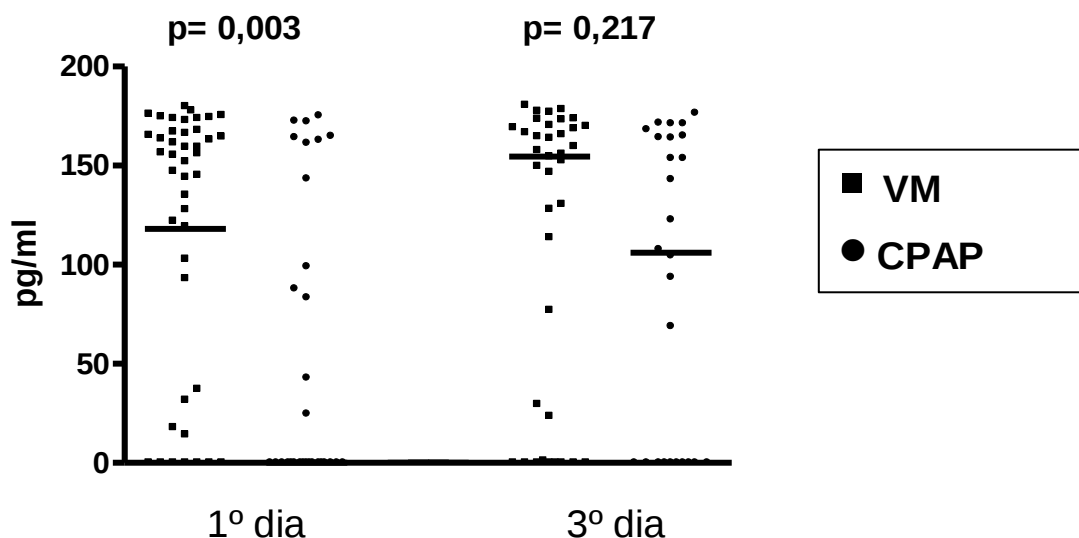


Figura 7- Concentrações de IL-8 dos prematuros no 1º e 3º dias de vida conforme o tipo de assistência ventilatória.

Ao investigar a relação dos biomarcadores com a ocorrência de DBP e/ou óbito, verificou-se que as concentrações de malondialdeído e de óxido nítrico em vias aéreas não se associaram ao desfecho de interesse (Figuras 8 e 9), enquanto que a IL-8 mostrou-se significativamente aumentada, tanto no primeiro como no terceiro dia de vida, nos prematuros que evoluíram com DBP/ óbito (Figura 10).

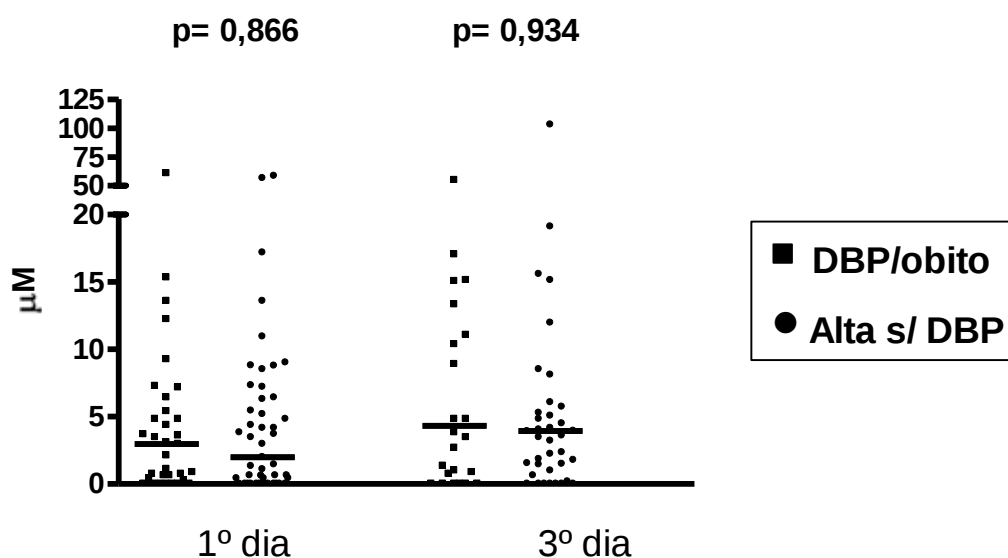


Figura 8- Concentrações de MDA dos prematuros no 1º e 3º dias de vida com relação ao desfecho de interesse.

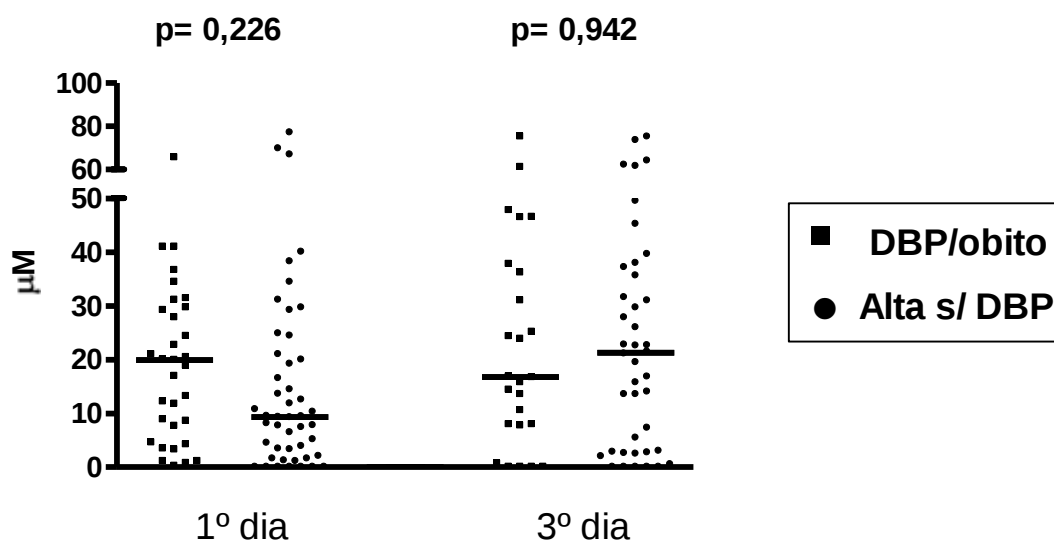


Figura 9- Concentrações de NO dos prematuros no 1º e 3º dias de vida com relação ao desfecho de interesse.

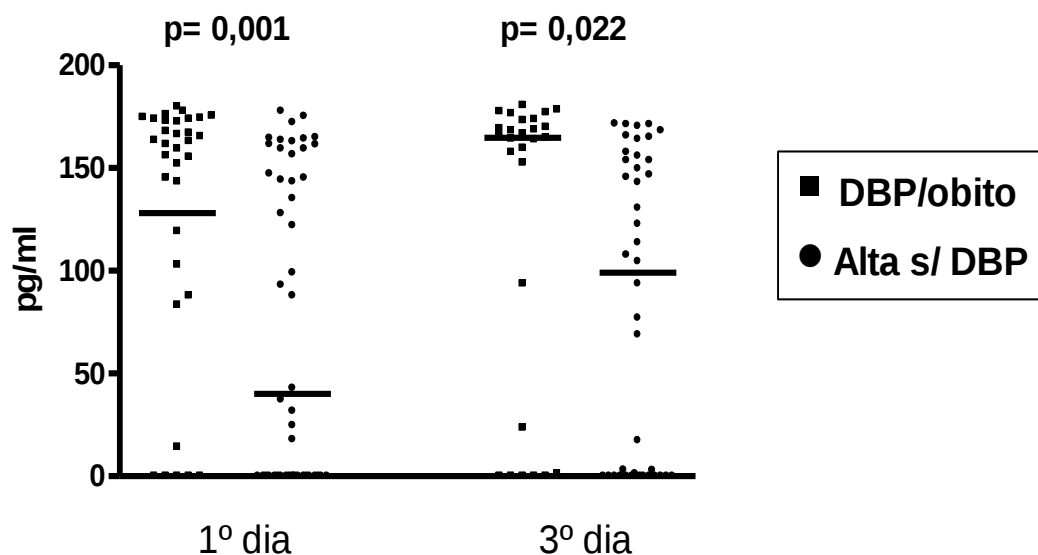


Figura 10- Concentrações de IL-8 dos prematuros no 1º e 3º dias de vida com relação ao desfecho de interesse.

O ajuste de modelos lineares generalizados com distribuição gama para testar a associação entre síndromes hipertensivas da gestação, idade gestacional, adequação do peso ao nascer para idade gestacional, uso de ventilação mecânica e os níveis de biomarcadores, não mostrou associação significativa entre as síndromes hipertensivas da gestação, a idade gestacional, o uso de ventilação mecânica e as concentrações dos biomarcadores nos dois momentos de avaliação. A adequação do peso para a idade gestacional influenciou nos níveis de MDA no primeiro ($p= 0,016$) e terceiro dias ($p= 0,009$) e nos valores de óxido nítrico no primeiro dia de vida ($p= 0,046$).

Na análise multivariada com regressão logística foram incluídos como potenciais fatores de risco para DBP/óbito as síndromes hipertensivas da gestação, a idade gestacional, a adequação do peso ao nascer para idade gestacional e o uso de ventilação mecânica, evidenciando-se efeito significativo da idade gestacional e da ventilação mecânica (Tabela 3).

Tabela 3: Modelo de regressão logística para a variável resposta DBP/óbito

Variável	OR	IC 95%
VM	17,6	2,0 – 152,5
Idade gestacional	1,5	1,1 – 1,9

5 - DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia como manifestação mais freqüente das síndromes hipertensivas da gestação confirmou-se neste estudo em que 74% das gestantes tiveram esse tipo de manifestação das síndromes hipertensivas, e também mostrou elevada morbidade neonatal nos filhos de mães hipertensas, porém sem diferença significativa em relação aos de mães normotensas. As principais complicações neonatais foram aquelas associadas com a prematuridade (síndrome do desconforto respiratório, hemorragia periintra-ventricular, enterocolite necrosante e displasia broncopulmonar), já que em ambos os grupos a idade gestacional foi baixa. Resultado semelhante foi obtido em estudo caso-controle com 223 prematuros de mães com pré-eclâmpsia e idade gestacional menor que 35 semanas, no qual a morbidade neonatal não diferiu entre os filhos de mães hipertensas e normotensas, mesmo no subgrupo menor que 32 semanas (Friedman et al., 1995). Esses resultados corroboram o conceito de que a pré-eclâmpsia não acelera a maturidade fetal nem melhora a evolução neonatal, que pode até ser pior nos prematuros de mães hipertensas como documentado por Withagen et al., (2001).

Restrição do crescimento intra-uterino é uma complicação freqüente das síndromes hipertensivas da gestação, com incidência de 15 até mais que 50% de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (Roberts et al., 2005), o que se confirmou neste estudo em que 44% dos prematuros de mães hipertensas foram pequenos para a idade gestacional. Esse é um aspecto que desperta preocupação, pois neste estudo associou-se aos níveis de marcadores de estresse oxidativo em vias aéreas. A associação da restrição do crescimento intra-uterino com os níveis de malondialdeído foi recentemente documentada em sangue materno, do cordão umbilical e do recém-nascido, em gestações de termo, caracterizando a ocorrência de estresse oxidativo nesta condição (Gveric-Ahmetasevic et al., 2009), mas ainda não havia sido descrita em vias aéreas de prematuros.

O efeito das SHG na morbidade respiratória de prematuros ainda é controverso na literatura e os estudos focalizaram predominantemente a ocorrência de SDR, sendo sugerido nos estudos iniciais que a situação de estresse intra-uterino crônico que ocorre na pré-eclâmpsia poderia estimular a maturação pulmonar e diminuir o risco de SDR (Yoon et al., 1980). Outros autores não evidenciaram diferença na maturação pulmonar e no risco de SDR (Schiff et al., 1993; Carvalho et

al.,1997), o que foi corroborado no presente estudo. Porém há estudos que mostram aumento de SDR em prematuros de mães com pré-eclâmpsia (Chang et al., 2004).

A associação da pré-eclâmpsia com a displasia broncopulmonar tem sido investigada recentemente e os resultados são conflitantes. No presente estudo as síndromes hipertensivas da gestação não tiveram associação com a ocorrência de DBP, semelhante ao descrito por Cunha et al., (2003) e também por Cetinkaya et al., (2010). Entretanto, em uma coorte de 107 prematuros menores que 32 semanas de gestação, dos quais 25% desenvolveram DBP, a pré-eclâmpsia foi fator independente de risco para DBP com OR= 18,7 (IC95% 2,44 – 144,76) (Hansen et al., 2010).

A ausência de diferenças na evolução neonatal de prematuros de mães hipertensas deve ser vista com cautela devido à natureza do grupo controle, que geralmente é constituído por prematuros advindos de trabalho de parto prematuro e/ou rotura prematura de membranas, o que não é uma evolução gestacional normal e está relacionada a mecanismos inflamatórios/infecciosos que podem influenciar no prognóstico neonatal (Speer, 2001; Bry et al., 2010).

A prática obstétrica é também importante fator modulador do prognóstico neonatal, conforme documentado em estudo recente envolvendo 1858 gestantes com hipertensão gestacional leve e estável, das quais em 67% o parto foi eletivo, culminando em 25,5% de prematuridade tardia iatrogênica com aumento na morbidade respiratória (Barton et al., 2011). Assim, se o prognóstico neonatal dos filhos de mães com síndromes hipertensivas da gestação é decorrente do efeito direto da doença materna ou devido à prematuridade é uma questão não totalmente esclarecida, que requer mais estudos.

Há que se considerar que a pré-eclâmpsia é considerada uma doença de 2 estágios, iniciando-se com inadequada placentação e redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário, resultando em hipóxia placentária. Esse estágio, em que os eventos são sub-clínicos é seguido pela liberação de vários mediadores, incluindo produtos de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, dos quais causam disfunção endotelial e síndrome de resposta inflamatória sistêmica, resultando no segundo estágio que é a manifestação clínica da pré-eclâmpsia (Borzychowski et al., 2006).

Independente da condição materna, prematuros doentes apresentam níveis urinários aumentados de marcadores de estresse oxidativo, quando comparados a prematuros estáveis e recém-nascidos de termo saudáveis (Tsukahara et al., 2004).

A condição de estresse oxidativo aumentado em gestações complicadas pelas síndromes hipertensivas está bem documentada na literatura. Vários estudos mostraram aumento nos níveis de agentes pró-oxidantes e diminuição dos antioxidantes em sangue materno e placenta (Rodriguez et al., 2008; Cindrova-Davies, 2009; Rani et al., 2010) e em alguns estudos essas alterações também foram evidenciadas em amostras de cordão umbilical, sugerindo que o aumento do estresse oxidativo nas gestantes hipertensas pode afetar o conceito (Chamy et al., 2006; Howlader et al., 2009), mas a relação entre síndromes hipertensivas, estresse oxidativo e prognóstico neonatal ainda foi pouco estudada e os resultados não são conclusivos.

Há forte evidência que o estresse oxidativo, associado à resposta inflamatória desencadeada por citocinas pró-inflamatórias, mediadores lipídicos e ativação do complemento, estão envolvidos na patogênese da displasia broncopulmonar, e vários biomarcadores tem sido investigados em lavado broncoalveolar ou aspirado de vias aéreas, na tentativa de prever o risco de DBP, entretanto os estudos tiveram amostra pequena e ainda não foi identificado um marcador ideal (Schock et al., 2001; Collard et al., 2004; Thompson & Bhandari, 2008).

Em relação à obtenção do material biológico de vias aéreas, o lavado broncoalveolar é considerado a técnica mais acurada, entretanto a aspiração traqueal tem sido a técnica mais utilizada, por ser um procedimento rotineiro e padronizado na assistência neonatal (Thompson & Bhandari, 2008). O presente estudo confirmou a efetividade da aspiração de vias aéreas, com recuperação de 85% do volume injetado.

A hipótese deste estudo foi que os níveis dos biomarcadores estivessem aumentados em vias aéreas dos prematuros de mães hipertensas, e esse aumento relacionado ao pior prognóstico pulmonar, o que não foi confirmado, pois os prematuros de mães hipertensas não apresentaram diferenças nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e óxido nítrico) e de inflamação (interleucina 8) no aspirado de vias aéreas nas primeiras 72 horas quando comparados aos filhos de mães normotensas, notando-se em ambos os grupos grande variabilidade nos valores dos biomarcadores. Esta é uma

contribuição deste estudo para o conhecimento da evolução neonatal de prematuros de mães hipertensas, pois, ao revisar a literatura não foram encontrados estudos que avaliaram marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas de recém-nascidos de mães com SHG.

É possível que a ausência de efeito da doença materna nos biomarcadores seja em parte devido à investigação ter sido realizada exclusivamente em vias aéreas nas quais outros fatores, como o tipo de assistência respiratória, possam exercer maior influência. Assim, foi investigado o efeito da ventilação mecânica versus CPAP nasal nos níveis de MDA, NO e IL-8, independente a presença de hipertensão materna. Não foi detectada diferença nos marcadores de estresse oxidativo, sugerindo que, pelo menos nos 3 primeiros dias de uso, a ventilação mecânica não causa maior estresse oxidativo em vias aéreas do que o CPAP nasal. Porém a IL-8 foi maior nos prematuros com ventilação mecânica, traduzindo o processo inflamatório associado a essa modalidade de assistência, o que está bem documentado na literatura, tanto em estudos experimentais como clínicos.

Em estudo com cordeiros prematuros documentou-se que os animais tratados com CPAP tinham menos indicadores de lesão pulmonar do que os que utilizaram ventilação mecânica (Jobe et al., 2002). Entretanto, outro estudo experimental mostrou que o uso de CPAP nasal não protege da lesão pulmonar causada por citocinas pró-inflamatórias (Polglase et al., 2009). Aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-8 foi documentado em lavado broncoalveolar de prematuros ventilados por 2 semanas (Schultz et al., 2003), e níveis séricos aumentados foram descritos após 2 horas de uso de ventilação mecânica (Bohrer et al., 2010).

Nenhum estudo realizado anteriormente avaliou os níveis de MDA e NO em vias aéreas comparando ventilação mecânica e CPAP nasal.

Vento et al., (2000) estudaram 16 prematuros menores que 1250g submetidos à ventilação mecânica nos primeiros dias de vida e com diferentes concentrações de oxigênio, nos quais foram dosados anti-oxidantes e o conteúdo de carbonil protéico como marcador de lesão oxidativa em vias aéreas. Com o aumento da concentração de oxigênio houve aumento dos antioxidantes, mas não do carbonil protéico sugerindo que apesar das limitações nos mecanismos antioxidantes os prematuros apresentam alguma resposta adaptativa à hiperóxia, o que não garante proteção contra a lesão pulmonar.

Em lavado broncoalveolar de prematuros extremos em ventilação mecânica nas primeiras 72 horas de vida, foi documentado níveis elevados de MDA (265.6 $\mu\text{mol/l}$) com diminuição significativa após a instilação intra-traqueal de glutathione (11.2 $\mu\text{mol/l}$), o que sugere ser esta uma possível intervenção para prevenção da displasia broncopulmonar (Cooke & Drury, 2005).

Ao investigar a relação dos biomarcadores com a ocorrência de displasia broncopulmonar/ óbito, o MDA e o NO não tiveram associação, enquanto que a IL-8 foi significativamente maior nos prematuros que evoluíram com DBP/óbito.

Embora a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da displasia broncopulmonar seja classicamente referida na literatura, poucos estudos investigaram os níveis de marcadores de estresse oxidativo e agentes antioxidantes em vias aéreas de prematuros que evoluíram com displasia. Em 2001, Schock et al, dosaram produtos de oxidação proteica e agentes antioxidantes em amostras seriadas de lavado broncoalveolar de prematuros durante a primeira semana de vida e verificaram nos que evoluíram com displasia broncopulmonar níveis aumentados de antioxidantes nos primeiros 3 dias, enquanto que o marcador de estresse oxidativo não diferiu em relação aos prematuros sem displasia. Nos prematuros com DBP houve diminuição dos níveis de oxidantes e redução ainda mais acentuada dos antioxidantes no decorrer da primeira semana.

Em lavado broncoalveolar de prematuros menores que 32 semanas ventilados na primeira semana de vida, documentaram-se níveis elevados de MDA e níveis diminuídos de glutathione nos que evoluíram com displasia broncopulmonar, contudo os preditores de displasia foram infecção endotraqueal, sepse e idade gestacional (Collard et al., 2004).

Poucos estudos avaliaram o óxido nítrico em vias aéreas de prematuros e sua relação com a displasia broncopulmonar.

Vyas et al., (1999) avaliaram semanalmente os níveis de NO em lavado broncoalveolar de 12 prematuros que evoluíram com DBP; 18 com síndrome do desconforto respiratório e sem DBP e 7 recém-nascidos de termo sem doença pulmonar (controle). Na primeira semana não houve diferença entre os grupos (25-31 $\mu\text{mol/l}$), entretanto a partir da segunda semana os níveis permaneceram elevados nos prematuros que evoluíram com DBP e diminuíram nos demais grupos, com níveis significativamente maiores nos displásicos aos 14 dias de vida. Os níveis inicialmente elevados nos 3 grupos sugerem que o óxido nítrico pode ser importante

mediador na adaptação da circulação pulmonar após o nascimento, enquanto que a persistência de níveis elevados nos prematuros com DBP pode ser devida à má adaptação pulmonar precoce ou aumento de inflamação pulmonar na segunda semana de vida . Esses dados podem explicar os resultados do presente estudo, que avaliou as concentrações de NO apenas nas primeiras 72 horas de vida e não encontrou diferenças entre os grupos.

Em prematuros extremos foram avaliados o NO exalado e a função pulmonar como preditores de DBP. Prematuros que evoluíram com DBP, tiveram menor peso de nascimento e idade gestacional, e pior função pulmonar no 3º dia de vida, sendo o peso de nascimento o melhor preditor de DBP. O óxido nítrico exalado não diferiu nos displásicos (Williams et al., 2007).

Devido ao pequeno número de estudos e de pacientes avaliados com diferentes métodos de dosagem, o papel do NO em vias aéreas de prematuros e sua relação com DBP ainda não estão esclarecidos e mais estudos são necessários.

Vários autores têm documentado aumento das citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-8 em vias aéreas de prematuros que evoluem com DBP, corroborando os achados do presente estudo (Munshi et al., 1997; Beresford & Shaw, 2002; De Dooy et al., 2007; Thompson & Bhandari, 2008).

Neste estudo, apesar das maiores concentrações de IL-8 nos prematuros que evoluíram com DBP, os biomarcadores de estresse oxidativo e de inflamação em vias aéreas nos primeiros dias de vida não foram preditores de displasia broncopulmonar. A análise multivariada identificou 2 fatores clássicos de risco para DBP: a idade gestacional e o uso de ventilação mecânica.

A literatura é unânime em apontar a idade gestacional como fator primário de risco para DBP e tem sido crescente o enfoque no risco de lesão pulmonar associado à assistência ventilatória, principalmente a ventilação mecânica utilizada por mais que 24 horas (Tapia et al., 2006; Bhering et al., 2007; Van Marten, 2009). Recente estudo multicêntrico com 1260 prematuros de muito baixo peso mostrou que o uso de ventilação mecânica por mais que 24 horas aumentou em 2,4 vezes o risco de DBP e o uso por mais que 7 dias aumentou em 14,8 vezes esse risco (Gagliardi et al., 2011)

O presente estudo tem algumas limitações como o pequeno número amostral, o período de investigação restrito aos primeiros 3 dias de vida e o fato do grupo controle não ser “sadio”, pois nasceram de trabalho de parto prematuro ou rotura

prematura de membranas, e embora tenham sido excluídos os casos de corioamnionite clínica, outra limitação do estudo foi não ter investigado a presença de corioamnionite histológica.

Contudo é um estudo inovador sobre os níveis de marcadores de estresse oxidativo e de IL-8 em vias aéreas de prematuros de mães com síndromes hipertensivas da gestação, que ajuda a esclarecer alguns aspectos ainda pouco compreendidos sobre esse tema e desperta questionamentos a serem investigados em novos estudos.

6 – CONCLUSÃO

- Nas primeiras 72 horas de vida os valores de MDA, de óxido nítrico e de IL-8 em vias aéreas não diferiram entre prematuros de mães hipertensas e normotensas.
- Ventilação mecânica associou-se com aumento de IL-8, mas não aumentou os marcadores de estresse oxidativo, nos primeiros 3 dias de vida.
- Os biomarcadores não foram preditores de DBP/ óbito. A idade gestacional e o uso de ventilação mecânica foram fatores de risco para DBP/óbito.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander GR, Hilmes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States National Reference for Fetal Growth. *Obst & Gynecol.* 1996; 87: 163-16.
2. Alves S, Ishiki LS. Atuação do óxido nítrico fora do sistema nervoso. *Rev. Neurociencias.* 2005; 13: 105-9.
3. Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Brás Pneumol* 2005; 31: 60-8.
4. Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia: old problem, new presentation. *J Pediatr* 2006; 82: 2-3.
5. Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progresssion and outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 979-83.
6. Barton JR, Barton LA, BS; Istwan NB, Desch CN, Rhea DJ, Stanziano GJ, Sibai BM. Elective delivery at 34^{0/7} to 36^{6/7} weeks'gestation and its impact on neonatal outcomes in women with stable mild gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: e1-5.
7. Beresford MW, Shaw N. Detectable IL-8 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome. *Pediatr Res.* 2002; 52: 973-8.
8. Bernardi FBC. Metabolismo do óxido nítrico e parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia [dissertação]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2007.
9. Bhering CA, Mochdece CC, Moreira MEL, Rocco JR, Sant'Anna GM. Bronchopulmonary predication model for 7-day-old-infants. *J Pediatr.* 2007; 83: 163-70.
10. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical ventilation of newborns infant changes plasma pro and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr.* 2010; 156: 16-9.
11. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CWG. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 309-16.

12. Bry K, Hogmalm A, Backstrom E. Mechanisms of inflammatory lung injury in the neonate: lessons from a transgenic mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*. 2010; 34: 211-21.
13. Cabral SALCS, Costa CFF, Cabral Junior SF. Correlação entre idade materna, paridade, gemelaridade, síndrome hipertensiva e ruptura prematura de membranas e a indicação de parto cesáreo. *RBGO*. 2003; 25(10): 739-44.
14. Carvalho MA, Faúndes, Santos LC. Pregnancy-induced hypertension and hyaline membrane disease. *Int J Gynaecol Obstet* 1997; 58:197-202.
15. Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JÁ, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res*. 2006; 39: 229-36.
16. Cindrova-Davies T. Gabor than award lecture 2008: Pre-eclampsia - From placental oxidative stress to maternal endothelia dysfunction. *Placenta* 2009; 23 (suppl A): S55-S66.
17. Chang EY, Menard MK, Vermillion ST, Hulsey T, Ebeling M. The association between hyaline membrane disease and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191:1414-7.
18. Collard KJ, Godeck S, Halley JE, Quinn. Pulmonary antioxidant concentrations and oxidative damage in ventilated premature babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004; 89: 412-6.
19. Cooke RWI, Drury JA. Reduction of oxidative stress marker in lung fluid of preterm infants after administration of intra-tracheal liposomal glutathione. *Biol Neonate*. 2005; 87: 178-80.
20. Cunha GS, Mezzacapa Filho F, Ribeiro JD. Fatores maternos e neonatais na incidência de displasia broncopulmonar em recém-nascidos de muito baixo peso. *Jornal de Pediatria*. 2003; 79: 550-6.
21. D'Angio CT, Basavegowda K, Avissar NE, Finkelstein JN, Sinkin RA. Comparasion of tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage specimens from premature infants. *Biol Neonate*. 2002; 82: 145-9.
22. De Dooy J, Ieven M, Stevens W, De Clerck L, Mahieu L. High levels of CXCL8 in tracheal aspirate samples taken at birth are associated with adverse respiratory outcome only in preterm infants younger than 28 weeks gestation. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 193-203.

-
23. De Vries LS, Eken P, Dubowitz LM. The spectrum of leukomalacia using cranial ultrasound. *Behav Brain Res* 1992; 49:1-6.
 24. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 130-7.
 25. Ferrão MHL, Pereira ACL, Gersgorin HCTS, Paula TAA, Correa RRM, Castro ECC. Eficácia do tratamento de gestantes hipertensas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52: 390-4.
 26. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*. 1997; 43: 61-8.
 27. Fisher LD, Belle GV. A methodology for the health sciences. Wiley- interscience, New York, 1993, 1981p.
 28. Friedrich L, Corso AL, Jones MH. Prognóstico pulmonar em prematuros. *Jornal de Pediatria*. 2005; 81: 579-88.
 29. Friedman SA, Schiff E, Kao L, Sibai BM. Neonatal outcome after preterm delivery for preeclampsia. *Am J Gynecol* 1995; 172: 1785-92.
 30. Gagliardi L, Bellu R, Lista G, Zanini R. Do differences in delivery room intubation explain different rates of bronchopulmonary dysplasia between hospitals? *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2011; 96: 30-5.
 31. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JR JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. 1996; 268: 142-51.
 32. Gveric-Ahmetasevic S, Sunjic SB, Skala H, Stroser M, Zarkovic K, et al. Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers. *Free Radic Res*. 2009; 43(4): 376-84.
 33. Grotto D, Valentini J, Boeira S, Paniz C, Santa Maria L, Vicentini J, Moro A, Charao M, Garcia SC. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – malondialdeído. *Quim. Nova*. 2008; 2: 275-9.
 34. Hack M, Fanaroff AA. Outcomes of children of extremely low birth weight and gestational age in the 1990s. *Semin Neonatol*. 2000; 5: 89-106.
 35. Hamrick SE, Hansmann G. Patent ductus arteriosus of preterm infant. *Pediatrics*. 2010; 5: 1020-30.

-
36. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, et al. Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics* 2002; 110: 143-51.
 37. Howlader ZH, Parveen S, Tamanna S, Khan TA, Begum F. Oxidative stress and antioxidant status in neonates born to pre-eclamptic mother. *J Trop Ped* 2009; 55: 363-7.
 38. Kohlmann Jr. Osvaldo, Guimarães Armênio Costa, Carvalho Maria Helena C., Chaves Jr. Hilton de Castro, Machado Carlos Alberto, Praxedes José Nery et al. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Endocrinol Metab* [serial on the Internet]. 1999. Aug [cited 2007 Aug 20]; 43: 247-9. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php>
 39. Kwong KYC, Jones CA, Cayabyab R, Lecart C, Khuu N, Rhandhawa I, et al. The effects of IL-10 on proinflammatory cytokine expression (IL-1 β and IL-8) in hyaline membrane disease (HMD). *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1998; 88(1): 105-13.
 40. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1723-9.
 41. Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, Newnham JP, Ikegami M. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res*. 2002; 52: 387-92.
 42. Joint statement of the American Academy of Pediatrics (AAP), the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus, and the American Academy of Ophthalmology: screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics*. 2001; 108:809-11
 43. Monte LFV, Silva Filho LVF, Miyoshi M, Rozov T. Displasia broncopulmonar. *J Pediatr* 2005; 81: 99-110.
 44. Munshi UK, Niu JO, Siddiq MM, Parton LA. Elevation of interleukin-8 and inteleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonary*. 1997; 24: 331-6.
 45. Nash P. Experimental and clinical studies of oxidative stress in pré-eclampsia [dissertação]. Uppsala: Faculty of Medicine Uppsala Univerty, 2007.
 46. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program

-
- Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: S1-S22.
47. Oliveira CA, Lins CP, Sa RAM, Netto HC, Bornia RG, Silva NR, et al. Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2006; 6(1): 93-8.
48. Oliveira LH, Xavier CC, Lana AMA. Alterações morfológicas placentárias de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional. *J Pediatr.* 2002; 78: 397-402.
49. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.
50. Papile LA, Munsick G, Weaver N, Pecha S. Cerebral intraventricular hemorrhage (CVH) in infants less than 1500 grams: developmental follow-up at one year. *Pediatr Res.* 1979; 13: 528
51. Peraçoli JC, Parpinelli MA. Síndromes hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27: 627-34.
52. Polglase GR, Hillman NH, Ball MK, Kramer BW, Kallapur SG, Jobe AH, et al. Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation. *Pediatr Res.* 2009; 65: 67-71.
53. Philip AGS. Chronic lung disease of prematurity: a short history. *Seminars in Fetal & Neonatal.* 2009; 14: 333-8.
54. Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative Stress and Preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension.* 2004; 44: 374-80.
55. Ramsay PL, Demayo FJ, Hegemier SE, Wearden ME, Smith CV, Welty SE. Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 155-61.
56. Rani N, Dhingra R, Arya DS, Kalaivani M, Bhatla N, Kumar R. Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclampsia. *J Obstet Gynecol Res.* 2010; 36(6): 1189-94.
57. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPP-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001; 138: 92-100.
58. Roberts CL, Algert CS, Morris JM, Ford JB, Henderson-Smart DJ. Hypertensive disorders in pregnancy: a population based study. *MJA* 2005; 182: 332-5.

59. Rodriguez MJC, Yahuacci MP, Presno BM, Alvarado AJL. Oxidative stress level and placental histological changes during preeclampsia. *Ginecol Obstet Mex.* 2008; 76(6): 319-26.
60. Rugolo LMSS. Crescimento e desenvolvimento a longo prazo do prematuro extremo. *Jornal de Pediatria.* 2005; 81: 101-10.
61. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr.* 1996; 85: 1-4.
62. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia – oxidative stress and antioxidants. *Seminars in Neonatology.* 2003; 8: 39-49.
63. Schiff E, Friedman AS, Mercer BM, Sibai BM. Fetal lung maturity is not accelerated in preeclampsia pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 1096-101.
64. Schultz C, Tautz J, Reiss I, Moller JC. Prolonged mechanical ventilation induces pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol. Neonate.* 2003; 84: 64-6.
65. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate.* 2001; 79: 205-9.
66. Speer CP. Inflammation and brochopulmonary dysplasia: a continuing story. *Seminars in Fetal & Neonatal.* 2006; 11: 354-62.
67. Stoelhorst GM, Rijken M, Martens SE, Brand R, den Ouden AL, Wit JM, Veen S. Changes in neonatology: comparison of two cohorts of very preterm infants (gestational age < 32 weeks): the project On Preterm and Small for Gestational Age Infants 1983 and Leiden follow up Project on Prematurity 1996-1997. *Pediatrics.* 2005; 115: 396-405.
68. Tapia JL, Agost D, Alegria A, Standen J, Escobar M, Grandi et al. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J Pediatr.* 2006; 82: 15-20.
69. Thompson A, Bhandari. Pulmonary biomarkers of bronchopulmonary dysplasia. *Biomarker Insights.* 2008; 361-73.
70. Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *Neoreviews.* 2007; 8: 522-32.
71. Tsukahara H, Jiang MZ, Ohta N, Sato S, Tamura S, Hiraoka M, et al. Oxidative stress in neonates evaluation using specific biomarkers. *Life Sci* 2004; 75: 933-8.
72. Vancini RL, Lira CAB, Aboulafia J, Nouailhetas VLA. Radical livre, estresse oxidativo e exercício [monografia da internet]. São Paulo: UNIFESP; 2005 [acesso 14 jul 2007]. Disponível em: www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf.

-
73. Van Marter LJ. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2009; 14: 358-66.
 74. Vento G, Mele MC, Mordente A, Romagnoli C, Matassa PG, Zecca E, et al. High total antioxidant activity and uric acid in tracheobronchial aspirate fluid of preterm infants during oxidative stress: an adaptive response to hyperoxia? *Acta Paediatr*. 2000; 89: 336-42.
 75. Vento G, Matassa PG, Concolino P, Vendettuoli V, Vaccarella C, et al. Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Med*. 2006; 32: 723-30.
 76. Villar J, Say L, Shennan A, Lindheimer M, Duley L, Conde-Agudelo A. Methodological and technical issues related to the diagnosis, screening, prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. *Intern J Gynecol Obstet* 2004; 85: S28-S41.
 77. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52: 537-49.
 78. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am*. 1986; 33: 179-201.
 79. Withagen MIJ, Visser W, Wallenburg HCS. Neonatal outcome of temporizing treatment in early-onset preeclampsia. *Eur J Obstet & Gynecol and Reproductive Biology*. 2001; 94: 211-15.
 80. Yoon JJ, Kohl S, Harper RG. The relationship between maternal hypertensive disease of pregnancy and the incidence of idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1980; 65:735-9.
 81. Xiong X, Demianczuk NN, Saunders LD, Wang FL, Fraser WD. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. *Am J Epidemiol*. 2002; 155: 203-9.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE INFLAMAÇÃO EM VIAS AÉREAS E PROGNÓSTICO RESPIRATÓRIO DE PREMATUROS DE MÃES HIPERTENSAS E NORMOTENSAS

Nome e endereço do pesquisador: Rosa Juliana Madoglio

Avenida São Paulo, 25 São Manuel-SP Fone: (14) 91623183

Nome e endereço do Orientador: Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

R. Dr. Cardoso de Almeida, 1000 Ap.62 Botucatu-SP Fone: (14) 38154647.

Esta pesquisa será realizada na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP para investigar se algumas substâncias que são produzidas devido à hipertensão na gestação estão aumentadas na secreção das vias respiratórias do recém-nascido prematuro; e também investigar se essas substâncias estão associadas com a ocorrência de uma doença pulmonar crônica, chamada Displasia Broncopulmonar. As substâncias que vamos dosar chamam-se marcadores de estresse oxidativo e de inflamação, o que significa, são substâncias que normalmente existem em pequena quantidade no organismo e quando elas aumentam podem causar lesão nas células e então o bebê fica doente.

Após o nascimento, muitos prematuros apresentam dificuldade respiratória e precisam de assistência respiratória (VM ou CPAP). Nos recém-nascidos com assistência respiratória realizamos de rotina aspiração das vias respiratórias para não acumular secreções.

Como seu bebê está em assistência respiratória ele precisará ser aspirado diariamente, e se a senhora concordar em participar desse estudo, vai coletar uma pequena quantidade (1,5 ml) de secreção de vias aéreas, que seria jogada fora, para dosar as substâncias que estamos investigando. Faremos essa coleta no primeiro e no 3º dia de ventilação mecânica. O recém-nascido receberá todos os

cuidados necessários e padronizados no Serviço e não será submetido a nenhum procedimento diferente devido a sua participação nesse estudo.

Esse estudo não tem qualquer risco para a mãe nem para o bebê, pois o procedimento que vamos realizar já é feito de rotina em todos os recém-nascidos que necessitam de assistência respiratória. Embora o estudo não proporcione benefício imediato para o bebê, poderá beneficiar no futuro, muitos outros recém-nascidos de mães hipertensas, pois os resultados que iremos obter nos permitirão conhecer melhor os mecanismos pelos quais a hipertensão materna repercute na condição de saúde do recém-nascido.

Eu _____ entendo que, qualquer informação obtida sobre mim e meu bebê, será confidencial. Eu também entendo que nossos registros de pesquisa estão disponíveis para revisão dos pesquisadores. Esclareceram-me que minha identidade não será revelada em nenhuma publicação desta pesquisa; assim, consinto na publicação para propósitos científicos.

Eu entendo que estou livre para recusar a participação neste estudo ou para desistir a qualquer momento e que a minha decisão não afetará meu tratamento, nem o do meu bebê.

Eu certifico que li ou foi-me lido o texto de consentimento e entendi seu conteúdo. Este termo constará de 2 cópias e minha assinatura confirma que concordei livremente em participar deste estudo.

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Eu certifico que expliquei a(o) Sr.(a) _____, acima, a natureza, propósito, benefícios e possíveis riscos associados à sua participação nesta pesquisa, que respondi todas as questões que me foram feitas e testemunhei assinatura acima.

Assinatura do Pesquisador: _____

Data: _____

ANEXO 2: PROTOCOLO DE PESQUISA**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE INFLAMAÇÃO EM VIAS
AÉREAS E PROGNÓSTICO RESPIRATÓRIO DE PREMATUROS DE MÃES
HIPERTENSAS E NORMOTENSAS**

RN Nº: _____

Registro: _____

Dados Maternos:

Nome: _____ Idade: _____

Estado civil _____ Escolaridade _____

Procedência _____

Nº de Gestações: _____ Nº de partos: _____ Nº de aborto: _____

Hipertensão Arterial Crônica: Sim () Não ()

Gestação Atual:

Pré-Natal: sim () não () Nº de Consultas: _____ Local FMB () Fora ()

Doenças:

Diabete sim () não () Cardiopatia sim () não ()

Infecção urinária sim () não () quando _____

Infecção genital sim () não () quando _____

Sangramento vaginal sim () não () quando _____

Gravidade da pré-eclâmpsia / eclâmpsia:

Grau de Proteinúria: _____ Maior PA na gestação: _____

Convulsões: sim () não () Síndrome HELLP: sim () não ()

Medicamentos para hipertensão/ PE: _____

Uso atual de medicamentos () não () sim _____

DUM ____/____/____ US () não () sim Data: ____/____/____

Fumo: sim () não () Álcool: sim () não () Drogas: sim () não ()

Corticosteróide antenatal: () sim () não Ciclo completo () sim () não

Indução do parto: sim () não () Inibição do parto: sim () não ()

Membrana: () íntegra () rota _____ horas

Trabalho de parto () sim () não Sofrimento fetal () sim () não

Tipo de Parto: vaginal () cesáreo () urgente () sim não () Motivo _____

Dados do Recém-Nascido:

Data Nascimento: ____/____/____ Masculino () Feminino ()

IG DUM: _____ US: _____ New Ballard: _____ AIG () PIG () GIG ()

Peso Nascimento: _____ g Comprimento: _____ cm

Perímetros: Cefálico: _____ cm Torácico: _____ cm Abdominal: _____ cm

Peso da placenta: _____ g

Reanimação Neonatal? Sim () Não () Oxigênio? Sim () Não ()

Ventilação P. Positiva? Sim () Não () Intubação? Sim () Não ()

Massagem Cardíaca? Sim () Não () Drogas? Sim () Não ()

Apgar: 1º min _____ 5º min _____ BSA: _____ SNAP- PE: _____

Internação: UTIN () _____ d Berçário () _____ d Alojamento Conjunto () _____ d

Morbidade Neonatal: (S= sim N= não)

() Doença Membrana Hialina () Distúrbio Respiratório Adaptativo

() S. Pulmão Úmido/ TTRN () S. Escape ar Qual? _____

() Pneumonia precoce (1^{as} 72hv) () Pneumonia tardia (Após 72hv)

() Sepsis precoce (1^{as} 72hv) () Sepsis tardia (Após 72hv)

() PCA clínico () eco () Hemorragia pulmonar

() Enterocolite Necrosante () Dist. Metabólico _____

() Retinopatia da Prematuridade Grau _____

() Leucomalácia periventricular () Hemorragia Intracraniana Grau: _____

Óbito Intra-Hospitalar: () não () sim Data ____/____/____

Necrópsia () sim () não

Assistência Neonatal:

Jejum _____ d NPP: sim () não () Tempo de uso _____ d

Tipo de Aleitamento: _____ Início dieta: _____ d

Drogas Vasoativas () não () sim _____

Surfactante () não () sim 1ª dose com _____ hs vida nº doses _____

Diuréticos () não () sim início: ____/____/____ término ____/____/____
 Indometacina () não () sim Cirurgia PCA () não () sim Idade: ____
 Antibioticoterapia: Tipo: _____ Tempo de uso: _____
 Transfusão de GV () não () sim Quantas transfusões ____ data: ____
 Plaquetas () não () sim data: ____
 Fototerapia: Tempo de uso: _____ d
 Assistência Respiratória () sim () não
 () O₂ Tempo de uso _____ dias
 () CPAP nasal Início ____ dv Tempo de uso _____ dias
 () VMC Início ____ dv Tempo de uso _____ dias
 () Outras modalidades _____ Tempo uso _____ dias

Dosagens Laboratoriais:

Marcadores	Secreção de vias aéreas 1º dia	Secreção de vias aéreas 3º dia
Malondialdeído		
Óxido Nítrico		
Interleucina 8		

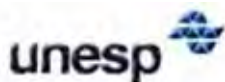
Dados da alta/óbito: Data: ____/____/____

Peso: _____ g Comp: _____ cm PC _____ cm

Óbito: Causa básica _____ Causa terminal _____

Diagnósticos finais:

ANEXO 3



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de junho de 2.009

OF. 217/2009-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Departamento de Pediatria da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Drª Lígia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto: **(Protocolo CEP 3236-2009)** "Prognóstico respiratório de prematuros de baixo peso nos primeiros anos de vida", a ser conduzido por Rosa Juliana Madoglio, orientada por Vossa Senhoria recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 01/06/2009.

Situação do Projeto: **APROVADO. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.**

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.