



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

Adriana Saito Jasper

**Marcadores de estresse oxidativo e anti-oxidantes em
prematturos de mães com pré-eclampsia: relação com
prognóstico neonatal no curto prazo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Lígia Maria S.S. Rugolo

**Botucatu
2016**

Adriana Saito Jasper

Marcadores de estresse oxidativo e anti-oxidantes em
prematturos de mães com pré-eclampsia: relação com
prognóstico neonatal no curto prazo

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientadora: Profª Dra. Lígia Maria S.S. Rugolo

Botucatu
2016

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

Jasper, Adriana Saito.

Marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes em prematuros de mães com pré-eclampsia : relação com prognóstico neonatal no curto prazo / Adriana Saito Jasper. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Capes: 40101150

1. Stress oxidativo. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Prematuros - Doenças. 4. Recém-nascidos. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Doenças do prematuro; Estresse oxidativo; Pré-eclampsia; Recém-nascido prematuro.

Dedicatória

*Aos meus pais, Saito e Olga, pelo amor, apoio e dedicação
durante todos esses anos.*

*Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha, doando-me
confiança e guiando-me por caminhos seguros. Obrigada pela
certeza de que terei sempre onde amparar caso eu tropece.*

Agradecimentos especiais

Às minhas filhas, Mariana e Gabriela, bênçãos de Deus em minha vida. Filhas que fazem o amor mais forte, os dias mais curtos, as noites mais longas, a casa mais feliz, as roupas mais largas ou mais apertadas e o futuro digno de ser vivido. Obrigada por terem compreendido minha dinâmica de trabalho e estudo ao longo desses anos.

Ao meu marido, Samir, companheiro querido de vida, que me ajudou e apoiou em todos os momentos durante esse trajeto.

Com carinho especial à Dra Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo, pessoa maravilhosa, iluminada e inigualável. Tenho muito orgulho de tê-la como orientadora e, acima de tudo, como amiga. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, amizade, dedicação e incentivo.

A Deus, pela sua presença constante em minha vida.

À toda minha família, que mesmo de longe sempre estiveram presentes transmitindo carinho e apoio.

À Dra. Maria Regina Bentlin, uma das grandes responsáveis pelo que aprendi sobre Neonatologia, sempre muito responsável e competente. Se tornou além de minha mestra, uma grande amiga. Muito obrigada por tudo!

Às gestantes e seus filhos, seres indispensáveis para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Às amigas Milene Piorkowsky Almeida de Sá e Rosa Juliana Madoglio, que estiveram sempre ao meu lado na batalha da coleta dos dados.

À Cilmery Kurokawa que ajudou muitíssimo nos dados e análise laboratoriais. Muito obrigada!

À equipe da Unidade Neonatal pela ajuda, compreensão e carinho. A todos meus amigos eternos de trabalho, que mesmo de longe, são inesquecíveis.

Às funcionárias do laboratório de Pediatria e funcionários da seção de Pós-Graduação.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e do Departamento de Pediatria.

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

RESUMO

Introdução: Estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da pré-eclampsia e de várias complicações neonatais, porém, a relação entre pré-eclampsia, estresse oxidativo e doenças neonatais não está bem estabelecida. **Objetivo:** Avaliar em prematuros os níveis de marcadores de estresse oxidativo e de anti-oxidantes, ao nascimento e nos primeiros dias de vida, e sua relação com a pré-eclampsia e com o prognóstico neonatal. **Método:** Estudo prospectivo observacional com 60 prematuros menores que 34 semanas de gestação, nascidos na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp sem malformações/infecções congênitas. Foram constituídos dois grupos: 30 prematuros de mães com pré-eclampsia e 30 de mães normotensas, pareados pela idade gestacional. Foram determinadas por espectrofotometria as concentrações de: malondialdeído (TBARS), glutathione, glutathione peroxidase e glutathione reductase, em amostras de placenta, do sangue de veia umbilical, da urina do 1.º e 4.º dia de vida e sangue no 4.º dia de vida. Os prematuros foram avaliados quanto à presença de: síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, persistência do canal arterial, hemorragia periintraventricular, enterocolite necrosante e óbito durante a internação. As associações entre grupos foram testadas pelo teste t de Student ou Mann-Whitney, Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher e por modelos lineares com distribuição gama. **Resultados:** A idade gestacional média foi de 30 semanas e não houve diferença nas condições de nascimento, morbidade e mortalidade em função da presença de pré-eclampsia. Tiveram alta sem seqüelas 80% dos prematuros no grupo pré-eclampsia e 73% no controle ($p=0,642$). Estresse oxidativo foi evidenciado em prematuros de mães com pré-eclampsia pelo aumento dos níveis de TBARS na urina e da glutathione peroxidase no sangue do 4º dia de vida. O aumento dos TBARS no 1.º dia de vida associou-se com a ocorrência de todas as doenças investigadas e menores valores das glutathiones em urina associaram-se com enterocolite necrosante, displasia broncopulmonar e óbito. Valores aumentados de TBARS na urina do 1.º dia de vida e da glutathione em sangue de cordão umbilical associaram-se com mau prognóstico neonatal. **Conclusão:** O estresse oxidativo está aumentado em prematuros de mães com pré-eclampsia e está associado com a morbidade neonatal no curto prazo. O desequilíbrio da condição oxidante/antioxidante, com aumento da peroxidação lipídica

e diminuição das glutathionas nos primeiros dias de vida está associado ao mau prognóstico neonatal de prematuros.

Palavras – Chave: Estresse Oxidativo; Pré-Eclampsia; Doenças do prematuro.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress is implicated in the pathophysiology of preeclampsia and many diseases of the neonatal period. However, the relationship between preeclampsia, oxidative stress and neonatal disease is not well established. **Objective:** To evaluate the levels of oxidative stress markers and anti-oxidants, at birth and in the first days of life, in preterm neonates born to preeclamptic and normotensive women and to investigate their relationship with preeclampsia and neonatal outcome. **Method:** a prospective observational study with 60 preterm infants less than 34 weeks gestation, born at the Maternity of Botucatu School of Medicine-Unesp, without congenital malformation/infection. Two groups were studied: 30 preterm of mothers with pre-eclampsia and 30 of normotensive mothers, matched by gestational age. Samples from the placental tissue, venous cord blood and the newborns' blood at day 4 and urine at days 1 and 4 were assayed for Malondialdehyde (TBARS), glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase concentrations, by spectrophotometry. Premature infants were evaluated for the presence of: respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, patent ductus arteriosus, periventricular intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis and death during hospitalization. The associations between groups were tested by Student's t test or Mann-Whitney, chi-square or Fisher's exact test and generalized linear models were fitted to compare biomarkers levels and neonatal outcome. **Results:** The mean gestational age was 30 weeks and there was no difference in the conditions of birth, morbidity and mortality between the groups. In preeclampsia group 80% of the infants were discharged without sequelae and 73% in the control ($p = 0.642$). Oxidative stress was evident in premature infants of mothers with pre-eclampsia by increased TBARS levels in urine and glutathione peroxidase in the blood of the 4th day of life. Higher levels of TBARS on the first day of life was associated with the occurrence of all investigated neonatal diseases, whereas lower levels of glutathione in urine was associated with necrotizing enterocolitis, bronchopulmonary dysplasia and death. Increased levels of TBARS in the urine of the first day of life and glutathione in umbilical cord blood were associated with poor neonatal outcome. **Conclusion:** Oxidative stress is increased in preterm infants of mothers with pre-eclampsia and is associated with early neonatal morbidity. The imbalance of oxidant /antioxidant condition, with increased lipid peroxidation and reduced glutathione system activity, in the first days of life is associated with poor outcome of preterm infants.

Key - Words: Oxidative Stress; Pre eclampsia; Infant, premature diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre sistema oxidante e antioxidante (<i>Adaptado de Vazquez et al., 2004</i>).	13
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados maternos e gestacionais nos grupos pré-eclampsia e controle	26
Tabela 2. Dados de nascimento nos grupos pré-eclampsia e controle.....	26
Tabela 3. Gravidade, morbidade e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos pré-eclampsia e controle.	27
Tabela 4. Valores medianos de TBARS em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.....	29
Tabela 5. Valores medianos de Glutathione Peroxidase (GPx) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.	30
Tabela 6. Valores medianos de Glutathione Redutase (GR) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.	31
Tabela 7. Valores medianos de Glutathione (GSH) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.	32
Tabela 8. Relação do marcador de estresse oxidativo e dos anti-oxidantes com o prognóstico neonatal.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Pré-eclampsia	11
1.2. Estresse Oxidativo	12
1.3. Situações que aumentam o estresse oxidativo	14
1.3.1. Na gestação	14
1.3.2. No recém-nascido.....	14
1.4. Pré-eclampsia e morbidade neonatal.....	15
2. OBJETIVO	17
3. MÉTODO	18
3.1. Delineamento da pesquisa e tamanho da amostra	18
3.2. Seleção dos sujeitos	18
3.2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão.....	19
3.3. Variáveis Clínicas.....	19
3.4. Variáveis Laboratoriais e momentos de avaliação	21
3.5. Métodos das dosagens laboratoriais.....	22
3.6. Coleta e processamento das amostras	22
3.7. Desfechos	23
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. ANEXOS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pré-eclampsia

A pré-eclampsia (PE) é a manifestação mais frequente das síndromes hipertensivas da gestação e a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal. Ocorre em 5% a 7% de todas as gestações, com cifras crescentes nos países em desenvolvimento (RAIJMAKERS et al., 2004; FERRÃO et al., 2006; NASH, 2007; MOURA et al., 2010; NOVO & GIANINI, 2010; SOUZA et al., 2010).

A etiologia dessa doença não está esclarecida. Estudos mostram que fatores genéticos, imunológicos e também o estresse oxidativo estão envolvidos no desenvolvimento da pré-eclampsia (XIONG et al., 2002; PERAÇOLI & PARPINELLI, 2005; NASH, 2007; PERES, 2007; RAIJMAKERS et al., 2008; SOUZA et al., 2010; RUGOLO et al., 2011; SHAH & KHALIL, 2015).

Na pré-eclampsia há falha da invasão trofoblástica nas artérias espiraladas do endométrio resultando em vasoespasmo generalizado, que determina alterações estruturais e lesão da parede vascular, o que contribui para inadequado fluxo sanguíneo e isquemia placentária (GRANGER et al., 2001; VAZQUEZ et al., 2004). A redução da perfusão e hipóxia placentária propiciam a ocorrência do estresse oxidativo, com produção aumentada de radicais livres (RUGOLO et al., 2011; SHAH & KHALIL, 2015).

Os índices de morbidade e mortalidade perinatal elevam-se, quando é necessário interromper prematuramente a gestação, devido a condições intra-uterinas adversas e/ou complicações maternas (COELHO et al., 2004).

A pré-eclampsia associa-se com repercussões imediatas para o concepto representadas por prematuridade, restrição do crescimento fetal, sofrimento fetal, risco aumentado de doenças pulmonares agudas e crônicas e morte perinatal. No longo prazo existe preocupação com as crianças nascidas de baixo peso, pois essas apresentam maior risco de desenvolver hipertensão e dislipidemia na idade adulta (FERRÃO et al., 2006; SOUZA et al., 2010; RUGOLO et al., 2011; RUGOLO et al., 2012).

1.2. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Dentre os compostos oxidantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio, encontradas predominantemente na forma de radicais livres de oxigênio derivados do metabolismo mitocondrial. Pela sua instabilidade, os radicais livres facilmente agregam-se a outras moléculas tentando capturar elétrons para se tornarem estáveis, entretanto nesse processo ocorre lesão de proteínas, DNA e lipídios (Figura 1). Espécies reativas de oxigênio são produzidas por diversos mecanismos, incluindo metabolismo de prostaglandinas e de ácidos graxos, isquemia-reperfusão, hipoxia e hiperoxia, inflamação e degradação de ATP (TRINDADE & RUGOLO, 2007).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e ou reduzir os danos causados pelos radicais livres e ou espécies reativas de oxigênio. Esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Dentre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se: selênio, zinco, cobre, glutathione, ceruloplasmina, bilirrubina e as vitaminas C e E (TRINDADE & RUGOLO, 2007).

Glutathione, um tripeptídeo (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), existe no organismo em duas formas: reduzida e oxidada, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. A atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) é um dos meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos no organismo, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular. Essa enzima possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Sua atividade depende da glutathione reduzida, que é oxidada em glutathione oxidada (MEISTER et al., 1983).

Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a glutathione reductase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de radicais livres, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), visando impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (MEISTER et al., 1983).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da produção excessiva de radicais livres ou da insuficiente capacidade de remoção dos mesmos. Tal processo propicia a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo de estruturas celulares em vários tecidos e órgãos, com alteração de suas funções vitais (VANCINI et al., 2005; TRINDADE & RUGOLO, 2007).



Figura 1. Relação entre sistema oxidante e antioxidante (*Adaptado de Vazquez et al., 2004*).

A membrana celular é a estrutura mais suscetível à ação das espécies reativas de oxigênio que causam peroxidação lipídica, podendo esta peroxidação ser catalisada por íons ferro ou iniciada pelo radical hidroxila (TRINDADE & RUGOLO, 2007). Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (DEL RIO et al., 2005). O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo. A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (ANDRADE JR et al, 2005).

Na presença do estresse oxidativo são produzidos metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados.

1.3. Situações que aumentam o estresse oxidativo

1.3.1. Na gestação

O estresse oxidativo aumenta na gestação normal, por haver maior consumo de oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio. Porém, esse estresse oxidativo é compensado pela ativação dos mecanismos de defesa antioxidante da gestante (SHARMA et al., 2006; MARSEGLIA et al., 2014).

Na pré-eclampsia, a perfusão sanguínea placentária é inadequada, propiciando a ocorrência de áreas de isquemia e reperfusão, com aumento na formação de radicais livres e, paralelamente, o sistema de defesa antioxidante se torna deficitário. Estudos em placenta de gestantes com pré-eclampsia mostram aumento de peroxidação lipídica e oxidação proteica, bem como diminuição das enzimas antioxidantes. Assim, o estresse oxidativo placentário é considerado importante evento na patogênese dessa doença (VANDERLELIE et al., 2005; CHAMY et al., 2006; SHARMA et al., 2006; KAUR et al., 2008; RUGOLO et al., 2011; HILALI et al., 2013; NEGI et al., 2014; SHAH & KHALIL, 2015).

1.3.2. No recém-nascido

O nascimento impõe um grande desafio ao conceito pela abrupta transição de um ambiente hipóxico intrauterino para ambiente relativamente hiperóxico extrauterino, ocasionando importantes mudanças fisiológicas e metabólicas no organismo, associadas ao aumento de estresse oxidativo. No recém-nascido prematuro a imaturidade e deficiência do sistema anti-oxidante aumenta o risco de lesão celular por radicais livres. Assim, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de várias doenças da prematuridade como displasia broncopulmonar, hemorragia peri-intraventricular ou lesão de substância branca, retinopatia da prematuridade e enterocolite necrosante (TSUKAHARA et al., 2004; TRINDADE & RUGOLO, 2007; YZYDORCZYK et al., 2015).

A assistência neonatal ao prematuro envolve, com frequência, situações que aumentam o risco de estresse oxidativo, incluindo o uso de maior concentração de oxigênio na reanimação em sala de parto e/ou na ventilação mecânica; emprego de nutrição parenteral na qual os lipídios, aminoácidos e vitaminas são fontes de radicais

livres; as transfusões sanguíneas que propiciam sobrecarga de ferro; fototerapia que pode desencadear dano fotodinâmico aos tecidos e ainda a ocorrência frequente de infecção/inflamação (AYCICEK & EREL, 2007; TRINDADE & RUGOLO, 2007; KAPADIA et al., 2013; MARSEGLIA et al., 2014; MOHAMED et al., 2015; AVERSA et al., 2016).

1.4. PRÉ-ECLAMPSIA E MORBIDADE NEONATAL

Na pré-eclampsia, um aspecto preocupante é que algumas alterações bioquímicas identificadas na placenta estão presentes em sangue de cordão umbilical, traduzindo a exposição do conceito à condição de estresse oxidativo materno (CHAMY et al., 2006; MEHENDALE et al., 2008). Assim, a pré-eclampsia, além de associar-se ao baixo peso ao nascer, prematuridade e restrição do crescimento intra-uterino, pode causar desequilíbrio na condição oxidante/antioxidante do conceito, favorecendo o desenvolvimento de doenças neonatais associadas ao estresse oxidativo (XIONG et al., 2002; TSUKAHARA et al., 2004; WEINBERGER et al., 2006). Entretanto, alguns estudos não detectam aumento do estresse oxidativo na circulação fetal e ou da morbidade neonatal em recém-nascidos de mães pré-eclâmpicas (TASTEKIN et al., 2005; BRAEKKE et al., 2006; RUGOLO et al., 2015).

Os conhecimentos atuais apontam para a atuação do estresse oxidativo na fisiopatologia da pré-eclampsia com consequente exposição do conceito ao estresse oxidativo materno, o que pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças neonatais. Porém, a relação entre pré-eclampsia / estresse oxidativo / anti-oxidantes e doenças neonatais não está bem estabelecida e o impacto clínico das alterações bioquímicas necessita de mais investigação.

Estudos sugerem que, as concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo na urina pode ser uma alternativa válida e de grande interesse em recém-nascidos, por ser menos invasiva em relação à dosagem sérica (SICIARZ et al., 2001, KUMAR et al., 2008).

Esses aspectos despertaram o interesse para a realização desta pesquisa, visando responder as seguintes questões:

- Quais as concentrações séricas e urinárias de marcadores de estresse oxidativo e de anti-oxidantes em prematuros de mães com pré-eclampsia, ao nascimento e nos primeiros dias de vida?
- A condição oxidante/antioxidante nos primeiros dias de vida relaciona-se com o prognóstico neonatal no curto prazo?

2. OBJETIVO

Determinar as concentrações de marcadores de peroxidação lipídica (TBARS) e dos antioxidantes glutathiona, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase em tecido placentário, no sangue de veia umbilical, na urina do 1.º e 4.º dia de vida e no sangue do 4.º dia de vida de prematuros de mães com pré-eclampsia, comparados com prematuros de mães normotensas.

Investigar se prematuros de mães com pré-eclampsia são expostos ao aumento do estresse oxidativo.

Caracterizar a relação dos biomarcadores oxidante e antioxidantes com o prognóstico neonatal no curto prazo.

3. MÉTODO

3.1. Delineamento da pesquisa e tamanho da amostra

Foi realizado estudo prospectivo na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (ANEXO 1).

Essa pesquisa é parte de um projeto referente ao prognóstico de recém-nascidos de mães com Síndromes Hipertensivas da Gestação, financiado pela FAPESP (Processo: 2008/01180-4). O recrutamento dos pacientes ocorreu no período de 2008-2009. Os resultados referentes às concentrações de óxido nítrico foram apresentados como dissertação de mestrado e publicados (RUGOLO et al., 2015).

A amostra compreendeu o número máximo de recém-nascidos prematuros que preencheram os critérios de inclusão no período de estudo.

O grupo controle foi constituído por prematuros de mães normotensas sem doenças ou complicações na gestação, nascidos devido a trabalho de parto prematuro ou rotura prematura de membranas (sem corioamnionite), que preencheram os mesmos critérios de inclusão do grupo de estudo (exceto a presença de pré-eclampsia) e que foram selecionados de forma aleatória com base na idade gestacional.

3.2. Seleção dos sujeitos

Foram selecionadas as gestantes com idade gestacional inferior a 34 semanas e diagnóstico de pré-eclampsia, internadas na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, tendo como motivo da internação trabalho parto ou resolução da gestação. O mesmo critério de seleção foi aplicado ao grupo controle, que teve como única diferença a ausência de hipertensão arterial. As gestantes foram informadas quanto aos objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

3.2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas no estudo as gestantes que preencheram os seguintes critérios:

- Diagnóstico de pré-eclampsia;
- Ausência de outras patologias clínicas na gestação;
- Ausência de corioamnionite clínica;
- Gestação única, entre 27 a 34 semanas de gestação com pré-eclampsia ou que internaram por trabalho de parto prematuro ou para resolução da gestação.
- Peso de nascimento entre 600 e 1800g;
- Obtenção de sangue do cordão umbilical e amostra de tecido placentário.

Foram excluídos os recém-nascidos que apresentaram:

- Diagnóstico clínico e/ou sorológico de infecção congênita;
- Síndrome genética, má-formação congênita múltipla, má-formação renal;
- Uso de diuréticos ou transfusão sanguínea nos primeiros quatro dias de vida;
- Óbito antes de 24 horas de vida.

O diagnóstico de pré-eclampsia fundamentou-se nos critérios do NHBPEP (2000). Assim, hipertensão arterial foi definida pelos valores pressóricos de 140 / 90 mmHg ou mais, em duas ocasiões com intervalo mínimo de quatro horas. Pré-eclampsia foi caracterizada pelo desenvolvimento de hipertensão após 20 semanas de gestação, associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina de 24 horas), em mulher previamente normotensa.

3.3. Variáveis Clínicas

Foram coletados dados maternos, de pré-natal, do nascimento, da evolução clínica e da assistência médica prestada aos prematuros durante a internação. Nenhum procedimento invasivo diferente dos praticados na rotina assistencial ao recém-nascido foi efetuado com finalidade da pesquisa. Como geralmente os recém-

nascidos de alto risco permanecem com saco coletor de urina, coletou-se a primeira amostra urinária da manhã para a dosagem dos marcadores de estresse oxidativo, nos dias estabelecidos na pesquisa.

Os dados de interesse para o estudo foram obtidos do prontuário do paciente, e incluíram:

- Dados maternos: idade; paridade; tabagismo; realização de pré-natal; uso de corticóide antenatal; rotura prematura de membranas pré-termo; sofrimento fetal e tipo de parto.
- Dados do recém-nascido: sexo; idade gestacional determinada pela melhor estimativa obstétrica, com base na data da última menstruação ou ultrassonografia precoce (antes de 20 semanas de gestação); medidas antropométricas ao nascimento (peso, comprimento e perímetro cefálico); adequação do peso para a idade gestacional conforme critério de FENTON et al (2013); reanimação neonatal em sala de parto (necessidade de ventilação com pressão positiva); boletim de APGAR no primeiro e quinto minutos de vida; grau de desconforto respiratório avaliado pelo Boletim de Silvermann – Andersen (BSA; se ≥ 4 desconforto moderado); escore de gravidade SNAPPE II (RICHARDSON et al., 2001) aplicado nas primeiras 24 horas de vida dos recém-nascidos;
- Morbidade neonatal: caracterizada pela presença das seguintes doenças:
 - Síndrome do desconforto respiratório: diagnóstico clínico-radiológico e gasométrico, com base no desconforto respiratório precoce e progressivo, com necessidade de oxigênio e padrão radiológico característico (retículo-granular fino).
 - Persistência do canal arterial: diagnóstico clínico confirmado pelo ecocardiograma, realizado rotineiramente na primeira semana de vida em todo prematuro de muito baixo peso.
 - Displasia broncopulmonar (DBP): definida pela necessidade de oxigênio (O₂) aos 28 dias de vida e com 36 semanas de idade gestacional corrigida (JOBE & BANCALARI, 2001).
 - Sepsis: manifestações clínicas e laboratoriais de infecção sistêmica, associadas ou não a hemocultura positiva; considerada precoce quando detectada nas primeiras 72 horas de vida e tardia após esse período.

- Hemorragia peri-intraventricular e leucomalácia periventricular: diagnóstico realizado pela ultrassonografia transfontanelar, realizada de rotina em prematuros de muito baixo peso na primeira e na quarta semanas de vida. O grau de hemorragia foi determinado conforme a classificação de PAPILE et al (1978), sendo consideradas graves as hemorragias graus III ou IV. A leucomalácia cística foi caracterizada pela presença de pequenos cistos na região periventricular.
- Enterocolite necrosante: diagnóstico clínico-radiológico com estadiamento efetuado segundo WALSH & KLIEGMANN (1986), sendo confirmada quando grau ≥ 2 .
- Retinopatia da prematuridade: diagnóstico realizado pela fundoscopia indireta realizada no final do primeiro mês de vida em todo prematuro de muito baixo peso.
- Evolução:
 - Óbito intra-hospitalar e idade do óbito.
 - Tempo de internação.
- Variáveis referentes à assistência neonatal:
 - Transfusão de hemácias após o 4º de vida;
 - Uso de surfactante exógeno;
 - Assistência respiratória: necessidade e tempo de uso de oxigênio, CPAP nasal, ventilação mecânica convencional;
 - Nutrição parenteral: necessidade e tempo de uso.

3.4. Variáveis Laboratoriais e momentos de avaliação

- Marcador de estresse oxidativo:
 - Malondialdeído (peroxidação lipídica).
- Marcadores de atividade anti-oxidante:
 - Glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx).

Esses marcadores foram avaliados em 3 momentos:

- M1: Nascimento (placenta e sangue de veia umbilical)
- M2: primeiro dia de vida (urina)
- M3: quarto dia de vida (sangue e urina)

3.5. Métodos das dosagens laboratoriais

- Malondialdeído foi dosado por absorvância espectrofotométrica das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, designadas TBARS, as quais reagem com o malondialdeído produzindo uma substância rósea, conforme o método de OHKAWA et al., 1979;
- Glutathione e as enzimas glutathione redutase e glutathione peroxidase foram dosadas por método espectrofotométrico, utilizando-se kits específicos, que por meio de reciclagem enzimática, acoplando a oxidação da glutathione e do NADPH permitem quantificar a glutathione (GSH) e determinar a atividade da glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (VANDERLELIE et al., 2005).

Todas as dosagens foram realizadas por técnicos do laboratório de Pesquisa em Pediatria, com a participação da pesquisadora. Os resultados obtidos nas amostras urinárias foram corrigidos pela creatinina urinária, conforme classicamente recomendado na avaliação de biomarcadores, a fim de controlar o efeito da diluição da urina (McCLINTOCK et al., 2007).

3.6. Coleta e processamento das amostras

Foram obtidas amostras dos seguintes materiais biológicos:

- Placenta: fragmento de cinco centímetros de diâmetro coletado da região das vilosidades coriônicas na porção central da placenta, logo após a dequitação e imediatamente congelado em nitrogênio líquido;
- Sangue de cordão umbilical: amostra de dois e meio mililitros coletados por punção da veia do cordão umbilical;
- Sangue do recém-nascido: amostra de dois e meio mililitros coletados por punção venosa periférica no 4º dia de vida, que corresponde ao período do pico da hiperbilirrubinemia neonatal, quando rotineiramente é avaliado o nível sérico de bilirrubinas;
- Urina do recém-nascido: amostra de cinco mililitros de uma micção, coletada por meio de saco coletor, no 1º e no 4º dias de vida.

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos com EDTA e imediatamente centrifugadas a 2000xg por 10 minutos, para a separação do plasma, que foi distribuído equitativamente em dois frascos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

As amostras de urina também foram alicotadas em dois criotubos e congeladas em nitrogênio líquido.

Após obtenção de todas as amostras do paciente, estas foram transportadas em recipiente com gelo para o Laboratório de Pesquisa em Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, onde permaneceram estocadas a -80° C até o momento das dosagens.

3.7. Desfechos

- Bom prognóstico: alta sem sequelas.
- Mau prognóstico: morte ou sequelas.
-

Sequelas foram definidas pela presença de uma ou mais das seguintes doenças que comprometem o prognóstico do recém-nascido: displasia broncopulmonar (dependência de O₂ com 36 semanas de idade corrigida), hemorragia peri-intraventricular graus III ou IV, leucomalácia periventricular, enterocolite necrosante grau ≥ 2 e retinopatia da prematuridade.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva dos dados foi realizada por tabelas de frequência e de associação, sendo as variáveis numéricas apresentadas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentis, e as variáveis categóricas expressas pelo número e proporção de eventos.

A comparação entre os 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.

Devido à falta de normalidade dos valores das concentrações de TBARS e das glutationas, a comparação dos mesmos, para cada uma das variáveis categorizadas de interesse foi efetuada utilizando-se modelos lineares generalizados com distribuição gama. O ajuste dos modelos foi feito pela PROC GENMOD do programa SAS for Windows v.9.2.

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

5. RESULTADOS

No período de julho de 2008 a dezembro de 2009 foram selecionadas 70 gestantes com gestação única e nascimento previsto antes de 34 semanas de gestação, que concordaram em participar do estudo, das quais 34 apresentavam pré-eclampsia.

No grupo pré-eclampsia, um recém-nascido foi excluído por problemas técnicos na coleta ao nascimento, outro recém-nascido por ter sido submetido à exsanguíneo transfusão nas primeiras 72 horas de vida e dois recém-nascidos por não se conseguir o pareamento pela idade gestacional com o grupo controle. No grupo controle, seis recém-nascidos foram excluídos: cinco por falta de pareamento e um devido ao óbito nas primeiras 24 horas de vida. Assim, do total de 70 recém-nascidos, devido ao critério de inclusão e pareamento pela idade gestacional foi possível estudar 60 prematuros, sendo 30 filhos de mães com pré-eclampsia (grupo pré-eclampsia) e 30 filhos de mães normotensas (grupo controle).

As principais características maternas e gestacionais encontram-se na Tabela 1, onde se destaca o elevado percentual de uso de corticóide antenatal em ambos os grupos. A resolução da gestação por cesárea predominou no grupo pré-eclampsia, sempre em caráter de urgência por indicação materna, enquanto que no grupo controle o trabalho de parto e a rotura prematura de membranas foram mais frequentes (Tabela 1).

Tabela 1. Dados maternos e gestacionais nos grupos pré-eclampsia e controle

Variável		Pré-eclampsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Idade (anos)	x ± DP	27 ± 7	25 ± 7	0,308
Adolescentes	n (%)	3 (10)	6 (20)	0,309
Primigestas	n (%)	11 (37)	13 (43)	0,792
Tabagistas	n (%)	7 (23)	11 (37)	0,398
Nº consultas pré-natal	x ± DP	6 ± 2	4 ± 2	0,016
Corticóide antenatal	n (%)	25 (83)	25 (83)	0,729
Membrana rota > 18 h	n (%)	1 (3)	15 (50)	<0,001
Sofrimento fetal	n (%)	14 (47)	8 (27)	0,180
Trabalho de parto	n (%)	4 (13)	21 (70)	<0,001
Cesariana	n (%)	29 (97)	16 (53)	<0,001

As características dos prematuros ao nascimento não diferiram entre os grupos conforme se observa na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de nascimento nos grupos pré-eclampsia e controle.

Variável		Pré-eclampsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Idade gestacional (sem)	x ± DP	30 ± 2	30 ± 2	0,603
Peso de nascimento (g)	x ± DP	1236 ± 333	1337 ± 288	0,213
Comprimento (cm)	x ± DP	37,4 ± 3	38,6 ± 2,5	0,130
Perímetro cefálico (cm)	x ± DP	27,3 ± 2,4	27,7 ± 2	0,564
Ventilação com pressão positiva	n (%)	19 (63)	18 (60)	1,000
Gênero masculino	n (%)	19 (63)	14 (47)	0,299
Pequeno para idade gestacional	n (%)	10 (33)	7 (23)	0,567
Apgar 1º minuto	md (P25; P75)	4 (3; 7)	4 (4; 7)	0,647
Apgar 5º minuto	md (P25; P75)	8 (7; 9)	8 (7; 9)	0,544
BSA*	md (P25; P75)	5 (4;6)	6 (4; 6)	0,141

*BSA = boletim de Silvermann-Andersen

A gravidade dos recém-nascidos, avaliada pelo escore SNAP-PE II nas primeiras horas de vida, bem como a morbidade neonatal e a mortalidade não diferiram entre os prematuros de mães com pré-eclampsia em relação aos controles (Tabela 3). Na amostra estudada houve apenas um caso de leucomalácia periventricular (no grupo controle) e nenhum caso de retinopatia da prematuridade.

Tabela 3. Gravidade, morbidade e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos pré-eclampsia e controle.

Variável	Pré-eclampsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
SNAP-PE II md (P25; P75)	17 (13; 30)	13 (8; 28)	0,273
S. desconforto respiratório (%)	18 (60)	15 (50)	0,604
Persistência do canal arterial (%)	12 (40)	12 (40)	0,792
Sepse precoce (%)	0 (--)	1 (3)	1,000
Sepse tardia (%)	4 (13)	4 (13)	1,000
Enterocolite necrosante grau ≥ 2 (%)	4 (13)	2 (7)	0,671
Hemorragia periintraventricular III-IV (%)	3 (10)	8 (27)	0,182
Oxigênio aos 28 dias(%)	9 (30)	4 (13)	0,210
DBP (O ₂ com 36 semanas (%))	3 (10)	3 (10)	1,000
Óbito intrahospitalar (%)	3 (10)	2 (6,7)	1,000

*DBP = Displasia broncopulmonar

Na assistência neonatal apenas a necessidade de transfusão de hemácias foi mais frequente no grupo pré-eclampsia (37% vs 10%; $p=0,033$). A mediana do tempo de internação não diferiu nos 2 grupos (28 vs 36 dias; $p=0,732$).

O prognóstico neonatal foi bom na grande maioria dos prematuros estudados, sendo que 80% no grupo pré-eclampsia e 73% no grupo controle ($p=0,642$) tiveram alta sem sequelas.

A relação dos marcadores de estresse oxidativo com o prognóstico neonatal foi investigada para as seguintes variáveis: pré-eclampsia (PE), pequeno para a idade gestacional (PIG), necessidade de ventilação com pressão positiva ao nascimento (VPP), síndrome do desconforto respiratório (SDR), persistência do canal arterial (PCA), enterocolite necrosante (NEC), hemorragia periintraventricular graus III ou IV

(HPIV), dependência de oxigênio aos 28 dias (O₂ 28dias), displasia broncopulmonar, oxigênio com 36 semanas e óbito na internação. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 a 8.

Como se observa na Tabela 4 os TBARS (marcadores de peroxidação lipídica), especialmente nas dosagens urinárias relacionaram-se com a presença de pré-eclampsia, com nascer PIG e também com a maioria das doenças neonatais, mas não tiveram relação com o óbito.

Tabela 4. Valores medianos de TBARS em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.

Variáveis clínicas		TBARS placenta (µM/mg)		TBARS veia umbilical (µM)		TBARS urina 1.º dia (µM/mg creatinina)		TBARS urina 4.º dia (µM/mg creatinina)		TBARS sangue 4.º dia (µM)	
		Md	p valor	Md	P valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor
Pré-eclampsia	Sim	55,01	0,674	82,08	0,189	0,20	0,004	0,37	0,001	184,38	0,275
	Não	60,39		68,92		0,23		0,26		114,02	
PIG	Sim	48,93	0,852	105,07	0,186	0,12	0,018	0,25	0,016	182,18	0,298
	Não	57,56		65,62		0,25		0,30		97,57	
VPP ao nascer	Sim	55,89	0,404	57,71	0,006	0,25	0,130	0,26	0,107	72,12	0,207
	Não	56,65		130,34		0,19		0,30		194,09	
SDR	Sim	55,19	0,234	88,71	0,857	0,25	0,019	0,27	<0,001	89,60	0,509
	Não	57,23		72,21		0,22		0,30		143,58	
PCA	Sim	48,00	0,216	94,76	0,628	0,24	<0,001	0,30	<0,001	254,54	0,146
	Não	59,36		70,21		0,22		0,26		110,79	
NEC	Sim	54,55	0,692	105,09	0,378	1,18	<0,001	0,17	<0,001	277,60	0,531
	Não	56,94		72,21		0,22		0,29		127,82	
HPIV	Sim	53,65	0,772	60,20	0,626	0,31	<0,001	0,36	<0,001	28,21	0,018
	Não	56,65		77,32		0,22		0,29		141,62	
O ₂ aos 28 dias	Sim	55,19	0,639	94,76	0,393	0,23	<0,001	0,31	<0,001	226,54	0,895
	Não	57,23		70,21		0,22		0,25		114,02	
DBP 36 sem	Sim	55,83	0,865	65,27	0,105	0,22	<0,001	0,30	<0,001	241,89	0,604
	Não	56,94		74,77		0,20		0,26		109,78	
Óbito	Sim	59,36	0,736	78,66	0,543	0,43	0,701	0,35	0,145	70,09	0,250
	Não	56,24		72,21		0,22		0,29		143,58	

A glutationa peroxidase (GPx) mostrou-se aumentada no sangue do 4.º dia de vida em prematuros de mães com pré-eclampsia, e na veia umbilical e urina do 1.º dia de vida nos prematuros que tiveram hemorragia periintraventricular. Menores valores na urina do 4.º dia associaram-se com a ocorrência de enterocolite necrosante e óbito (Tabela 5).

Tabela 5. Valores medianos de Glutaciona Peroxidase (GPx) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.

Variáveis clínicas		GPx placenta (UI/ml)		GPx veia umbilical (UI/ml)		GPx urina 1.º dia (UI/ml/mg Cr)		GPx urina 4.º dia (UI/ml/mg Cr)		GPx sangue 4.º dia (UI/ml)	
		Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor
Pré-eclampsia	Sim	126,50	0,077	77,68	0,563	0,33	0,627	1,50	0,725	94,24	<0,001
	Não	96,36		65,37		0,27		1,87		62,82	
PIG	Sim	121,83	0,103	68,77	0,671	0,44	0,251	0,44	0,314	44,15	0,960
	Não	98,48		66,22		0,86		0,86		42,87	
VPP ao nascer	Sim	114,19	0,415	68,77	0,423	0,85	0,618	0,85	0,167	45,84	0,582
	Não	101,03		64,52		0,46		0,48		31,41	
SDR	Sim	99,33	0,332	62,82	0,178	0,85	0,326	0,85	0,213	33,11	0,106
	Não	113,76		83,62		0,48		0,48		46,69	
PCA	Sim	111,22	0,613	59,00	0,779	0,69	0,409	0,69	0,362	41,60	0,514
	Não	110,79		74,71		0,48		0,66		39,05	
NEC	Sim	111,22	0,457	51,79	0,753	0,20	0,149	0,20	0,030	23,60	0,792
	Não	111,22		67,92		0,86		0,86		40,33	
HPIV	Sim	114,19	0,315	132,44	0,023	2,01	0,038	3,16	0,111	62,82	0,809
	Não	111,64		67,49		0,48		0,49		31,41	
O ₂ aos 28d	Sim	91,69	0,307	47,54	0,234	0,50	0,719	0,50	0,109	2,43	0,238
	Não	112,91		68,77		0,85		0,85		44,15	
DBP 36 sem	Sim	91,69	0,892	85,32	0,952	0,87	0,615	0,87	0,338	41,60	0,811
	Não	112,06		67,49		0,50		0,50		39,05	
Óbito	Sim	91,69	0,851	79,80	0,661	0,32	0,050	0,32	0,015	21,33	0,505
	Não	111,64		67,00		0,86		0,87		40,33	

Quanto à Glutathione redutase (GR) níveis urinários diminuídos, no 1.º ou 4.º dia de vida relacionaram-se com enterocolite necrosante, dependência de O₂ aos 28 dias, displasia broncopulmonar com 36 semanas e óbito, enquanto que prematuros com hemorragia periintraventricular tiveram maiores níveis em placenta (Tabela 6).

Tabela 6. Valores medianos de Glutathione Redutase (GR) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.

Variáveis clínicas		GR placenta (UI/ml)		GR veia umbilical (UI/ml)		GR urina 1.º dia (UI/ml/mg creatinina)		GR urina 4.º dia (UI/ml/mg creatinina)		GR sangue 4.º dia (UI/ml)	
		Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor
Pré-eclampsia	Sim	19,95	0,239	34,38	0,824	0,20	0,466	1,65	0,158	32,26	0,184
	Não	25,68		29,71		0,64		1,79		27,17	
PIG	Sim	18,68	0,160	28,87	0,068	0,41	0,083	2,22	0,455	39,90	0,307
	Não	22,92		41,60		0,39		1,78		22,92	
VPP ao nascer	Sim	22,07	0,762	22,07	0,320	0,42	0,095	4,43	0,050	28,87	0,761
	Não	21,22		41,60		0,39		1,65		31,37	
SDR	Sim	19,53	0,333	28,87	0,899	0,19	0,113	2,70	0,935	24,62	0,841
	Não	26,74		29,71		0,47		1,71		31,41	
PCA	Sim	19,10	0,287	35,23	0,906	0,52	0,931	1,14	0,955	31,41	0,767
	Não	23,77		29,71		0,30		2,70		29,71	
NEC	Sim	29,71	0,881	50,94	0,893	0,05	0,005	1,00	0,029	42,45	0,520
	Não	21,22		29,71		0,42		2,22		28,87	
HPIV	Sim	53,06	0,034	38,20	0,651	0,11	0,109	2,22	0,231	21,65	0,478
	Não	22,50		28,87		0,41		1,78		30,52	
O ₂ aos 28 d	Sim	20,38	0,137	35,23	0,763	0,61	0,687	1,01	0,020	19,53	0,735
	Não	22,92		29,71		0,40		3,54		31,33	
DBP 36 sem	Sim	24,62	0,976	63,67	0,247	1,23	0,439	0,78	0,019	5,09	0,535
	Não	21,22		29,29		0,40		2,70		31,33	
Óbito	Sim	24,62	0,784	28,87	0,817	0,15	0,021	1,38	0,205	40,75	0,643
	Não	21,22		29,71		9,43		1,78		28,02	

A Glutathione (GSH) mostrou-se aumentada na urina do 4.º dia de vida nos prematuros que necessitaram VPP ao nascimento, nos que tiveram NEC, PCA, HPIV e DBP. Os valores em veia umbilical e na urina do 1.º dia de vida relacionaram-se com a ocorrência de NEC e de óbito (Tabela 7).

Tabela 7. Valores medianos de Glutathione (GSH) em placenta, veia umbilical, urina do 1.º e 4.º dia e sangue do 4.º dia de vida, conforme a presença de pré-eclampsia, condição de nascimento, morbidade e mortalidade dos prematuros.

Variáveis clínicas		GSH placenta (µM/mg)		GSH veia umbilical (µM/min/L)		GSH urina 1.º dia (µM/mg creatinina)		GSH urina 4.º dia (µM/mg creatinina)		GSH sangue 4.º dia (µM/min/L)	
		Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor	Md	p valor
Pré-eclampsia	Sim	0,72	0,215	0,73	0,104	0,00	0,122	0,08	0,847	0,73	0,975
	Não	0,75		0,73		0,02		0,03		0,73	
PIG	Sim	0,73	0,735	0,73	0,409	0,00	0,065	0,03	0,061	0,73	0,710
	Não	0,73		0,74		0,02		0,08		0,73	
VPP ao nascer	Sim	0,73	0,556	0,73	0,309	0,02	0,399	0,15	<0,001	0,73	0,922
	Não	0,72		0,73		0,00		0,01		0,73	
SDR	Sim	0,52	0,072	0,73	0,327	0,01	0,529	0,10	0,085	0,73	0,523
	Não	0,74		0,73		0,00		0,01		0,73	
PCA	Sim	0,38	0,091	0,73	0,529	0,02	0,139	0,11	0,016	0,73	0,427
	Não	0,75		0,73		0,00		0,04		0,73	
NEC	Sim	0,73	0,139	0,72	0,010	0,00	0,009	0,14	0,009	0,73	0,874
	Não	0,73		0,73		0,01		0,05		0,73	
HPIV	Sim	0,76	0,148	0,74	0,547	0,01	0,498	0,14	0,023	0,74	0,999
	Não	0,72		0,73		0,01		0,02		0,73	
O ₂ aos 28 d	Sim	0,32	0,057	0,36	0,873	0,02	0,496	0,09	0,231	0,73	0,540
	Não	0,78		0,73		0,01		0,04		0,73	
DBP 36 sem	Sim	0,40	0,994	0,00	0,954	0,02	0,541	0,09	0,035	0,73	0,295
	Não	0,73		0,73		0,01		0,06		0,73	
Óbito	Sim	0,52	0,523	0,74	0,002	0,00	0,007	0,04	0,090	0,74	0,897
	Não	0,73		0,73		0,01		0,06		0,73	

Quanto ao desfecho de interesse nesse estudo, representado por bom prognóstico quando o prematuro teve alta sem sequelas e mau prognóstico em caso

de morte ou NEC grau ≥ 2 ou DBP ou HPIV graus III-IV, verificou-se que os TBARS em urina do 1.º e do 4.º dia de vida foram úteis em diferenciar o prognóstico e também a glutathiona (GSH) em veia umbilical.

Como se observa na Tabela 8, os prematuros que evoluíram com mau prognóstico apresentaram níveis de TBARS aumentados na urina do 1.º dia e diminuídos na urina do 4.º dia e tiveram valores de GSH significativamente maiores em sangue da veia umbilical (Tabela 8).

Tabela 8. Relação do marcador de estresse oxidativo e dos anti-oxidantes com o prognóstico neonatal.

Marcador (md)	Alta sem sequelas (n=46)	Morte / NEC / HPIV / DBP (n=14)	Valor de p
TBARS placenta	57,23	55,19	0,552
TBARS veia umbilical	82,08	66,91	0,063
TBARS urina 1.º dia	0,21	0,39	<0,001
TBARS urina 4.º dia	0,30	0,21	<0,001
TBARS sangue 4.º dia	109,78	211,20	0,938
GPx placenta	115,04	91,69	0,610
GPx veia umbilical	67,07	79,80	0,064
GPx urina 1.º dia	0,86	0,43	0,327
GPx urina 4.º dia	0,86	0,47	0,192
GPx sangue 4.º dia	36,08	42,87	0,642
GR placenta	21,45	22,50	0,740
GR veia umbilical	29,71	49,24	0,663
GR urina 1.º dia	0,42	0,19	0,623
GR urina 4.º dia	1,54	1,01	0,060
GR sangue 4.º dia	28,02	32,26	0,689
GSH placenta	0,73	0,73	0,919
GSH veia umbilical	0,69	0,74	0,004
GSH urina 1.º dia	0,01	0,00	0,936
GSH urina 4.º dia	0,04	0,09	0,074
GSH sangue 4.º dia	0,73	0,73	0,677

6. DISCUSSÃO

Esse estudo teve vários achados interessantes, destacando-se: os valores aumentados de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) na urina do 1.º dia de vida em associação com a ocorrência de várias doenças da prematuridade, confirmando a participação do estresse oxidativo na gênese das mesmas. Em relação ao sistema antioxidante da glutathiona, a glutathiona (GHS) mostrou-se diminuída na urina do 1.º dia de vida e a glutathiona peroxidase (GPx) diminuída na urina do 4.º dia de vida nos prematuros que tiveram enterocolite necrosante (NEC) e nos que evoluíram para óbito. A glutathiona redutase (GR) apresentou menores valores urinários em associação com enterocolite necrosante, dependência de O₂ aos 28 dias, displasia broncopulmonar e óbito.

O principal resultado do estudo foi mostrar que o mau prognóstico neonatal de prematuros está associado ao aumento do estresse oxidativo no 1.º dia de vida. Não foi evidenciada associação entre a deficiência do sistema antioxidante e o prognóstico neonatal. Há que se destacar que, embora não tenha sido evidente a deficiência do sistema antioxidante da glutathiona, foram detectadas alterações nas concentrações de GHS, GPx e GR nos primeiros quatro dias de vida, na maioria das situações em que inicialmente houve aumento do estresse oxidativo.

Alterações no equilíbrio entre estresse oxidativo e sistema antioxidante foram documentadas desde o nascimento até o 4.º dia de vida, em associação com diversas condições patológicas da amostra estudada, destacando-se inicialmente a pré-eclampsia.

Na pré-eclampsia não foi observado aumento do estresse oxidativo imediatamente ao nascimento e no 1.º dia de vida, porém no 4.º dia de vida os prematuros de mães com pré-eclampsia tiveram valores aumentados dos TBARS na urina e da glutathiona peroxidase no sangue, sugerindo que as repercussões dessa doença materna no concepto podem manifestar-se algum tempo após o nascimento e persistir nos primeiros dias de vida, traduzindo o aumento do estresse oxidativo e a resposta compensatória do sistema antioxidante da glutathiona.

Está bem documentado na literatura que o estresse oxidativo tem importante papel na fisiopatologia da pré-eclampsia, e embora os resultados não sejam uniformes, vários estudos mostraram aumento dos níveis séricos maternos e/ou

placentários de marcadores de peroxidação lipídica bem como diminuição da atividade antioxidante em gestações de termo e de pré-termo complicadas pela pré-eclampsia (ORHAN et al., 2003; ATAMER et al., 2005; VANDERLELIE et al., 2005; ROY et al., 2015). Estudo recente avaliou a condição oxidante e antioxidante em mulheres com pré-eclampsia comparadas com normotensas, em três momentos da gestação: M1=16-20 semanas, M2=26-30 semanas e M3=ao nascimento. Os resultados mostraram nas gestantes com pré-eclampsia maiores níveis de malondialdeído em M1 e M2 e menores valores de antioxidantes em M2 e M3, sugerindo os autores que o aumento precoce do estresse oxidativo pode alterar o desenvolvimento da placenta e comprometer a programação fetal (D'SOUZA et al., 2016). Entretanto ainda não está bem estabelecido como essas alterações acometem o feto.

Os poucos estudos que investigaram o estresse oxidativo em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia tiveram casuística pequena, com diferentes idades gestacionais e resultados inconclusivos.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Tastekin e col. que analisaram sangue de cordão umbilical de prematuros de mães com pré-eclampsia pareados pela idade gestacional (média de 32 semanas) com um grupo controle e não encontraram alteração na concentração de TBARS e das glutathionas, mas detectaram aumento da superóxido dismutase, sugerindo os autores que o feto foi exposto ao estresse oxidativo, porém em menor intensidade do que a mãe (TASTEKIN et al., 2005). Já no estudo de Howlader e col. foi detectado aumento dos marcadores de estresse oxidativo e diminuição dos antioxidantes em sangue de cordão umbilical dos prematuros de mães com pré-eclampsia, porém nesse estudo o grupo controle foi constituído por gestações de termo (HOWLADER et al., 2009). Outro estudo avaliou a condição oxidante e antioxidante total em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia e observou aumento da condição antioxidante em sangue de cordão umbilical e sangue do recém-nascido no 7.º dia de vida, sugerindo que com isso o feto estaria protegido do estresse oxidativo associado à doença materna (ALTUNHAN et al., 2013).

Um achado interessante neste estudo foi que os prematuros pequenos para a idade gestacional (PIG) não apresentaram alterações nos biomarcadores sugestivas de aumento do estresse oxidativo ou deficiência no sistema antioxidante nos primeiros dias de vida. Esse resultado difere dos achados em nascimentos de termo PIG, nos

quais foi documentado aumento dos marcadores de estresse oxidativo e diminuição de antioxidantes em sangue materno e do cordão umbilical (SAKER et al., 2008), podendo persistir a condição de estresse oxidativo aumentado nos primeiros dias de vida dos recém-nascidos PIG (GVERIC-AHMETASEVIC et al., 2009). Também difere dos achados de Mirzarhimi e col. que documentaram em recém-nascidos de termo associação dos níveis de antioxidantes em sangue de cordão umbilical com o peso de nascimento, com menores níveis de antioxidantes nos recém-nascidos de baixo peso ao nascer, sugerindo efeito deletério da restrição do crescimento fetal no mecanismo de defesa antioxidante (MIRZARHIMI et al., 2016). Por outro lado, há estudo que só encontrou associação entre marcadores de estresse oxidativo e nascimento PIG no sangue materno e não no sangue de cordão umbilical (WEBER et al., 2014).

Diferenças na metodologia e casuística dos estudos podem auxiliar na interpretação das divergências entre os resultados dos estudos, destacando-se que no presente estudo foram avaliados apenas prematuros, sendo relativamente pequeno o número de recém-nascidos PIG (17/60) e estes foram definidos pelo peso ao nascer inferior ao percentil 10 na curva de referência, o que não implica que todos esses recém-nascidos tenham sido submetidos à restrição do crescimento intra-uterino. Uma hipótese seria que a interrupção mais precoce da gestação em nosso estudo (idade gestacional média de 30 semanas) poderia ter evitado a progressão do agravo nutricional intra-útero nos prematuros PIG.

Prematuros que necessitaram ventilação com pressão positiva ao nascimento tiveram menores valores de TBARS em sangue de veia umbilical, comparados aos que não foram ventilados ao nascimento; entretanto essa associação estatística não tem relevância clínica, pois as concentrações detectadas na veia umbilical traduzem a condição antes do nascimento. Por outro lado seria esperado aumento do estresse oxidativo após o uso de VPP, uma vez que no período do estudo utilizava-se oxigênio a 100% na reanimação neonatal, o que atualmente não é recomendado por estar bem documentado o efeito lesivo do uso de altas concentrações de oxigênio na reanimação em sala de parto, bem como durante a assistência ventilatória neonatal no pulmão imaturo, propiciando lesão oxidativa, que está associada ao aumento da morbidade respiratória e maior risco de displasia broncopulmonar (GITTO et al., 2009; PERRONE et al., 2012; KAPADIA et al., 2013; AVERSA et al., 2016).

Coerente com os dados de literatura que mostram nítida associação entre aumento do estresse oxidativo e ocorrência de doenças do prematuro, este estudo documentou que valores aumentados de TBARS em urina do 1.º dia de vida, traduzindo a peroxidação lipídica, associaram-se com a ocorrência das principais doenças do prematuro, incluindo: síndrome do desconforto respiratório, persistência do canal arterial, enterocolite necrosante, hemorragia periintraventricular e displasia broncopulmonar.

Interessante notar que nas doenças agudas como síndrome do desconforto respiratório e enterocolite necrosante esse aumento inicial do estresse oxidativo não se manteve no 4.º dia de vida, enquanto que nas doenças crônicas ou de resolução mais lenta, como persistência do canal arterial, hemorragia periintraventricular e displasia broncopulmonar os valores urinários de TBARS permaneceram aumentados, enquanto que os níveis das glutatonas foram baixos na urina do 4.º dia de vida, indicando que a persistência do estresse oxidativo e deficiência do sistema antioxidante nos primeiros dias de vida está envolvida na patogênese dessas doenças.

Considera-se atualmente que o estresse oxidativo tem papel fundamental na patogênese da displasia broncopulmonar, uma vez que os prematuros são expostos a múltiplos estímulos oxidantes e apresentam limitados mecanismos de defesa antioxidante. Isso tem motivado várias pesquisas na tentativa de identificar estratégias ou medicamentos antioxidantes para prevenção dessa doença (POGGI e DANI, 2014; AVERSA et al., 2016). Estudo realizado em nosso serviço para identificar marcadores precoces do risco de desenvolvimento de displasia broncopulmonar em prematuros submetidos à ventilação mecânica mostrou aumento da Interleucina-8, mas não do malondialdeído no aspirado broncoalveolar obtido nos primeiros três dias de vida, não sendo assim possível caracterizar o aumento do estresse oxidativo nos pacientes que evoluíram para displasia (MADOGLIO et al., 2016). Entretanto outro grupo de pesquisadores encontrou aumento das concentrações de antioxidantes no lavado pulmonar nos primeiros dias de vida em prematuros que tiveram displasia broncopulmonar, sugerindo a participação do estresse oxidativo na gênese dessa doença (SCHOCK et al., 2001).

Dentre as doenças do prematuro em que o estresse oxidativo está envolvido, tem sido destacada a enterocolite necrosante, doença frequente e grave, acometendo cerca de 5-7% dos prematuros de muito baixo peso, com cifras de mortalidade que

podem atingir até 50% e elevada morbidade nos sobreviventes. A etiologia é multifatorial, mas a isquemia, hipóxia-reperfusão, inflamação e infecção podem ser fonte de radicais livres e conseqüente lesão oxidativa intestinal (AYDEMIR et al., 2011). Estudos recentes têm mostrado níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo em sangue de cordão umbilical em prematuros que desenvolveram enterocolite necrosante sugerindo que esses biomarcadores possam ser úteis na identificação precoce dos recém-nascidos de risco para essa doença (PERRONE et al., 2012; PERRONE et al., 2014). Os resultados do presente estudo são coerentes com esses dados de literatura, pois foi encontrado diminuição da glutathione na veia umbilical e associado a isso foi caracterizado o aumento do estresse oxidativo na urina do 1.º dia de vida e menores valores das glutathiones urinárias até o 4.º dia de vida, sugerindo que o desequilíbrio precoce entre oxidantes e antioxidantes pode alertar para o maior risco de ocorrência de enterocolite necrosante em prematuros.

Outro resultado que merece destaque foi o aumento da condição oxidante e antioxidante desde o nascimento até o 4.º dia de vida nos prematuros que tiveram hemorragia periintraventricular, com maiores valores de TBARS em urina do 1.º e 4.º dia de vida, associados com aumento das glutathiones em placenta, sangue da veia umbilical e urina do 1.º e 4.º dia de vida, mostrando que nessa doença ocorre alteração precoce do equilíbrio oxidante/antioxidante. Esses achados confirmam que o estresse oxidativo que ocorre na transição do ambiente hipóxico intra-útero para o ambiente relativamente hiperóxico ao nascimento, é um importante fator na patogênese da hemorragia periintraventricular (PERRONE et al., 2015). Por outro lado, o aumento persistente das enzimas antioxidantes pode refletir um mecanismo de proteção que não foi suficiente para evitar o problema.

Um dado importante nesse estudo e não referido na literatura foi o achado de menores valores urinários das glutathiones nos primeiros dias de vida nos prematuros que foram a óbito, sugerindo que a deficiência do sistema antioxidante pode ter contribuído para o pior prognóstico desses prematuros. Entretanto ao analisar a relação entre os marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes com o prognóstico neonatal (Tabela 8), considerando-se mau prognóstico a ocorrência de morte ou displasia broncopulmonar ou enterocolite necrosante ou hemorragia periintraventricular não se evidenciou a deficiência do sistema antioxidante associada ao mau prognóstico e sim o aumento do estresse oxidativo no 1.º dia de vida.

Quanto ao material biológico para investigação do estresse oxidativo, os resultados aqui encontrados permitem afirmar que a placenta não trouxe informações, o sangue de veia umbilical e do recém-nascido também não se mostrou útil, permitindo detectar poucas alterações. É possível que a técnica de coleta e/ou a metodologia das dosagens, tenham contribuído para a falta de sensibilidade das avaliações nesses materiais biológicos. Entretanto, um aspecto novo evidenciado neste estudo foi a utilidade da urina como material biológico para investigação em recém-nascidos, o que é muito interessante para as pesquisas neonatais, pois além de ser de fácil obtenção evita a espoliação sanguínea dos recém-nascidos.

Esse estudo tem algumas limitações, pois não foram avaliados os níveis maternos dos marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes, o que possibilitaria a interpretação mais profunda dos resultados e o maior entendimento dos mecanismos de interação na circulação materno-fetal. Como marcador de estresse oxidativo foi dosado apenas o malondialdeído, traduzindo a peroxidação lipídica, e quanto ao sistema antioxidante as glutathionas, assim, outras alterações no equilíbrio oxidante/antioxidante não foram investigadas. Entretanto, o rigoroso delineamento metodológico e criterioso pareamento dos grupos estudados permitiu obter resultados consistentes que agregam novos conhecimentos sobre as alterações do complexo sistema oxidante/antioxidante em prematuros de mães com pré-eclampsia, bem como a relação das mesmas com a morbimortalidade neonatal. Os resultados desse estudo alertam para a importância do estresse oxidativo nos primeiros dias de vida no prognóstico neonatal de prematuros e apontam novas questões que motivam e norteiam futuras pesquisas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Prematuros de mães com pré-eclampsia apresentam maiores concentrações de TBARS e de glutathione peroxidase no 4.º dia de vida, indicando que esses recém-nascidos são expostos ao aumento persistente do estresse oxidativo nos primeiros dias de vida.
- O aumento do estresse oxidativo no primeiro dia de vida associa-se com a morbidade neonatal de prematuros, representada pela ocorrência de síndrome do desconforto respiratório, persistência do canal arterial, enterocolite necrosante, hemorragia periintraventricular e displasia broncopulmonar.
- O desequilíbrio da condição oxidante/antioxidante, com aumento da peroxidação lipídica e diminuição das glutathionas nos primeiros dias de vida está associado ao mau prognóstico neonatal de prematuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altunhan H, Annagür A, Kurban S, Ertuğrul S, Konak M, Örs R. Total oxidant, antioxidant, and paraoxonase levels in babies born to pre-eclamptic mothers. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013; 39: 898-904.
2. Andrade Jr DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005; 31: 60-68.
3. Atamer Y, Koçyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119: 60-6.
4. Aversa S, Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Cuppari C, David A, et al. Ventilation strategies for preventing oxidative stress-induced injury in preterm infants with respiratory disease: an update. *Paediatr Respir Rev.* 2016; 17: 71-9.
5. Aycicek A, Erel O. Estado oxidante/antioxidante total em recém-nascidos ictericos antes e depois da fototerapia. *J Pediatr.* 2007; 83: 319-22.
6. Aydemir C, Dilli D, Uras N, Ulu HO, Oguz SS, Erdevi O, Dilmen U. Total oxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2011; 46: 2096-100.
7. Braekke K, Harsem NK, Staff AC. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006; 128: 209-15.
8. Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of preeclampsia. *Biol Res.* 2006; 39: 229-36.
9. Coelho TM, Martins MG, Viana E, Mesquita MRS, Camano L, Sass N. Proteinúria nas síndromes hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. *Rev Assoc Méd Bras.* 2004; 50: 207-13.
10. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15: 316-328.

11. D'Souza V, Rani A, Patil V, Pisal H, Randhir K, Mehendale S, et al. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2016; 38: 225-32.
12. Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr*. 2013; 13: 59. doi: 10.1186/1471-2431-13-59.
13. Ferrão MHL, Pereira ACL, Gersgorin HCTS, Paula TAA, Correa RRM, Castro ECC. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52: 390-94.
14. Gitto E, Pellegrino S, D'Arrigo S, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress in resuscitation and in ventilation of newborns. *Eur Respir J*. 2009; 34: 1461-9.
15. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001; 38: 718-22.
16. Gveric-Ahmetasevic S, Sunjic SB, Skala H, Andrisic L, Stroser M, Zarkovic K, et al. Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers. *Free Radic Res*. 2009; 43: 376-84.
17. Hilali N, Kocyigit A, Demir M, Camuzcuoglu A, Incebiyik A, Camuzcuoglu H, et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013; 170: 377-80.
18. Howlander ZH, Parveen S, Tamanna S, Khan TA, Begum F. Oxidative stress and antioxidant status in neonates born to pre-eclamptic mother. *J Trop Pediatr*. 2009; 55: 363-67.
19. Jobe A, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 173: 1723-29.
20. Kapadia VS, Chalak LF, Sparks JE, Allen JR, Savani RC, Wyckoff MH. Resuscitation of preterm neonates with limited versus high oxygen strategy. *Pediatrics*. 2013; 132: e1488-96.
21. Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Med Cell Biochem*. 2008; 313: 37-44.

22. Kumar A, Panigrahi I, Basu S, Dash D. Urinary malondialdehyde levels in newborns following delivery room resuscitation. *Neonatology*. 2008; 94: 96-9.
23. Madoglio RJ, Rugolo LMSS, Kurokawa CS, Sá MPA, Lyra JC, Antunes LCO. Inflammatory and oxidative stress airway markers in premature newborns of hypertensive mothers. *Braz Med Biol Res*. 2016 (no prelo).
24. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Arrigo T, Barberi I, Reiter RJ, Gitto E. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:358375. doi: 10.1155/2014/358375.
25. McClintock DE, Ware LB, Eisner MD, Wickersham N, Thompson BT, Matthay MA; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. Higher urine nitric oxide is associated with improved outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175: 256-62.
26. Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008; 100: 234-8.
27. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem*. 1983; 52: 711-60.
28. Mirzarahimi M, Ahadi A, Bohlooli S, Namakikhalajan E, Barak M. Antioxidant Levels in Cord Blood of Term Neonates and Its Association with Birth Weight. *Iran J Child Neurol*. 2016; 10: 31-4.
29. Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Oxygen and parenteral nutrition two main oxidants for extremely preterm infants: 'It all adds up'. *J Neonatal Perinatal Med*. 2015; 8:189-97.
30. Moura ERF, Oliveira CGS, Damasceno AKC, Pereira MMQ. Fatores de risco para síndrome hipertensiva específica da gestação entre mulheres hospitalizadas com pré-eclampsia. *Cogitare Enferm*. 2010, 15: 250-55.
31. Nash P. Experimental and Clinical Studies of Oxidative Stress in Preeclampsia [dissertação]. Uppsala: Faculty of Medicine Uppsala University; 2007.
32. 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.

33. Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Chem Biol Interact.* 2014; 208: 77-83.
34. Novo JLVG, Gianini RJ. Mortalidade materna por eclampsia. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2010, 10: 209-17.
35. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi k. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. 1979; 95: 351-358.
36. Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003; 267): 189-95.
37. 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; 92: 529-34.
38. Peraçoli JC, Parpinelli MA. Síndromes hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27: 627-34.
39. Peres LAB. Pré-eclampsia: papel do estresse oxidativo e resposta imune. *J Bras Nefrol.* 2007; 29: 164-70.
40. Perrone S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Neonatol.* 2012; 1: 109-14.
41. Perrone S, Tataranno ML, Santacroce A, Negro S, Buonocore G. The role of oxidative stress on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Curr Pediatr Rev.* 2014;1: 202-7.
42. Perrone S, Tataranno LM, Stazzoni G, Ramenghi L, Buonocore G. Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28 Suppl 1: 2291-5.
43. Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Cornacchione S, Longini M, Proietti F, Soubasi V, Benders MJ, Van Bel F, Buonocore G. May oxidative stress biomarkers in cord blood predict the occurrence of necrotizing enterocolitis in preterm infants? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; Suppl 1:128-31.

44. Poggi C, Dani C. Antioxidant strategies and respiratory disease of the preterm newborn: an update. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:721043. doi: 10.1155/2014/721043
45. Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and Pre-eclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension*. 2004; 44: 374-80.
46. Raijmakers MTM, Roes EM, Poston L, Steegers EAP, Peters WHM. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 138: 39-44.
47. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr*. 2001; 138: 92-100.
48. Roy S, Dhobale M, Dangat K, Mehendale S, Lalwani S, Joshi S. Differential oxidative stress levels in mothers with preeclampsia delivering male and female babies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28: 1973-80.
49. Rugolo LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preeclampsia: Effect on the Fetus and Newborn. *Neoreviews* 2011; 12: 198-206.
50. Rugolo LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preclampsia: Early and Late neonatal outcomes. *NeoReviews* 2012; 13: 532-41.
51. Rugolo LM, de Sá MP, Kurokawa CS, Madoglio RJ, Bentlin MR, Rugolo A Jr, Corrente JE. There is no difference in nitric oxide metabolites and neonatal outcome between premature infants born to pre-eclamptic and those born to normotensive women. *Paediatr Int Child Health*. 2015; 35: 47-52.
52. Saker M, Soulimane Mokhtari N, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 141: 95-9.
53. Shah DA, Khalil RA. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Biochem Pharmacol*. 2015; 95: 211-26.

54. Schock BC, Sweet DG, Halliday HL, Young IS, Ennis M. Oxidative stress in lavage fluid of preterm infants at risk of chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281:1386-91.
55. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet*. 2006; 94: 23-7.
56. Siciarz A, Weinberger B, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Urinary thiobarbituric acid-reacting substances as potential biomarkers of intrauterine hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2001; 155: 718-22.
57. Souza AR, Amorim MR, Costa AAR, Neto CN. Tratamento anti-hipertensivo na gravidez. *Acta Med Port*. 2010, 23: 77-84.
58. Tastekin A, Ors R, Demircan B, Saricam Z, Ingec M, Akcay F. Oxidative stress in infants born to preeclamptic mothers. *Pediatr Int*. 2005; 47: 658-62.
59. Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *Neoreviews*. 2007; 8: 522-32.
60. 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: 933-38.
61. 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 .
62. Vanderlelie J, Venardos K, Clifton V, Gude N, Clarke F, Perkins A. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 2005; 26: 53-8.
63. Vazquez ML, Forte WCN, Tedesco JJA. Quantificação das populações e subpopulações de linfócitos em gestantes com pré-eclampsia. *RBGO*. 2004; 26: 619-24.
64. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33: 179-201.

65. Weber D, Stuetz W, Bernhard W, Franz A, Raith M², Grune T¹, Breusing N³.
Oxidative stress markers and micronutrients in maternal and cord blood in relation to neonatal outcome. *Eur J Clin Nutr.* 2014; 68: 215-22.
66. Weinberger B, Nisar S, Anwar M, Ostfeld B, Hegyi T. Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome. *Pediatr Int.* 2006; 48: 479-83.
67. 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.
68. Yzydorczyk C, Mitanchez D, Buffat C, Ligi I, Grandvuillemin I, Boubred F, Simeoni U. Oxidative stress after preterm birth: origins, biomarkers, and possible therapeutic approaches. *Arch Pediatr.* 2015; 22:1047-55.

9. ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



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



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 11 de fevereiro de 2008

Of. 004/08-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Ligia Maria Suppo de Souza Rúgulo
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Profª. Ligia

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa **"Estresse oxidativo em recém-nascidos de mães hipertensas. Relação com prognóstico neonatal no curto prazo,"** que será conduzido por Milene Plorkowsky de Almeida, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 11/02/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO.** Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,


Sueli Aparecida Garcia
Secretário do CEP/Subst.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos de Mães Hipertensas: Relação com Prognóstico Neonatal no Curto Prazo

Nome e endereço do pesquisador: Adriana Saito Jasper

R: Almirante Tamandaré, 78 - Ap 132 – Curitiba – PR. Fone: (41) 9197-7089

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

R: Dr. Cardoso de Almeida, 1000 - Ap.62 - Botucatu- SP. Fone: (14) 3815-4647

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 placenta, no sangue do cordão umbilical e na urina do recém-nascido; e também investigar se essas substâncias são responsáveis pelas doenças dos recém-nascidos. As substâncias que vamos dosar chamam-se marcadores de estresse oxidativo, 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, vamos coletar uma pequena quantidade (3,5 ml) de sangue do cordão umbilical e um pedaço da placenta para dosagem das substâncias que são marcadores de estresse oxidativo e das substâncias anti-oxidantes. Depois vamos obter 5 ml de urina do bebê, colhida de saco coletor, colhida no primeiro e no 4º dia de vida, para dosagem das mesmas substâncias. No 4º dia de vida, quando é colhido sangue para avaliar a icterícia do recém-nascido, iremos dosar também as substâncias que estamos investigando nesse estudo. 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.

Vamos avaliar se o bebê irá apresentar doenças durante a internação e quais são essas doenças. Esse estudo não tem qualquer risco para a mãe nem para o bebê, e embora não proporcione benefício imediato para seu filho, 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 na gestação 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: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

ANEXO 3

PROTOCOLO DE PESQUISA

Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos de Hipertensas: Relação com Prognóstico Neonatal no Curto Prazo

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 _____

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 ()

Desconhecido

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

Perímetro Cefálico: _____ cm Perímetro Torácico: _____ 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 () Dist. Resp. Adaptativo

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

() Pneumonia precoce (1as 48hv) () Pneumonia tardia (Após 48hv)

() Sepsis precoce (1as 48hv) () Sepsis tardia (Após 48hv)

() PCA clínico () eco () () Hemorragia pulmonar

() Enterocolite Necrosante () Dist. Metabólico _____

() Retinopatia da Prematuridade Grau _____

() Leucomalácia periventricular () Hemorragia Intracraniana Grau: _____

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

Motivo: _____ 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

Antibioticoterapia: Tipo: _____ Tempo de uso: _____

Transfusão de GV () não () sim 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 _____ d

() VMC Início ____ dv Tempo de uso _____ d

() Outras modalidades _____ Tempo uso _____ d

Dosagens Laboratoriais:

Hemograma (sangue de cordão umbilical):

Htc _____ Hb _____ GB _____ Diferencial: _____

Plaquetas _____

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

Peso: _____ g Comp: _____ cm PC _____ cm

Diagnósticos finais:
