

Miriam Hashimoto

Fator de necrose tumoral- α , interleucinas-8 e 10 em sangue de cordão umbilical como marcadores de infecção neonatal precoce na rotura prematura de membranas pré-termo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria - Área de Concentração em “Pediatria” da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

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

Botucatu/SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Hashimoto, Miriam.

Fator de necrose tumoral- α , interleucinas-8 e 10 em sangue de cordão umbilical como marcadores de infecção neonatal precoce na rotura prematura de membranas pré-termo / Miriam Hashimoto. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientadora: Lígia Maria S. Souza Rugolo

Assunto CAPES: 40101088

1. Prematuro - Infecções - Diagnóstico 2. Neonatologia

CDD 618.5

Palavras chave: Fator de necrose tumoral alfa; Infecções bacterianas; Interleucina-8; Interleucina-10; Recém-nascido prematuro; Ruptura prematura de membranas

**Estudo realizado na Unidade de Neonatologia e Maternidade do Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP**

**Pesquisa parcialmente financiada pela CAPES como parte do Projeto PRO-
DOC da Pesquisadora Cilmary Suemi Kurokawa na Pós-graduação de
Pediatria**

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Mário e Maria Kjsimoto, exemplos de dedicação, integridade, honestidade e respeito ao próximo.

Ao Mitsuo, esposo amado, companheiro sempre presente com sua mansidão e dedicação.

Às queridas: Isabela e Gabriela, filhas amadas, que me proporcionam a benção de ser mãe.

Aos meus irmãos: Daniel, Jennie, Raquel, Marisa e suas famílias, pessoas amorosas, que trazem alegria no convívio familiar.

A minha eterna gratidão:

Ao Deus Triuno,

que é **Pai** e nos ama incondicionalmente,

que é **Filho** e se fez um de nós para que nos tornássemos seus irmãos,

que é **Espírito Santo** e nos consola.

A minha imensa gratidão:

À Profa. Adj. Dra. **Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo**

por toda orientação na minha formação de pós-graduanda (residência, mestrado, doutorado) e também na minha formação pessoal:
ao ser exemplo de dedicação, otimismo e determinação;
ser exemplo de liderança e competência;
por ser acessível e conselheira;
por ser amiga e acolhedora.

Agradecimentos

Aos recém-nascidos e suas mães que participaram deste estudo.

À bióloga e pesquisadora Cilmery Suemi Kurokawa, parceira nesta pesquisa, pela dedicação constante e pela realização criteriosa das dosagens das citocinas.

À amiga Maria Regina Bentlin, pela amizade sincera, pelo incentivo constante, pela preciosa contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos Antonio Rugolo Jr., Grasiela Bossolan, Alice Yamashita Prearo, Águeda Beatriz Pires Rizzato, Francisca T.V. Faleiros, pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra Cleide Petean Enoir Trindade, pelo exemplo de dedicação ao Ensino e Pesquisa, pelos sábios conselhos, por toda orientação.

À Dra Sáskia M.W. Fekete, por toda dedicação na realização dos exames de ultra-som transfontanelar.

Ao obstetra Prof. Dr José Carlos Peraçoli, pela importante contribuição na realização desta tese.

À patologista Profa. Marcia Guimarães Silva, por todo auxílio neste estudo.

À toda equipe de Neonatologia, médicos, residentes, docentes, enfermeiros e funcionários que muito me auxiliaram na realização desta pesquisa.

À toda equipe do Serviço de Obstetrícia, pelo auxílio e colaboração.

À equipe da Secretaria do Departamento de Pediatria: Adriana F. B. Tavares, Fabiano Michelin, Maria do Carmo S. Oliveira, por todo apoio e disposição.

Ao Paulo Cesar Lopes, pelo auxílio na diagramação da tese e confecção dos slides.

Aos funcionários dos laboratórios: clínico e experimental, pelo auxílio e realização dos exames.

A bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.

Ao Hélio Rubens C. Nunes, pela análise estatística dos dados.

À Dra. Joelma Gonçalves Martin, por todo apoio, pelo carinho e dedicação no cuidado dos pacientes e alunos da Enfermaria de Pediatria.

À todos do Departamento de Pediatria, pelo apoio e incentivo.

À CAPES, que parcialmente financiou esta pesquisa.

À todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Resumo

Introdução: A rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) é uma das principais causas de morbimortalidade perinatal e fator de risco para infecção neonatal precoce. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-8 e a antiinflamatória IL-10 são importantes mediadores da resposta imune, e na situação de risco infeccioso podem ser adjuvantes úteis no diagnóstico de infecção neonatal.

Objetivo: Investigar se os níveis de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical são marcadores de infecção precoce em prematuros advindos de gestações com RPM-PT.

Método: Estudo clínico, prospectivo e do tipo teste diagnóstico, realizado no Serviço de Obstetria e Neonatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, envolvendo prematuros de gestantes com rotura de membranas ≥ 12 horas. As citocinas TNF- α , IL-8 e IL-10 foram dosadas em sangue de cordão umbilical pelo método ELISA. Conforme a evolução clínica e laboratorial dos recém-nascidos foram constituídos dois grupos: Infectado e Não infectado, os quais foram comparados quanto às variáveis perinatais e neonatais por análise estatística univariada; com significância em 5%. A acurácia do teste diagnóstico foi obtida pela curva ROC, sendo calculados: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN).

Resultados: Foram estudados 55 prematuros: 27 infectados e 28 não infectados. O tempo de rotura não diferiu entre os grupos (54 x 29 hs; $p=0,102$) mas, no grupo infectado corioamnionite clínica e histológica foi mais frequente; a idade gestacional (31 x 33 semanas; $p<0,001$) e o peso de nascimento (1707 x 2109g; $p=0,003$) foram menores; a morbidade foi maior desde o nascimento com necessidade de assistência mais intensiva e o óbito ocorreu somente nesse grupo. As medianas de TNF- α (3.67 vs 1.76 pg/ml; $p=0.084$) e IL-10 (0 vs 4.10 pg/ml; $p=0.291$) não diferiram entre os grupos. IL-8 diferenciou o grupo infectado (136.47 vs 15.84 pg/ml; $p<0.001$), com acurácia de 84% pela área da curva ROC e no ponto de corte de 35 pg/ml obteve-se sensibilidade de 78%, especificidade de 82%, VPP de 66% e VPN de 89%. As citocinas pró-inflamatórias aumentaram na presença de sofrimento fetal, corioamnionite e tiveram correlação negativa com a idade gestacional e peso ao nascer. Menores níveis da IL-10 associaram-se com SDR e PCA; maiores níveis de TNF- α e IL-8 associaram-se com DBP.

Conclusões: Citocinas em sangue de cordão umbilical associaram-se com morbidade neonatal. A IL-8 parece ser bom preditor de infecção neonatal precoce.

Palavras chave: fator de necrose tumoral-alfa, infecções bacterianas, interleucina-8, interleucina-10, recém-nascido prematuro, ruptura prematura de membranas fetais

Abstract

Introduction: Preterm premature rupture of membranes (PPROM) is one of the major causes of perinatal morbidity and mortality, and an important risk factor for early-onset neonatal infection. The pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-8 and anti-inflammatory cytokine IL-10 are mediators of immune response and may be helpful as early indicator of neonatal infection in the presence of perinatal risk factor.

Objective: To evaluate umbilical cord blood levels of TNF- α , IL-8 and IL-10 as markers for early-onset infections in premature infants from pregnancies complicated by PPRM.

Methods: Clinical, prospective and diagnostic test study performed at Obstetrician and Neonatal Unit of Botucatu School of Medicine, enrolling premature infants from pregnant women with ≥ 12 hours of premature rupture of membranes. TNF- α , IL-8 and IL-10 cytokines were measured in umbilical cord blood by ELISA. According to clinical and laboratorial evaluation patients were classified into two groups: infected and noninfected. Perinatal and neonatal variables were studied. Comparisons between groups were performed by univariate statistical analysis; significance at $p < 0.05$. The diagnostic test accuracy was obtained by ROC curve. Sensibility, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated by comparing infected with noninfected group.

Results: 55 premature infants were studied: 27 infected and 28 noninfected. There was no difference between the groups in the latency period (54 x 29 hours; $p=0,102$). In the infected group, clinical and histological chorioamnionitis were more frequent, gestational age (31 x 33 weeks; $p<0,001$) and birth weight(1707 x 2109g; $p=0,003$) were lower. Morbidity, mortality and resource use were higher among infected premature infants. The median levels of TNF- α (3.67 vs 1.76 pg/ml; $p=0.084$) and IL-10 (0 vs 4.10 pg/ml; $p=0.291$) did not differ between the groups. IL-8 was significantly elevated in the infected group (136.47 vs 15.84 pg/ml; $p<0.001$) showing the area under the ROC curve of 0,84. The optimal cutoff point for IL-8 was 35 pg/ml. At this cutoff point the sensibility was 78%, specificity was 82%, PPV was 66% and NPV was 89%. Fetal distress and chorioamnionitis were associated with higher levels of pro-inflammatory cytokines in cord blood. There was a negative relationship between pro-inflammatory cytokines and the gestational age and birth weight. Lower level of IL-10 was associated with RDS and PDA; and higher levels of TNF- α and IL-8 were associated with BDP.

Conclusions: In PPRM, cord blood cytokines levels are associated with neonatal outcome. IL-8 seems to be a good predictor of early-onset neonatal infection.

Key words: bacterial infections; fetal membranes, premature rupture; infant, premature; interleukin-8; interleukin-10; tumor necrosis factor-alpha.

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados maternos e gestacionais segundo a ocorrência de infecção precoce nos recém-nascidos prematuros.....	47
Tabela 2: Tempo de rotura prematura de membranas segundo a ocorrência de infecção precoce nos recém-nascidos prematuros.....	48
Tabela 3: Dados de nascimento dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce.....	49
Tabela 4: Parâmetros hematológicos dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce.....	49
Tabela 5: Escore e índices hematológicos, Proteína C reativa dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce.....	50
Tabela 6: Investigação microbiológica e radiológica de infecção precoce nos grupos de estudo.....	50
Tabela 7: Morbidade, mortalidade e procedimentos nos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce.....	52
Tabela 8: Valores de citocinas (pg/ml) no sangue de cordão umbilical dos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce.....	53
Tabela 9: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da IL-8 em seu respectivo ponto de corte: valores percentuais e intervalo de confiança (IC) a 95%.....	57
Tabela 10: Valores de TNF, IL-8 e IL-10 (pg/ml) conforme a presença ou não de corticóide antenatal, sofrimento fetal, corioamnionite clínica, corioamnionite histológica/funisite e parto cesáreo.....	58
Tabela 11: Valores de citocinas conforme a presença ou não de doenças neonatais.....	61

Lista de figuras

Figura 1: Topografia da infecção precoce.....	51
Figura 2: Valores de TNF- α (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infectado e Não Infectado.....	54
Figura 3: Valores de IL-8 (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infectado e Não Infectado.....	54
Figura 4: Valores de IL-10 (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infectado e Não Infectado.....	55
Figura 5: Curva ROC dos valores de IL-8 no sangue de cordão umbilical.....	56
Figura 6: Correlação (r) entre os valores de TNF- α (pg/ml) e peso de nascimento (g).....	59
Figura 7: Correlação (r) entre os valores de IL-8 (pg/ml) e peso de nascimento (g).....	60
Figura 8: Correlação (r) entre os valores de IL-8 (pg/ml) e idade gestacional (sem.).....	60

Abreviaturas e Siglas

AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ATB IP	Antibiótico Intraparto
BSA	Boletim de Silverman Andersen
CA	Corioamnionite
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CEAN	Corticóide antenatal
CPAP	<i>Continuous positive air pressure</i> , Pressão positiva contínua em vias aéreas
DBP	Displasia broncopulmonar
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade gestacional
IL	Interleucina
ITU	Infecção do trato urinário
LPV	Leucomalácia periventricular
PCA	Persistência do canal arterial
PDA	<i>Patent ductus arteriosus</i>
PCR	Proteína C reativa
PN	Peso de Nascimento
RDS	<i>Respiratory Distress Syndrome</i>
RN	Recém nascido
ROC	<i>Receiver operator characteristic</i> , Curva de operação resposta
RPM-PT	Rotura prematura de membranas pré-termo
SDR	Síndrome do desconforto respiratório
SRIF	Síndrome da resposta inflamatória fetal
SF	Sofrimento fetal
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UTI	Unidade de terapia intensiva
VM	Ventilação mecânica
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Abreviaturas e Siglas	
Introdução	21
1. Rotura Prematura de Membranas Pré-termo.....	22
1.1. Aspectos obstétricos e perinatais.....	22
Uso de antibióticos.....	24
Uso de corticóide antenatal.....	24
1.2. Infecção / Inflamação.....	25
Síndrome da resposta inflamatória fetal.....	26
1.3. Infecção neonatal precoce.....	27
Diagnóstico.....	27
1.4. Citocinas.....	28
Citocinas como marcadores diagnósticos.....	30
1.5. Justificativa.....	33
Objetivos	34
1. Geral.....	35
2. Específicos.....	35
Método	36
1. Tipo e local de estudo.....	37
2. Tamanho amostral.....	37
3. Seleção dos sujeitos, critérios de inclusão e exclusão.....	37
4. Momentos de avaliação e procedimentos específicos para a pesquisa.....	38
5. Definições adotadas no estudo.....	38
6. Investigação da Infecção.....	39
7. Grupos de estudo.....	40
8. Variáveis de estudo.....	41
9. Técnica de obtenção das amostras para dosagens de citocinas.....	43
10. Análise Estatística.....	44

Resultados	46
1. Características maternas e gestacionais.....	47
2. Características dos recém-nascidos.....	48
3. Valores de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatória em sangue de cordão umbilical.....	53
Discussão	62
1. Características maternas e gestacionais.....	63
2. Características dos recém-nascidos.....	65
3. Citocinas como marcadores diagnósticos de infecção precoce.....	67
4. Citocinas e fatores perinatais.....	70
5. Citocinas e morbidade não infecciosa.....	72
6. Considerações finais.....	75
Conclusões	77
Referências bibliográficas	79
Anexos	89

1. Rotura Prematura de Membranas Pré-termo (RPM-PT)

1.1. Aspectos obstétricos e perinatais

A rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) é um grande dilema para obstetras e neonatologistas. Ocorre entre 3 e 4,5% das gestações, é responsável por 30-40% de todos os nascimentos prematuros e não há consenso quanto à conduta mais efetiva e segura para o binômio mãe-filho (Merenstein & Weisman, 1996; Menon & Fortunato, 2007). Estudos clínicos e experimentais evidenciam que a RPM-PT é importante causa de morbidade materna e perinatal, associando-se também ao aumento da mortalidade perinatal. (Debillon et al., 2000; Mercer, 2003).

RPM-PT é definida como a rotura espontânea das membranas fetais, que ocorre antes do início do trabalho de parto e da 37ª semana de gestação (Lee & Silver, 2001). O intervalo entre a rotura de membranas e o início de trabalho de parto é designado período de latência e quando esse período for superior a 24 horas considera-se rotura prolongada de membranas (Mercer, 2003).

O diagnóstico da rotura das membranas é clínico, sendo confirmado em 90% dos casos com base na história de perda de líquido via vaginal ou por testes bioquímicos que avaliam as características do líquido vaginal (Mercer, 2003).

A rotura das membranas pode propiciar infecção intra-uterina ascendente pelos microrganismos presentes na vagina, determinando o quadro de corioamnionite, complicação materna mais frequente da RPM-PT, com ocorrência de 13 a 60% dos casos (Kilbride & Thibeault, 2001).

A corioamnionite é definida por parâmetros clínicos e laboratoriais incluindo febre materna (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) associada à presença de pelo menos dois dos seguintes sinais: útero doloroso, líquido amniótico fétido, leucocitose materna, taquicardia materna ou fetal (Gibbs et al., 1980). A presença de infiltrado neutrofílico nas membranas fetais e na placenta caracteriza a corioamnionite histológica (Berezowski et al., 1994).

Na RPM-PT, a morbi-mortalidade fetal e neonatal depende da idade gestacional, bem como do período de latência até a resolução da gestação e da gravidade do oligoâmnio. As principais complicações para o feto e recém-nascido incluem: prematuridade, infecção, deformidades e hipoplasia pulmonar. A presença de corioamnionite piora o prognóstico neonatal no curto e longo prazo, associando-se com maior risco de sepse, síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar,

enterocolite necrosante, hemorragia peri-intraventricular, leucomalácia periventricular e paralisia cerebral. (Hitti et al., 1997; Gomez et al., 1998; Yoon et al., 2000; Hitti et al., 2001; Jobe & Ikegami, 2001; Tauscher et al., 2003; Romero et al., 2006).

Infecção e/ou inflamação estão associadas ao trabalho de parto prematuro, cuja latência é inversamente proporcional à idade gestacional; conseqüentemente, quanto menor a idade gestacional maior a frequência de infecção intra-uterina (Ramsey et al., 2005; Romero et al., 2006). Rocha et al. (2002) acompanharam 50 gestantes a partir do diagnóstico da rotura de membranas e, por critérios clínico-laboratoriais, documentaram que o risco infeccioso materno-fetal teve relação direta com o período de latência. Quando a latência foi menor que 24 horas nenhum caso de corioamnionite clínica e de infecção neonatal ocorreu; entre 24-72 horas de bolsa rota a incidência dessas complicações foi de 8%, aumentando cerca de 3 vezes nos casos de latência superior a 72 horas.

Os resultados perinatais na RPM-PT estão fortemente relacionados à conduta obstétrica e essa varia conforme a idade gestacional em que ocorre a rotura das membranas. Em gestações com mais de 34 semanas, recomenda-se a resolução da gestação logo após a rotura das membranas, pois a conduta expectante associa-se com aumento na incidência de corioamnionite, prolongamento do tempo de hospitalização materna e não diminui as complicações perinatais relacionadas à prematuridade (Naef et al., 1998; Lieman et al., 2005). Em estudo multicêntrico, envolvendo gestantes com rotura prematura de membranas acima de 34 semanas, Pajntar & Verdenik (1997), verificaram menor índice de complicações maternas e perinatais quando a resolução da gestação ocorreu até 12 horas após a rotura, e documentaram relação direta entre o tempo de latência e a ocorrência de infecção materna e neonatal.

Em idade gestacional inferior a 34 semanas, há controvérsia quanto ao momento ideal para a resolução da gestação complicada pela rotura de membranas, pois a conduta expectante melhora o prognóstico neonatal relacionado à prematuridade, entretanto, aumenta o risco de infecção materno-fetal (Merenstein & Weisman, 1996; Garite, 2001). Um amplo estudo multicêntrico investigou, em gestações de 24 a 33 semanas, o efeito do tempo de rotura das membranas no prognóstico neonatal. Os recém-nascidos foram estratificados em dois grupos conforme o tempo de latência: curta (< 48 horas) e longa (\geq 48 horas), e avaliados quanto à mortalidade e desenvolvimento neuromotor aos dois anos. Nas gestações com menos de 30 semanas, a latência curta aumentou a mortalidade neonatal, enquanto que, após a 30^a semana de gestação, a latência curta associou-se com menor mortalidade. O tempo de latência não influenciou o prognóstico de desenvolvimento

aos dois anos. Frente a esses resultados os autores propõem a reavaliação da conduta expectante na RPM-PT, após 30 semanas de gestação (Pasquier et al., 2007).

Uso de antibióticos

A administração de antibióticos, em gestantes com RPM-PT aumenta o período de latência, o que justificaria a antibioticoterapia materna. Entretanto, o uso crescente dessa prática tem gerado preocupação quanto à segurança de prolongar o nascimento sem efetivamente tratar a infecção fetal.

Esses aspectos motivaram a realização de revisão sistemática para avaliar a eficácia e segurança da antibioticoterapia materna na rotura prematura de membranas de pré-termo (Kenyon et al., 2007). Nessa revisão foram incluídos 22 ensaios clínicos randomizados, envolvendo aproximadamente 7000 gestantes e seus conceitos. Os resultados mostraram que o uso de antibióticos prolonga o tempo de latência e diminui a morbidade materna e neonatal, entretanto não reduz a mortalidade perinatal e neonatal. Um aspecto de preocupação evidenciado nessa revisão foi o aumento no risco de enterocolite necrosante associado ao uso de amoxicilina com ácido clavulânico (Kenyon et al., 2001). Na rotura prematura de membranas próximo ao termo, revisão sistemática de 2 ensaios clínicos randomizados mostrou que o uso de antibióticos na gestante diminui a morbidade infecciosa materna, mas não traz benefícios ao conceito e não há evidências suficientes para recomendar esse uso de rotina (Flenady & King, 2007).

Uso de corticóide antenatal

Até meados da década de 90 havia restrição obstétrica ao uso de corticóide antenatal na RPM-PT devido à preocupação com o aumento no risco de infecção materno-fetal. Vários ensaios clínicos randomizados investigaram essa possibilidade e não encontraram associação entre o uso de corticóide e infecção materno-fetal. Assim, em 1994, o *National Institute of Health* recomendou o uso de corticóide antenatal em pacientes com RPM-PT, antes de 32 semanas de gestação, desde que não houvesse corioamnionite. Em recente revisão sistemática sobre a efetividade e segurança do uso de corticóide antenatal em mulheres com ameaça de parto prematuro, os resultados mostraram que, mesmo na presença de rotura prematura de membranas, não houve aumento no risco de morte materna, corioamnionite ou infecção puerperal. Para o recém-nascido houve

benefício significativo com diminuição do risco de: morte, síndrome do desconforto respiratório, hemorragia peri-intra-ventricular, sepse precoce e enterocolite necrosante. Também houve menor necessidade de suporte respiratório e de terapia intensiva (Roberts & Dalziel, 2008).

1.2. Infecção / inflamação

Infecção e inflamação participam da fisiopatologia da RPM, mas a relação causa-efeito entre elas ainda não está esclarecida (Asrat, 2001; Menon & Fortunato, 2007).

Shim et al. (2004) alertaram para a importância da inflamação intra-amniótica na RPM-PT, pois verificaram que a morbidade materna e perinatal foi semelhante entre as pacientes com inflamação sem infecção intra-amniótica e as com infecção comprovada, sendo que, nos dois grupos a morbidade foi maior do que nas gestantes sem inflamação. Os autores sugerem que as pacientes com RPM-PT deveriam ser classificadas e tratadas de acordo com a presença da inflamação.

A detecção precoce de inflamação e/ou infecção intra-amniótica não é fácil, pois as manifestações clínicas tendem a ser tardias e os testes diagnósticos não invasivos têm valor preditivo limitado. Essas dificuldades têm sido superadas a partir do conhecimento, advindo de estudos experimentais e clínicos com dosagens de citocinas em líquido amniótico e soro materno, que mostram o papel das citocinas na ativação da resposta inflamatória na RPM-PT. Níveis elevados de citocinas inflamatórias no líquido amniótico, mesmo na ausência de corioamnionite clínica e/ou histológica associam-se com aumento da morbi-mortalidade neonatal (Bracci & Buonocore, 2003).

Tanto a rotura prematura de membranas como o trabalho de parto prematuro, quando associados à infecção, são caracterizados por aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no líquido amniótico (Casey et al., 1989; Romero et al., 1990; Fortunato et al., 2002).

Em gestantes com RPM-PT, a corioamnionite clínica e o início de trabalho de parto são precedidos por aumento de proteína C reativa, cuja produção pelas células hepáticas é induzida pela IL-6 (Gomez et al., 1995).

Shimoya et al. (1997) avaliaram os níveis séricos de IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 em gestantes com e sem corioamnionite e, somente a IL-8 mostrou associação com corioamnionite. No líquido amniótico, o aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β associou-se diretamente com a extensão das lesões histológicas de corioamnionite (Baud et al., 1999).

A IL-10, potente citocina antiinflamatória, parece ter efeito protetor, evitando a rotura prematura de membranas. Conforme documentado em estudo experimental, ocorre aumento na produção de metaloproteinases em membranas corioamnióticas estimuladas com lipopolissacarídeo. A associação do lipopolissacarídeo com IL-10 diminui significativamente a produção das metaloproteinases. Considerando que essas enzimas causam destruição do colágeno das membranas fetais e estão diretamente envolvidas na patogênese da rotura de membranas amnióticas, a IL-10 poderia contribuir na prevenção da rotura prematura de membranas (Fortunato et al., 2001).

Síndrome da resposta inflamatória fetal

A ocorrência da rotura prematura das membranas é atribuída à infecção ascendente e à resposta inflamatória materna em nível coriodesidual, porém há que se considerar que, também no feto ocorre resposta pró-inflamatória, mediada por citocinas, que resulta em maior risco de morbidade (Athayde et al., 2005).

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica corresponde à inflamação presente na circulação sanguínea e caracterizada pela presença de febre, taquicardia, hiperventilação e leucocitose. No feto, essa síndrome foi descrita por Gomez et al. (1998), que atribuíram-na aos efeitos de mediadores pró-inflamatórios produzidos pelo feto, sendo a IL-6 a principal citocina envolvida. Segundo esses autores, níveis de IL-6 superiores a 11 pg/ml em sangue fetal, possibilitam o diagnóstico da síndrome de resposta inflamatória fetal (SRIF).

A SRIF pode ocorrer tanto na RPM-PT como no trabalho de parto prematuro e é motivo de preocupação, pois fetos com SRIF têm maior morbidade neonatal (Romero et al., 2006).

A característica histopatológica da SRIF é a presença de funisite (infiltrado neutrofílico em cordão umbilical) e vasculite coriônica. A funisite está associada à ativação endotelial com aumento na expressão de moléculas de adesão e ativação de várias citocinas pró-inflamatórias, cujos níveis estão aumentados no sangue de cordão umbilical. Entretanto, as alterações inflamatórias não se limitam aos vasos do cordão umbilical, traduzindo o comprometimento sistêmico fetal e por isso a funisite é considerada fator de risco para evolução neonatal adversa, seja para a ocorrência de sepse, displasia broncopulmonar e até mesmo paralisia cerebral (Yoon et al., 2000; D'alquen et al., 2005).

1.3. Infecção neonatal precoce

A rotura prematura de membranas é importante fator de risco para infecção neonatal precoce, definida por manifestações clínicas associadas a alterações laboratoriais nos primeiros 2-3 dias de vida. Estudo epidemiológico, na Unidade Neonatal do HC da FMB-UNESP, mostrou que a rotura prematura de membranas com duração superior a 12 horas foi o principal fator de risco para sepse precoce e esteve presente em 48% dos casos (Silva, 2007).

A via mais comum de transmissão materno-fetal dos microrganismos é a ascendente, evidenciada pelos achados histopatológicos de infiltrado neutrofilico intenso nos locais de rotura das membranas e pelo fato das bactérias identificadas em infecções precoces serem da mesma espécie que as encontradas no trato genito-urinário materno (Romero et al., 2002).

Segundo Romero et al. (2002), a infecção ascendente compreende quatro estágios: Estágio 1: crescimento excessivo da microflora vaginal/cervical ou presença de microrganismos patogênicos.

Estágio 2: acesso dos microrganismos à cavidade intra-uterina, atingindo a decídua.

Estágio 3: microrganismos presentes no corio e âmnio, e a infecção pode propagar-se para os vasos fetais (coriovasculite) ou atingir através do âmnio, a cavidade amniótica (amnionite), causando a infecção intra-amniótica.

Estágio 4: os microrganismos têm acesso ao feto.

As principais vias de acesso dos microrganismos ao feto incluem: aspiração do líquido amniótico infectado, que pode causar pneumonia; invasão direta dos microrganismos resultando em otite, conjuntivite e onfalite. A partir de qualquer um destes sítios de infecção, a disseminação dos microrganismos para a circulação fetal pode resultar em bacteremia e sepse. (Romero et al., 2002).

Diagnóstico

O diagnóstico rápido e preciso da infecção neonatal precoce é fundamental para o adequado tratamento e melhora no prognóstico. Entretanto, há várias dificuldades para se confirmar rapidamente a infecção.

As manifestações clínicas de infecção são inespecíficas, e geralmente estão presentes em doenças não infecciosas.

O padrão ouro para o diagnóstico da infecção é a identificação do agente etiológico em fluídos corporais internos, especialmente em cultura de sangue ou liquor. Entretanto, a positividade dessas culturas na infecção precoce é baixa, com cifras inferiores a 2% e o resultado não é rápido. (Buttery, 2002; Stoll & Hansen, 2003; Silva, 2007).

Dentre os recursos diagnósticos laboratoriais, o exame mais utilizado no rastreamento de infecção é o hemograma, por ser um exame rápido e de baixo custo. Porém é inespecífico e sujeito à influência de vários fatores perinatais não infecciosos, além de apresentar variações fisiológicas nos primeiros dias de vida. Frente a essas limitações, para melhor interpretar os dados hematológicos é bastante utilizado o escore de Rodwell, que considera sete itens obtidos a partir dos dados do hemograma, e apresenta sensibilidade de 96% e especificidade de 78% quando a pontuação do escore for ≥ 3 , porém com baixo valor preditivo positivo (31%). Na prática clínica, a maior utilidade do escore de Rodwell está na exclusão de infecção, pois, quando realizado de forma seriada e com escore < 3 tem valor preditivo negativo de 99% (Rodwell et al., 1988; Fowlie & Schmidt, 1998).

Dentre os reagentes de fase aguda, utilizados no diagnóstico de infecção, destaca-se a dosagem quantitativa da proteína C reativa (PCR). Entretanto, a PCR é mais útil na avaliação da resposta terapêutica do que no diagnóstico precoce de infecção, uma vez que sua síntese inicia-se em 6 a 8 horas após a exposição ao agente infeccioso ou lesão tecidual, e níveis séricos elevados ocorrem entre 24-48 horas (Gerdes & Polin, 1987; Ng, 2004). A procalcitonina é outro reagente de fase aguda promissor, porém seu uso no período neonatal é recente e os resultados ainda não são conclusivos (Fowlie & Schmidt, 1998; Ng, 2004; Mishra et al., 2006).

A detecção de segmentos genômicos de microorganismos por meio da reação de polimerização em cadeia é uma perspectiva bastante promissora, porém pela complexidade e alto custo, seu uso ainda está limitado à pesquisa (Mishra et al., 2006).

1.4. Citocinas

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa em resposta a microrganismos e outros antígenos. Essas proteínas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação, portanto, podem ser úteis no diagnóstico de infecção. Como muitas citocinas são sintetizadas por leucócitos e atuam em outros leucócitos, são designadas de interleucinas (Abbas & Lichtman, 2005).

A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado. Uma citocina pode agir em diferentes tipos celulares (pleiotropismo) e essa propriedade permite que a citocina exerça diferentes efeitos biológicos. Outra propriedade das citocinas é a redundância, ou seja, a capacidade de várias citocinas apresentarem os mesmos efeitos funcionais. As citocinas frequentemente influenciam a síntese e as ações de outras citocinas, desencadeando uma cascata na qual a segunda ou terceira citocina produzida pode mediar os efeitos biológicos da primeira. A capacidade de uma citocina aumentar ou suprimir a ação de outra é importante mecanismo regulador da resposta inflamatória. A maioria das citocinas age na mesma célula que a secretou ou em uma célula próxima, mas quando produzidas em grande quantidade podem entrar na circulação e atuar em local distante de sua produção (Abbas & Lichtman, 2005).

A secreção de citocinas é um componente importante da resposta imune inata inicial a antígenos bacterianos e as citocinas mais estudadas na inflamação/infecção da RPM-PT são:

Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α): é o principal mediador da resposta inflamatória a microrganismos e responsável por muitas das complicações sistêmicas em infecções graves. O TNF- α é secretado principalmente pelos fagócitos mononucleares ativado e atua como mediador precoce na cascata das citocinas, tendo como principal função fisiológica estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos nos locais de infecção e ativar essas células para a eliminação dos microrganismos. O TNF- α faz com que as células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão e estimula células endoteliais e macrófagos a secretarem quimiocinas e IL-1. Quando produzido em grande quantidade, o TNF- α entra na corrente sanguínea e age como pirógeno endógeno, atua também nos hepatócitos para aumentar a síntese de proteínas séricas. Produção prolongada de TNF- α causa perda de células musculares e adiposas, resultando em caquexia. Quantidades elevadas do TNF- α causam diminuição da contratilidade do miocárdio e do tônus vascular, trombose intravascular, distúrbios metabólicos graves e apoptose (Mehr & Doyle, 2000; Abbas & Lichtman, 2005).

Interleucina-1 (IL-1): é mediadora da resposta imune do hospedeiro às infecções e outros estímulos inflamatórios. Sua fonte celular e ações biológicas são semelhantes ao TNF- α , porém altas concentrações sistêmicas de IL-1 não causam as alterações fisiopatológicas do choque séptico e não induzem a apoptose. (Hack et al., 1997; Abbas & Lichtman, 2005)

Interleucina-6 (IL-6): atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular e outras células em resposta aos microrganismos e a outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α . A IL-6 estimula a síntese de proteínas de fase aguda e a produção de neutrófilos. (Hack et al., 1997; Abbas & Lichtman, 2005)

Interleucina-8 (IL-8): sintetizada por macrófagos, células T, células endoteliais, fibroblastos e plaquetas. É uma quimiocina, ou seja, uma citocina quimiotática que promove o recrutamento de leucócitos, preferencialmente os neutrófilos para os locais de infecção. Quimiocinas são proteínas com cisteína em sua composição. A IL-8 pertence à família CXC das quimiocinas, sendo designada CXCL8. Sua produção é estimulada por produtos bacterianos ou diretamente por outras citocinas como IL-1 e TNF- α (Mukaida, 2003). A produção de IL-8 é descrita como bifásica, sendo que a fase inicial ocorre após estímulo direto da endotoxina com pico em duas horas e retorno aos níveis basais após 5 horas (Martich et al., 1991). A fase tardia ocorre 6 horas após o estímulo inicial, em seguida ao TNF- α e IL-1 (Hack et al., 1997).

Interleucina-10 (IL-10): descrita inicialmente em sobrenadante de cultura de linfócitos T ativados, porém monócitos estimulados com produtos bacterianos podem também produzir grande quantidade de IL-10. É uma potente citocina antiinflamatória que tem papel central na regulação do processo inflamatório, inibindo a resposta imune do hospedeiro, particularmente quando os macrófagos estão envolvidos. Sua ação antiinflamatória consiste na supressão das citocinas pró-inflamatórias por inibição da síntese e liberação das mesmas (Oberholzer et al., 2002).

Citocinas como marcadores diagnósticos

Frente às limitações no diagnóstico clínico e laboratorial da infecção neonatal e, considerando o papel das citocinas no desencadeamento do processo infeccioso, a partir da metade da década de 90, vários estudos buscam identificar uma ou mais citocinas que possam ser usadas como marcadores precoces e sensíveis da infecção neonatal.

Embora o recém-nascido seja classicamente considerado imunoincompetente, sua capacidade de resposta inflamatória mostrou-se adequada no estudo de Schultz et al. (2002), que documentou maior síntese de IL-6 e IL-8 pelos monócitos de recém-nascidos comparados aos de adultos. Nesse estudo, as células obtidas de sangue de recém-nascidos de termo, prematuros e de adultos foram cultivadas *in vitro*. A capacidade de síntese de

interleucinas pelos monócitos dos recém-nascidos foi maior em condições basais e após estimulação com endotoxina.

Dentre as várias citocinas envolvidas no processo inflamatório/infeccioso, as mais estudadas como marcadores de infecção neonatal precoce são: IL-6, IL-8, TNF- α . (Messer et al., 1996; Ng, 2004).

A IL-6 é uma citocina importante na resposta inicial à infecção e, apesar de sua vida média curta, é considerada marcador sensível e precoce de infecção neonatal, apresentando melhor sensibilidade quando avaliada em conjunto com a dosagem da proteína C reativa (Messer et al., 1996; Ng et al., 1997; Dollner et al., 2001a).

Em recém-nascidos com idade gestacional entre 24- 42 semanas, Messer et al. (1996) verificaram que a concentração da IL-6 $\geq 100\text{pg/ml}$, nas primeiras 12 horas de vida, foi bom marcador de infecção precoce, com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 90,3%. Após 12 horas de vida mostrou-se também bom preditor, desde que associado à dosagem de proteína C reativa.

O TNF- α é importante mediador na fisiopatologia do choque séptico e na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Messer et al., 1996; Ng et al., 1997).

Os estudos sobre TNF- α em sangue de cordão umbilical ou do recém-nascido nas primeiras horas de vida, mostram resultados contraditórios quanto à utilidade desse marcador no diagnóstico de infecção precoce. Girardin et al. (1990) documentaram aumento significativo de TNF- α em recém-nascidos com idade gestacional entre 28 e 40 semanas, que apresentaram sepse precoce ou tardia, sendo que os pacientes que evoluíram com choque séptico apresentaram maior aumento. Berner et al. (2000) verificaram aumento da expressão gênica do TNF- α em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de termo ou pré-termo que evoluíram com sepse. Resultados diferentes foram obtidos no estudo de Santana et al. (2001), que investigaram várias citocinas em sangue de cordão umbilical, como preditores de sepse precoce em recém-nascidos. De acordo com a evolução clínica, os recém-nascidos foram estratificados em três grupos: sepse confirmada; doença não infecciosa e sadios pareados por peso de nascimento e idade gestacional. Não houve diferença nos valores de TNF- α nos três grupos de recém-nascidos.

A IL-8 é considerada marcador de alta acurácia no diagnóstico de infecção neonatal precoce e tardia (Franz et al., 1999; Berner et al., 2000; Bentlin et al., 2007) e concentrações elevadas têm sido observadas em pacientes com RPM-PT (Asrat, 2001).

Krueger et al. (2001) avaliaram os níveis de IL-8 em sangue de cordão de recém-nascidos de termo e prematuros, e obtiveram valores mais elevados nos pacientes que

evoluíram com sepse precoce confirmada. A sensibilidade foi de 87% e a especificidade de 94% para valores de IL-8 ≥ 90 pg/ml. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Santana et al. (2001) que também avaliou recém-nascidos de termo e prematuros, nos quais a IL-8 $\geq 111,7$ pg/ml em sangue de cordão umbilical, teve sensibilidade de 78% e especificidade de 91%, com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 84% no diagnóstico de sepse precoce confirmada.

No estudo de Nupponem et al. (2001), a IL-8 foi dosada no momento da suspeita de infecção, em recém-nascidos com idade gestacional entre 29 e 41 semanas e menos que 48 horas de vida, que foram estratificados em dois grupos: sepse e infecção provável, e comparados com um grupo controle constituído por recém-nascidos de termo saudáveis. Houve diferença significativa entre os grupos, com maiores valores no grupo séptico e menores nos termos saudáveis, com alta sensibilidade (91%) e especificidade (100%) para valores de IL-8 ≥ 50 pg/ml.

A interação entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias exerce importante papel na resposta inflamatória sistêmica. Do equilíbrio entre elas resulta a cura do processo infeccioso, enquanto que o desequilíbrio pode determinar disfunção de órgãos e morte. As citocinas pró-inflamatórias iniciam a resposta contra os patógenos, porém, a superprodução destes mediadores pode causar destruição tecidual. As citocinas antiinflamatórias exercem papel contra-regulador na manutenção da homeostase da resposta imune corporal, mas a resposta antinflamatória exacerbada pode resultar na supressão da função imune (Van Dissel et al., 1998; Ng, 2004).

Dentre as citocinas antiinflamatórias destaca-se a interleucina-10 (IL-10). Sua participação na contenção da resposta inflamatória é fundamental para impedir a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Assim, a IL-10 pode ser considerada melhor marcador da evolução do processo infeccioso do que marcador diagnóstico (Van Dissel et al., 1998; Ng, 2004).

Vários autores têm destacado o papel da IL-10 na regulação da produção de TNF- α (Gérard et al., 1993; Cassatella et al., 1993; Van Der Poll et al., 1994). O TNF- α é considerado mediador da indução de IL-10, e sua ação parece envolver um mecanismo de *feedback* auto-regulador (Van Der Poll et al., 1994). O mecanismo contra-regulador entre as citocinas pró e antinflamatórias já está presente em prematuros de muito baixo peso, sendo evidenciadas concentrações elevadas de TNF- α , IL-6 e IL-10, bem como aumento na relação IL-10/TNF- α e IL6/IL10 em prematuros com infecção grave (Ng et al., 2003).

1.5. Justificativa

A importância da rotura prematura de membranas como fator de risco para infecção precoce em recém-nascidos prematuros e os resultados controversos sobre o papel das citocinas como marcadores de infecção precoce motivaram a realização desse estudo para responder a seguinte questão:

- Na RPM-PT, os níveis de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical auxiliam no diagnóstico de infecção precoce ?

Objetivos

1. Objetivo geral

Investigar se os níveis de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical são marcadores de infecção precoce em prematuros advindos de gestações com RPM-PT.

2. Objetivos específicos

Na RPM-PT:

- ✓ Verificar se os valores de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical, diferenciam ou não a presença infecção precoce.

 - ✓ Determinar se essas citocinas dosadas em sangue de cordão umbilical são úteis como teste diagnóstico, avaliando sua acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.

 - ✓ Avaliar a influência de variáveis perinatais nos valores de TNF- α , IL-8 e IL-10.

 - ✓ Investigar a relação entre os níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical e a morbidade neonatal.
-

Método

1. Tipo e local de estudo

Estudo observacional, prospectivo, realizado na Unidade Neonatal do HC da FMB-UNESP, no período de abril de 2004 a novembro de 2006, envolvendo recém-nascidos prematuros, filhos de mães com rotura prematura de membranas, e nascidos na Maternidade do Serviço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Anexo 1).

2. Tamanho amostral

O tamanho da amostra foi estimado com base no estudo de Silva (1999) que verificou a ocorrência de 30,8% de infecção precoce em recém nascidos prematuros de mães com rotura prematura de membranas. Por meio do programa estatístico *SigmaStat*[®] *Statistical Software 2.0* foi calculado número mínimo de 27 pacientes em cada grupo, considerando poder do teste em 80% e erro alfa de 5%.

3. Seleção dos sujeitos, critérios de inclusão e exclusão

O binômio mãe-filho foi selecionado por meio de visitas diárias da pesquisadora na enfermaria de Obstetrícia, para obter informação sobre a internação de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo. As gestantes selecionadas foram convidadas a participar do estudo, sendo incluídos no estudo os recém-nascidos cujas mães concordaram, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) e preencheram os critérios de inclusão:

- idade gestacional menor que 37 semanas
- diagnóstico de rotura de membranas confirmado na Maternidade do HC-FMB
- tempo de rotura de membranas igual ou maior que 12 horas
- gestação única
- ausência de diabete melito e pré-eclampsia

Os critérios para exclusão do estudo foram:

- concepto nascido morto
 - má-formação congênita múltipla
 - diagnóstico clínico e/ou sorológico de infecção congênita
-

- problema técnico na coleta e/ou realização dos exames em sangue de cordão
- impossibilidade de confirmar ou afastar definitivamente a infecção precoce

Preenchidos os critérios de inclusão, foram registrados no protocolo de investigação os dados maternos, do nascimento e da evolução dos recém-nascidos durante o período de internação (Anexo 3).

4. Momentos de avaliação e procedimentos específicos para a pesquisa:

- Nascimento: Obtenção das amostras
 - Coleta de sangue de cordão umbilical
 - Encaminhamento da placenta para exame anátomo-patológico
- Primeiras 48 horas de vida: Avaliação do desfecho primário: presença ou não de infecção
 - vigilância clínica contínua
 - exames hematológicos
 - exame radiológico e punção lombar (quando indicados)
 - culturas de sangue e líquido
- Terceiro dia de vida até a alta ou óbito: Obtenção de dados clínicos e exames subsidiários para os desfechos secundários (morbidade neonatal)

5. Definições adotadas no estudo

Rotura prematura de membranas pré-termo: rotura espontânea das membranas fetais que ocorreu antes do início do trabalho de parto e antes de 37 semanas de gestação (Lee & Silver, 2001).

Infecção neonatal precoce: manifestações clínicas associadas a alterações laboratoriais, sugestivas de infecção e que se manifestam até 48 horas de vida (Gaynes et al., 1996).

Corioamnionite clínica: presença de rotura prematura de membranas associada à temperatura materna superior a 38°C e pelo menos uma das seguintes alterações clínicas e laboratoriais: útero doloroso, líquido amniótico fétido, leucocitose ($>15.000/\text{mm}^3$), taquicardia materna e/ou fetal (Gibbs et al., 1980).

Corioamnionite histológica: diagnosticada pelo exame histopatológico da placenta e caracterizada pela presença de infiltração de neutrófilos nas membranas fetais e placenta

segundo critério de Berezowski et al., 1994. A presença de infiltrado neutrofilico em cordão umbilical caracterizou a funisite.

Sepse: evidência clínica de infecção associada a alterações de temperatura e/ou taquicardia e/ou taquipnéia e alteração do leucograma. Na presença de hemocultura positiva foi considerado sepse confirmada, caso contrário, sepse clínica (Saez-Llorenz & McCracken, 1993).

Pneumonia: evidência clínica e laboratorial de infecção associada a alterações radiológicas não homogêneas e persistentes no parênquima pulmonar (Calil, 2002).

Meningite: caracterizada pelo aumento da celularidade líquórica associada a hiperproteínoorraquia e hipoglicorraquia, de acordo com os valores descritos por Rodriguez et al. (1990).

6. Investigação da infecção

A vigilância de infecção dos recém-nascidos na RPM-PT foi realizada de acordo com o protocolo instituído na Unidade Neonatal do HC-FMB (Bentlin & Rugolo, 2006).

Na situação de risco infeccioso associado à RPM, além de criteriosa vigilância clínica, é rotina nesse Serviço a avaliação hematológica incluindo: hemograma completo e dosagem de proteína C reativa nas primeiras 6 horas de vida e, se o resultado for inconclusivo essa avaliação, é repetida entre 12-24 horas. Caso ainda persista a dúvida quanto à presença de infecção, ou ocorra piora clínica, os exames são repetidos em qualquer momento na evolução do recém-nascido. Nos recém-nascidos sintomáticos e/ou com alterações hematológicas sugestivas de infecção é coletado material biológico para a realização de culturas: sangue e líquido e inicia-se antibioticoterapia com a associação de uma penicilina e gentamicina.

Nesse estudo foi valorizado o hemograma mais alterado e o maior valor da PCR, dentre as dosagens realizadas nas primeiras 24 horas de investigação.

O hemograma completo com contagem de plaquetas foi realizado com 0,5 ml de sangue no aparelho ABX Pentra 120 (Horiba[®]), com leitura de lâmina em microscópio por técnicos do laboratório. A dosagem quantitativa da proteína C reativa foi realizada pelo método de química seca no aparelho Vitros 5,1 FS (Johnson & Johnson[®]) utilizando 10 µl de soro e tendo como valor normal PCR menor que 1 mg/dL. Esses exames foram realizados no laboratório de Análises Clínicas do HC-FMB.

Com os dados do hemograma foi calculado o escore para infecção descrito por Rodwell et al. em 1988 (Anexo 4).

A hemocultura foi realizada com 1 ml de sangue periférico obtido por punção, após anti-sepsia com álcool 70% e posterior inoculação em frasco de cultura BD Bactec Peds Plus Medium[®] que contém caldo de extrato de soja-caseína e resinas que favorecem o crescimento de microorganismos.

O líquido foi obtido por punção lombar após anti-sepsia com clorexidina, e coletado em 2 frascos: um para análise bioquímica, citológica e outro para cultura.

As culturas foram realizadas na Seção de Microbiologia do laboratório de Análises Clínicas do HC-FMB.

O exame radiográfico de tórax foi realizado em todo recém-nascido que apresentou desconforto respiratório.

O diagnóstico de infecção foi dado pela equipe médica que assistiu os recém-nascidos. Todos os exames utilizados no diagnóstico de infecção, inclusive os exames radiológicos nos casos de pneumonia, foram checados pela pesquisadora e havendo dúvida na interpretação dos mesmos, foi considerada a opinião de um 3º avaliador não envolvido na pesquisa.

7. Grupos de estudo

Foram constituídos dois grupos de estudo: infectado e não infectado.

O critério para definir o grupo infectado foi: clínico e laboratorial, requerendo: Duas ou mais alterações clínicas e pelo menos uma alteração laboratorial, nas primeiras 48 horas de vida.

Foram valorizados os seguintes achados clínicos: letargia, irritabilidade, perfusão periférica lentificada (>3segundos), hipotensão, instabilidade térmica, bradicardia (Frequência cardíaca <100 batimentos por minuto), taquicardia (Frequência cardíaca > 160 batimentos por minuto), desconforto respiratório, apnéia, distensão abdominal, vômitos e intolerância alimentar.

A alteração laboratorial foi caracterizada por 3 possibilidades:

- Cultura positiva em sangue e/ou líquido
 - Escore de Rodwell ≥ 3
 - Alterações de neutrófilos (neutropenia, neutrofilia, aumento de formas jovens) associadas à proteína C reativa > 1,0 mg/dl.
-

Os critérios para definir o grupo não infectado foram: ausência de manifestações clínicas; manifestações clínicas sem qualquer alteração laboratorial; alterações clínicas e/ou laboratoriais suspeitas, porém, com rápida normalização sem uso de antibióticos ou tempo de antibioticoterapia menor que 5 dias.

Os casos que não preencheram os critérios propostos para caracterizar os recém-nascidos como infectados ou não infectados foram considerados duvidosos e excluídos do estudo.

8. Variáveis de estudo

Independentes

Maternas:

- Idade materna – em anos completos.
 - Tempo de rotura de membranas – tempo em horas, a partir do momento em que se iniciou a perda de líquido via vaginal. A rotura foi caracterizada pela história clínica de perda de líquido amniótico pela vagina e, confirmada no Serviço de Obstetrícia do HC da FMB, pela saída de líquido pela vagina ou pelo teste da cristalização no esfregaço de secreção do fundo de saco vaginal.
 - Antecedentes obstétricos: número da gestação atual, presença de complicações clínicas e/ou obstétricas na gestação atual.
 - Uso de corticóide antenatal: considerado presente quando foi realizado um ciclo completo.
 - Uso de antibiótico intraparto: valorizado a administração de pelo menos uma dose de antibiótico nas 4 horas que antecederam o parto.
 - Sofrimento fetal: considerado presente ou ausente conforme o resultado do Doppler de vasos fetais e/ou cardiotocografia e/ou presença de mecônio no líquido amniótico.
 - Tipo de parto: vaginal ou cesáreo.
-

Neonatais:

- Peso ao nascimento (PN): considerado o peso de nascimento em gramas, aferido na sala de parto.

- Idade gestacional (IG): calculada pela data da última menstruação, desde que a mãe tivesse certeza da mesma. Na impossibilidade dessa informação, foi considerada a estimativa obtida pelo ultra-som precoce (antes de 20 semanas). Quando nenhuma das alternativas anteriores estava disponível, considerou-se a avaliação clínica do recém-nascido segundo o método de New Ballard (Ballard et al., 1991).

- Adequação do peso de nascimento para a idade gestacional: baseada na curva de Alexander et al. (1996), considerando-se adequado para a idade gestacional quando o peso de nascimento situou-se entre os percentis 10 e 90 da referida curva.

- Boletim de Apgar: aplicado no primeiro e quinto minutos de vida. A nota obtida no primeiro minuto definiu a condição de vitalidade ao nascer, classificando-se como depressão neonatal grave a nota ≤ 3 ; depressão moderada: 4 a 6, e boa vitalidade quando ≥ 7 . A nota no 5º minuto igual ou menor que 6 caracterizou a má recuperação do recém-nascido.

- Reanimação neonatal: realizada de forma sistematizada no Serviço, conforme as normas da Sociedade Brasileira de Pediatria em consonância com a Academia Americana de Pediatria (AAP & AHA, 2000). Considerada presente quando houve necessidade de ventilação com pressão positiva em sala de parto.

- Boletim de Silverman –Andersen (BSA): utilizado para quantificar o grau de dificuldade respiratória ao nascimento, considerando-se a pontuação ≥ 4 , indicativa de desconforto respiratório moderado com necessidade de assistência respiratória.

- Necessidade de internação em UTI Neonatal.

- Tempo total de hospitalização: em dias.

- Procedimentos: uso de CPAP nasal e de ventilação mecânica.

- Morbidade neonatal não infecciosa: presença de síndrome do desconforto respiratório (SDR), persistência de canal arterial (PCA), hemorragia peri-intraventricular (HPIV), leucomalácia periventricular (LPV), displasia broncopulmonar (DPB).

O diagnóstico de SDR foi considerado pela presença de insuficiência respiratória progressiva associada à necessidade de oxigenoterapia e alterações radiológicas características (Rugolo, 1999).

A PCA foi caracterizada pela presença de manifestações clínicas sugestivas e confirmada pelo ecocardiograma.

A HPIV foi diagnosticada por ultra-som transfontanelar, realizado nos prematuros na primeira semana de vida e repetido no 28º dia de vida e classificada conforme o critério de Papile et al. (1978). A leucomalácia periventricular foi diagnosticada pela presença de lesões císticas hipocóicas na substância branca periventricular, observadas por meio de ultra-sons seriados.

A displasia broncopulmonar (DBP) foi definida pela necessidade de oxigênio por período superior a 28 dias, associada aos sinais clínicos e radiológicos característicos e classificada quanto à gravidade em função do uso de oxigênio ao atingir 36 semanas pós-concepção (Jobe & Bancalari, 2001).

Dependentes

Citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-8 e citocina ant-inflamatória IL-10

9. Técnica de obtenção das amostras para dosagem de citocinas

Para a dosagem de TNF- α , IL-8 e IL-10 foram coletados 5 ml de sangue de cordão após a dequitação da placenta por meio de punção da veia umbilical com agulha e seringa descartáveis. Logo após, o sangue foi transferido para tubos a vácuo contendo EDTA (ácido etileno diaminotetracético) e centrifugado por cinco minutos para separação do plasma. O plasma obtido foi colocado em tubos Ependorff® e estocado em freezer a -70°C até o momento das dosagens. O material foi descongelado 24 horas antes das dosagens, que foram realizadas no Laboratório Experimental de Pediatria.

As placas para as dosagens de citocinas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-TNF- α , anti-IL-8 e anti-IL-10 (R & D Systems®), na concentração de 2 μ g/ml, diluído em PBS (salina tamponada com fosfato pH=7,4) e incubadas por um período de 18 horas à 5°C em câmara úmida.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas com PBST (PBS adicionado de 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 1% de albumina bovina sérica (BSA-Sigma®). O período de bloqueio foi de 2 horas à temperatura ambiente, seguindo-se 4 lavagens das placas com PBST. Após bloqueio das placas, 100 μ L das amostras foram depositadas em cada orifício e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Ao mesmo tempo, TNF- α , IL-8 e IL-10 recombinantes foram diluídos em PBS (pH=7,4) acrescido de 1% de BSA. As

concentrações da curva foram de 7.81 a 1000 pg/ml para o TNF- α , 1.56 a 200 pg/ml para IL-8 e de 15.6 a 4000 pg/ml para IL-10.

Após a retirada das amostras das placas, e posterior lavagem, anticorpos anti-TNF- α , anti-IL-8 e anti IL-10 foram adicionados e conjugados com biotina (R & D Systems[®]), com posterior incubação de 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente com PBST e incubadas com estreptoavidina conjugada com peroxidase (R & D Systems[®]) na concentração e condições recomendadas pelo fabricante.

Como substrato foi utilizada solução de tetrametilbenzidina pronta para uso (Pharmingen[®]). O tempo de reação foi de 30 minutos e o bloqueio realizado com H₂SO₄ a 4 N (normal). A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 450 nm.

O limite mínimo de detecção pelo método de dosagem empregado foi de 1.6 pg/ml para o TNF- α ; 3.5 pg/ml para a IL-8; e menor que 3.9 pg/ml para a IL-10.

O coeficiente de variabilidade inter-ensaio foi de 8% e intra-ensaio de 5 %.

10. Análise estatística

A estatística 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 quartis. Média foi utilizada para variáveis com distribuição normal ou simétrica e a análise das associações foi realizada pelo teste t de Student. Variáveis com distribuição não normal ou assimétrica foram expressas pela mediana e comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

As variáveis categóricas foram representadas pelo número e proporção de eventos, sendo utilizado o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher para o estudo das associações. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (Curi, 1997).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo das citocinas foram calculadas comparando-se os grupos: infectado e não infectado.

O padrão ouro para definir o grupo infectado foi: clínico e laboratorial, requerendo: duas ou mais alterações clínicas e pelo menos uma alteração laboratorial, nas primeiras 48 horas de vida.

Os pontos de corte das citocinas foram determinados após construção da curva de operação resposta – ROC - *receiver operator characteristic*, construída pela representação da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) no eixo y, contra a taxa de falsos positivos (1-especificidade) no eixo x. O cruzamento entre a sensibilidade e a especificidade dos valores das citocinas foram usados para identificar o melhor ponto de corte.

Acurácia do teste diagnóstico (Fletcher & Fletcher, 2006)

A acurácia ou validade da determinação das citocinas foi dada pelo cálculo de sensibilidade e especificidade.

Sensibilidade – proporção de positivos verdadeiros entre os prematuros infectados.

Especificidade – proporção de negativos verdadeiros entre os prematuros não infectados.

A acurácia global do teste também foi obtida pelo cálculo da área sob a curva ROC. Quanto maior a área, melhor a acurácia do teste. Para a determinação da probabilidade utilizou-se:

Valor preditivo positivo: probabilidade do prematuro ser infectado com resultado do teste positivo.

Valor preditivo negativo: probabilidade do prematuro não ser infectado com resultado do teste negativo.

Os valores preditivos foram determinados a partir da sensibilidade e especificidade dos valores das citocinas, considerando-se a incidência de 30 % de infecção precoce na RPM-PT, documentada previamente no Serviço (Silva, 1999).

Modelos de regressão linear simples e múltipla foram propostos para investigar os fatores maternos e perinatais que poderiam influenciar os níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical.

Resultados

Do total de 65 recém-nascidos selecionados, 10 foram excluídos: cinco porque o diagnóstico de infecção não pode ser confirmado ou rejeitado; quatro devido às amostras serem insuficientes para as dosagens das citocinas, e um prematuro que teve diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita.

Foram estudados 55 prematuros, dos quais 27 constituíram o grupo infectado e 28 o grupo não infectado.

1. Características maternas e gestacionais

Os principais dados maternos e gestacionais estão apresentados na Tabela 1, observando-se que corioamnionite clínica e/ou histológica foi significativamente mais frequente no grupo infectado. O uso de corticóide antenatal foi frequente nos dois grupos.

A mediana do número de gestações foi 2 em ambos os grupos ($p=0,469$).

Tabela 1 – Dados maternos e gestacionais segundo a ocorrência de infecção precoce nos recém-nascidos prematuros

Variáveis maternas e Gestacionais		Recém-nascido			Estatística Valor de p
		Total n=55	Infectado n=27	Não Infectado n=28	
Idade (anos)	X (\pm DP)	23.9 (\pm 6.7)	24 (\pm 6.9)	23.9 (\pm 6.7)	0.970*
ITU	n (%)	19 (34.5)	13 (48.2)	6 (21.4)	0.072 [†]
Inf. Genital	n (%)	13 (23.6)	7 (25.9)	6 (21.4)	0.940 [†]
Tabagismo	n (%)	14 (25.5)	8 (29.6)	6 (21.4)	0.698 [†]
CEAN	n (%)	35 (63.6)	20 (74.1)	15 (53.6)	0.194 [†]
SF	n (%)	17 (30.9)	11 (40.7)	6 (21.4)	0.209 [†]
ATB IP	n (%)	17 (30.9)	9 (33.3)	8 (28.6)	0.928 [†]
Cesárea	n (%)	21 (38.2)	12 (38.7)	9 (32.1)	0.800 [†]
CA clínica	n (%)	13 (23.6)	11 (40.7)	2 (7.1)	0.009[‡]
CA histológica	n (%)	18/48 (37.5)	16/24 (66.7)	2/24 (8.3)	<0.001[‡]
Funisite	n (%)	9/48 (18.8)	6/24 (25)	3/24 (12.5)	0.299 [‡]

ITU= infecção do trato urinário; Inf.=infecção; CEAN=corticóide antenatal; SF= sofrimento fetal;

ATB IP= antibiótico intraparto; CA= corioamnionite

* teste t † Qui-quadrado ‡ Fisher

O tempo de rotura de membranas não diferiu entre os grupos, com mediana de 54 horas (Q25=33; Q75=88) para o grupo infectado e de 29 horas (Q25=20; Q75=65) para o não infectado ($p=0.102$). Entretanto, a estratificação em períodos de horas de bolsa rota mostrou proporção significativamente maior de rotura superior a 48 horas no grupo infectado (Tabela 2).

Tabela 2 – Tempo de rotura prematura de membranas segundo a ocorrência de infecção precoce nos recém-nascidos prematuros

Tempo de rotura prematura de membranas	Total n=55	Recém-nascido		Estatística Valor de p
		Infectado n=27	Não Infectado n=28	
12 -18 horas n (%)	11 (20)	5 (18.5)	6 (21.4)	0.946 [†]
18 - 24 horas n (%)	4 (7.3)	0 (0)	4 (14.3)	0.111 [‡]
24 - 48 horas n (%)	14 (25.5)	5 (18.5)	9 (32.1)	0.395 [†]
> 48 horas n (%)	26 (47.3)	17 (63)	9 (32.1)	0.044[†]

†Qui-quadrado ‡Fisher

2. Características dos recém-nascidos

Os dados das condições de nascimento estão apresentados na Tabela 3, na qual se observa que os prematuros do grupo infectado tiveram significativamente, menor idade gestacional e peso de nascimento; maior necessidade de intubação em sala de parto e maiores valores de boletim de Silverman-Andersen.

Tabela 3 – Dados de nascimento dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce

Dados de nascimento		Total n=55	Infectado n=27	Não Infectado n=28	Estatística Valor de p
IG (semanas)	X (±DP)	32 (±2.5)	31 (±2.7)	33 (±1.7)	< 0.001 [*]
PN (gramas)	X (±DP)	1912(±525)	1707 (±612)	2109 (±328)	0.003 [*]
Sexo masculino	n (%)	33 (60.0)	16 (59.3)	17 (60.7)	0.869 [†]
Reanimação: VPP	n (%)	21 (38.2)	13 (48.2)	8(28.6)	0.224 [†]
Intubação	n (%)	10 (18.2)	9 (29.0)	1(3.6)	0.013 [‡]
Apgar 1'	Md (Q25; Q75)	8 (5; 8)	7 (4; 8)	8 (7; 9)	0.060 [§]
5'	Md (Q25; Q75)	9 (8; 9)	9 (8; 9)	9 (9; 10)	0.136 [§]
BSA	Md (Q25; Q75)	4 (3; 6)	5 (4; 6)	4 (1; 5)	0.012 [§]

IG= idade gestacional; PN= peso de nascimento; VPP= ventilação com pressão positiva; BSA= Boletim de Silverman-Andersen

* teste t †Qui-quadrado ‡Fisher §Mann-Whitney

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados dos parâmetros laboratoriais avaliados nos recém-nascidos infectados e não infectados.

Tabela 4 –Parâmetros hematológicos dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce

Parâmetros hematológicos		Infectado n=27	Não Infectado n=28	Estatística Valor de p
Leucócitos (/mm ³)	Md (Q25; Q75)	11100 (7550; 18450)	12450 (8550; 17550)	0.550 [§]
Neutrófilos totais (/mm ³)	Md (Q25; Q75)	5940 (3845; 11841)	6950 (4301; 10310)	0.528 [§]
Neutrófilos imaturos (/mm ³)	Md (Q25; Q75)	1016 (267; 1955)	58 (0; 344)	< 0.001 [§]
Plaquetas (/mm ³)	X (± DP)	241222 (± 91921)	245285 (± 94566)	0.872 [*]

* teste t §Mann-Whitney

Os valores medianos da contagem de leucócitos e neutrófilos totais e o valor médio das plaquetas não diferiram entre os grupos. Os neutrófilos imaturos foram significativamente aumentados nos prematuros infectados.

A Tabela 5 mostra que os valores medianos do índice neutrofilico, da relação de neutrófilos imaturos/maduros, do escore de Rodwell e da proteína C reativa foram significativamente maiores nos prematuros com infecção precoce.

Tabela 5– Escore e índices hematológicos, Proteína C reativa dos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce

Parâmetros hematológicos		Infectado n=27	Não Infectado n=28	Estatística Valor de p
Índice Neutrofilico	Md (Q25; Q75)	0.17 (0.07; 0.24)	0.00 (0.00; 0.05)	< 0.001 [§]
Relação I/M	Md (Q25; Q75)	0.20 (0.08; 0.31)	0.00 (0.00; 0.05)	< 0.001 [§]
Escore de Rodwell	Md (Q25; Q75)	2 (2; 3)	1 (0; 1)	< 0.001 [§]
Proteína C reativa (mg/mL)	Md (Q25; Q75)	2.4 (1.7; 5.6)	0.4 (0.0; 0.8)	< 0.001 [§]

§Mann-Whitney

Como se observa na Tabela 6, todos os recém-nascidos do grupo infectado foram submetidos à investigação microbiológica por meio de hemocultura e foi elevada a indicação de coleta de liquor, porém nenhum agente foi isolado.

Tabela 6 – Investigação microbiológica e radiológica de infecção precoce nos grupos de estudo

Exames		Total n=55	Infectado n=27	Não Infectado n=28
Hemocultura	n (%)	51 (92%)	27 (100%)	24 (86%)
Liquor	n (%)	30 (55%)	25 (93%)	5 (18%)
RX de tórax	n (%)	37 (67%)	27 (100%)	10 (36%)

A topografia predominante da infecção precoce nessa amostra foi pulmonar, como mostra a Figura 1.

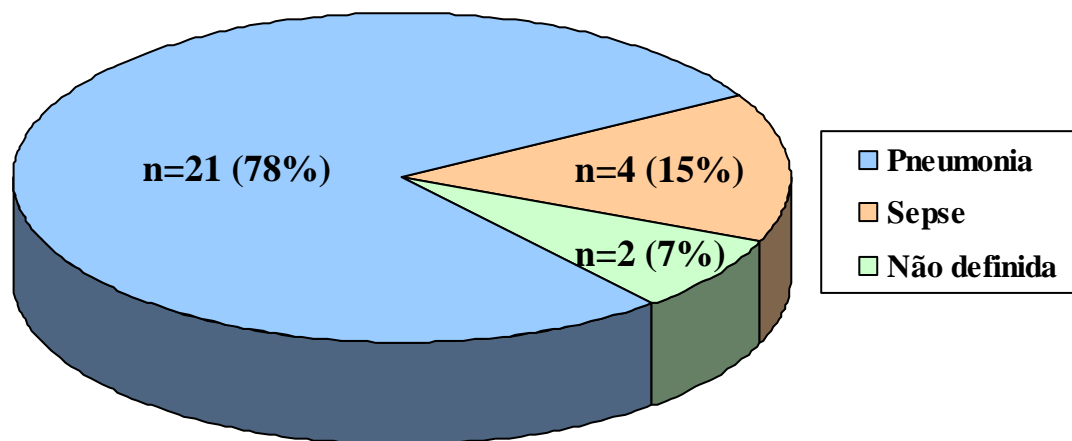


Figura 1 – Topografia da infecção precoce

Na Tabela 7 observa-se que, hemorragia peri-intraventricular ocorreu somente nos prematuros infectados com diferença significativa em relação aos não infectados. Em três recém-nascidos a hemorragia foi classificada como grau III, em um como grau II e em quatro recém-nascidos como grau I. A leucomalácia periventricular foi diagnosticada somente em um recém-nascido do grupo infectado. No grupo infectado a ocorrência de infecção tardia, a necessidade de terapia intensiva e de assistência ventilatória foram significativamente mais frequentes do que nos prematuros não infectados. Os óbitos ocorreram somente no grupo infectado, sendo dois na primeira semana de vida e associados a sepse precoce, e os outros 3 atribuídos à sepse tardia (Anexo 5).

O tempo de internação foi significativamente maior ($p < 0.001$) no grupo infectado com mediana de 15 dias (Q25=9; Q75=24) em comparação ao grupo não infectado cuja mediana foi de 6 dias (Q25=4; Q75=8).

Tabela 7 – Morbidade, mortalidade e procedimentos nos recém-nascidos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce

Morbi-mortalidade Procedimentos		Total n=55	Infectado n=27	Não Infectado n=28	Estatística Valor de p
SDR	n (%)	7 (12.7)	5 (18.5)	2 (7.1)	0.252 [‡]
PCA	n (%)	9 (16.4)	7 (25.9)	2 (7.1)	0.078 [‡]
HPIV	n (%)	8/40 (20)	8/24 (33.3)	0/16 (0)	0.013 [‡]
Infecção tardia	n (%)	9 (22.5)	8 (29.6)	1 (3.6)	0.012 [‡]
DBP	n (%)	3 (5.5)	3 (11.1)	0 (0)	0.111 [‡]
Necessidade UTI	n (%)	27 (49.1)	22 (81.5)	5 (17.9)	<0.001 [†]
CPAP nasal	n (%)	20 (36.4)	15 (55.6)	5 (17.9)	0.009 [†]
VM	n (%)	13 (23.6)	12 (38.7)	1 (3.6)	0.003 [†]
Óbito na hospitalização	n (%)	5 (9.1)	5 (18.5)	0 (0)	0.023 [‡]

SDR= síndrome do desconforto respiratório; PCA= persistência do canal arterial; HPIV= hemorragia periintraventricular; DBP= displasia bronco-pulmonar; UTI= unidade de terapia intensiva; CPAP= pressão positiva contínua em vias aéreas; VM= ventilação mecânica.

†Qui-quadrado ‡Fisher

3. Valores de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatória em sangue de cordão umbilical

Houve grande variação nos valores de IL-8 (pró-inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória).

Como se observa na Tabela 8 e Figuras 2, 3 e 4, não houve diferença significativa nos valores de TNF- α e IL-10 entre os grupos. Os valores de IL-8 foram significativamente maiores nos prematuros infectados.

Tabela 8. Valores de citocinas (pg/ml) no sangue de cordão umbilical dos prematuros segundo a ocorrência de infecção precoce

Citocinas		Total n=55	Infectado n=27	Não Infectado n=28	Estatística Valor de p
TNF-α (pg/ml)	Md	2.32	3.67	1.76	0.084 [§]
	(Q25; Q75)	(0.92; 4.41)	(1.20; 7.33)	(0.63; 3.70)	
	mín – máx	0 – 76.88	0 – 76.88	0 – 35.00	
IL-8	Md	34.11	136.47	15.84	<0.001 [§]
	(Q25; Q75)	(13.63; 136.47)	(36.85; 163.01)	(9.10; 33.13)	
	mín – máx	0.95 – 330.06	4.10 – 330.06	0.95 – 118.82	
IL-10	Md	0.89	0	4.10	0.291 [§]
	(Q25; Q75)	(0; 101.13)	(0; 67.42)	(0; 138.48)	
	mín – máx	0 – 891.22	0 – 618.23	0 – 891.22	

§Mann-Whitney

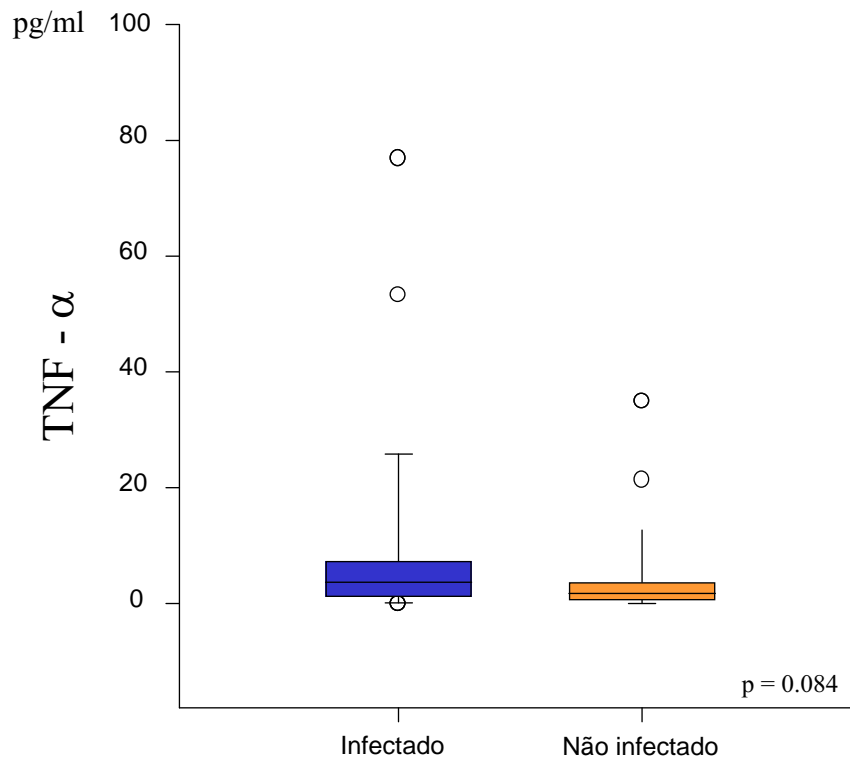


Figura 2 - Valores de TNF- α (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infetado e Não Infetado

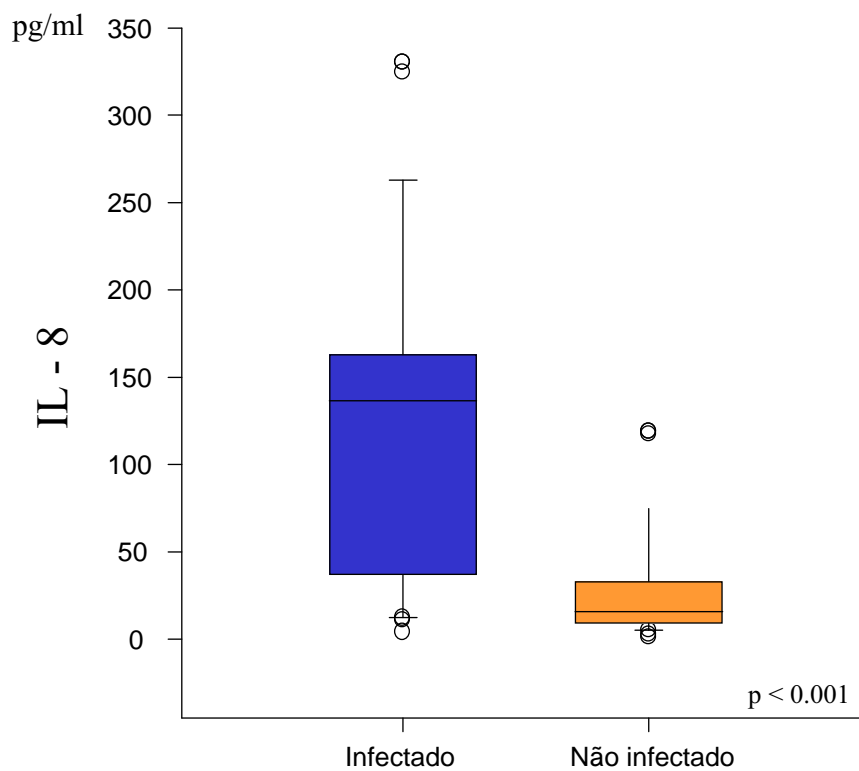


Figura 3 - Valores de IL-8 (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infetado e Não Infetado

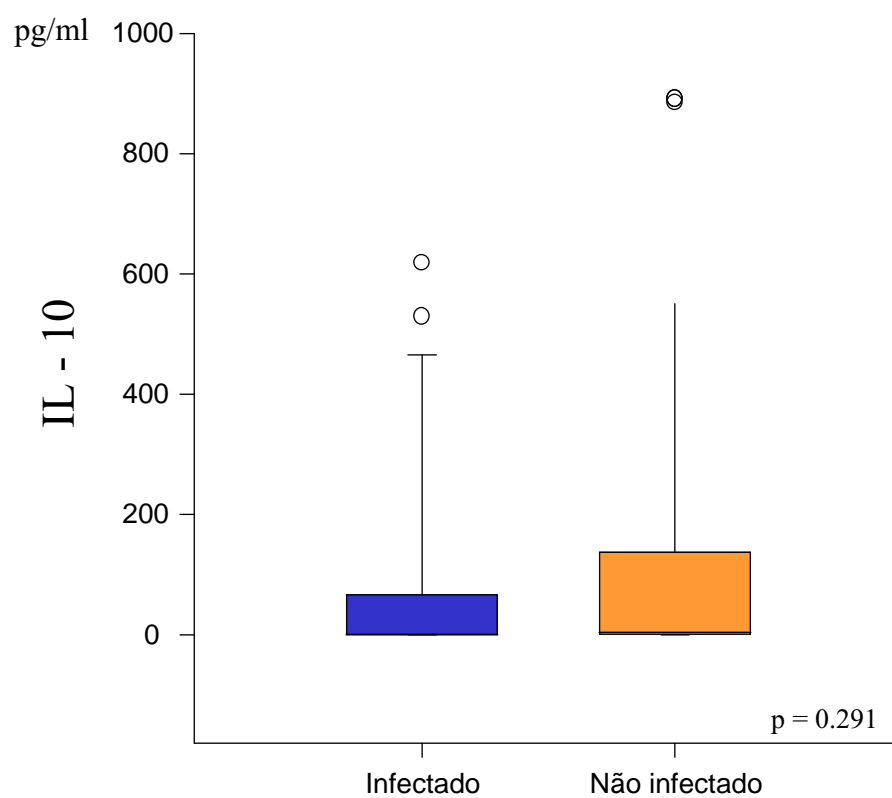


Figura 4 - Valores de IL-10 (pg/ml) em sangue de cordão nos grupos: Infectado e Não Infectado

A acurácia das citocinas em prever a infecção foi investigada somente para IL-8, a única que apresentou valores significativamente diferentes entre os recém-nascidos infectados e não infectados (Figura 5).

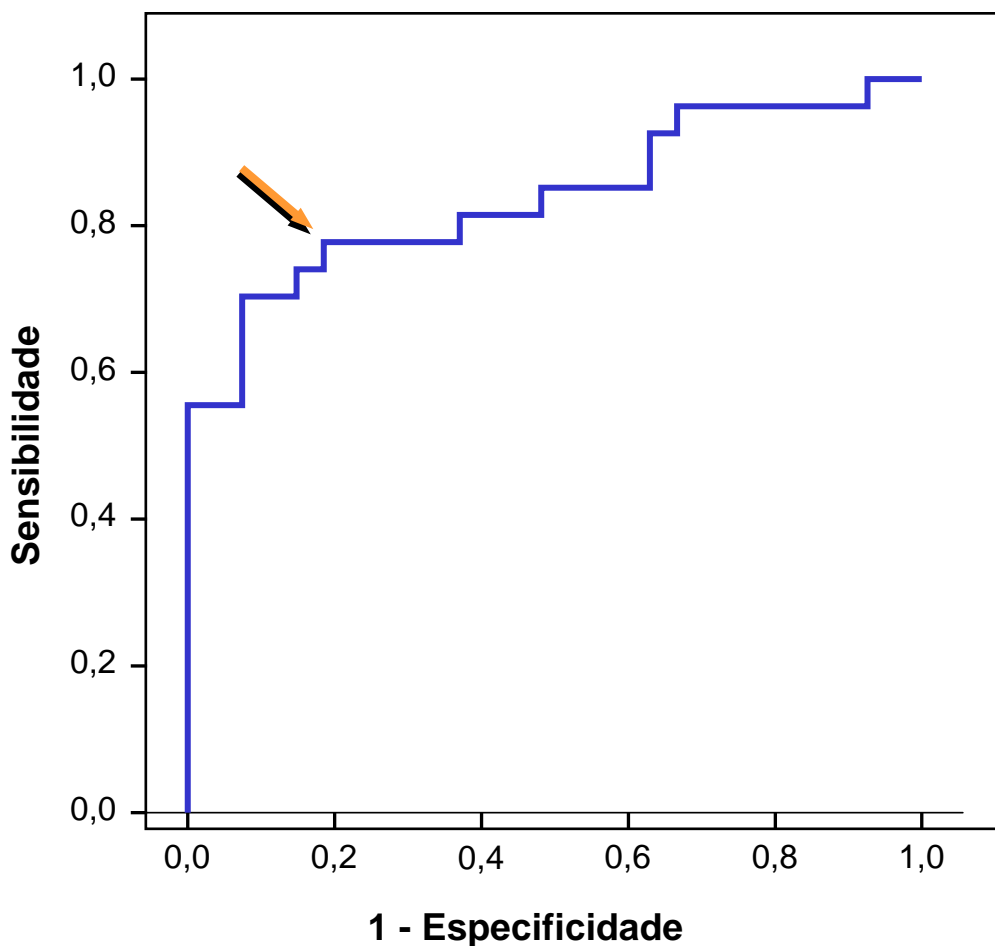


Figura 5 - Curva ROC dos valores de IL-8 no sangue de cordão umbilical

O ponto de inflexão apontado pela seta na Figura 5 correspondeu ao valor de 35 pg/ml, identificado pela curva ROC como ponto de corte ótimo da IL-8 em sangue de cordão umbilical.

A curva ROC para os valores de IL-8 mostrou área sob a curva de 0,84 com erro padrão de 0,06 e intervalo de confiança a 95% de 0,73 a 0,95. Calculou-se então, a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a acurácia da IL-8 que estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da IL-8 em seu respectivo ponto de corte: valores percentuais e intervalo de confiança (IC) a 95%

	IL-8 35 pg/ml
Sensibilidade % (IC a 95%)	78 (67; 89)
Especificidade % (IC a 95%)	82 (72; 92)
VPP % (IC a 95%)	66 (54; 79)
VPN % (IC a 95%)	89 (81; 97)
Acurácia %	84

Dentre as variáveis perinatais que potencialmente poderiam influenciar os valores séricos de citocinas ao nascimento houve interesse em investigar, por meio de modelos de regressão linear simples e múltipla, o efeito do tempo de rotura de membranas, do uso de corticóide antenatal, da corioamnionite clínica, da corioaminonite histológica/funisite, do sofrimento fetal, do tipo de parto, da idade gestacional e do peso de nascimento, nos níveis de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical. Porém, na análise inicial da adequação do modelo estatístico, os pressupostos de normalidade dos resíduos das variáveis dependentes não foram satisfeitos, mesmo após as tentativas de transformações logarítmicas e de raiz quadrada, entre outras. Assim, a investigação da influência das variáveis perinatais nos valores das citocinas foi realizada pelos testes de Mann-Whitney para as variáveis categóricas e correlação de Spearman para as variáveis numéricas (Tabela 10 e Figuras 6, 7 e 8).

Tabela 10 - Valores de TNF, IL-8 e IL-10 (pg/ml) conforme a presença ou não de corticóide antenatal, sofrimento fetal, corioamnionite clínica, corioamnionite histológica/funisite e parto cesáreo

Fatores perinatais		TNF- α	IL-8	IL-10
		Md (Q25;Q75)	Md (Q25;Q75)	Md (Q25;Q75)
CEAN	presente n=35	2.85 (1.18; 6.06)	41.07 (13.94;149.21)	0 (0; 159.64)
	ausente n=20	1.43 (0.56; 3.60)	26.23 (12.84; 99.90)	12.31 (0; 84.89)
	p	0.090 [§]	0.425 [§]	0.707 [§]
SF	presente n=17	3.76 (2.58; 9.52)	104.58 (15.99; 170.75)	7.82 (0; 448.48)
	ausente n=38	1.84 (0.63; 4.24)	31.89 (11.11; 105.02)	0 (0; 79.84)
	p	0.023 [§]	0.090 [§]	0.275 [§]
CA clínica	presente n=13	3.85 (2.85; 7.95)	147.91 (19.36; 170.75)	0 (0; 0)
	ausente n=42	1.87 (0.77; 4.24)	26.23 (11.95; 107.82)	5,43 (0; 104.63)
	p	0.046 [§]	0.085 [§]	0.101 [§]
CA histológica/ Funisite	presente n=20	2.89 (1.30;4.96)	154.10 (118.18; 205.23)	0 (0; 0)
	ausente n=28	2.58 (0.96; 5.32)	15.14 (9.29; 29.06)	0.89 (0; 163.33)
	p	0.794 [§]	<0.001 [§]	0.185 [§]
Cesárea	presente n=21	3.05 (1.05; 5.28)	35.44 (14.08; 159.63)	0 (0; 59.53)
	ausente n=34	2.01 (0.63; 4.42)	33.55 (13.00; 130.82)	3.05 (0; 138.48)
	p	0.411 [§]	0.887 [§]	0.492 [§]

CEAN= corticóide antenatal; SF= sofrimento fetal; CA= corioamnionite.

§Mann-Whitney

A Tabela 10 mostra que, corticóide antenatal e tipo de parto não se associam com os valores de citocinas, enquanto que sofrimento fetal e corioamnionite clínica associaram-se com aumento do TNF- α . Houve também associação entre corioamnionite histológica e funisite com maiores valores de IL-8.

As variáveis, tempo de rotura de membranas, idade gestacional e peso de nascimento foram correlacionadas com os valores de TNF- α , IL-8 e IL-10. Não houve correlação entre tempo de rotura de membranas e os valores das citocinas. O peso de nascimento teve fraca correlação negativa com TNF- α e IL-8 (Figuras 6 e 7) e a idade gestacional correlacionou-se fraca e negativamente com IL-8 (Figura 8).

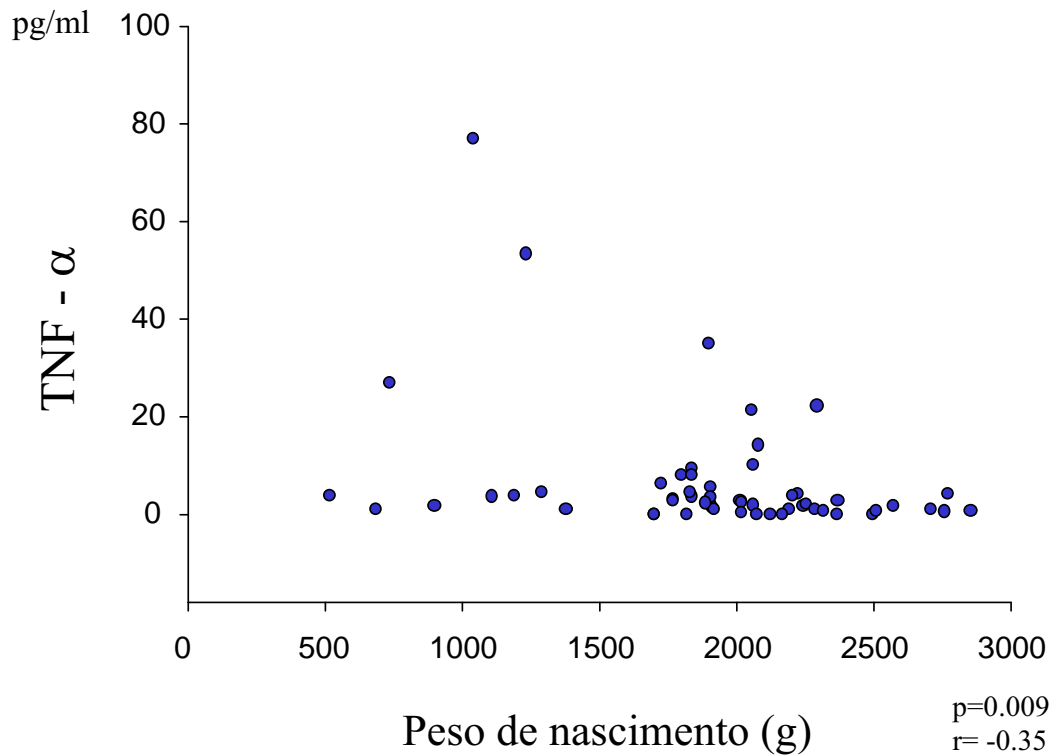


Figura 6 – Correlação (r) entre os valores de TNF- α (pg ml) e peso de nascimento (g)

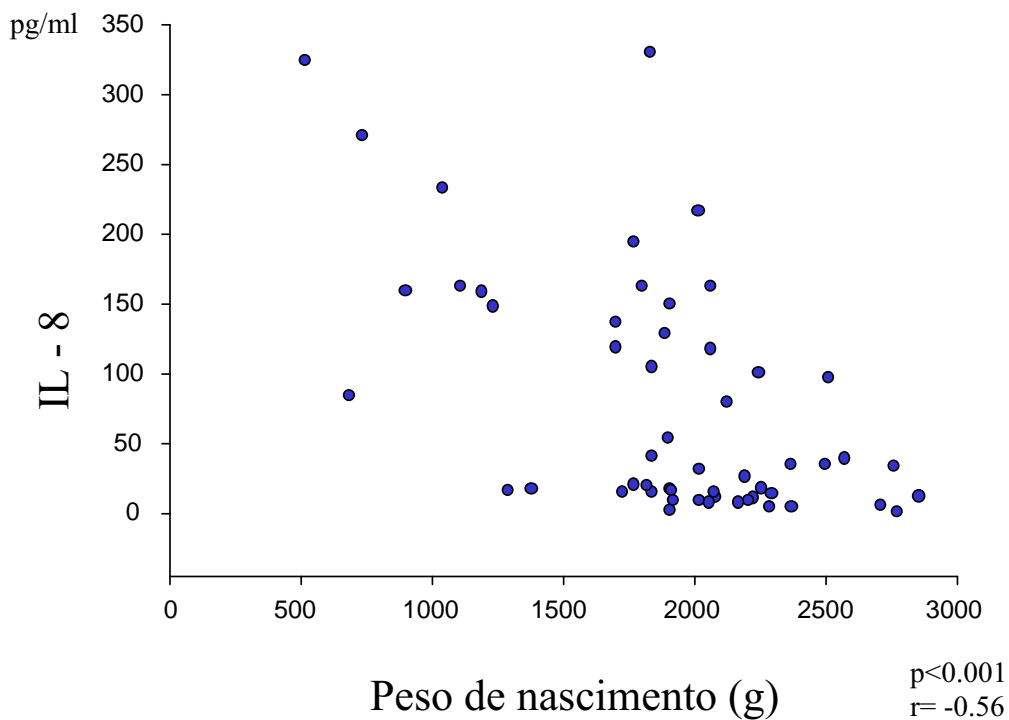


Figura 7 - Correlação (r) entre os valores de IL-8 (pg/ml) e peso de nascimento (g)

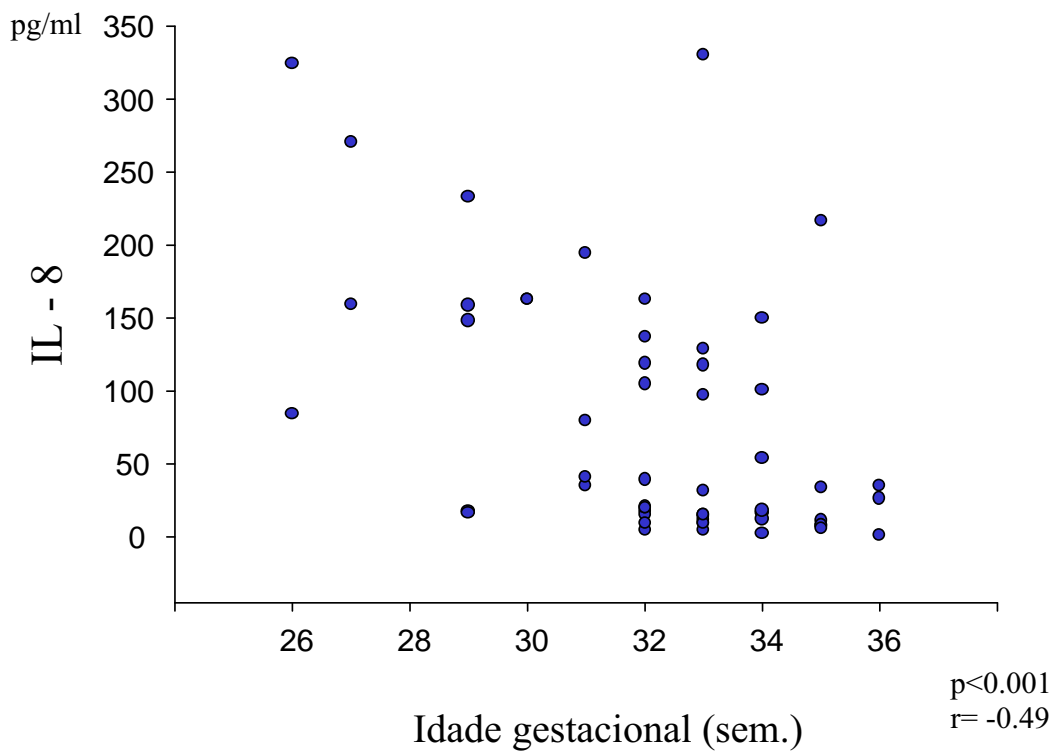


Figura 8 - Correlação (r) entre os valores de IL-8 (pg/ml) e idade gestacional (sem.)

Foi investigada a associação dos valores das citocinas com a morbidade neonatal (Tabela 11). Valores aumentados de TNF- α e IL-8 associaram-se com displasia bronco-pulmonar, enquanto que, menores valores de IL-10 tiveram associação com síndrome do desconforto respiratório e persistência de canal arterial.

Tabela 11 - Valores de citocinas conforme a presença ou não de doenças neonatais

Doenças neonatais		TNF- α	IL-8	IL-10
		Md (Q25; Q75)	Md (Q25; Q75)	Md (Q25; Q75)
SDR	presente n=7	3.85 (1.30; 7.06)	84.38 (23.66; 232.04)	0 (0; 0)
	ausente n=48	2.29 (0.78; 4.34)	31.89 (11.40; 134.59)	5.43 (0; 117.31)
	p	0.331 [§]	0.157 [§]	0.021[§]
PCA	presente n=9	4.38(1.62; 19.30)	84.38 (34.91; 159.86)	0 (0; 0.18)
	ausente n=46	2.22 (0.78; 4.24)	26.23 (11.11; 121.35)	7.82 (0; 149.06)
	p	0.139 [§]	0.099 [§]	0.028[§]
HPIV	presente n=8	3.56 (0.84; 13.28)	116.78 (50.40; 182.27)	0 (0; 13.03)
	ausente n=32	2.59 (0.96; 4.87)	41.07 (15.00; 144.47)	0.89 (0; 78.15)
	p	0.685 [§]	0.244 [§]	0.258 [§]
DPB	presente n=3	53.32 (16.15; 70.99)	158.55 (150.57; 214.52)	5.85 (1.46; 79.94)
	ausente n=52	2.22 (0.85; 4.33)	31.89 (12.58; 118.50)	0.70 (0; 102.55)
	p	0.025[§]	0.041[§]	0.906 [§]

SDR= síndrome do desconforto respiratório; PCA= persistência de canal arterial; HPIV= hemorragia periintra-ventricular; DBP= displasia bronco-pulmonar.

§ Mann-Whitney

Discussão

1. Características maternas e gestacionais

Dentre os dados maternos e gestacionais avaliados para caracterizar os grupos estudados, houve diferença significativa apenas na incidência de corioamnionite clínica e corioamnionite histológica que foram muito frequentes no grupo infectado (40,7% e 66,7% respectivamente) em comparação ao não infectado, no qual o percentual de corioamnionite foi inferior a 10%. O diagnóstico de funisite foi menos frequente e a diferença entre os grupos não alcançou significância estatística (25% no grupo infectado e 12,5% no não infectado). Esses resultados mostram quão importante é o intercâmbio de informações entre obstetras e neonatologistas, possibilitando a obtenção de dados relevantes como por exemplo, a presença de corioamnionite clínica; e alertam também para a importância do exame anátomo-patológico da placenta na RPM, procedimento factível na maioria dos Serviços, de baixo custo, que pode trazer informações valiosas na predição do risco neonatal, relacionado à corioamnionite histológica e principalmente na presença de funisite, que traduz a resposta inflamatória fetal.

Na literatura, vários estudos mostram que a corioamnionite histológica é frequente em nascimentos de pré-termo, detectada em cerca de 1/3 dos casos, independente da presença de RPM-PT. Sua ocorrência é inversamente proporcional à idade gestacional e está nitidamente associada com pior prognóstico neonatal, especificamente relacionado com lesão pulmonar e neurológica (Ogunyemi et al., 2003; Lahra & Jeffery, 2004; Lau et al., 2005; Lee et al., 2006; Murthy e Kennea, 2007).

Na RPM-PT a incidência de corioamnionite histológica é ainda mais elevada, atingindo cifras superiores a 50%, e a funisite descrita em até 40% dos casos (Lee et al., 2007).

No estudo de Lau et al. (2005) com ampla casuística de recém-nascidos de UTI neonatal, com idade gestacional média de 33 semanas, foi detectada ocorrência de 31 % de corioamnionite histológica, sendo esta, em mais da metade dos casos associada com funisite. A presença de funisite aumentou o risco de infecção precoce, SDR, necessidade de ventilação mecânica e oxigenoterapia, DPB, HPIV grave.

A corioamnionite clínica além de ser fator clássico de risco infeccioso, também tem influência negativa no prognóstico neonatal.

Morales (1987) estudou uma coorte de 698 prematuros e documentou nas gestações complicadas por corioamnionite clínica incidência significativamente maior de sepsis precoce (28 % vs 11%) e de outras morbidades incluindo SDR e HPIV. A mortalidade

neonatal foi elevada nos casos de corioamnionite, entretanto não houve diferença no desenvolvimento mental e psicomotor com um ano de idade corrigida. No estudo de Alexander et al (1998) a corioamnionite clínica foi fator independente de risco para sepse, SDR, hemorragia peri-intraventricular grave, leucomalácia periventricular e convulsões, em prematuros de muito baixo peso.

Ramsey et al. (2005) avaliaram 430 casos de RPM-PT dos quais 13% apresentaram corioamnionite clínica. Resultados neonatais adversos, incluindo quadros infecciosos como sepse confirmada, meningite, pneumonia, foram significativamente mais frequentes na presença de corioamnionite (55,4% vs 18,2%).

Quanto à influência do tempo de rotura de membranas no desfecho da gestação, em especial no risco infeccioso neonatal, alguns aspectos são destacados no enfoque obstétrico, como o tempo de 24 horas que define a rotura como prolongada, e a conduta expectante na RPM-PT entre 24 e 33 semanas completas de idade gestacional, visando prolongar o período de latência para diminuir os riscos da prematuridade. Entretanto, estudo recente mostrou que a latência prolongada, definida como maior que 48 horas só foi benéfica em gestações com menos que 30 semanas, após essa idade gestacional a mortalidade foi menor quando o nascimento ocorreu em menos que 48 horas de rotura das membranas (Pasquier et al, 2007). É preocupante a constatação que o risco de infecção materna e neonatal tem relação inversa com a idade gestacional e direta com o período de latência (Merenstein & Weisman, 1996; Rocha et al., 2002).

Em geral, a atenção do neonatologista está voltada para a rotura de membranas com duração de 18 horas ou mais, por ser esse um dos critérios de risco para a infecção precoce pelo estreptococo do grupo B, classicamente proposto nos Guidelines do CDC (CDC-2002). Entretanto deve ser considerado que esses guidelines não são específicos para a RPM-PT, e visam a ampla prevenção da infecção pelo estreptococo do grupo B em toda situação de risco, focalizando a investigação da colonização materna entre 35-37 semanas de idade gestacional (CDC, 2002).

O limite mínimo de tempo de rotura prematura de membranas, para a ocorrência de repercussões materno-fetais, bem como o tempo ideal para o nascimento visando otimizar a saúde materna e fetal são questões importantes que ainda não estão perfeitamente esclarecidas. Neste estudo, coerente com o protocolo de conduta obstétrica do Serviço, que propõe conduta expectante para a RPM-PT, em gestações com menos de 34 semanas, o tempo de bolsa rota foi muito variável, com valores medianos prolongados e sem

diferença entre os grupos: infectado e não infectado. A estratificação do tempo de rotura em faixas de horas confirmou a preocupação existente com a latência prolongada, pois a RPM-PT com duração superior a 48 horas foi significativamente mais frequente no grupo infectado do que no grupo não infectado (63% versus 32,1%), enquanto que os diferentes períodos de latência menores que 48 horas não se associaram com infecção neonatal.

2. Características dos recém-nascidos

A presença de infecção intra-uterina na RPM-PT pode comprometer o bem-estar fetal motivando a indicação do nascimento e, além disso, frequentemente se associa com o desencadeamento do trabalho de parto (Greig, 1998). Assim sendo, os prematuros infectados tiveram menor idade gestacional e peso ao nascer comparados aos não infectados, o que está de acordo com a literatura, que descreve estas variáveis como importantes fatores de risco para infecção tanto precoce como tardia (Martius et al., 1999; Stoll & Hansen, 2003; Silva, 2007).

Neste estudo não foi documentada maior frequência de sofrimento fetal e de depressão neonatal no grupo infectado, entretanto, a necessidade de reanimação em sala de parto foi frequente neste grupo e a intubação traqueal significativamente mais frequente, sugerindo que os prematuros infectados apresentam piores condições de vitalidade ao nascimento.

Desconforto respiratório em sala de parto, avaliado pelo boletim de Silverman-Andersen (BSA) esteve presente em todos os prematuros infectados e foi mais intenso do que no grupo não infectado, no qual sete prematuros não mostraram sinais de desconforto respiratório; o que alerta para maior acometimento pulmonar no grupo infectado. Em se tratando de prematuros, não se pode afirmar inicialmente que essa sintomatologia seja decorrente da infecção, principalmente por ser o grupo infectado mais imaturo e conseqüentemente com maior risco de SDR, entretanto a evolução clínica e as avaliações hematológica e radiológica confirmaram o diagnóstico de pneumonia na maioria dos casos.

Dentre os parâmetros avaliados no hemograma, os neutrófilos merecem especial atenção, por sua importante participação na resposta inflamatória inicial. Alterações qualitativas e quantitativas dos neutrófilos são associadas a quadros infecciosos, valorizando-se a neutropenia associada ao aumento das formas jovens, o que indica destruição ou uso acelerado dos neutrófilos, como sinal sugestivo de sepse (Christensen et al, 2000). No presente estudo, os prematuros infectados não apresentaram neutropenia,

porém os neutrófilos imaturos e os índices neutrofilicos foram significativamente aumentados em comparação ao grupo não infectado.

A PCR mostrou-se útil, mas há que se considerar que foi avaliada de forma seriada e valorizado no estudo o maior obtido nas primeiras 24 horas de investigação do quadro infeccioso, conforme padronizado no Serviço (Bentlin & Rugolo, 2006).

A avaliação isolada do hemograma e da PCR não é suficientemente sensível para o diagnóstico precoce de infecção neonatal (Mishra et al, 2006), o que se confirmou neste estudo, pois nem todos os prematuros infectados tiveram escore de Rodwell maior ou igual a 3 e PCR > 1mg/dl. Entretanto vale ressaltar que todos os pacientes tiveram manifestações clínicas sugestivas de infecção e pelo menos um dos exames laboratoriais alterados. Estudo prévio neste Serviço mostrou que mesmo nos casos de sepse precoce confirmada a PCR foi negativa em torno de 60% dos recém-nascidos (Silva, 2007).

Um aspecto importante evidenciado nessa amostra estudada foi o rigor na investigação do agente infeccioso, que constitui o padrão ouro na confirmação diagnóstica. Conforme padronizado no Serviço, na situação de risco infeccioso associado à RMP-PT em gestações com menos que 35 semanas e nos recém-nascidos sintomáticos, independente da idade gestacional (características essas presentes na amostra estudada), procede-se a investigação completa de infecção; por esse motivo foram obtidas culturas de sangue em quase todos os prematuros estudados, e líquido na maioria do grupo infectado. Nenhum agente foi identificado nessas culturas, o que é compatível com os dados de literatura, que mostram baixo percentual de positividade da hemocultura na sepse precoce, com valores estáveis entre 1 e 2% (Stoll & Hansen, 2003; Silva, 2007). O número amostral desse estudo, o fato da maioria dos recém-nascidos infectados apresentar foco pulmonar e também o uso de antibiótico intra-parto em 30% das gestantes, podem justificar porque nenhuma cultura resultou positiva.

A ocorrência de síndrome do desconforto respiratório (SDR) foi baixa nessa amostra estudada, o que provavelmente se deve ao uso frequente de corticóide antenatal, já que, sua incidência não diferiu entre os prematuros com e sem infecção. Estudos prévios sobre a relação entre infecção intra-uterina e SDR mostram resultados contraditórios, desde pouca alteração, aumento e até diminuição na incidência dessa doença (Alexander et al, 1998; Elimian et al., 2000; Holcroft et al., 2004; Richardson et al, 2006). A diminuição da SDR pode ser devida à ação das citocinas inflamatórias em induzir a síntese de surfactante.

Porém, esse aparente benefício do processo inflamatório intrauterino é sobrepujado pelo efeito deletério dos mediadores inflamatórios que alteram o desenvolvimento alveolar e vascular pulmonar, aumentando o risco de displasia broncopulmonar (Watterberg et al., 1996; Speer, 2003).

Os prematuros infectados tiveram pior evolução neonatal, apresentando maior morbidade, necessidade de assistência ventilatória e de UTI. Hemorragia periventricular foi detectada somente nesse grupo, o que é compreensível pois essa patologia é multifatorial e nos prematuros infectados concentraram-se os fatores de risco: maior grau de prematuridade, pacientes mais graves e o próprio efeito da infecção/inflamação. Lau et al. (2005) mostraram aumento de 2,4 vezes no risco de HPIV grave em prematuros quando a inflamação fetal estava presente.

A infecção neonatal tardia, também foi mais frequente nos prematuros que tiveram infecção precoce. Essa complicação era esperada, uma vez que esses pacientes eram mais imaturos, receberam assistência mais invasiva e antibioticoterapia prévia, aspectos esses que constituem os principais fatores de risco para infecção tardia (Stoll et al, 2002; Bentlin, 2003; Silva, 2007).

A mortalidade foi alta e ocorreu somente no grupo infectado. Deve-se considerar que todos os óbitos foram de prematuros extremos, com idade gestacional entre 26 e 29 semanas e a causa terminal foi sepse, sendo 2 casos de sepse precoce e 3 de tardia. Em amplo estudo epidemiológico realizado no Serviço, sobre a morbimortalidade de prematuros de muito baixo peso no período de 1995 a 2000, documentou-se que a sepse precoce e tardia foram os principais fatores de risco para óbito, aumentando mais que 10 vezes a chance de óbito nesses prematuros (Prigenzi et al, 2008).

3. Citocinas como marcadores diagnósticos de infecção precoce

Dentre as 3 citocinas investigadas em sangue de cordão umbilical como marcadores de infecção precoce na RPM-PT, apenas a IL-8 mostrou-se útil.

As concentrações de TNF- α não diferiram entre os grupos, o que pode ser entendido, considerando-se que o aumento desta citocina está associado com infecções sistêmicas graves com disfunção cardiopulmonar e/ou choque (Girardin et al.,1990; Shalak et al, 2002) e no presente estudo, o grupo infectado apresentou predominantemente quadro

infeccioso localizado, com foco pulmonar e sem comprometimento sistêmico. Outro aspecto que pode ter contribuído para esse resultado é a baixa capacidade de produção dessa citocina pelos recém-nascidos. Vários autores descrevem produção diminuída de TNF- α por monócitos de sangue de cordão umbilical, em comparação aos monócitos de adultos. (Weatherstone & Rich, 1989; Berner et al., 2002; Hassett et al.; 2006).

O TNF- α como marcador diagnóstico de infecção, mesmo em recém-nascidos com sepse comprovada, apresenta resultados controversos na literatura (Girardin e tal., 1990; Berner et al., 2000; Kashlan et al., 2000; Santana et al, 2001), que podem ser, em parte, explicados pela cinética dessa citocina. O TNF- α é mediador primário na cascata inflamatória, tem vida média curta, com pico de liberação na primeira hora seguido de declínio, atingindo níveis basais a partir de 3 horas após o estímulo antigênico, assim seus valores podem ser muito variáveis em função do momento de avaliação (Abbas & Lichtman, 2005).

Os níveis de IL-10 em sangue de cordão umbilical foram baixos neste estudo e não diferenciaram os prematuros infectados dos não infectados, coerente com os dados de Schultz et al. (2004) que demonstraram “in vitro” que a resposta antiinflamatória é imatura em recém-nascidos. Os autores avaliaram a capacidade de produção de citocinas antiinflamatórias: IL-10 e TGF- β (fator transformador de crescimento) em células de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo sadios e prematuros com idade gestacional entre 25 e 30 semanas; e compararam esses dois grupos de RN com adultos sadios. Após cultivo das células e estímulo com lipopolissacarídeo os níveis de IL-10 não diferiram entre os recém-nascidos de termo e prematuros, mas foram significativamente menores nos prematuros do que nos adultos (269 vs 643 pg/ml; $p=0,02$). Sem estimulação antigênica a IL-10 não pode ser detectada. Foi também avaliada a capacidade da IL-10 em inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α e a inibição de todas essas citocinas foi significativamente menor nos RN prematuros e termos quando comparados aos adultos (Schultz et al., 2004).

No presente estudo os valores medianos de IL-8 em sangue de cordão umbilical foram significativamente maiores nos prematuros infectados do que nos não infectados. Esses achados são concordantes com vários estudos clínicos e experimentais que mostram níveis de IL-8 aumentados na vigência de processo infeccioso ou após estímulo com endotoxinas (Berner et al., 2000; Nupponem et al, 2001; Santana et al., 2001; Schultz et al., 2002; Shalak et al., 2002).

Um aspecto interessante nos resultados da IL-8 foi a maior dispersão dos valores no grupo infectado, o que pode ser devido à presença ou não de corioamnionite histológica, já que, esta condição associou-se significativamente com maiores valores de IL-8 e não estava presente em todos os pacientes desse grupo. A variabilidade na idade gestacional e peso de nascimento também pode ter contribuído, pois essas duas variáveis tiveram correlação negativa com os valores de IL-8.

A acurácia global da IL-8 como teste diagnóstico de infecção precoce avaliada pela área sob a curva ROC foi bastante satisfatória, com valor de 0,84 (IC a 95% de 0,73 a 0,95), semelhante ao estudo de Dollner et al. (2001b) que mostrou acurácia de 0,87 (IC a 95% de 0,66 a 0,97). Estes autores avaliaram os níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical como marcadores de infecção precoce em recém-nascidos de termo e prematuros, independente da presença de rotura prematura de membranas. Foram constituídos 3 grupos: 52 RN infectados (31% com rotura prolongada de membranas); 33 RN com doenças não infecciosas (27% com rotura prolongada de membranas) e 99 RN sadios sem amniorrexe prematura (controle). Os valores de TNF- α , IL-1 β , IL-6 IL-8, receptores de TNF e IL-1ra foram significativamente aumentados nos recém-nascidos infectados e naqueles com doenças não infecciosas, quando comparados ao grupo controle. A estratificação dos recém-nascidos em prematuros e termos, mostrou aumento das citocinas apenas nos prematuros, sugerindo que a infecção intra-uterina pode ter sido a causa desses nascimentos prematuros, enquanto que os recém-nascidos de termo infectados podem ter adquirido a infecção durante a passagem no canal de parto. O ponto de corte na curva ROC para a IL-8 foi de 50,7 pg/ml com sensibilidade de 81% e especificidade de 77%.

No presente estudo, o ponto de corte para obtenção da melhor sensibilidade e especificidade foi de 35 pg/ml. Com esse valor obteve-se sensibilidade e especificidade em torno de 80%, o que permite considerar a IL-8 como bom teste diagnóstico de infecção precoce. Adicionalmente, foram calculados os valores preditivos cujos resultados mostraram que a maior utilidade desse teste relacionou-se com seu alto valor preditivo negativo, ou seja, valores de IL-8 < 35 pg/ml auxiliaram a excluir a presença de infecção em 89% dos prematuros com RPM-PT, o que tem grande aplicabilidade clínica, considerando-se que a situação de risco infeccioso na RPM-PT, principalmente se associada à corioamnionite, é indicação para o início de antibioticoterapia, devendo a mesma ser suspensa no caso de não confirmação da infecção. Entretanto, na prática clínica é sempre mais fácil iniciar do que suspender o uso de antibióticos e nesse sentido a IL-8 < 35 pg/ml auxiliaria na retirada do antibiótico.

Na literatura há grande variabilidade nos valores de ponto de corte da IL-8 para diagnóstico de infecção precoce, em função das diferenças na metodologia e casuística dos estudos.

Dentre as várias citocinas avaliadas em sangue de cordão umbilical por Berner et al. (1998) no diagnóstico de sepse precoce, a IL-8 mostrou-se bom marcador. Com ponto de corte de 300pg/ml, os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram de 91%, 93%, 91% e 97% respectivamente. Esse estudo envolveu recém-nascidos de termo e prematuros com suspeita de infecção até 96 horas de vida que foram classificados em 2 grupos: infecção confirmada e infecção possível. Um terceiro grupo de recém-nascidos de termo sadios foi o controle. Os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 foram significativamente maiores no grupo com infecção confirmada comparado aos outros dois grupos, que não mostraram diferença entre si.

Mehr et al.(2001) avaliaram os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 em 101 RN de termos e prematuros no momento da suspeita de sepse precoce ou tardia. Conforme a evolução dos recém-nascidos foram constituídos 4 grupos: infecção confirmada; infecção provável; infecção possível; e grupo não infectado, no qual a suspeita de infecção foi afastada. Os valores de IL-6 e IL-8 foram significativamente maiores no grupo com infecção confirmada em comparação aos demais. Na curva ROC o ponto de corte ótimo da IL-8 foi 28 pg/ml, com sensibilidade de 82%, especificidade de 81%, valor preditivo positivo de 64% e valor preditivo negativo de 91%, resultados esses muito semelhantes aos obtidos no presente estudo.

No estudo de Santana et al. (2001) a IL-8 de cordão umbilical mostrou-se útil na identificação dos recém-nascidos que apresentaram sepse. Foram estudados recém-nascidos de termo e prematuros, classificados em 3 grupos: sepse, doenças não infecciosas e sadios (controle). Aumento significativo da IL-8 ocorreu somente no grupo séptico. Os níveis de IL-6 foram significativamente maiores nos grupos sepse e doenças não infecciosas em relação ao grupo controle. Os valores de TNF- α não diferiram entre os grupos. Das 3 citocinas, a IL-8 apresentou a melhor acurácia como marcador de infecção, com área sob a curva ROC de 0,79.

4. Citocinas e fatores perinatais

Um aspecto importante na utilidade de um marcador diagnóstico é saber se ele sofre influência de fatores perinatais.

O corticóide antenatal, muito utilizado na amostra estudada, poderia interferir nos valores das citocinas por sua ação antiinflamatória, acarretando menores valores das citocinas inflamatórias em cordão umbilical dos RN, o que não ocorreu no presente estudo. Shimoya et al.(1992) obtiveram valores de IL-8 significativamente diminuídos em sangue de cordão umbilical de prematuros expostos ao corticóide antenatal, sendo esse efeito observado somente naqueles cujas mães receberam corticóide até 5 dias antes do nascimento. Em estudo experimental documentou-se que nas primeiras horas após a administração, o corticóide antenatal tem efeito inibitório na produção de citocinas e na resposta de monócitos de cordão umbilical à endotoxina. Entretanto esse efeito foi transitório e após 7 dias do uso verificou-se aumento na resposta imune das ovelhas prematuras (Kramer et al., 2004).

Citocinas, principalmente as pró-inflamatórias estão envolvidas na fisiologia do trabalho de parto, mas os estudos que compararam recém-nascidos provenientes de parto vaginal versus cesáreo, não evidenciaram efeito do tipo de parto nos níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical (Hata et al., 1996; Jokic et al., 2000). Alguns autores observaram aumento de IL-1 β na cesárea de urgência e no parto induzido por ocitocina (Miller et al., 1990). No presente estudo não houve influência do tipo de parto nos níveis das citocinas avaliadas.

Está bem documentado em estudos clínicos e experimentais que a hipoxia induz produção de citocinas pelo feto e assim, no sofrimento fetal tem sido descrito aumento de diversas citocinas inflamatórias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos não infectados. Entretanto a relação entre o sofrimento fetal e a resposta inflamatória fetal ainda não está completamente esclarecida e os resultados não são uniformes em relação a qual citocina encontra-se aumentada. Em recém-nascidos de termo sem infecção e com sofrimento fetal, Jokic et al (2000) documentaram aumento de IL-6 e IL-8 e diminuição de TNF- α em sangue de cordão. Nos prematuros do presente estudo, o ambiente intra-uterino adverso representado por sofrimento fetal ou pela corioaminonite clínica associou-se com aumento nos níveis de TNF- α . Essas discrepâncias podem ser devido a diferentes situações clínicas nos 2 estudos, incluindo: a idade gestacional, a situação de risco infeccioso, o grau e duração da hipoxia, pois a resposta inflamatória fetal é um processo dinâmico, individual e complexo, modulado em situações de estresse por catecolaminas e pelo estresse oxidativo (Severn et al., 1992; Trindade & Rugolo, 2007).

Considerando que a corioamnionite histológica e a funisite caracterizam-se pela presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, e que a IL-8 tem potente ação

quimiotática, sendo a principal responsável pelo recrutamento de neutrófilos no local da inflamação (Shimoya et al., 1992; Dollner et al., 2002; Holzman et al., 2007), obteve-se neste estudo o resultado esperado, com maiores valores de IL-8 associados a essas duas condições.

Um resultado interessante foi a correlação negativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias com o peso de nascimento e da IL-8 também com a idade gestacional, mostrando que quanto menor o prematuro maior sua atividade inflamatória. Strunk et al. (2004) compararam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos de adultos, de recém-nascidos de termo saudáveis e de fetos com idade gestacional entre 21 e 32 semanas. Os monócitos dos RN de termo e dos fetos foram obtidos de sangue de cordão umbilical. Após estimulação com endotoxina, a produção de TNF- α e IL-6 foi significativamente menor nos fetos do que nos adultos e RN a termo, porém a produção fetal de IL-8 foi semelhante à dos RN de termo e significativamente maior do que nos adultos. Esses resultados sugerem que a capacidade de produção de IL-8 durante a gestação é mais precoce do que a do TNF- α e IL-6. Os autores alertam para a importância da participação das citocinas pró-inflamatórias na patogênese das doenças neonatais mesmo nos recém-nascidos imaturos.

Esse aspecto foi bem evidenciado no presente estudo que mostrou associação das 3 citocinas avaliadas em sangue de cordão umbilical com a morbidade não infecciosa dos prematuros.

5. Citocinas e morbidade não infecciosa

A análise da evolução neonatal dos prematuros estudados alerta para a importância da IL-10 na regulação da resposta inflamatória, pois os prematuros que tiveram valores muito baixos ou não detectáveis de IL-10 em sangue de cordão umbilical, evoluíram com duas das principais doenças dos prematuros: PCA e SDR.

A maior ocorrência de PCA pode estar relacionada à deficiência da IL-10. A falta do potente efeito biológico dessa citocina em inibir a produção de citocinas inflamatórias e outros mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, propiciaria exposição do tecido ductal à ação das citocinas pró-inflamatórias e de prostaglandinas vasodilatadoras, favorecendo a persistência do canal arterial. Conforme documentado por Niiro et al (1997), a IL-10 inibe a produção de prostaglandina E2, que é a mais potente prostaglandina vasodilatadora do canal arterial. Gonzalez et al. (1996) investigaram a influência da

infecção na persistência do canal arterial e documentaram níveis aumentados de prostaglandinas e TNF- α nos prematuros infectados e com PCA.

A IL-8 é considerada o fator quimiotático mais importante encontrado nos pulmões, e sua ação em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, está diretamente envolvida nas lesões teciduais pulmonares de recém-nascidos prematuros com SDR e displasia broncopulmonar. Nesses recém-nascidos altas concentrações dessas citocinas têm sido detectadas em secreções bronco-alveolares. A atividade quimiotática exercida pela IL-8 é responsável, em parte, pela expressão das moléculas de adesão intercelular e selectinas, bem como pela migração de células inflamatórias para dentro das vias aéreas e tecidos pulmonares (Speer and Groneck, 1998).

Concentrações aumentadas de TNF- α em líquido amniótico são associadas com a ocorrência de SDR, sendo sugerido que o TNF- α altera a integridade alveolar dos pulmões imaturos. Hitti et al. (1997) estudaram 136 prematuros entre 22 e 34 semanas, dos quais 67 evoluíram com SDR. Ao avaliar os fatores de risco para a SDR controlando-se os fatores de confusão, verificou-se associação entre níveis elevados de TNF- α (>30 pg/ml) em líquido amniótico com SDR e também com tempo mais prolongado de ventilação assistida e de oxigenoterapia.

A produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-8 é parcialmente regulada pela citocina antiinflamatória IL-10 e conforme documentado por Jones et al. (1996) em prematuros menores que 32 semanas de idade gestacional, com insuficiência respiratória aguda e intubados nas primeiras 12 horas de vida, a IL-10 foi indetectável em lavado bronco-alveolar durante os primeiros 4 dias de vida, enquanto que os níveis de IL-8 foram elevados e permaneceram estáveis até 96 horas. TNF- α também foi detectado na secreção bronco-alveolar, porém os níveis não foram tão elevados quanto os da IL-8. Os autores propuseram que a incapacidade de regulação inflamatória devido à deficiência na produção de IL-10 pelos prematuros, durante os estágios precoces da inflamação pulmonar, é um possível mecanismo para o desenvolvimento de displasia broncopulmonar em prematuros com SDR.

No presente estudo, em que os prematuros foram expostos ao processo inflamatório associado à RPM, ficou bem evidenciado que o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias está envolvido na patogênese da lesão pulmonar aguda e crônica. Os níveis de IL-10 diferiram significativamente entre os prematuros com e sem SDR. Nos que apresentaram a doença, a IL-10 não foi detectada em sangue de cordão umbilical

propiciando que esses pacientes fossem mais susceptíveis à ação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-8), cujos níveis em sangue de cordão foram mais elevados, embora sem significância estatística, quando comparados aos prematuros sem SDR. Os prematuros que evoluíram com displasia broncopulmonar apresentaram níveis significativamente aumentados de TNF- α e IL-8 em sangue de cordão umbilical, traduzindo a maior intensidade do agravo inflamatório envolvido na gênese dessa doença crônica.

Inflamação é um evento fundamental na patogênese da displasia broncopulmonar, sendo sua ação deletéria atribuída às altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8) e baixa concentração de IL-10, a qual poderia inibir a liberação da IL-8, considerada a principal citocina envolvida e descrita como preditor precoce de displasia broncopulmonar. (Huang et al, 2005; Davidson et al., 2007).

Huang et al. (2005) avaliaram de forma seriada IL-8, IL-10 e TNF- α em secreção bronco-alveolar e sangue periférico de prematuros e relacionaram os níveis dessas citocinas com o risco de displasia broncopulmonar. A IL-8 no lavado bronco-alveolar do 1º dia de vida teve correlação negativa com a idade gestacional. Nos prematuros que evoluíram com DBP os níveis de IL-8 no lavado bronco-alveolar foram significativamente elevados no 1º dia de vida e aumentaram progressivamente na primeira semana; os níveis séricos da IL-8 foram elevados nas primeiras 3 semanas de vida, embora sem diferença significativa em relação aos prematuros sem displasia. Os valores de TNF- α e IL-10 não diferiram entre os grupos e nem se correlacionaram com a idade gestacional.

An et al. (2004) investigaram várias citocinas em sangue de cordão umbilical como marcadores da ocorrência de displasia broncopulmonar em prematuros. Ao comparar os prematuros com e sem displasia, houve diferença significativa nos níveis de IL-8, IL-6 e receptor solúvel de TNF-I (sTNFR-I). Apesar dos níveis de TNF- α não diferirem entre os grupos, os autores propuseram que os níveis aumentados do receptor de TNF poderiam refletir aumento prévio de TNF- α , uma vez que níveis de sTNFR e TNF- α são correlacionados. A IL-10 não foi detectável nesses recém-nascidos. Segundo os autores a homeostase entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias poderia estar desbalanceada propiciando persistente reação inflamatória nesses prematuros e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças tais como a displasia broncopulmonar.

A associação de citocinas pró-inflamatórias e hemorragia peri-intraventricular tem sido destacada na literatura. Tauscher et al. (2003) mostraram aumento significativo dos

níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em sangue de cordão umbilical de prematuros menores que 32 semanas de idade gestacional que evoluíram com HPIV. Houve também maior ocorrência de corioamnionite histológica nos prematuros com HPIV. Os autores propuseram que a ocorrência da HPIV associou-se com a resposta inflamatória fetal representada pelo aumento dos níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical e que a lesão cerebral iniciou-se antes do nascimento.

Babnik et al. (2006) estudaram os fatores de risco para HPIV em prematuros extremos e documentaram que níveis elevados de IL 6 e IL8 em sangue de cordão umbilical, corioamnionite com funisite, sepse precoce e ressuscitação em sala de parto associaram-se com a HPIV precoce, ou seja, no 1º dia de vida; mas não se associaram com a HPIV diagnosticada após esse período (tardia).

No presente estudo não foi investigada a ocorrência de HPIV precoce e não houve associação entre os níveis de citocinas em sangue de cordão e HPIV nos prematuros infectados. Vários aspectos podem ter contribuído para esse resultado, incluindo: a natureza multifatorial dessa patologia, o predomínio de graus leves e o momento de investigação pelo ultrassom de crânio, que neste Serviço é rotineiramente realizado no final da primeira semana de vida.

6. Considerações finais

Esse estudo é importante, pois focaliza um problema frequente na prática diária do neonatologista: a RPM-PT, que pode ter graves repercussões para o recém-nascido, e sobre a qual ainda pairam muitas dúvidas nos aspectos fisiopatológicos e nas condutas, destacando-se também que o tema tem sido mais investigado pelos obstetras do que pelos neonatologistas. Trata-se de estudo clínico de execução bastante laboriosa, requerendo disponibilidade da pesquisadora desde a internação da gestante com RPM-PT, no nascimento para a coleta do material da pesquisa, e durante todo o período de internação do recém-nascido, para vigilância da evolução clínica e garantir a realização dos exames necessários ao estudo.

A grande motivação para a realização da pesquisa foi procurar um marcador precoce e acurado, que não espolie os recém-nascidos, e que possa auxiliar a conduta do neonatologista frente a uma das complicações mais temidas na RPM-PT: a infecção

neonatal precoce. Pela complexidade na execução do estudo, a amostra estudada não foi grande, mas foi calculada e permitiu responder a questão do estudo, identificando a IL-8 em sangue de cordão como bom marcador de infecção precoce.

O grande desafio ao estudar infecção precoce, que pode ser considerado como uma limitação do presente estudo é a falta do padrão ouro representado pela hemocultura positiva. Entretanto pelo rigor nos critérios adotados para definição do grupo infectado, consideramos os resultados consistentes. A maior morbidade e mortalidade, detectada nos prematuros com infecção precoce, justifica a busca de um marcador precoce de infecção neonatal, entretanto o número amostral não foi calculado para avaliar esses desfechos, limitando a interpretação dos resultados das citocinas como marcadores de prognóstico não infeccioso.

Este estudo amplia a linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida no Serviço, sobre o papel das citocinas na sepse neonatal e acrescenta novos conhecimentos sobre a fisiopatologia das infecções neonatais, pois até então foi investigado apenas o papel da IL-8 na sepse tardia, e neste estudo foram avaliadas duas outras citocinas: TNF- α e IL-10.

A pesquisa trouxe novas informações sobre a importância das citocinas na morbidade neonatal não infecciosa, motivando a realização de novas pesquisas voltadas não apenas para o problema das infecções neonatais, mas principalmente para o prognóstico global do recém-nascido na RPM-PT.

Conclusões

A avaliação dos níveis de TNF- α , IL-8 e IL-10 em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos na RPM-PT permitiram concluir que:

- IL-8 foi bom marcador para infecção precoce.
 - TNF- α e IL-10 não diferenciaram o grupo infectado.
 - O ponto de corte ótimo da IL-8 foi 35 pg/ml, com 84% de acurácia. Valor de IL-8 de 35 pg/ml ou mais foi capaz de detectar 2/3 dos prematuros infectados e abaixo de 35 pg/ml permitiu excluir infecção em 89% dos casos.
 - Não houve influência de fatores perinatais na IL-10. Os níveis de TNF- α aumentaram com o sofrimento fetal e a corioamnionite clínica; a IL-8 aumentou com a corioamnionite histológica.
 - Citocinas pró-inflamatórias tiveram correlação negativa com a idade gestacional e peso de nascimento.
 - Citocinas em sangue de cordão umbilical relacionaram-se com a morbidade neonatal: prematuros com SDR e PCA tiveram níveis diminuídos de IL-10 e os com DBP tiveram TNF- α e IL-8 aumentados.
-

*Referências Bibliográficas**

- AAP/AHA – American Academy of Pediatrics & American Heart Association. International guidelines for neonatal resuscitation: an excerpt from the guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science. *Pediatrics*. 2000;160:1-16.
- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- Alexander GR, Hines JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States National reference for fetal growth. *Obstet Gynecol*. 1996;87:163-8.
- Alexander JM, Gilstrap LC, Cox SM, McIntire DM, Leveno KJ. Clinical chorioamnionitis and the prognosis for very low birth weight infants. *Obstet Gynecol* 1998;91:725-9.
- An H; Nishimaki S; Ohyama M; Haruki A; Naruto T; Kobayashi N et al. Interleukin-6, interleukin-8, and soluble tumor necrosis factor receptor-I in the cord blood as predictors of chronic lung disease in premature infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1649-54.
- Asrat T. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes: Pathophysiology, detection, and management. *Clin Perinatol*. 2001;28:735-52.
- Athayde N, Wang J, Wang X, Trudinger B. Fetuses delivered following preterm prelabor rupture of the membranes are capable of stimulating a proinflammatory response in endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig*. 2005;12:118-22.
- Babnik J, Stucin-Gantar I, Kornhauser-Cerar L, Sinkovec J, Wraber B, Derganc M. Intrauterine inflammation and the onset of peri-intraventricular hemorrhage in premature infants. *Biol Neonate*. 2006;90:113-21.
- Ballard JL, Khoury JC, Weidig K, Wang L, Ellers-Walsman BI, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-23.
- Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6 and TNF- α in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106:72-7.
- Bentlin MR, Rugolo LMSS, Jr Rugolo A, Hashimoto M, Lyra JC. Is urine interleukin-8 level a reliable laboratory test for diagnosing late onset sepsis in premature infants? *J Trop Pediatr*. 2007;53:403-8.
- Bentlin MR, Rugolo LMSS. Rotura prematura de membranas (RPM) e infecções bacterianas no recém-nascido. In: *Pediatria Clínica*, 1ªed Petrópolis: EPUB, 2006:83-7.
- Bentlin MR. Determinação dos níveis séricos e urinários da interleucina 8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia. [Tese Doutorado] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

* De acordo com orientação da Divisão de Biblioteca e Documentação do Campus de Botucatu – UNESP, utilizaram-se normas de Vancouver, porém em ordem alfabética e com citação no texto por autor e ano de publicação. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

- Berezowski AT, Cunha SP, Da Costa JC, Bacchi CE. Quantification of immunoglobulin A in a chorioamniotic membrane of patients with premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet.* 1994;47:23-6.
- Berner R; Niemeyer CM; Leititis JU; Funke A; Schwab C; Rau U et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res.* 1998;44:469-77.
- Berner R, Tüxen B, Clad A, Forster J, Brandis M. Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr.* 2000;159:205-10.
- Berner R, Welter P, Brandis M. Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res.* 2002;51:304-9.
- Bracci R, Buonocore, G. Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate.* 2003;83:85-96.
- Buttery JP. Blood cultures in newborns and children: optimising an everyday test. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;87:F25-8.
- Calil R. Diagnóstico das infecções hospitalares em recém-nascidos. In: Diagnóstico e prevenção de infecção hospitalar em neonatologia. [S.I.]: APECIH, 2002.p29-42.
- Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, MacDonald PC. Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human decidua: potential role of cytokines in infection-induced PTL. *J Clin Invest.* 1989;83:430-6.
- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10(IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leucocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1993;178:2207-11.
- CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR* 2002;51[RR-11]:1-28.
- Christensen RD, Calhoun DA, Rimsza LM. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol.* 2000;27:577-601.
- Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. 1ª ed. Botucatu: Gráfica e Editora Topomic, 1997.
- D'alquen D, Kramer BW, Seidenspinner S, Marx A, Berg D, Groneck P et al. Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis. *Pediatr Res.* 2005;57:263-9.
- Davidson D; Miskolci V; Clark DC; Dolmaian G; Vancurova I. Interleukin-10 production after pro-inflammatory stimulation of neutrophils and monocytic cells of the newborn. Comparison to exogenous interleukin-10 and dexamethasone levels needed to inhibit chemokine release. *Neonatology.* 2007;92:127-33.
-

Debillon T, Gras-Leguen C, Vérielle V, Winer N, Caillon J, Rozé JC et al. Intrauterine infection induces programmed cell death in rabbit periventricular white matter. *Pediatr Res*. 2000;47:736-42.

Dollner H, Vatten L, Augstgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol*. 2001a;54:1251-7.

Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Augstgulen R. Inflammatory mediators in umbilical from neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate*. 2001b;80:41-7.

Dollner H; Vatten L; Halgunset J; Rahimipoor S; Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *Br J Obstet Gynaecol*. 2002;109:534-9.

Elimian A; Verma U; Beneck D; Cipriano R; Visintainer P; Tejani N. Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes. *Obstet Gynecol*. 2000;96:333-6.

Flenady V, King J. Antibiotics for prelabour rupture of membranes at or near term (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.

Fletcher RH, Fletcher SW. *Epidemiologia clínica-elementos essenciais*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 2001;98:284-8.

Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187:1159-62.

Fowlie PW, Schmidt B. Diagnostic tests for bacterial infection from birth to 90 days-a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998;87:F92-8.

Franz AR, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:666-71.

Garite TJ. Management of premature rupture of membranes. *Clin Perinatol*. 2001;28:837-47.

Gaynes RP, Edwards JR, Jarvis WR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ. Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. *Pediatrics*. 1996;98:357-61.

Gérard C, Brunys C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenaabeele P, Delvaux A et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med*. 1993;177:547-50.

- Gerdes JS, Polin RA. Sepsis screen in neonates with evaluation of plasma fibronectin. *Pediatr Infect Dis J.* 1987;6:443-7.
- Gibbs RS, Castillo MS, Rodgers PJ. Management of acute chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;136:709-13.
- Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. Serum tumour necrosis factor in newborns at risk for infections. *Eur J Pediatr.* 1990;149:645-7.
- Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Muñoz H, Tolosa JE, Rojas I. Premature labor and intra-amniotic infection. *Clin Perinatol.* 1995;22:281-342.
- Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:194-202.
- Gonzalez A; Sosenko IR; Chandar J; Hummler H; Claire N; Bancalari E. Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic lung disease in premature infants weighing 1000 grams or less. *J Pediatr.* 1996;128:470-8.
- Greig PC. The diagnosis of intrauterine infection in women with preterm premature rupture of the membranes (PPROM). *Clin Obstet Gynecol.* 1998;48:849-63.
- Hack CE; Aarden LA; Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol.* 1997;66:101-95.
- Hassett S; Moynagh P; Reen D. TNF-alpha is a mediator of the anti-inflammatory response in a human neonatal model of the non-septic shock syndrome. *Pediatr Surg Int.* 2006;22:24-30.
- Hata T, Kawamura T, Inada K, Fujiwaki R, Ariyuki Y, Hata K et al. Cord blood cytokines and soluble adhesion molecules in vaginal and cesarean delivered neonates. *Gynecol Obstet Invest.* 1996;42:102-4.
- Hitti J, Krohn MA, Patton DL, Tarczy-Hornoch P, Hillier SL, Cassen EM et al. Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:50-6.
- Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J, Hillier SL, Aura J, Eschenbach DA. Amniotic fluid infection, cytokines, and adverse outcome among infants at 34 weeks' gestation or less. *Obstet Gynecol.* 2001;98:1080-8.
- Holcroft CJ; Askin FB; Patra A; Allen MC; Blakemore KJ; Graham EM. Are histopathologic chorioamnionitis and funisitis associated with metabolic acidosis in the preterm fetus? *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:2010-5.
- Holzman C; Lin X; Senagore P; Chung H. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 2007;166:786-94.
- Huang HC; Tai FY; Wang FS; Liu CA; Hsu TY; Ou CY; Yang KD. Correlation of augmented IL-8 production to premature chronic lung disease: implication of posttranscriptional regulation. *Pediatr Res.* 2005;58:216-21.
-

- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1723-9.
- Jobe AH, Ikegami M. Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury. *Respir Res.* 2001;2:27-32.
- Jokic M; Guillois B; Cauquelin B; Giroux JD; Bessis JL; Morello R et al. Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumour necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates. *Br J Obstet Gynaecol.* 2000;107:420-5.
- Jones CA; Cayabyab RG; Kwong KY; Stotts C; Wong B; Hamdan H et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res.* 1996;39:966-75.
- Kashlan F; Smulian J; Shen-Schwarz S; Anwar M; Hiatt M; Hegyi T. Umbilical vein interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha plasma concentrations in the very preterm infant. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:238-43.
- Kenyon S, Boulvain M, Neilson J. Antibiotics for premature rupture of membranes (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
- Kenyon S, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: The ORACLE I randomised trial. *Lancet.* 2001;357:978-88.
- Kilbride HW, Thibeault DW. Neonatal complications of preterm premature rupture of membranes. *Pathophysiology and management. Clin Perinatol.* 2001;28:761-85.
- Kramer BW; Ikegami M; Moss TJ; Nitsos I; Newnham JP; Jobe AH. Antenatal betamethasone changes cord blood monocyte responses to endotoxin in preterm lambs. *Pediatr Res.* 2004;55:764-8.
- Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, Berner R. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early -onset infection in premature infants. *Biol Neonate.* 2001;80:118-23.
- Lahra MM; Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:147-51.
- Lau J; Magee F; Qiu Z; Houbé J; Von Dadelszen P; Lee SK. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:708-13.
- Lee SE; Romero R; Jung H; Park CW; Park JS; Yoon BH. The intensity of the fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:294.e1-6.
- Lee SY; Ng DK; Fung GP; Chow CB; Shek CC; Tang PM et al. Chorioamnionitis with or without funisitis increases the risk of hypotension in very low birthweight infants on the first postnatal day but not later. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91:F346-8.
- Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol.* 2001;28:721-34.
-

- Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W, Ramsey PS. Preterm premature rupture of membranes: is there an optimal gestacional age for delivery? *Obstet Gynecol.* 2005;105:12-7.
- Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J Exp Med.* 1991;173:1021-4.
- Martius JA, Ros T, Gora B, Oehler MK, Schrod L, Papadopoulos T, et al. Risk factors associated with early-onset sepsis in prematures infants. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85:151-8.
- Mehr SS; Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:879-87.
- Mehr SS; Doyle LW; Rice GE; Vervaart P; Henschke P. Interleukin-6 and interleukin-8 in newborn bacterial infection. *Am J Perinatol.* 2001;18:313-24.
- Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21:467-78.
- Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol.* 2003;101:178-93.
- Merenstein GB, Weisman LE. Premature Rupture of the membranes: neonatal consequences. *Semin Perinatol.* 1996;20:375-80.
- Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr.* 1996;129:574-80.
- Miller LC; Isa S; LoPreste G; Schaller JG; Dinarello CA. Neonatal interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. *J Pediatr.* 1990;117:961-5.
- Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, Garland SM. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91:F208-12.
- Morales WJ. The effect of chorioamnionitis on the developmental outcome of preterm infants at one year. *Obstet Gynecol.* 1987;70:183-6.
- Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:L566-77.
- Murthy V; Kennea NL. Antenatal infection/inflammation and fetal tissue injury. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21:479-89.
- Naef RW 3rd, Allbert JR, Ross EL, Weber BM, Martin RW, Morrison JC. Premature rupture of membranes at 34 to 37 weeks' gestation: Aggressive versus conservative management. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:126-30.
-

- National Institute of Health. NHI Consensus Development Conference Statement: effect of corticosteroids for fetal lung maturation on perinatal outcomes, February 28-March 2, 1994. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:246-52.
- Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecules, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;77:F221-7.
- Ng PC, Li K, Wong RPO, Chui K, Wong E, Li G, Fok TF. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine response in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88:F209-13.
- Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89:F229-35.
- Nihiro H; Otsuka T; Izuhara K; Yamaoka K; Ohshima K; Tanabe T et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood.* 1997;89:1621-8.
- Nupponem I, Andersson S, Järvenpää AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics.* 2001;108:1-6.
- Oberholzer A; Oberholzer C; Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.* 2002;30:S58-63.
- Ogunyemi D, Murillo M, Jackson U, Hunter N, Alperson B. The relationship between placental histopathology findings and perinatal outcome in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13:102-9.
- Pajntar M, Verdenik I. Maternal and neonatal outcome related to delivery time following premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet.* 1997;58:281-6.
- Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weight less than 1500 gm. *J Pediatr.* 1978;92:529-34.
- Pasquier JC, Bujold EL, Rabilloud M, Picaud JC, Ecochard R, Claris O et al. Effect of latency period after premature rupture of membranes on 2 years infant mortality (DOMINOS study). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;135:21-7.
- Prigenzi MLH, Trindade CEP, Rugolo LMSS, Silveira LVA. Fatores de risco associados à mortalidade de recém-nascidos de muito baixo peso no período de 1995-2000. *Rev Bras Saude Matern Infant.* 2008; 8: xx-xx.
- Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:1162-6.
- Richardson BS; Wakim E; daSilva O; Walton J. Preterm histologic chorioamnionitis: impact on cord gas and pH values and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:1357-65.
-

- Roberts D, Dalziel. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, issue 2, 2008. Oxford: Update Software.
- Rocha JES, Tomaz ACP, Rocha DB, Bezerra AF, Lopes ALC, Breda AMO et al. Morbidade materna e morbimortalidade perinatal associada à infecção ascendente na rotura prematura das membranas. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2002;24:15-20.
- Rodriguez AF, Kaplan SL, Mason EO. Cerebrospinal fluid values in the very-low-birth-weight infant. *J Pediatr.* 1990;116:971-4.
- Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope D. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring. *J Pediatr.* 1988;112:761-7.
- Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin-6 in PTL: association with infection. *J Clin Invest.* 1990;85:1392-400.
- Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol.* 2002;7:259-74.
- Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammatory in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatol Med.* 2006;11:317-26.
- Rugolo LM. Síndrome do desconforto respiratório. In: *Conduitas em Pediatria*, 2^a ed, Rio de Janeiro:EPUB, 1999: 180-6.
- Saez-Llorenz X, McCracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology, and management. *J Pediatr.* 1993;123:497-508.
- Santana C, Guindeo MC, Gonzalez G, García-Muñoz F, Saavedra P, Doménech E. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 2001;90:1176-81.
- Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucskey P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res.* 2002;51:317-22.
- Schultz C; Temming P; Bucskey P; Göpel W; Strunk T; Härtel C. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol.* 2004;135:130-6.
- Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and β -adrenergic agonists. *J Immunol.* 1992;148:3431-5.
- Shalak LF, Luptook AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics.* 2002;110:673-80.
- Shim SS, Romero R, Hong JS, Park CW, Jun JK, Kim BI, Yoon BH. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1339-45.
- Shimoya K; Matsuzaki N; Taniguchi T; Jo T; Saji F; Kitajima H et al. Interleukin-8 in cord sera: a sensitive and specific marker for the detection of preterm chorioamnionitis. *J Infect Dis.* 1992;165:957-60.
-

Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Okada T, Saji F, Murata Y. Interleukin-8 level in maternal serum as marker for screening of histological chorioamnionitis at term. *Int J Obstet Gynecol.* 1997;57:153-9.

Silva GHS. Análise clínica e laboratorial da sepse com hemocultura positiva em recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal durante 5 anos.[dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Silva MG. Avaliação microbiológica da secreção cervical e níveis de citocinas inflamatórias no soro e líquido amniótico de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo.[dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1999.

Speer CP, Groneck P. Oxygen radicals, cytokines, adhesion molecules and lung injury in neonates. *Semin Neonatol.* 1998;3:219-28.

Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol.* 2003;8:29-38.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics.* 2002;110:285-91.

Stoll BJ; Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003;27:293-301.

Strunk T; Temming P; Gembruch U; Reiss I; Bucszy P; Schultz C. Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res.* 2004;56:219-26.

Tauscher MK, Berg D, Brockmann M, Seidenspinner S, Speer CP, Groneck P. Association of histologic chorioamnionitis, increased levels of cord blood cytokines, and intracerebral hemorrhage in preterm neonates. *Biol Neonate.* 2003;83:166-70.

Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *NeoReviews.* 2007; 8(Suppl 12):522-32.

Van der Poll T, Jansen J, Levi M, Ten Cate H, Ten Cate JW, Van Deventer SJH. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med.* 1994;180:1985-8.

Van Dissel JT, Van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet.* 1998;351:950-3.

Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics.* 1996;97:210-5.

Weatherstone KB, Rich EA. Tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion cord blood monocytes from premature and term neonates. *Pediatr Res.* 1989;25:342-6.

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:675-81.

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, 16 de agosto de 2.004

OF 371/2004-CEP
MACAH/asc

*Ilustríssima Senhora
Profª Drª Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Drª Ligia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o projeto de pesquisa intitulado "Níveis de TNF α e IL-10 em recém nascidos prematuros de gestação com rotura prematura de membranas" de autoria da Drª Miriam Hashimoto, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 16/08/2004.

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP*

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esta pesquisa tem como objetivo estudar o papel de substâncias inflamatórias envolvidas na bolsa rota e no nascimento de prematuros.

Para isso, serão colhidos 10 ml de sangue de cordão e 1ml de sangue periférico do recém-nascido no primeiro dia de vida durante a coleta de rotina. Será coletado 1 ml do aspirado gástrico, material retirado em aspiração de rotina, realizada logo após o nascimento para verificar se não há obstrução do esôfago. Caso o seu filho necessite de ventilação mecânica, será coletado o aspirado traqueal durante a rotina de cuidados de aspiração. Os fluidos obtidos destes procedimentos serão guardados e utilizados na pesquisa. Também serão coletados os seus dados e do seu recém-nascido por meio do prontuário.

Este estudo não traz nenhum risco ou desconforto adicional para você e para o seu recém-nascido e também nenhum benefício. As informações serão avaliadas em conjunto e a identificação de cada participante não será divulgada.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

Não há despesas pessoais para o participante e também não há compensação em dinheiro.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Cilmery Suemi Kurokawa, que pode ser encontrada na rua Úrsula Camargo de Barros,433, Botucatu, telefone 3815-5711 e e-mail: kurokawa@fmb.unesp.br
Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo o estudo “**Níveis de IL-8, IL-10 e TNF-alfa em recém-nascidos prematuros de gestações com rotura prematura de membranas pré-termo**”.

Ficaram claros para mim quais os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

data: ___/___/___

Assinatura do participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para a Participação neste estudo.

data: ___/___/___

Assinatura do pesquisador do estudo

Pesquisadores participantes:

Ligia S.S. Rugolo
R. Cardoso de Almeida,1000
Botucatu
Fone: (14) 3815-4647
e-mail: ligiasr@fmb.unesp.br

Maria Regina Bentlin
R. da Amizade, 457 –
Botucatu
Fone: (14) 3882-3684
e-mail:
mbentlin@fmb.unesp.br

Miriam Hashimoto
R.Com. Dr. Miguel
Losso,303 Botucatu-
Fone:(14)3882-3984
e-mail:
miriam@fmb.unesp.br

José Carlos Peraçoli
R. Dr Cardoso de Almeida
1613
Fone: (14) 3815-3740

Anexo 3. Protocolo de investigação da RPM-PT

Protocolo RPM 2004 B. Rota TPP Termo N° _____

Dados maternos

RG materno: _____ Idade : _____ G ___ P ___ A ___ C ___

Procedência _____

Escolaridade: _____ Estado civil _____

Patologia prévia _____

Patologia nesta gestação _____

Pré natal: N° de consultas _____ FMB fora Bolsa rota: tempo de rotura: _____ horas

	Não	Sim	
Fumo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Álcool	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Drogas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Indução	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Condução	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Inibição	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Corticóide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hiperhidratação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sufrimento fetal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Antibióticos (intraparto)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Outros medicamentos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Tipo de parto: Vaginal Cesárea Urgente Peso placenta _____ gramas

Corioamnionite histológica: não sim funisite: não sim N° _____ não realizado

Corioamnionite clínica: não sim T mat. >38°C FCmat. >100 FC fetal >160

útero doloroso LA fétido LC materna >15.000

Dados do RN

RG RN: _____ DN ___/___/___ hora: _____ Gênero: F M

Id. Gestacional DUM: _____ sem PN: _____ gramas AIG PIG GIG

Usom: _____ sem NB Ballard: _____ sem Comp.: _____ cm PC _____ cm

Reanimação: não O2 inalat. VPP BM MC IOT Drogas

Apgar ___/___/___ BSA _____

Encaminhado UTI BI AC

Manifestações clínicas

	0-12 horas	12-24 horas	24-48 horas
Cardiovasculares			
Digestivas			
Respiratórias			
SNC			
Urinárias			
Metab./Hidro-eletr			
Hematológicas			

Procedimentos

	0-12 horas	12-24 horas	24-48 horas
Cateter arterial			
Cateter venoso			
NPP			
Dieta			
RX			
Assistência resp.	VM <input type="checkbox"/> CPAP <input type="checkbox"/>	VM <input type="checkbox"/> CPAP <input type="checkbox"/>	VM <input type="checkbox"/> CPAP <input type="checkbox"/>
Outros			

Monitorização

	0-12 horas	12-24 horas	24-48 horas
ΔT			
ΔFR			
ΔFC			
$\Delta Dextro$			
$\Delta SatO_2$			
PaO_2/FiO_2			
Pressão arterial			
Perf. periférica	Boa <input type="checkbox"/> Reg <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/>	Boa <input type="checkbox"/> Reg <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/>	Boa <input type="checkbox"/> Reg <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/>

Laboratorial

Data	Ht/Hb	GB	diferencial	plaquetas	I/M	I/T	Rodwell	PCR

LCR

Data	GV	GB	diferencial	proteína	glicose	Gram	outros

Culturas

Data	Sangue	Secreção gástrica	LCR	Secreção traqueal	Urina	outras

PCA não sim data ____ / ____ / ____ Eco: _____

NEC não sim

SDR não sim surfactante não sim

O₂ com 28 dias de vida não sim O₂ com 36 sem. IPC não sim

Us **crânio** data ____ / ____ / ____

Normal

Alterado _____

Us **crânio** data ____ / ____ / ____

Normal

Alterado _____

Origem da Infecção:

materna e ou precoce (até 48 horas de vida)

Antibiótico: _____ tempo: ____ dias

ambiental e/ou tardia (após 48 horas de vida)

Evolução da Infecção

não infec. infecção s/ foco pneum. meningite sepse clínica sepse confirmada

DMOS (hemodinâm. / resp. / neurol. / hematol. / renal / hepat / gastrointest.)

outros _____

Alta não sim

data ____ / ____ / ____

Óbito relacionado a infecção não sim data ____ / ____ / ____

Necrópsia não sim

HD Finais

	cordão	RN
IL10		
TNF-α		
IL 8		

Anexo 4. Escore de Rodwell

	Alterações	Pontuação
Leucócitos	<5000/mm ³ ou >25000/ mm ³ (nasc) >21000/mm ³ (12-24h)	1
Neutrófilos		
Imaturos/totais	≥ 0,16	1
Imaturos/maduros	≥ 0,3	1
Totais (↑ou↓)	< 1800/mm ³ (nasc) <7000/mm ³ (12-24h): PN> 1500g ou > 12400/mm ³	1
Imaturos	> 1500/mm ³	1
Plaquetas	<150000/mm ³	1
Alterações degenerativas	vacuolizações, granulações tóxicas ou corpúsculos de Döhle	1

Anexo 5. Características dos recém-nascidos que foram a óbito

	RN 1	RN 2	RN 3	RN 4	RN 5
TRPM (h)	100	216	96	120	28
Coriamnionite	histológica	clínica e histológica	clínica	histológica	clínica e funisite
CE antenatal	sim	sim	sim	sim	não
Sofrimento fetal	não	sim	sim	não	sim
Antibiótico intraparto	não	não	sim	não	sim
Parto cesárea	não	não	sim	não	não
IG (s)	27	26	29	26	27
PN (g)	900	515	1290	685	735
Sexo	masculino	feminino	masculino	feminino	feminino
Apgar 1- 5 minutos	7 - 10	4 - 7	7 - 9	1 - 7	2 - 7
PCR (mg/dl)	1.1	-	3.1	0.7	1.4
Escore de Rodwell	3	3	1	3	5
Infecção precoce	pneumonia	sepse clínica	sepse clínica	sepse clínica	sepse clínica
Morbidade neonatal	PCA	SDR	HPIV, SDR, PCA	HPIV, SDR, PCA	SDR
Idade do óbito (d)	24	1	17	21	4
Causa terminal	sepse	sepse	sepse	sepse	sepse
TNF-α (pg/ml)	1.83	3.85	4.38	0.99	26.75
IL-8 (pg/ml)	158.8	324.48	16.42	84.38	270.20
IL-10 (pg/ml)	0.00	0.00	0.00	0.00	-

TRPM= tempo de rotura de membranas; ITU= infecção do trato urinário; CE= corticóide, IG= idade gestacional; PN= peso de nascimento; PCR= proteína C reativa, h= horas; s= semanas; g= gramas

Anexo 6-Dados gerais dos recém-nascidos prematuros do grupo infectado

Nº	Id	nº gest	t BR	t CE	SF	IP	Afb	Ces	CA cl	CA hist	CA fun	IG	Masc	PN	VPP	IOT	Ap 1	Ap 5	BSA	UTI	Rod	PCR	VM	Cpap	Pn	Sp clin	HPIV	SDR	PCA	Inf T	DBP	t Int	Ob	TNF	IL-10	IL-8
1	20	1	15	1	0	0	0	0	0	0	0	33	1	2295	1	0	5	8	6	1	2	3,3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	13	0	22,14	288,33	13,63
2	18	1	100	1	0	0	0	0	0	0	0	27	1	900	0	0	7	10	3	1	3	1,1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	24	1	1,83	0	158,8
3	16	1	72	1	1	1	1	1	0	0	0	32	1	2060	1	0	7	9	6	1	2	5,6	0	1	1	0	0	0	0	0	10	0	9,98	618,23	162,87	
4	21	4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	34	0	2245	0	0	9	9	3	0	3	5,9	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	1,85	0	100,84	
5	30	4	50	1	0	0	0	1	1	1	0	31	0	2500	0	0	9	10	3	0	3	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	35,44	
6	30	2	39	1	1	0	1	0	0	0	0	32	0	1840	0	0	8	9	6	1	4	4,3	0	1	1	0	0	0	0	14	0	3,66	7,82	104,58		
7	36	4	117	0	1	1	1	1	1	1	0	30	0	1110	1	0	4	9	6	1	3	7,2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	43	0	3,67	0	163,05
8	17	3	35	1	0	0	0	0	0	0	0	35	1	2225	0	0	8	9	4	0	3	8,3	0	0	1	0	0	0	0	11	0	4,24	78,15	11,07		
9	17	1	43	1	0	1	0	0	1	0	0	33	1	1830	1	0	5	8	5	1	2	2,2	1	1	1	0	1	0	0	23	0	4,42	0	330,06		
10	21	2	32	1	1	0	0	1	1	1	1	30	0	1800	1	1	5	8	6	1	3	1,8	0	1	1	0	0	0	0	18	0	7,95	529,39	162,72		
11	42	7	49	0	1	0	1	1	1	1	0	31	1	1770	1	1	1	5	0	1	1	1,4	1	1	1	0	0	0	0	29	0	3,05	0	193,83		
12	19	3	16	1	0	0	0	1	1	1	0	29	1	1235	1	1	8	9	6	1	3	2,1	1	0	1	0	1	0	1	42	0	53,33	0	147,91		
13	17	1	70	1	0	0	0	1	0	1	0	29	0	1040	1	1	2	3	6	1	2	10,7	1	0	1	0	0	1	1	72	0	76,88	5,85	233,18		
14	28	6	216	1	1	0	0	1	1	1	1	26	0	515	1	1	4	7	0	1	3	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	3,85	0	324,48		
15	22	1	54	1	0	0	0	0	1	1	0	34	1	1905	0	0	8	10	5	0	2	1,8	0	0	0	0	0	0	0	8	0	5,49	0	149,65		
16	25	2	80	1	1	0	1	0	1	1	1	29	1	1190	1	1	1	8	6	1	2	1,6	0	1	1	0	0	0	0	45	0	3,76	104,63	158,55		
17	16	2	120	0	1	0	1	0	1	0	0	34	1	2855	0	0	8	9	4	0	1	2,1	0	0	1	0	0	0	0	8	0	0,78	0	12,23		
18	30	5	96	1	1	1	1	1	0	0	0	29	1	1290	1	1	7	9	4	1	1	3,1	1	0	1	1	1	1	1	17	1	4,38	0	16,42		
19	35	8	28	0	1	1	0	1	0	1	0	27	0	735	1	1	2	7	0	1	5	1,4	1	0	0	1	1	0	4	1	26,75	0	270,2			
20	19	2	17	0	0	1	0	0	0	0	0	32	1	1820	0	0	6	7	5	1	2	2,5	0	1	1	0	0	0	13	0	0	0	56,70	19,51		
21	23	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	33	1	2510	0	0	8	10	7	1	3	0,6	1	1	1	0	1	0	8	0	0,63	0	97,09			
22	18	1	54	1	0	1	0	0	1	1	1	32	1	1700	0	0	6	9	5	1	3	2,5	0	1	1	0	1	0	15	0	0	0	26,06	136,47		
23	20	1	91	1	0	1	1	1	0	0	0	31	1	1840	0	0	8	9	5	1	1	5,7	0	1	1	0	0	1	1	15	0	7,95	0	41,07		
24	23	3	17	1	1	0	1	0	1	0	0	35	0	2015	0	0	8	9	3	1	2	7,1	0	1	1	0	1	0	28	0	2,73	0	216,63			
25	28	2	69	1	0	1	0	0	1	1	1	33	0	1885	0	0	7	9	6	1	2	2,3	0	1	1	0	0	0	19	0	2,26	458,64	128,94			
26	25	2	54	1	0	0	1	1	0	0	0	33	1	2285	0	0	8	9	7	1	1	1,7	1	1	1	0	0	0	19	0	0,92	0	4,1			
27	31	3	120	1	0	0	0	0	0	1	0	26	0	685	1	1	1	7	0	1	3	0,7	1	0	0	1	1	1	21	1	0,99	0	84,38			

Anexo 7- Dados gerais dos recém-nascidos do grupo não infectado

Nº	Id mt	nº gest	t BR	t CE	SF	IP	Atb	Ces	CA cl	CA hist	Fun	IG	Masc	PN	VPP	IOT	Ap 1	Ap 5	BSA	UTI	Rod	PCR	VM	CPAP	HPIV	SDR	PCA	inf T	DPB	t Int	Ob	TNF	IL-10	IL-8
1	32	6	15	0	0	0	0	0	0	0	35	1	2760	0	0	9	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,48	0	33,55
2	29	11	26	0	1	1	0	1	0	0	32	1	1905	0	0	8	9	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,15	21,44	17,16
3	15	1	19	1	0	1	0	0	0	0	33	0	1725	1	0	4	9	0	0	0	1	0,6	0	0	0	0	1	1	0	17	0	6,25	0,70	14,86
4	31	1	15	1	0	0	0	0	1	0	32	0	2370	0	0	9	10	4	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	5	0	2,83	159,64	4,98	
5	30	2	57	1	0	0	0	0	0	0	33	1	2205	1	0	7	9	2	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	6	0	3,85	5,02	9,67	
6	21	2	12	1	0	0	0	1	0	1	33	0	2060	1	0	1	8	6	1	1	0,7	0	1	0	1	0	0	0	6	0	1,92	0	117,55	
7	34	2	192	1	1	0	0	0	0	0	34	0	1900	1	0	3	7	6	1	1	0,2	0	1	0	1	0	0	0	7	0	35,00	891,22	54	
8	37	6	800	1	1	0	0	1	0	0	29	1	1380	0	0	7	9	6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	36	0	1,09	0	17,85	
9	19	4	25	0	0	0	0	0	0	0	33	0	2020	0	0	8	10	4	0	2	0,6	0	0	0	0	0	0	2	0	0,38	117,31	31,89		
10	30	3	165	1	0	0	0	0	0	0	32	1	2570	0	0	8	9	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1,60	0	39,03		
11	22	3	16	0	0	0	0	0	0	0	33	0	2080	0	0	8	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	14,12	317,65	11,12		
12	25	2	120	1	0	1	1	1	0	0	32	1	1770	0	0	8	9	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	17	0	2,85	0	20,33		
13	19	1	22	0	0	0	0	0	0	0	34	1	2255	0	0	7	9	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	3	0	2,17	0	18		
14	18	1	12	0	0	0	0	0	0	0	36	0	2770	0	0	8	9	0	0	3	0,3	0	0	0	0	0	0	2	0	4,27	69,89	0,95		
15	20	1	46	1	0	1	0	0	0	0	33	0	2020	1	0	8	9	4	0	1	0,7	0	0	0	0	0	0	7	0	2,32	0	9,65		
16	22	3	83	1	0	1	0	0	0	0	32	1	1920	0	0	9	9	0	0	1	0,8	0	0	0	0	0	0	6	0	1,01	167,01	8,92		
17	23	2	12	0	0	0	0	0	1	1	32	0	1700	1	0	4	8	4	1	1	0,8	0	1	0	0	0	0	10	0	0	0	0	118,82	0
18	31	2	34	0	0	0	0	1	0	0	34	1	1905	0	0	8	9	4	0	0	0,6	0	0	0	0	0	0	7	0	3,53	884,36	2,65		
19	19	1	264	1	0	0	0	0	0	0	34	0	1910	0	0	9	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,46	0	15,84		
20	16	1	32	0	0	0	0	0	0	0	35	0	2315	0	0	7	9	5	0	1	3,3	0	0	0	0	0	0	6	0	0,77	84,89	0		
21	16	1	25	0	0	1	0	0	0	0	36	1	2365	0	0	10	10	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	25,55	34,67	
22	24	1	49	1	1	0	1	1	0	0	35	1	2055	0	0	9	10	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	2	0	21,36	650,83	7,53		
23	26	1	20	1	0	0	0	1	0	0	31	1	2125	1	1	5	7	6	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	79,90	0
24	18	2	23	0	0	0	0	0	0	0	36	1	2190	0	0	9	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	1,01	1,08	26,23	0	
25	17	1	34	1	1	1	0	0	0	0	35	1	2165	1	0	3	7	6	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	8	0	0	205,74	7,45	0	
26	37	5	25	0	1	0	1	0	0	0	32	1	1935	0	0	8	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	9,36	3,17	14,70	0	
27	16	1	72	1	0	1	0	0	0	0	33	1	2075	0	0	7	9	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	15,43	0
28	22	3	48	0	0	0	0	1	0	0	35	1	2710	0	0	8	9	1	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	3	0	0,95	97,62	6,08	0	