FÁBIO GONÇALVES COUTINHO

**Avaliação do dano oxidativo e atividade do sistema
antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical
e saliva de recém-nascidos pré-termo com fatores de
risco para sepse neonatal precoce**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Fábio Gonçalves

Avaliação do dano oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical e saliva de recém-nascidos pré-termo com fatores de risco para sepse neonatal precoce / Fábio Gonçalves Coutinho. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Edna Maria de Albuquerque Diniz.

Descritores: 1.Estresse oxidativo 2.Recém-nascido prematuro 3.Malondialdeído 4.Superóxido dismutase 5.Glutationa peroxidase 6.Catalase

USP/FM/DBD-489/17

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Ingrid, minha maior incentivadora, pela ajuda e compreensão nos momentos de ausência. Minha mãe, Deinha, pelo estímulo aos estudos e aos meus filhos, Liz e Lars, pelo carinho e incentivo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter guiado os meus passos e ter me sustentado até aqui em todas as circunstâncias com a sua força divinal.

A minha orientadora Profa. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz pelas suas contribuições, transmitindo-me seus conhecimentos e vivências.

Ao Prof.Dr. Vicente Odoni Filho coordenador da Pós-Graduação do Departamento de Pediatria – FMUSP, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Dr. Marco Cianciarullo por ter facilitado a obtenção dos dados dessa pesquisa no Hospital e Maternidade de Barueri.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira pelo apoio e facilidades na realização dos exames laboratoriais no “Laboratório de Bioquímica Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – USP”

Ao Sr. Douglas Nesadal pela sua dedicação e colaboração nas dosagens laboratoriais.

A Sra. Rosângela pela ajuda na formatação do trabalho.

A Sra. Mariza Kazue pela ajuda constante na bibliografia desta dissertação.

Ao Sr. Nivaldo pelo auxílio na impressão.

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”

(Martin Luther King)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos.....	3
1.2. Malondialdeído.....	4
1.3. Superóxido Dismutase.....	4
1.4. Catalase.....	4
1.5. Glutathione Peroxidase.....	4
2 JUSTIFICATIVA.....	6
3. HIPÓTESE.....	8
4 OBJETIVOS.....	10
4.1. Geral.....	11
4.2. Específicos.....	11
5 CASUÍSTICA.....	12
6 METODOLOGIA.....	18
6.1. Caracterização da Amostra.....	18
6.2. Coleta de material.....	20
6.3. Metodologia estatística.....	20
7 RESULTADOS.....	23
8 DISCUSSÃO.....	29
9 CONCLUSÃO.....	33
10 ANEXOS.....	35
11 REFERÊNCIAS.....	43

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP=	Adenosina monofosfato
CAT=	Catalase
GPX=	Glutathione peroxidase
GPx1=	Glutathione peroxidase 1
H ₂ O ₂ =	Peróxido de hidrogênio
HIV=	Vírus da Imunodeficiência Humana
IG=	Idade gestacional
IVH=	Hemorragia intraventricular
MDA=	Malondialdeído
NEC=	Enterocolite necrosante
O ₂ ⁻ =	Superóxido
OH ⁻ =	Radical hidroxila
PaO ₂ =	Pressão parcial de oxigênio
PN=	Peso de nascimento
RN=	Recém-nascido
RNPT=	Recém-nascido pré-termo
ROP=	Retinopatia da prematuridade
SDR=	Síndrome do desconforto respiratório
SNP=	Sepse neonatal precoce
SOD=	Superóxido dismutase
TORCHS=	Toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpesvírus e sífilis
USP=	Universidade São Paulo
UTIN=	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização demográfica dos RN do estudo de acordo com a presença ou não de risco para sepse neonatal: população do estudo.....	12
Tabela 2	Caracterização demográfica dos RN do estudo de acordo com a presença ou não de risco para sepse neonatal: aspectos neonatais.....	13
Tabela 3	Caracterização demográfica dos RN do estudo de acordo com a presença ou não de risco para sepse neonatal: aspectos maternos.....	15
Tabela 4	Caracterização demográfica dos RN deste estudo de acordo com a presença ou não de fator de risco para sepse neonatal: Peso ao nascimento e Índice de APGAR.....	16
Tabela 5	Resultados do teste de normalidade – Teste de Shappiro-Wilk- (p-valores).....	23
Tabela 6	Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Sangue do cordão umbilical) segundo grupos.....	24
Tabela 7	Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Saliva nas 1 ^{as} 24 hrs) Segundo grupos.....	25
Tabela 8	Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Saliva nas entre 24 hrs e 48 hrs) Segundo grupos.....	25
Tabela 9	Estatísticas descritivas, e resultados do teste de Friedman – Grupo 1- com Fatores de Risco Maternos para sepse neonatal.....	26
Tabela 10	Estatísticas descritivas, e resultados do teste de Friedman – Grupo 1- sem Fatores de Risco Maternos para sepse neonatal.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos simplificados do estresse oxidativo.....	2
Figura 2	Bioquímica da peroxidação lipídica.....	3

Resumo

Coutinho FG. Avaliação do estresse oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical e saliva de recém-nascidos pré-termo com fatores de risco para sepse neonatal precoce [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Objetivos: Determinar a concentração do Marcador de Peroxidação Lipídica: Malondialdeído (MDA) e dos Marcadores Antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), Catalase (CAT); no sangue do cordão umbilical e na saliva não estimulada nas primeiras 24 e 48 horas de vida nos RNPT com e sem fatores de risco maternos para sepse neonatal precoce.

Casuística/Metodologia: Foram estudados 21 RNPT nascidos na Maternidade e provenientes do Serviço de Neonatologia do Hospital Municipal de Barueri, São Paulo. Os RNPT foram classificados em dois grupos: Grupo 1- RNPT de mães com fatores de risco maternos para sepse neonatal e Grupo 2- RNPT de mães sem fatores de risco maternos para sepse. Foram coletadas amostras de sangue do cordão umbilical e da saliva não estimulada nas primeiras 24 e 48 horas de vida para dosagem de MDA, SOD, CAL, GPX. **Resultados:** Na amostra houve prevalência do sexo feminino, de RNPT adequados para a idade gestacional. Quanto a necessidade de oxigênio (61,9%) utilizaram. Foi feito o diagnóstico de sepse presumida em 9,5%. Houve somente diferença estatística na variável GPX no grupo 1.). **Conclusão:** Os dados deste estudo apontam para um aumento da concentração da GPX no sangue da veia umbilical dos RNPT do grupo das mães com fatores de risco maternos para sepse neonatal precoce. Sem significância estatística na comparação da saliva e o sangue do cordão umbilical. Não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis MDA, SOD, CAT entre os dois grupos tanto na saliva de 24 e 48 horas de vida quanto no sangue do cordão umbilical.

A dosagem de GPX o sangue do cordão umbilical pode ser uma possível ferramenta diagnóstica para identificar de forma mais rápida a suspeição de sepse neonatal precoce do RNPT de mãe com fator de risco para sepse neonatal precoce sem produzir maior estresse ao paciente.

Descritores: estresse oxidativo; recém-nascido prematuro; malondialdeído; superóxido dismutase; glutathione peroxidase; catalase.

Abstract

Coutinho FG. *Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Enzymatic System Activity in umbilical cord blood and saliva of Preterm Newborns with risk factors for Early Neonatal Sepsis* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Objectives: To determine the concentration of the Lipid Peroxidation Marker: Malondialdehyde (MDA) and Antioxidant Markers: Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), Catalase (CAT); in umbilical cord blood and non-stimulated saliva in the first 24 and 48 hours of life in Pre-Term Newborns (PTN) with and without maternal risk factors for early neonatal sepsis. **Casuistic / Methodology:** Twenty - one PTN born at the Maternity Hospital and from the Neonatal Service of the Municipal Hospital of Barueri, São Paulo, Brazil, were studied. Preterm infants were classified into two groups: Group 1 - Preterm infants of mothers with maternal risk factors for neonatal sepsis and Group 2 - Preterm infants of mothers without maternal risk factors for sepsis. Blood samples from umbilical cord and non-stimulated saliva were collected in the first 24 and 48 hours of life for dosage of MDA, SOD, CAT, GPX. **Results:** In the sample, there was a prevalence of female, preterm infants suitable for gestational age. Regarding the need for oxygen (61.9%) they used. The diagnosis of presumed sepsis was made in 9.5%. There was only statistical difference in the GPX variable in group 1. **Conclusion:** The data from this study point to an increase in GPX concentration in the umbilical vein blood of the PTNB group of mothers with maternal risk factors for early neonatal sepsis. No statistical significance in the comparison of saliva and umbilical cord blood. There was no statistically significant difference in the MDA, SOD, and CAT variables between the two groups in both saliva of 24 and 48 hours of life and in umbilical cord blood.

The measurement of GPX umbilical cord blood may be a possible diagnostic tool to more quickly identify the suspicion of early neonatal sepsis of the PTN from a mother with maternal risk factor for early neonatal sepsis without producing greater stress to the patient.

Descriptors: oxidative stress; infant, premature; malondialdehyde; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; catalase.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, o diagnóstico precoce de sepse neonatal não tem tido avanços significativos, o que se reflete em incidência elevada e crescente (GARENNE 2013). Houve a duplicação da incidência de 4.5 para 9.7 casos por 1.000 nascimentos, entre 1995 a 2005 (HARTMAN 2013). Desse modo é de grande importância a identificação dos fatores de risco para sepse neonatal precoce (SNP) para um rápido diagnóstico (ESCOBAR 2013)

Há vários fatores de risco que contribuem para o processo infeccioso neonatal. Dentro destes fatores de risco, temos: maternos, neonatais e ambientais.

Dos fatores maternos, a presença de microorganismos colonizados no trato genitourinário materno podem chegar ao feto, pela via transplacentária, ou ao RN através do canal de parto. Dentro dos fatores que incrementam o risco de infecção neonatal, destacamos:

- 1) Rotura prematura de membranas superior a 18 horas.
- 2) Febre materna, com temperatura axilar $>38^{\circ}\text{C}$.
- 3) Corioamnionite.

Dos fatores neonatais, destacamos dois pontos importantes que favorecem o dano tecidual, coadjuvante ao processo infeccioso:

- Imaturidade do Sistema antioxidante.
- Stress oxidativo : resultado da hiperóxia pela transição da vida intrauterina (meio hipóxico) para vida extrauterina. (SAUGSTAD 2012).

Dos fatores ambientais, destacamos situações que quebram a barreira:

- Pulmonar: uso de cânulas.
- Cutânea: uso de scalp, cateteres, drenos.
- Higienização das mãos.
- Ausência de aleitamento materno.

1.1. Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos

Os RNPT são mais propensos a desenvolverem estresse oxidativo em relação a crianças e adultos pela maior susceptibilidade a infecções e/ou inflamações e imaturidade do sistema antioxidante (MUTINATI *et al* 2013). O stress oxidativo esta relacionado principalmente as espécies reativas de oxigênio decorrentes da exposição a elevada concentração de oxigênio. A transição do meio intrauterino com pressão parcial de oxigênio (PaO_2) de 20 a 25 mmHg para o ambiente extra-uterino com a PaO_2 cerca de 100 mmHg (TORRES-CUEVAS 2016) aumenta a produção dos radicais de oxigênio reativo que pode ser detectado no sangue do cordão umbilical ao nascimento. (TORRES-CUEVAS 2017).

A exacerbação de radicais livres em contrapartida a menor resposta antioxidante promove desequilíbrio da homeostase dos sistemas oxidativos e antioxidante. Há portanto stress oxidativo. Este, por sua vez, é representado pela formação de O_2^- (supeóxido); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e radical OH^- (hidroxila).

Figura 1: Mecanismos simplificados do Estresse Oxidativo.

Portanto a elevada concentração de oxigênio, períodos de hipóxia durante o trabalho de parto e o estresse oxidativo provocam um desequilíbrio com o sistema antioxidante (MARSEGLIA 2014). Durante o nascimento a presença de hipóxia/isquemia promove a produção de hipoxantina a partir da lise da adenosina monofosfato (AMP), com a reperfusão tecidual e presença do oxigênio em altas concentrações. Segundo a figura 1, a hipoxantina é oxidada em urato, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que na presença de ferro livre sérico pela reação de Haber-Weiss, produz o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (PERRONE 2016), altamente reativo, capaz de gerar danos ao DNA, causar peroxidação lipídica, alterações na estrutura proteica, alteração da permeabilidade vascular, fibrose arteriocapilar secundária a peroxidação lipídica (VENTO 2014, KALVANARAMAN 2013, SAUGSTAD 2014).

Figura 2: Bioquímica da Peroxidação lipídica.

Fonte: Yuan, et al, 2012.

Os RN Pré-termo são mais propensos a desenvolverem estresse oxidativo em relação aos RN a termo pela maior susceptibilidade a infecções, inflamações e imaturidade do sistema antioxidante (MUTINATI et al 2013).

Como o estresse oxidativo provoca a apoptose das células proliferativas? Muitas doenças neonatais e complicações incluindo síndrome

do desconforto respiratório (SDR), enterocolite necrosante (NEC), retinopatia da prematuridade (ROP) e hemorragia intraventricular (IVH) estão associadas a produção de espécies de oxigênio reativo e redução da atividade antioxidante enzimática, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em RNPT (NEGI et al., 2012).

Os RNPT não possuem níveis adequados de antioxidantes, devido à interrupção da transferência placenta-feto e a produção endógena é insuficiente (DANI,2014). A atividade de Glutathione peroxidase (GPX) no RNPT é duas a seis vezes maior, enquanto que a atividade da catalase é três vezes menor nos tecidos neonatais em comparação com os adultos. (BAJCETIC 2014).

1.2. Malondialdeído

O malondialdeído (MDA) constitui um marcador importante, pois é um metabólito direto da peroxidação lipídica. Esse aldeído é uma molécula altamente tóxica, sua interação com o DNA e as proteínas é frequentemente referida como potencialmente mutagênica e aterogênica (ABDEL GHANY 2016), sendo sua fonte principal a peroxidação enzimática dos lipídeos poliinsaturados (PORTER 1995) e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação dos radicais de oxigênio reativo, metais de transição e outros radicais livres (BARRERA 2012).

O MDA é o indicador mais utilizado para avaliar o estresse oxidativo medido em sangue de cordão umbilical (EL BANA, 2016,BASU 2014), sangue periférico (BUONOCORE, 1998) e saliva (MOORE 2013).

1.3. Superóxido Dismutase

A SOD é uma metaloproteína com poder antioxidante enzimático potente. Possui 3 isoformas: a primeira que contém cobre e zinco, presente citoplasma, a segunda que contém manganês e esta presente na mitocôndria e a terceira isoforma presente no meio intracitoplasmático, no RN , passando a o meio extracelular ao chegar a idade adulta (BAR-OR 2015). Todas as isoformas promovem a conversão do superóxido (espécies de oxigênio reativo) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (ZELKO 2002). Durante a consulta da bibliografia foram achados poucos artigos sobre a

medição desta enzima durante a sepse neonatal em sangue do cordão umbilical e nenhum em saliva.

1.4. Catalase

A CAT chamada também de hidroperoxidase, está presente no meio intracelular sendo produzida em sua maior parte no fígado. Ela está presente nos citoplasma das células, principalmente os eritrócitos que, na presença de ferro livre, catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (IWASE 2013). Foram encontrados poucos dados na pesquisa da bibliografia sobre catalase no sangue do cordão umbilical e nenhum saliva não estimulada de RNPT com e sem sepse.

1.5. Glutathione Peroxidase

A GPX é uma enzima antioxidante, descoberta por (MILLS 1957), expressa praticamente em todas as células, sua atividade biológica principal é proteger o organismo contra danos oxidativos através da detoxificação dos peróxidos na presença do selênio. Ela apresenta 8 isoformas sendo a glutathione peroxidase 1 (GPx1) a versão mais abundante, encontrada no citoplasma, promovendo a redução do peróxido de hidrogênio em água. Após a pesquisa da bibliografia foram vistos poucos trabalhos com sangue do cordão umbilical (NEJAD 2016, AHMED 2017) e não foram achados artigos com medição da GPX e saliva de RNPT com risco de sepse.

2. JUSTIFICATIVA

A homeostase entre o stress oxidativo e o sistema antioxidante tem sido estudado.

Situações que induzem o stress oxidativo, como a sepse neonatal, podem ser o contrapeso que leve ao desequilíbrio desta homeostase promovendo o dano oxidativo.

Deste modo, resolvemos realizar um estudo para verificar o comportamento da homeostase entre o stress oxidativo e o Sistema antioxidante em uma situação sem o stress oxidativo (controle) e uma situação de stress oxidativo, com RN com sepse neonatal.

3. HIPÓTESE

A nossa hipótese é que os RNPT de mães com fatores de risco maternos (Rotura Prematura de Membranas ≥ 18 horas; Febre Materna acima de 38°C ; Corioamnionite) para sepse apresentavam desequilíbrio homeostático entre stress oxidativo e sistema antioxidante que possa ser mensurada nas concentrações de MDA e enzimas antioxidantes no sangue e na saliva, em 2 tempos, nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Dosar e comparar a concentração de MDA (marcador de peroxidação lipídica), superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase (marcadores antioxidantes) em sangue do cordão umbilical e na saliva dos RNPT de mães com e sem fatores de risco maternos para sepse neonatal precoce.

4.2. Específicos

- Analisar se há diferença na concentração do MDA e dos marcadores antioxidantes no sangue do cordão umbilical e na saliva não estimulada nas 1^{as} 24h de vida e entre 24 e 48 horas de vida de RNPT de mães com fatores de risco maternos para infecção em relação àquelas sem fatores de risco para sepse neonatal precoce.

5. CASUÍSTICA

Modelo de estudo

Este é um estudo transversal prospectivo.

Local do estudo

O estudo foi realizado na maternidade e no setor de neonatologia do Hospital Municipal de Barueri Dr. Francisco Moran. Este é um hospital de média complexidade com 288 leitos, com UTI adulto, UTI pediátrica, UTI neonatal, além de ambulatórios médicos especializados. Que dá o suporte a todas unidades básicas de saúde do município de Barueri.

População do estudo

A população estudada foram de 21 RN prematuros. Caracterizada conforme a tabela abaixo.

Tabela 1 - Caracterização demográfica dos RN do estudo de acordo com a presença ou não de risco para sepse neonatal: população do estudo.

	CAPURRO	SEXO	CLASS PELO PESO
GRUPO 1	31s 2d	masculino	AIG
	36s 2d	feminino	AIG
	34s 1d	feminino	AIG
	36s 1d	feminino	AIG
	36s 4d	feminino	AIG
	36s	feminino	AIG
	36s 4d	feminino	AIG
	36s 1d	masculino	AIG
	36s 4d	feminino	AIG
	35s 4d	masculino	AIG
	30s 4d	masculino	AIG
	30s 6d	masculino	AIG
GRUPO 2	33s 2d	feminino	PIG
	35s 5d	masculino	PIG
	36s 1d	masculino	GIG
	35s 4d	masculino	PIG
	36s 5d	feminino	AIG
	36s 5d	feminino	AIG
	34s 5d	masculino	GIG
	35s 6d	feminino	AIG
	33s 6d	masculino	PIG

AIG= adequado para a idade gestacional; PIG=pequeno para a idade gestacional; GIG=grande para a idade gestacional.

Período de estudo

Realizado coleta dados de junho a julho de 2016.

Critérios de Inclusão

- RNPT (≤ 37 semanas de idade gestacional) de mães com e sem fatores de risco maternos para sepse neonatal precoce.
- Aceite do termo de consentimento livre esclarecido assinado pelos responsáveis.

Critérios de Exclusão

- RNPT portador infecção congênita do grupo TORCHS (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpesvírus e sífilis) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); portadores de malformações congênitas.
- RNPT com asfixia perinatal.
- RNPT com icterícia. (AYYAPPAN 2015, BASU 2014).
- Mãe tabagista.
- RNPT submetidos a fototerapia.

Tabela 2 – Caracterização demográfica dos RN do estudo de acordo com a presença ou não de risco para sepse neonatal: aspectos neonatais.

Variáveis	Com fatores		Sem fatores		Total	
	n	%	n	%	n	%
Gênero						
Masculino	5	41,7	5	55,6	10	47,6
Feminino	7	58,3	4	44,4	11	52,4
Classificação pelo peso de nascimento						
PIG	-	-	4	44,4	4	19,0
AIG	12	100,0	3	33,3	15	71,4
GIG	-	-	2	22,2	2	9,5
Uso de Oxigênio 100% ao nascimento						
Sim	9	75,0	4	44,4	13	61,9
Não	3	25,0	5	55,6	8	38,1
Fototerapia nas 1^{as} 48h de vida.						
Sim	-	-	-	-	-	-
Não	12	100,0	9	100,0	21	100,0
Sepse presumida						
Sim	2	16,7	-	-	2	9,5
Não	10	83,3	9	100,0	19	90,5
Sofrim. Neonatal						
Sim	-	-	3	33,3	3	14,3
Não	12	100,0	6	66,7	18	85,7
Total	12	100,0	9	100,0	21	100,0

Tabela 3 – Caracterização demográfica dos RN deste estudo de acordo com a presença ou de fator de risco para sepse neonatal: aspectos maternos.

Variáveis	Com fatores		Sem fatores		Total	
	n	%	n	%	n	%
Número de gestações						
Uma	7	58,3	-	-	7	33,3
Duas	3	25,0	5	55,6	8	38,1
Quatro	2	16,7	2	22,2	4	19,0
Cinco	-	-	2	22,2	2	9,5
Tipo de parto						
Normal	7	58,3	-	-	7	33,3
Cesárea Elet.	3	25,0	3	33,3	6	28,6
Cesárea Emerg.	2	16,7	6	66,7	8	38,1
Tabagismo						
Sim	-	-	-	-	-	-
Não	12	100,0	9	100,0	21	100,0
Etilismo						
Sim	-	-	-	-	-	-
Não	12	100,0	9	100,0	21	100,0
Uso de corticoide						
Sim	4	33,3	1	11,1	5	23,8
Não	8	66,7	8	88,9	16	76,2
Rotura Prematura Membranas						
Sim	4	33,3	-	-	4	19,0
Não	8	66,7	9	100,0	17	81,0

Febre materna						
Sim	-	-	-	-	-	-
Não	12	100,0	9	100,0	21	100,0
Corioamnionite						
Sim	2	16,7	-	-	2	9,5
Não	10	83,3	9	100,0	19	90,5
Total	12	100,0	9	100,0	21	100,0

Tabela 4 – Caracterização demográfica dos RN deste estudo de acordo com a presença ou não de fator de risco para sepse neonatal: Peso ao nascimento e Índice de APGAR.

Grupos	Variáveis	n	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão
Com fatores	Peso ao nascer (g)	12	1390,00	3270,00	2355,00	2308,33	587,62
	Apgar 5º minuto	12	8,00	10,00	9,00	9,25	0,75
	Apgar 10º minuto	2	9,00	10,00	9,50	9,50	0,71
Sem fatores	Peso ao nascer (g)	9	1270,00	3855,00	2235,00	2356,67	768,14
	Apgar 5º minuto	9	8,00	10,00	9,00	9,22	0,67
	Apgar 10º minuto	1	9,00	9,00	9,00	9,00	-
TOTAL	Peso ao nascer (g)	21	1270,00	3855,00	2300,00	2329,05	653,09
	Apgar 5º minuto	21	8,00	10,00	9,00	9,24	0,70
	Apgar 10º minuto	3	9,00	10,00	9,00	9,33	0,58

6. METODOLOGIA

Delineamento do estudo

Tratou-se de um estudo tipo transversal onde foram coletadas informações de todos os nascimentos, no período de 01 junho a 31 de julho de 2016. As informações foram colhidas no prontuário e junto as gestantes, na sala de parto e na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Municipal de Barueri, São Paulo.

Crítérios para diagnóstico de sepse

SEPSE PRESUMIDA: É uma resposta inflamatória neonatal generalizada decorrente da infecção presumida ou comprovada e presença de dois dos quatro critérios: hipertermia ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e anormalidades na contagem de leucócitos (WYNN 2016).

SEPSE COMPROVADA: É a presença de sepse presumida associada ao resultado positivo de hemocultura. (WYNN 2016).

SEPSE NEONATAL PRECOCE: Quando os sintomas e sinais clínicos da sepse clínica se manifestam nas primeiras 72 horas de vida. Provavelmente adquirida através dos microorganismos presentes no canal do parto materno (GOLDSTEIN 2005).

Caracterização da amostra

Baseado em evidências na literatura (CANCELIER 2009) que o grupo de risco para sepse neonatal precoce teria uma dosagem de MDA média de 10.1 e desvio padrão de 2.8 e o grupo sem fatores de risco maternos uma média 4.2 e desvio-padrão de 2.5, para uma probabilidade de se cometer erro alfa de 5% e um poder estatístico de 80% seriam necessários 7 RNPT em cada grupo. Para efeito de margem de segurança foram estudados 21 RNPT entre 30 a 36 semanas de gestação.

6.4. Determinação dos grupos

Todo os RNPT foram classificados em 2 grupos. Grupo I: constituído por RNPT de mães com fatores de risco maternos para sepse neonatal precoce; Grupo II: constituído por RNPT de mães sem fatores de risco maternos para infecção.

Implicações éticas

Neste estudo antes do parto foi contactado o responsável legal ou a gestante para explicação do estudo e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética FMUSP (anexo 1), recebeu autorização para pesquisa no Hospital Municipal de Barueri (anexo 2) e foi aprovado pela Plataforma Brasil.

Metodologia

Após exclusão de 10 RNPT, dos quais 3 com má-formações congênitas, 4 portadores de sífilis neonatal, 2 portadores de toxoplasmose congênita e 1 com asfixia perinatal. Foram estudados de 21 RNPT entre 30 a 36 semanas de gestação, nascidos na Maternidade e provenientes do setor de Neonatologia do Hospital Municipal de Barueri, São Paulo, de junho a julho de 2016.

Os recursos financeiros empregados neste estudo foram do próprio mestrando.

Foram utilizados os parâmetros da normalidade de acordo com o peso de nascimento (PN), gênero e idade gestacional (IG) pelo Capurro.

A idade gestacional foi confirmada pela Capurro. Em todos os RNPT foram coletados os dados de acordo com questionário padrão, que continha: 1-Antecedentes maternos e obstétricos (idade, peso, altura, número de consultas de pré-natal, número de gestações prévias, tipo de parto, abortos, presença de doenças sistêmicas, tabagismo, etilismo, uso de medicações durante a gestação. 2- Fatores de risco para infecção neonatal: Rotura Prematura de Membranas $\geq$ 18 Horas, febre materna acima de 38°C, Corioamnionite. 3-Antecedentes neonatais (gênero, data de nascimento, peso e estatura ao nascer, índice de APGAR no 5º e 10º minuto de vida, uso de oxigênio complementar, diagnóstico de sepse neonatal precoce presumida e/ou comprovada, necessidade de fototerapia).

Coleta de Material

Após o clampeamento tardio do cordão umbilical e dequitação da placenta de cada parto de mãe de RNPT, foi coletado na sala de parto 10 ml de sangue do cordão umbilical através da punção da veia umbilical, em tubo heparinizado. No RN foi colhido 1ml de saliva não estimulada, para que não houvesse influência de fatores externos, como o estresse, nas idades de 24 e 48 horas de vida através de aspiração direta a vácuo em tubo seco. As amostras foram centrifugadas e armazenadas em freezer a -70°C sendo posteriormente encaminhada ao Laboratório de Bioquímica Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – USP- sob a responsabilidade do Prof.Dr. Fernando Neves Nogueira. Foram realizadas as análises por espectrofotometria da GPX (PUNCHARD 1996), SOD (PAOLLETI 1986). As análises do MDA foram realizadas pela estimativa das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (ESTERBAUER 1990) e a da CAT pela decomposição do peróxido de hidrogênio (AEBI 1984).

Metodologia estatística

Comparação das Variáveis entre os Grupos

Para se testar a diferença entre uma variável métrica entre dois grupos, geralmente seria utilizado o teste t para médias (paramétrico), mas para se utilizar tal teste, alguns requisitos são necessários, o principal deles é que os dados tenham distribuição normal (GAUSS).

Para isso, é aplicado um teste de normalidade, no caso o teste de Shapiro-Wilk. A hipótese a ser testada é de que os dados apresentam distribuição normal, quando o p-valor for menor que 0,05 rejeita-se esta hipótese, ou seja, os dados não são distribuídos normalmente.

Se a hipótese de normalidade for rejeitada, será utilizado um teste não paramétrico, no caso o teste de Mann-Whitney. A hipótese a ser testada é de que os dados entre os grupos são semelhantes, quando o p-valor for menor do que 0,05, rejeita-se esta hipótese, ou seja, há diferença entre os grupos testados.

As técnicas não-paramétricas têm diversas vantagens sobre os métodos paramétricos, uma delas é que não exigem todos os pressupostos restritivos dos testes paramétricos, muito menos exigem que as variáveis venham de uma distribuição Normal. Precisamos somente que as variáveis sejam ordenáveis, para aplicarmos os postos ou ordem. Os testes são feitos em cima destes postos, e não dos valores reais das observações, e são realizados de modo relativamente rápido para pequenas amostras. O uso de postos torna as técnicas não-paramétricas menos sensíveis aos erros de medidas e a valores extremos do que os testes paramétricos.

Comparação das Variáveis entre os Momentos

Devido as quebras da hipótese de normalidade nas variáveis nos 3 momentos, será aplicado o teste não-paramétrico de Friedman. Este teste é utilizado para comparar dados amostrais pareados, ou seja, quando o mesmo indivíduo é avaliado mais de uma vez. O teste de Friedman não utiliza os dados numéricos diretamente, mas sim os postos ocupados por eles após a ordenação feita para cada grupo separadamente.

A hipótese a ser testada é de que as variáveis nos 3 momentos tem a mesma distribuição, quando o p-valor é significativo ($<0,050$), rejeita-se esta hipótese, ou seja, as variáveis testadas não tem a mesma distribuição.

7. RESULTADOS

Trata-se de um estudo tipo transversal prospectivo no qual foram estudados 21 recém-nascidos pré-termo de acordo com os critérios de inclusão, distribuídos em 2 grupos. Que foram avaliados em 3 momentos: ao nascimento, nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida.

Os resultados estão divididos entre a comparação dos grupos 1 e 2. E a comparação entre os 3 momentos nesses 2 grupos.

Comparação das Variáveis entre os Grupos

Realizado o teste de Shapppiro-Wilk nos dois grupos para definição de quais ferramentas estatísticas a ser utilizadas.

Observou-se que houve quebra da hipótese de normalidade em algumas variáveis (tabela 5). Nestes casos será aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nas demais variáveis será aplicado o teste t para médias.

Tabela 5 – Resultados do teste de normalidade – Teste de Shappiro-Wilk- (p-valores)

Variáveis	Grupos	
	Com fatores	Sem fatores
MDA (Sangue de cordão umbilical)	0,702	0,007*
Catalase (Sangue de cordão umbilical)	0,838	0,675
Glutationa Peroxidase (Sangue de cordão umbilical)	0,015*	0,686
SOD (Sangue de cordão umbilical)	0,384	0,415
MDA (Saliva 24 horas)	0,099	0,005*
Catalase (Saliva 24 horas)	0,000*	0,393
Glutationa Peroxidase (Saliva 24 horas)	0,132	0,638
SOD (Saliva 24 horas)	0,694	0,124
MDA (Saliva 48 horas)	0,507	0,255
Catalase (Saliva 48 horas)	0,070	0,030*
Glutationa Peroxidase (Saliva 48 horas)	0,782	0,136
SOD (Saliva 48 horas)	0,029*	0,305

* p-valor < 0,05, rejeita-se a hipótese de normalidade.

Foi encontrada diferença estatística significativa somente na variável “Glutathione Peroxidase” do sangue do cordão umbilical. Nesta variável pode-se dizer que o grupo “Com fatores de risco” apresentam maiores valores de Glutathione Peroxidase do que o grupo sem fatores (tabela 6).

Tabela 6 – Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Sangue do cordão umbilical) segundo grupos

Variáveis (Sangue)	Grupos	Mediana	Média	Desvio-padrão	p-valor
MDA	Com fator	0,0271	0,0281	0,0052	0,286**
	Sem fator	0,0313	0,0295	0,0041	
Catalase	Com fator	0,1896	0,1922	0,0374	0,366*
	Sem fator	0,1487	0,1628	0,0875	
Glutathione Peroxidase	Com fator	0,2285	0,2465	0,1793	0,019**
	Sem fator	0,0791	0,0792	0,0220	
SOD	Com fator	0,0051	0,0054	0,0016	0,067*
	Sem fator	0,0039	0,0041	0,0014	

* Teste t para médias

** Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatística nas variáveis testadas (MDA;CAT;GPX;SOD) na saliva das 1^{as} 24h e entre 24h e 48h de vida nos 02 grupos (tabela 7).

Tabela 7 – Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Saliva nas 1^{as} 24 hrs) segundo grupos

Variáveis (Saliva 24h)	Grupos	Mediana	Média	Desvio- padrão	p-valor
MDA	Com fator	0,0153	0,0175	0,0071	0,522**
	Sem fator	0,0147	0,0136	0,0043	
Catalase	Com fator	0,0090	0,0119	0,0079	0,201**
	Sem fator	0,0124	0,0126	0,0044	
Glutathiona Peroxidase	Com fator	0,0941	0,1057	0,0351	0,071*
	Sem fator	0,1339	0,1320	0,0250	
SOD	Com fator	0,9950	1,0637	0,3048	0,053*
	Sem fator	1,2510	1,3579	0,3462	

* Teste t para médias

** Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatística nas variáveis testadas (MDA;CAT;GPX;SOD) na saliva das 1^{as} 24h e entre 24h e 48h de vida entre os 02 grupos (tabela 8).

Tabela 8 – Estatísticas descritivas, e resultados dos testes de comparação – (Saliva 48 hrs) segundo grupos

Variáveis (Saliva 48h)	Grupos	Mediana	Média	Desvio- padrão	p-valor
MDA	Com fator	0,0136	0,0140	0,0017	0,992*
	Sem fator	0,0157	0,0140	0,0056	
Catalase	Com fator	0,0138	0,0160	0,0091	0,943**
	Sem fator	0,0112	0,0157	0,0089	
Glutational Peroxidase	Com fator	0,1198	0,1200	0,0346	0,194*
	Sem fator	0,1241	0,1462	0,0548	
SOD	Com fator	1,0290	1,3223	0,5757	0,356**
	Sem fator	0,9930	1,0673	0,3615	

* Teste t para médias

** Teste de Mann-Whitney

Comparação das Variáveis entre os Momentos

Foi realizado o Teste não paramétrico de Friedman. Para a comparação das variáveis (MDA;CAT;GPX;SOD) nos 3 momentos: ao nascimento, nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida.

Observado no grupo com fatores de risco (tabela 9) significância estatística entre os momentos nas variáveis: MDA, CAT e SOD. Pode-se dizer que:

- MDA e CAT se comportam de maneira semelhante. Os maiores valores estão no sangue do cordão umbilical. Já entre a Saliva nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida não há diferença nestas variáveis.
- SOD: os menores valores estão no sangue do cordão umbilical. Já entre a Saliva nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida não há diferença, mas nestes dois momentos os valores são maiores do que no sangue do cordão umbilical.

Tabela 9 – Estatísticas descritivas, e resultados do teste de Friedman – Grupo 1- com Fatores de Risco Maternos para sepse neonatal.

Variáveis	Momentos	Mediana	Média	Desvio-padrão	p-valor
MDA	Sangue	0,0271	0,0281	0,0052	0,001
	Saliva 24hrs	0,0153	0,0175	0,0071	
	Saliva 48hrs	0,0136	0,0140	0,0017	
Catalase	Sangue	0,1896	0,1922	0,0374	0,000
	Saliva 24hrs	0,0090	0,0119	0,0079	
	Saliva 48hrs	0,0138	0,0160	0,0091	
Glutathione Peroxidase	Sangue	0,2285	0,2465	0,1793	0,779
	Saliva 24hrs	0,0941	0,1057	0,0351	
	Saliva 48hrs	0,1198	0,1200	0,0346	
SOD	Sangue	0,0051	0,0054	0,0016	0,000
	Saliva 24hrs	0,9950	1,0637	0,3048	
	Saliva 48hrs	1,0290	1,3223	0,5757	

No grupo sem fatores (tabela 10) foi observado significância estatística entre os momentos em todas as variáveis. Pode-se dizer que:

- MDA e CAT se comportam de maneira semelhante. Os maiores valores estão no sangue do cordão umbilical. Já entre a nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida não há diferença nestas variáveis.
- GPX e SOD se comportam de maneira semelhante. Os menores valores estão no sangue do cordão umbilical. Já entre a Saliva nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida não há diferença, mas nestes dois momentos os valores são maiores do que no sangue do cordão umbilical.

Tabela 10 – Estatísticas descritivas, e resultados do teste de Friedman –
Grupo 2 - sem Fatores de Risco Maternos para sepse neonatal.

Variáveis	Momentos	Mediana	Média	Desvio-padrão	p-valor
MDA	Sangue	0,0313	0,0295	0,0041	0,001
	Saliva 24hrs	0,0147	0,0136	0,0043	
	Saliva 48hrs	0,0157	0,0140	0,0056	
Catalase	Sangue	0,1487	0,1628	0,0875	0,001
	Saliva 24hrs	0,0124	0,0126	0,0044	
	Saliva 48hrs	0,0112	0,0157	0,0089	
Glutational Peroxidase	Sangue	0,0791	0,0792	0,0220	0,001
	Saliva 24hrs	0,1339	0,1320	0,0250	
	Saliva 48hrs	0,1241	0,1462	0,0548	
SOD	Sangue	0,0039	0,0041	0,0014	0,000
	Saliva 24hrs	1,2510	1,3579	0,3462	
	Saliva 48hrs	0,9930	1,0673	0,3615	

8. DISCUSSÃO

A homeostase do sistema oxidativo e o sistema antioxidativo na população neonatal é estudada há muitos anos. Sausgtad criou o termo doença dos radicais livres o que ajudou a explicar a patofisiologia da Síndrome do Desconforto Respiratório, Hemorragia Intraventricular, Retinopatia do Prematuro, Enterocolite Necrosante. (SAUGSTAD 2014).

Em nosso estudo todos os RNPT do grupo 1 (com fatores de risco materno) foram classificados de acordo com o peso de nascimento como adequados para a idade gestacional (AIG) e apresentaram maior concentração de GPX do que o grupo 2. Mirzarahimi et al mostrou, com significância estatística, que os níveis de GPX eram maiores nos RN adequados para a idade gestacional (MIRZARAHIMI 2016). Ahmed et al. descreveu uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre o peso de nascimento e a idade gestacional com as concentrações de GPX no RNPT (AHMED 2017). Já em contrapartida Santos et al. descreve que a concentração de GPX em RNPT saudáveis está ligada a idade gestacional quanto mais prematuro o recém-nascido menor concentração de GPX. (SANTOS 2017).

O MDA é um dos mais conhecidos produtos secundários de peroxidação lipídica. O MDA medido pela reatividade do ácido tiobarbitúrico é um índice sensível de estresse oxidativo que é bem conhecido e clinicamente utilizado (KARATAS 2002).

Yuksel et al. demonstrou que o sangue do cordão umbilical tem a concentração menor de MDA em comparação ao sangue periférico materno. Por provável efeito antioxidante da GPX e da CAT, que se encontravam em grande concentração no sangue de cordão umbilical (YUKSEL 2015).

Neste estudo mostramos que no grupo 1 houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,019$) na variável “GPX” no sangue do cordão umbilical. Sendo que 02 RNPT deste grupo evoluíram para sepse presumida por apresentarem corioamnionite.

Esses dados estão em concordância com ASCI et al.que reportou que há uma aumento significativo da GPX em casos de sepse neonatal clínica ou comprovada. Onde os níveis de peroxidação lipídica aumentam (ASCI 2015).

Molina et al. também demonstrou em um estudo na faixa pediátrica com 84 crianças, 42 com sepse clínica e 42 saudáveis. Que na presença de

sepse, mesmo que presumida, a concentração da GPX é maior ($P<0.001$), do que nos pacientes do grupo controle (MOLINA 2017).

No grupo 1 foram visualizadas concentrações maiores de MDA e CAT no sangue de cordão umbilical, sem diferença estatística na saliva nas 1^{as} 24, entre 24 e 48 horas de vida. De acordo com Bajcetic et al. que reportou um aumento, com significância estatística, da enzima antioxidante CAT no sangue de cordão em prematuros (BAJCETIC 2014). Mas não foram encontrados na literatura artigos sobre stress oxidativo na saliva de neonatos.

Mas Cipierre et al. encontrou concentrações, com significância estatística, maiores de MDA no sangue de cordão umbilical em RNPT. (CIPIERRE 2013). E Chakravarty et al. reportou que quanto mais prematuro o RN, mais imaturo o sistema antioxidante o que facilita o desequilíbrio oxidativo e o maior risco de sepse (CHAKRAVARTY 2012).

Neste estudo vimos a concentração de SOD no sangue do cordão umbilical estava mais reduzida em relação a concentração na saliva nas 1^{as} 24, entre 24 e 48 horas de vida. Em acordo com Dede et al. que mostrou redução da atividade da SOD no sangue de cordão umbilical por possível mecanismo de proteção antioxidante desta enzima contra o aumento da peroxidação lipídica (DEDE 2017).

Em nosso estudo utilizamos o sangue do cordão umbilical como parâmetro para avaliarmos a homeostase do sistema oxidante e antioxidante. Optamos pela saliva por não ser invasivo, disponível para coletas frequentes e por não oferecer estresse ao RN vislumbrando ser uma ferramenta diagnóstica e para acompanhamento da terapêutica contra sepse neonatal precoce.

No grupo 2 (sem fatores de risco materno) o MDA e a CAT no sangue do cordão umbilical se comportaram com concentrações semelhantes na saliva nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida. Em acordo com Yuksel et al. que relatou um estudo onde foram coletadas 30 amostras de sangue do cordão umbilical de RN saudáveis sendo analisado o MDA que se apresentava em concentrações baixas na hora do parto (YÜKSEL 2015). Mas não encontramos na literatura dados na saliva de recém-nascidos.

Mas a concentração de GPX e SOD foram menores no sangue do

cordão umbilical em relação a saliva nas 1^{as} 24 horas de vida e entre 24 e 48 horas de vida. De acordo com os estudos de Lazar et al. e Diaz Castro et al. que também demonstraram concentrações reduzidas de GPX e SOD em RNPT (LÁZAR 2015), (DIAZ- CASTRO 2015).

9. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo apontam para um aumento da concentração da GPX no sangue da veia umbilical dos RNPT do grupo das mães com fatores de risco para sepse em relação ao outro grupo. E não houve significância estatística na comparação da saliva e o sangue do cordão umbilical. Não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis MDA, SOD, CAT entre os dois grupos tanto na saliva de 24 e 48 horas de vida quanto no sangue do cordão umbilical.

A dosagem de GPX o sangue do cordão umbilical pode ser uma possível ferramenta diagnóstica para identificar de forma mais rápida a suspeição de sepse neonatal precoce do RNPT de mãe com fator de risco para sepse neonatal precoce sem produzir maior estresse ao paciente.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **01/10/2014**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **334/14** intitulado: **“AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO E ATIVIDADE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E SALIVA DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO COM FATORES DE RISCO PARA SEPSE NEONATAL PRECOCE.”** apresentado pelo Departamento de PEDIATRIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Edna Maria de Albuquerque Diniz
Pesquisador (a) Executante: Fábio Gonçalves Coutinho

CEP-FMUSP, 01 de Outubro de 2014.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 – Autorização do Hospital Municipal de Barueri.

Ofício nº 501/2016 - HMB

Barueri, 18 de maio de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Departamento de Neonatologia e a Diretoria Técnica do Hospital Municipal de Barueri – “Dr. Francisco Moran”, está ciente e de acordo com o Projeto de Pesquisa intitulado: “Avaliação do dano oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical e saliva de recém-nascidos pré-termo com fatores de risco para sepse neonatal precode”, do pesquisador Fábio Gonçalves Coutinho, do Programa de Mestrado em Pediatria do Instituto da Criança do HCFMUSP.

Desta forma autorizamos a coleta do material necessário para a realização do estudo em questão, desde que sejam respeitadas as normas éticas do hospital. Informamos ainda, que conforme discutido em reunião prévia com o Coordenador do Departamento de Neonatologia, a coleta será realizada por profissional médico por ele designado e toda a análise será feita no Instituto da Criança do HCFMUSP.

HOSPITAL MUNICIPAL DR. FRANCISCO MORAN
Dr. João Paulo Maffei Junior
Diretor Técnico
INSTITUTO DA CRIANÇA DO HCFMUSP

Dr. Marco Antonio Cianciarullo
Coord. Depto. Neonatologia

Anexo 3 – Brochura do Pesquisador**Disciplina de Pediatria Neonatal - Departamento de Pediatria****Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo - FMUSP****Brochura do Pesquisador**

Avaliação do Dano Oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue de cordão umbilical e saliva de Recém-Nascido com fatores de risco para Seps Neonatal Precoce.

Aluno: Fábio Gonçalves Coutinho

Orientadora: Prof. Dra. Edna Maria Albuquerque Diniz

Ficha Clínica

IDENTIFICAÇÃO

Nome/Cód: _____

Prontuário: _____

Endereço: _____ N° _____ Complemento: _____

Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____ CEP: _____

Cel: () _____ Tel: () _____

Nome da Mãe e/ou Responsável: _____

ANTECEDENTES**A)Materno e Obstétrico:**

Idade: _____ Data de Admissão: ____ / ____ / ____

Gesta: _____ Para: _____ Aborto: _____ Idade gestacional: _____

Hora Natal: _____

Pré-Natal: ()S ()N nº de consultas: _____

Internações Hospitalares: ()S ()N

Parto tipo: ()Normal ()Cesárea eletiva ()Cesárea emergencial

Tabagismo durante a gravidez: ()S ()N Etilismo Crônico: ()S ()N

Intercorrências: ()S ()N Qual:

- Doença Materna Crônica ()S ()N

Qual? _____

- Medicação contínua ()S ()N

Qual? _____

- Medicamentos no pré-natal: ()S ()N

Qual? _____

- Uso de corticóide antenatal: ()S ()N

Idade Gestacional do uso de corticoide: _____

- Estresse materno: ()S ()N - Sofrimento neonatal: ()S ()N

-Uso de Oxigêniooterapia: ()S ()N FIO₂ máx: _____

-Fatores de Risco:

- 1-Rotura de membranas ≥ 18 Horas. ()S ()N
 2-História prévia de mãe portadora de infecção pelo estreptococo Beta hemolítico do Grupo B ()S ()N
 3-Febre materna acima de 38°C. ()S ()N
 4-Fisometria. ()S ()N
 5-Dor uterina. ()S ()N
 6-Útero amolecido. ()S ()N
 7-Taquicardia fetal (≥ 170 bcf/min) ou materna. ()S ()N
 8-Leucocitose materna (> 13.000 leucócitos). ()S ()N
 9-Febre materna de origem desconhecida. ()S ()N
 10-Infecção urinária materna não tratada ou com tratamento $< 72h$. ()S ()N 11-
 Leucorréia materna. ()S ()N
 12-Quadro de sepse materna de qualquer origem. ()S ()N

B) Recém Nascido Pré-Termo:

Sexo: ()M ()F

Data do nascimento: ____ / ____ / ____ Horário: _____

Peso: _____g Estatura: _____cm

()PIG ()AIG ()GIG

Idade gestacional: _____

Índice de APGAR: 1ºminuto: _____ 5ºminuto: _____ 10ºminuto: _____

Oxigenioterapia: () Invasiva () Não invasiva FIO₂ máxima: _____%

Sepse () SIM ()NÃO

Necessidade de fototerapia () S ()N

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Disciplina de Pediatria Neonatal - Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo - FMUSP**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE: ESTADO:
CEP: TELEFONE: ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE: ESTADO:
CEP: TELEFONE: (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Avaliação do Dano Oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical e saliva de Recém-Nascido com fatores de risco para Seps Neonatal Precoce.

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz
Cargo/Função: Docente (RDIDP) do Departamento de Pediatria da FMUSP
Inscrição no Conselho Regional de Medicina: CREMESP 19327- SP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

Rubrica do sujeito de Pesquisa (Responsável)

Rubrica do Pesquisador

DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

Justificativa e Objetivos da Pesquisa:

Mãe, seu filho está sendo cuidado e acompanhado na UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal) do Hospital Municipal de Barueri nestes seus primeiros dias de vida, e junto com isto estarei desenvolvendo um estudo com o objetivo de avaliar as concentração de algumas substâncias no sangue e saliva que ajudam a prever doenças no bebê. Durante o parto irei coletar 5ml de sangue do cordão umbilical após seu corte. No setor de Neonatologia do Hospital Municipal de Barueri , será coletado nas primeiras 12 horas de vida, as amostras de 1 ml de saliva não estimulada por aspiração direta por vácuo gerando o mínimo de desconforto ao seu filho. Várias outras crianças da mesma idade do seu/sua filho (a) poderão ser beneficiadas com os resultados do estudo, pois os médicos, após a pesquisa, poderão prevenir o desenvolvimento de doenças graves ou infecções disseminadas. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você poderá ter acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas e direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Acrescento que não haverá despesas pessoais incluindo exames e consultas, não havendo também compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Se houver alguma intercorrência de saúde, com o seu filho participante, decorrente da pesquisa, este será atendido no HUCAM segundo o critério de assistência do mesmo. Também não há compensação financeira relacionada à participação na pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O principal investigador é a Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz que pode ser encontrada no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº 647, Cerqueira César, São Paulo- SP Telefone: (11) 2661-8500. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br

Rubrica do sujeito de Pesquisa (Responsável)

Rubrica do Pesquisador

O segundo investigador é o Dr. Fábio Gonçalves Coutinho que pode ser encontrado no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, na Av. Maruípe, s/n, Maruípe, Vitória – ES.Tel: (27) 3335-7100. Mãe, você tem liberdade de retirar o consentimento e, portanto, deixar de participar

do estudo a qualquer momento. As informações obtidas na pesquisa são confidenciais e asseguram o sigilo sobre a participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar identificação do paciente.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. “Avaliação do Dano Oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue de cordão umbilical e saliva de Recém-Nascido com fatores de risco para Sepse Neonatal Precoce.”

Eu discuti com o Dr. Fábio Gonçalves Coutinho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo.

Data ____ / ____ / ____

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel Ghany, E.A.G., et al. "Anti-oxidant profiles and markers of oxidative stress in preterm neonates." *Paediatrics and International Child Health* 36.2 (2016): 134-140.
2. Aeibi H. Catalase. In: Bergmeyer HV (ed.). *Methods in enzymatic analysis*. N Y Acad Press, 1983;276–80.
3. Ahmed AE-A, Abd-Elmawgood EA, Hassan MH. Circulating Protein Carbonyls, Antioxidant Enzymes and Related Trace Minerals among Preterms with Respiratory Distress Syndrome. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 2017;11(7):BC17-BC21.
4. Asci, Ali, et al. "Oxidant and antioxidant status in neonatal proven and clinical sepsis according to selenium status." *Pediatrics International* 57.6 (2015): 1131-1137.
5. Ayyappan, S., et al. "Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 7.5 (2015): 16.
6. Bajcetic, Milica, Snežana Spasic, and Ivan Spasojevic. "Redox therapy in neonatal sepsis: reasons, targets, strategy, and agents." *Shock* 42.3 (2014): 179-184.
7. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*. 2012;2012:137289.
8. Basu, S., et al. "Lipid peroxidation, DNA damage and total antioxidant status in neonatal hyperbilirubinemia." *Journal of Perinatology* 34.7 (2014): 519-523.
9. Buonocore, Giuseppe, et al. "Intraerythrocyte nonprotein-bound iron and plasma malondialdehyde in the hypoxic newborn." *Free Radical Biology and Medicine* 25.7 (1998): 766-770.
10. Cancelier, A.C., Petronilho, F., Reinke A., Constantino, L., Machado,

11. R., Ritter, C., Dal-Pizzol, F. "Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic early-onset neonatal sepsis: a case-control study". *Pediatric Critical Care Medicine*. 2009, Jul;10(4):467-71.
12. Chakravarty, Soumitra, and Alka N. Sontakke. "A correlation of antioxidants and lipid peroxidation between maternal and cord blood in full term and preterm deliveries." *Current Pediatrics* 16.2 (2012).
13. Cipierre, Cécile, et al. "Malondialdehyde adduct to hemoglobin: a new marker of oxidative stress suitable for full-term and preterm neonates." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013 (2013).
14. Dani C, Poggi C. The Role of Genetic Polymorphisms in Antioxidant Enzymes and Potential Antioxidant Therapies in Neonatal Lung Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(13):1863-1880. doi:10.1089/ars.2013.5811.
15. Dede, Hulya, et al. "Higher Level of Oxidative Stress Markers in Small for Gestational Age Newborns Delivered by Cesarean Section at Term." *Fetal and Pediatric Pathology* (2017): 1-8.
16. Díaz-Castro J, Florido J, Kajarabille N, et al. A New Approach to Oxidative Stress and Inflammatory Signaling during Labour in Healthy Mothers and Neonates. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:178536. doi:10.1155/2015/178536.
17. El Bana, Sawsan Mahmoud, et al. "Serum and Urinary Malondialdehyde (MDA), Uric acid, and Protein as markers of perinatal asphyxia." *Electronic Physician* 8.7 (2016): 2614.
18. Escobar, Gabriel J., et al. "Stratification of risk of early-onset sepsis in newborns $\geq$ 34 weeks' gestation." *Pediatrics* (2013): peds-2013.

19. Esterbauer, Herman; Cheeseman, Kevin H. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407-421, 1990.
20. Garenne, Michel, et al. "Maternal mortality in rural South Africa: the impact of case definition on levels and trends." *International Journal of Women's Health* 5 (2013): 457-463.
21. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):2–8.
22. Iwase, Tadayuki, et al. "A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach." *Scientific Reports* 3 (2013): 3081.
23. Hartman, Mary E., et al. "Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis." *Pediatric Critical Care Medicine* 14.7 (2013): 686-693.
24. Kalyanaraman, B. "Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms, *Redox Biology* 1 (1)(2013) 244–257, ht tp." dx. doi. org/10.1016/j. redox 14 (2013): 24024158.
25. Karatas, F., M. Karatepe, and A. Baysar. "Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography." *Analytical biochemistry* 311.1 (2002): 76-79.
26. Lázár, Renáta, et al. "The quality of the antioxidant defence system in term and preterm twin neonates." *Redox Report* 20.3 (2015): 103-108.
27. Marseglia, Lucia, et al. "Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014 (2014).

28. Mills, Gordon C. "Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." *Journal of Biological Chemistry* 229.1 (1957): 189-197.
29. Mirzarahimi, Mehrdad, et al. "Antioxidant levels in cord blood of term neonates and its association with birth weight." *Iranian journal of child neurology* 10.1 (2016): 31.
30. Molina, Víctor, et al. "Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis: a prospective observational pilot study." *Redox Report* 22.6 (2017): 330-337.
31. Moore, Tiffany A., et al. "Relationships between Feeding Intolerance and Stress Biomarkers in Preterm Infants." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2013).
32. Mutinati, M. et al. "Oxidative Stress in Neonatology. A Review." *Reproduction in Domestic Animals* (2013).
33. Negi, Reena, et al. "Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates." *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 25.8 (2012): 1338-1341.
34. Nejad, Rasoul Kaviany, et al. "Comparison of Oxidative Stress Markers and Serum Cortisol between Normal Labor and Selective Cesarean Section Born Neonates." *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 10.6 (2016): BC01.
35. Paoletti, F; Mocali, A.; "Determination of Superoxide Dismutase Activity by Purely Chemical System Based on NAD(P)H Oxidation". *Analytical Biochemistry* 154, 536-541 (1986)
36. Perrone, Serafina, et al. "Oxygen use in neonatal care: a two-edged sword." *Frontiers in Pediatrics* 4 (2016).

-
37. Porter, N. A., Caldwell, S. E., & Mills, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 1995, 30(4), 277-290.
 38. Punchard, N.A., Kelly, F.J. cap.16 Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA (Daret K. St. Clair e Ching K. Chow). Free radicals: a Practical Approach. *Oxford University Press*, p.227-240, 1996.
 39. Santos, Cristina, et al. "Selenium, selenoproteins and selenometabolites in mothers and babies at the time of birth." *British Journal of Nutrition* (2017): 1-8.
 40. Saugstad, O.D. "Oxygen and Oxidative Stress in the Newborn." *Studies on Pediatric Disorders. Springer New York*, 2014. 3-13.
 41. Saugstad, O.D, et al. "Oxygenation of the newborn: a molecular approach." *Neonatology* 101.4 (2012): 315-325.
 42. Torres-Cuevas, Isabel, et al. "Oxygen supplementation to stabilize preterm infants in the fetal to neonatal transition: no satisfactory answer." *Frontiers in Pediatrics* 4 (2016).
 43. Torres-Cuevas, Isabel, et al. "Oxygen and oxidative stress in the perinatal period." *Redox Biology* (2017).
 44. Vento, Máximo, et al. "Use of oxygen in the resuscitation of neonates." *Perinatal and Prenatal Disorders. Springer New York*, 2014. 213-243.

45. Wynn, James L. "Defining neonatal sepsis." *Current Opinion in Pediatrics* 28.2 (2016): 135-140.
46. Yüksel, sevda, and Ayşe arzu yiğit. "Malondialdehyde and nitric oxide levels and catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels in maternal blood during different trimesters of pregnancy and in the cord blood of newborns." *Turkish Journal of Medical Sciences* 45.2 (2015): 454-459.
47. Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radical Biology and Medicine* 33.3 (2002): 337-349.