

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Juliana de Oliveira Marcatto

Perfil de citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros: utilização de amostras coletadas em papel filtro e relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população.

Belo Horizonte

2015

Juliana de Oliveira Marcatto

Perfil de citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros: utilização de amostras coletadas em papel filtro e relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana de Gouvêa Viana

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina – UFMG

2015

M313p Marcatto, Juliana de Oliveira.
Perfil de citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros [manuscrito]: utilização de amostras coletadas em papel filtro e relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população. / Juliana de Oliveira Marcatto. - - Belo Horizonte: 2015.
130f.
Orientador: Pedro Guatimosim Vidigal.
Coorientador: Luciana de Gouvêa Viana.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Prematuro. 2. Sepsis. 3. Cuidados de Enfermagem. 4. Citocinas. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Vidigal, Pedro Guatimosim. II. Viana, Luciana de Gouvêa. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 410

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcísio Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Coordenador (a) Geral do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Ana Cristina Cortes

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia: Prof. Wagner Luiz Tafuri

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia: Geovane Dantas Cassali

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia:

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovane Dantas Cassali

Prof^a Rosa Maria Esteves Arantes

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Prof^a. Tatiane Alves da Paixão

Prof^a. Milene Alvarenga Rachid

Discente Conrado de Oliveira Gamba

A Deus por me permitir viver este projeto e à minha família por sonhar os meus sonhos e acreditar na concretização desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as demonstrações cotidianas de cuidado durante esta jornada. Por ter mostrado SUA face através das inúmeras presenças que contribuíram para a concretização desta etapa. Obrigada, SENHOR, porque seu amor me alcançou e debaixo da sua graça todos os sonhos são possíveis!

À minha família que viveu comigo esse sonho! Minha avó e minha mãe que sempre foram capazes de abdicar dos próprios sonhos para que a realização dos meus fosse possível. Miguel pela fidelidade e amor eternos. Filha querida, expressão maior do amor de Deus pela minha vida e ao meu presente atual, Lívia, que vai viver a emoção da defesa sendo parte de mim.

Ao meu orientador, Pedro Guatimosin Vidigal, por ter me acolhido desde a fase inicial deste projeto de maneira tão disponível. Obrigada pelo carinho, e apoio durante este período.

À minha co-orientadora, Luciana de Gouvêa Viana, por ter se envolvido com este projeto desde o princípio. Ao longo desta caminhada, muito mais que uma companheira de estudos e trabalho, se tornou exemplo, uma amiga querida, sempre positiva, extraindo o melhor de cada momento, me animando nas etapas mais difíceis. Obrigada por sempre ter acreditado que seria possível, mesmo quando nem eu fui capaz de acreditar.

Ao Professor Marcus Vinicius Andrade e equipe do laboratório Lineu de Paula Freire pela competência técnica, disponibilidade e envolvimento em todas as etapas da pesquisa. Sem esta parceria nenhum resultado teria sido possível.

À equipe técnica do NUPAD pelo acesso à tecnologia do papel filtro e doação de insumos.

A toda equipe da Unidade de Cuidados Progressivos Neonatais da Maternidade Unimed-BH, Dra Rosilu e Dr Paulo Tarcísio, enfermeiros e técnicos de enfermagem

que participaram de maneira direta ou indireta desta pesquisa e tornaram sua realização possível.

À estatística Aleida, pela competência e seriedade demonstradas na execução das análises deste trabalho.

À Fernanda pela disponibilidade e carinho na realização das traduções para o inglês.

RESUMO

Em recém-nascidos prematuros, os procedimentos realizados nas primeiras horas de vida podem desencadear resposta inflamatória sistêmica e potencializar o desenvolvimento de desfechos desfavoráveis bem como complicações imediatas e tardias.

Objetivo: Avaliar os níveis das Interleucinas (IL) 2, 4, 6, 8, 10, Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Fator estimulador de colônias de granulócitos e mastócitos (GM-CSF) nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros e a sua relação com os principais desfechos desfavoráveis da população estudada.

Método: Trata-se de um estudo analítico observacional prospectivo realizado na Maternidade Unimed-BH – Unidade Grajaú. Foram incluídos no estudo 34 recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas, admitidos no período de julho de 2012 a dezembro de 2014. As citocinas foram dosadas a partir de amostras coletadas em papel filtro com 10 minutos, 1 hora e 3 horas de vida.

Resultados: Foi possível dosar as citocinas investigadas a partir de sangue coletado em papel filtro. Foi evidenciada correlação entre os níveis séricos de TNF- α na primeira hora de vida e o desenvolvimento de sepse na população estudada e níveis aumentados de GM-CSF foram identificados nos pacientes que apresentaram hipotermia à admissão na unidade neonatal. Foi detectada a presença de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF nas três primeiras horas de vida, com diferença significativa entre os tempos para as citocinas IL-6, IL-8 e IFN- γ . IL-2 e IL-4 não foram observadas em nenhum dos tempos investigados. Não foi evidenciada correlação entre a expressão das citocinas nos tempos estudados e o desenvolvimento de displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, hemorragia peri intraventricular e óbito, mesmo após estratificação da população de acordo com o peso, entre maiores e menores de 1500 gramas.

Conclusão: A detecção de citocinas a partir de material coletado em papel de filtro demonstrou ser um método viável tendo como vantagens a facilidade de coleta, armazenamento e transporte, além da utilização de pequenos volumes. A relação da expressão de TNF- α e sepse pode sugerir sua utilização como marcador precoce e a correlação de hipotermia com o aumento de GM-CSF sugere o potencial danoso desse quadro clínico nas primeiras horas de vida de recém-nascidos prematuros, apontando a necessidade de adoção de medidas preventivas eficazes de controle térmico. Mais estudos são necessários para confirmar e esclarecer estas correlações e evidenciar o impacto das intervenções precoces no padrão de expressão das citocinas.

Palavras chave: Citocina. Recém-nascido. Prematuro. Sepse. Cuidados de enfermagem.

ABSTRACT

Procedures performed on preterm neonates within the first hours of birth may trigger systemic inflammatory responses and boost the development of unfavorable outcomes, in addition to immediate and late complications.

Objective: This study aimed to look into the correlations between levels of Interleukin (IL) 2, 4, 6, 8, 10, Interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in neonates within three hours of birth and the main unfavorable outcomes observed in this population.

Method: This prospective observational study was carried out at the Unimed-BH Unidade Grajaú Maternity Hospital. Thirty-four preterm neonates with gestational ages ranging between 28 and 32 weeks seen from July 2012 to December 2014 were enrolled in the study. Cytokine levels were measured from samples collected on filter paper within 10 minutes, one hour, and three hours of birth.

Results: Cytokine levels were measured from blood spots collected on filter paper. A correlation was found between TNF- α serum levels within one hour of birth and the occurrence of sepsis in the studied population. Increased levels of GM-CSF were observed in patients with hypothermia upon admission to the neonatal care unit. IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF were detected in the blood samples taken within three hours of birth, with statistically significant differences between each of the sample collection times for cytokines IL-6, IL-8, and IFN- γ . IL-2 and IL-4 were not detected in any of the tests. No correlation was found between the expression of cytokines at the sample collection times and the occurrence of bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, periventricular/intraventricular hemorrhage, or death, even after the studied population was divided into groups of individuals weighing less than 1,500 grams or 1,500 grams and more.

Conclusion: The detection of cytokine levels from blood spots on filter paper proved to be a viable testing method. Its advantages include easier sample collection, storage, and transportation, in addition to the low volume of blood required to perform the tests. The study findings suggested that TNF- α might be used as an early marker

for sepsis. The correlation between increased GM-CSF levels and hypothermia indicates the potentially harmful nature of hypothermia in preterm neonates within the first hours of birth, and the relevance of providing effective preventive thermal control measures. More studies are needed to confirm and clarify these correlations and underline the impact early intervention may have on cytokine expression patterns.

Key Words: Cytokine. Neonate. Preterm. Sepsis. Nursing care.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Variação de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF nas primeiras três horas de vida.....	57
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Intervenções realizadas em sala de parto e à admissão na unidade neonatal.....	21
TABELA 2 - Variáveis clínicas utilizadas/ definições.....	42
TABELA 3 - Variáveis desfechos utilizadas/definições.....	43
TABELA 4 - Medidas descritivas e coeficiente de variação de IL-6 e TNF nas eluições de 1:5 e 1:20 (pg/mL).....	47
TABELA 5 - Dados demográficos, perinatais e neonatais dos 34 pacientes envolvidos na pesquisa.....	49
TABELA 6 - Frequência de desfechos clínicos na população investigada.....	50
TABELA 7 - Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de sepse.....	51
TABELA 8 - Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de displasia broncopulmonar.....	52
TABELA 9 - Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de retinopatia da prematuridade.....	53
TABELA 10 - Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro hemorragia Peri intraventricular.....	54
TABELA 11 - Medidas descritivas de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF dos recém-nascidos com 10 minutos de vida.....	55
TABELA 12 - Medidas descritivas de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, dos recém-nascidos com 1 hora de vida.....	55

TABELA 13 - Medidas descritivas de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF dos recém-nascidos com 3 horas de vida.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPAP – Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DBP – Displasia broncopulmonar

DHEG – Doença hipertensiva específica da gravidez

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

FIO₂ – Fração inspirada de oxigênio

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HPIV – Hemorragia peri-intra ventricular

ICAM -- Moléculas de adesão intracelulares

IG – Idade gestacional

IL - Interleucina

ILCOR - International Liaison Committee on Resuscitation

IFN- γ - Interferon gama

NUPAD – Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG

Pg/mL – Picogramas por mililitro

PN – Peso de nascimento

ROP – Retinopatia da prematuridade

T_{ax} – Temperatura axilar

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM - Moléculas de adesão de células vasculares

SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão da literatura.....	19
1.1 Atendimento em sala de parto e admissão na unidade neonatal.....	20
1.2 Utilização de papel filtro na dosagem de citocinas.....	22
1.3 Associação entre os níveis séricos de citocinas e os desfechos prevalentes em recém-nascidos prematuros.....	25
1.3.1 Displasia broncopulmonar.....	25
1.3.2 Sepses.....	26
1.3.3 Retinopatia da prematuridade.....	27
1.3.4 Hemorragia peri intraventricular.....	28
1.4 Papel das citocinas investigadas no estudo.....	29
1.4.1 Interleucina 2.....	29
1.4.2 Interleucina 4.....	30
1.4.3 Interleucina 6.....	30
1.4.4 Interleucina 8.....	31
1.4.5 Interleucina 10.....	31
1.4.6 Fator de necrose tumoral alfa.....	32
1.4.7 Interferon gama.....	33
1.4.8 Fator estimulador de colônias de granulócitos e mastócitos.....	33
2. Justificativa.....	34
3. Objetivos	35

3.1	Objetivo principal.....	35
3.2	Objetivos secundários.....	35
4.	Método.....	36
4.1	Etapa 1: Padronização das dosagens de citocinas a partir de amostras coletadas em papel filtro.....	36
4.2	Etapa 2: Dosagem das citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros.....	38
4.2.1	Critérios de inclusão.....	38
4.2.2	Critérios de exclusão.....	39
4.2.3	Coleta das amostras.....	39
4.2.4	Ensaio laboratoriais: dosagem das citocinas.....	40
4.2.5	Variáveis para análise.....	40
4.2.5.1	Variáveis explicativas.....	41
4.2.5.2	Variáveis desfecho.....	41
4.2.6	Análise estatística.....	44
5.	Resultados.....	46
5.1	Resultados etapa 1.....	46
5.2	Resultados etapa 2.....	48
6.	Discussão.....	59
7.	Conclusão.....	67
8.	Considerações finais.....	68
9.	Limitações do estudo.....	71
10.	Perspectivas futuras.....	72

11. Referências.....	73
12. Anexos e Apêndices.....	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2012 demonstram que cerca de 3 milhões de crianças nascem no Brasil por ano, sendo 279.300 prematuras. Deste contingente de recém-nascido prematuros, 12.000 morrem no Brasil por complicações advindas da prematuridade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). A transição da vida intrauterina para a vida extrauterina exige adaptações fisiológicas, sobretudo respiratórias e circulatórias, que fazem com que estes momentos imediatamente após o parto sejam críticos, demandando conhecimento e habilidades da equipe de saúde no sentido de garantir suporte adequado quando necessário. A necessidade de reanimação neonatal é maior quanto menor for a idade gestacional e o peso ao nascer. Sabe-se que os momentos imediatamente após o parto são de grande vulnerabilidade para os recém-nascidos e que tudo que acontece nesta fase pode gerar repercussões imediatas e tardias (BRYCE *et al.*, 2005).

Recém-nascidos prematuros frequentemente necessitam de suporte tecnológico de maior complexidade e de assistência em locais com mão de obra especializada e capacitada para prestar atendimento a esta população. O cuidado intensivo neonatal é um importante recurso para a sobrevivência de recém-nascidos prematuros e o acesso ao mesmo tem possibilitado a redução das taxas de mortalidade, com redução dos limites de viabilidade e conseqüente aumento da sobrevida (HORBAR *et al.*, 2002).

Os insultos decorrentes das intervenções necessárias à garantia de suporte ventilatório, hemodinâmico e metabólico são numerosos, desde o momento do nascimento em sala de parto e se estendem para a unidade neonatal quando, especialmente no momento da admissão e nas primeiras horas de vida, tais pacientes são submetidos a vários procedimentos invasivos.

O maior desafio da equipe que presta cuidados a esta população é garantir suporte às demandas decorrentes da prematuridade sendo minimamente invasivo e causando menos impactos sistêmicos danosos, prevenindo complicações imediatas e tardias.

1.1 Atendimento em sala de parto e admissão na unidade neonatal

Vários trabalhos têm correlacionado a expressão de citocinas com os desfechos clínicos prevalentes em recém-nascidos prematuros (AMBALAVANAN *et al.*, 2009; SILVEIRA, FORTES FILHO, PROCIANOY, 2011; PRASHANT *et al.*, 2013). A possibilidade de identificar a relação entre as intervenções precoces realizadas desde o nascimento e o perfil de citocinas em estágios precoces da vida dos recém-nascidos, pode demonstrar o impacto de tais intervenções e a ativação de respostas metabólicas, humorais e endócrinas. A comunidade científica tem investigado a atuação de citocinas pró-inflamatórias como potencializadoras de insultos iniciais, apresentando correlação com desfechos desfavoráveis no período neonatal tais como desenvolvimento de sepse, doença pulmonar crônica, retinopatia da prematuridade, hemorragia peri intraventricular e óbito.

As intervenções necessárias ao suporte de vida desde a sala de parto, especialmente em recém-nascidos prematuros geram estresse que resulta em alterações comportamentais, endócrinas e imunológicas, aumentando a susceptibilidade a doenças em humanos e espécies animais (MEAGER, 2010). Sabe-se que desde idade gestacional tão precoce quanto vinte e quatro semanas, as estruturas neuroanatômicas e neuroquímicas necessárias à percepção de estímulos estressores já estão desenvolvidas (GRUNAU, 2002).

Em recém-nascidos prematuros, as intervenções realizadas desde a sala de parto e no momento da admissão do recém-nascido na unidade neonatal são potencialmente estressoras e capazes de induzir a liberação de citocinas.

A Tabela 1 apresenta o número de intervenções aplicadas após o nascimento desde a sala de parto até a admissão na unidade neonatal. A relação entre os procedimentos de rotina realizados na sala de parto/unidades neonatais e os níveis séricos de citocinas em estágios precoces da vida extrauterina de recém-nascidos prematuros tem sido pouco investigada até o momento, mas todas elas podem impactar nos desfechos clínicos investigados nesse estudo.

Tabela 1: Intervenções realizadas em sala de parto e à admissão na unidade neonatal.

Sala de Parto	Admissão na Unidade Neonatal
Clampeamento do cordão umbilical	Monitorização
Posicionamento e aspiração de vias aéreas	Suporte ventilatório: CPAP/ ventilação mecânica
Secagem	Intubação traqueal
Avaliação clínica	Acesso venoso: periférico/central
Monitorização	Coleta de exames laboratoriais
Suporte ventilatório: Ventilação com balão e máscara, CPAP.	Sondagem gástrica
Intubação traqueal	Administração de antibióticos
Sondagem gástrica	Administração de surfactante
Administração de vitamina K	Pesagem
Credê	Medidas antropométricas
	Avaliação de sinais vitais

CPAP: pressão positiva contínua em vias aéreas, do inglês: *Continuous positive airway pressure*.

A dosagem de citocinas em estágios precoces da vida do recém-nascido prematuro pode sinalizar os pacientes mais susceptíveis ao desenvolvimento de quadros clínicos prevalentes, direcionando a adoção de medidas preventivas nesse grupo. Entretanto, dosagens séricas demandam volumes de material biológico significativos, sendo uma restrição à aplicação clínica de tais dosagens nessa população. Dessa maneira, métodos alternativos de dosagem vêm sendo testados e validados com o objetivo de possibilitar a identificação e intervenções preventivas precoces, sendo o uso do papel filtro uma alternativa viável e promissora.

1.2 Utilização de papel filtro na dosagem de citocinas

As citocinas são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico, não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Elas apresentam meia-vida sérica curta e influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como têm atuação importante na atividade de outras citocinas que podem aumentar (citocinas pró-inflamatórias) ou atenuar (citocinas anti-inflamatórias) a resposta imune. São mediadores necessários na resposta inflamatória, também são responsáveis por atrair outras células para o local da lesão através da expressão de moléculas de adesão intracelulares (ICAM) e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM) (CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013). A inflamação compromete a integridade do tecido afetado e em quadros de resposta exacerbada pode ocorrer instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos.

A utilização de soro e plasma é o padrão ouro na identificação de biomarcadores. Entretanto, o custo, a logística relacionada à punção venosa ou arterial, manipulação e transporte das amostras após a coleta configuram obstáculos à metodologia. Na

população neonatal, além de todas estas considerações, o volume de sangue utilizado na realização dos exames é um ponto de atenção, uma vez que a volemia total de um recém-nascido é pequena e que múltiplas coletas resultam em comprometimento sistêmico, aumentando o risco de anemia nesta população, bem como de quadros clínicos específicos da prematuridade, tais como desequilíbrios hidroeletrólíticos e alterações do fluxo sanguíneo cerebral. Análises a partir de amostras de saliva e urina são alternativas à utilização do soro e plasma, mas muitos biomarcadores estão presentes apenas em sangue, aspecto que limita a utilização destas amostras.

O papel filtro foi utilizado pela primeira vez como estratégia para coleta de sangue capilar, em 1960, nos trabalhos de investigação de doença metabólica do recém-nascido pelo Dr. Robert Guthrie's (MEI *et al.*, 2001).

As vantagens da utilização de papel de filtro na coleta de sangue capilar são as seguintes:

1. O procedimento de coleta da amostra é simples e de baixo custo, o que viabiliza a aplicabilidade clínica do método. (McDADE; WILLIANS; SNODGRASS, 2007).
2. A amostra não precisa ser processada. Diferentemente das análises realizadas com soro ou plasma, o sangue colhido em papel filtro não precisa ser centrifugado, separado e imediatamente congelado. O papel é mantido em temperatura ambiente até a secagem e em seguida é congelado. A maior parte dos analitos é estável em papel filtro mantido em temperatura ambiente, o que minimiza as interferências da fase pré-analítica quando comparada a métodos tradicionais. (McDADE; WILLIANS; SNODGRASS, 2007). Alguns trabalhos demonstram estabilidade 20 anos após a coleta se amostra for refrigerada (WORTHMAN; STARLING, 1997). Não existe recomendação de refrigeração para o transporte e o risco de acidente biológico é muito baixo.
3. Facilidade de obtenção da amostra. Uma punção capilar é suficiente para realizar o preenchimento dos 5 círculos com volume de aproximadamente 50

$\mu\text{L}/\text{c\`{i}rculo}$. Este aspecto pode facilitar a ades\~{a}o a pesquisas futuras e ao uso rotineiro da t\~{e}cnica.

4. Utiliza\~{c}\~{a}o de pequeno volume de sangue. Aproximadamente 250 μL de sangue \~{e} suficiente para preencher os 5 c\~{i}rculos da cartela de papel filtro. Recentes inova\~{c}\~{o}es tecnol\~{o}gicas tais como Luminex®, t\~{e}m permitido a dosagem de m\~{u}ltiplos biomarcadores em um mesmo volume de amostra (SKOGSTRANGE *et al.*, 2005).

Dentre as desvantagens do m\~{e}todo est\~{a} o fato de que o processo de extra\~{c}\~{a}o pode causar libera\~{c}\~{a}o de algumas fra\~{c}\~{o}es do sangue que comprometem as dosagens ou este processo, denominado elui\~{c}\~{a}o, pode ainda alterar a estrutura bioqu\~{i}mica das mol\~{e}culas, impossibilitando a detec\~{c}\~{a}o. Outra desvantagem \~{e} o fato de resultados de an\~{a}lises a partir de papel filtro n\~{a}o serem o padr\~{a}o ouro de avalia\~{c}\~{a}o, exceto no caso da triagem neonatal.

Em rela\~{c}\~{a}o \~{a} t\~{e}cnica de elui\~{c}\~{a}o, a primeira etapa a ser cumprida para que o ensaio seja bem-sucedido \~{e} a escolha do reagente. \~{E} importante decidir acerca da utiliza\~{c}\~{a}o de reagentes comercialmente dispon\~{i}veis ou optar por desenvolver um protocolo de elui\~{c}\~{a}o pr\~{o}prio. A segunda etapa \~{e} o preparo da calibra\~{c}\~{a}o e das amostras de controle. O terceiro passo \~{e} a valida\~{c}\~{a}o do protocolo de elui\~{c}\~{a}o. S\~{a}o aspectos importantes o tipo do tamp\~{a}o, a temperatura e dura\~{c}\~{a}o da elui\~{c}\~{a}o e o tempo de agita\~{c}\~{a}o. O tempo de elui\~{c}\~{a}o varia de 2 horas a per\~{i}odos mais prolongados em que a extra\~{c}\~{a}o ocorre durante toda a noite. A desvantagem de realizar todo ensaio em um s\~{o} dia \~{e} que a elui\~{c}\~{a}o demanda um tempo significativo, tornando o ensaio muito longo. Entretanto, o risco de fazer a elui\~{c}\~{a}o por per\~{i}odos prolongados (durante toda noite) \~{e} a possibilidade de degrada\~{c}\~{a}o da amostra.

1.3 Associação entre os níveis séricos de citocinas e os desfechos prevalentes em recém-nascidos prematuros

1.3.1 Displasia Broncopulmonar (DBP)

A DBP é uma entidade clínica importante e alvo de muitas investigações no sentido de buscar estratégias preventivas efetivas. Em contraposição às expectativas, o tratamento com surfactante exógeno e as novas modalidades de ventilação mecânica não tem resultado na redução da incidência da doença (BOSE; DAMMANN; LAUGHON, 2008).

A etiologia da DBP é multifatorial, sendo que condições ante e pós-natais podem interferir no crescimento alveolar, resultando em manifestações clínicas da doença. O processo de inflamação pulmonar é o fator que mais contribui na patogênese da doença. Existe uma forte associação entre a DBP e a prematuridade, mas outros fatores também contribuem para o seu desenvolvimento, tais como infecções na gestação, ventilação mecânica, toxicidade do oxigênio com redução de liberação de fatores anti-oxidantes, persistência do canal arterial e sepse (JOBE; BANCALARI, 2001).

O termo displasia broncopulmonar foi aplicado considerando a interação de três aspectos chave no diagnóstico: imaturidade pulmonar, injúria aguda e reparação tecidual inadequada. A maior parte dos recém-nascidos que desenvolvem DBP é composta por prematuros, sendo que 75% dos indivíduos afetados tem peso inferior a 1.000 gramas. A incidência é inversamente proporcional ao peso de nascimento (FANAROFF *et al.*, 2007)

Em resposta à injúria pulmonar, uma complexa interação ocorre entre proteínas que atraem células que integram o processo inflamatório (quimiocinas), outras proteínas que facilitam a migração transendotelial de células inflamatórias dos vasos sanguíneos (moléculas de adesão), proteínas que produzem lesão tissular (citocinas

pró-inflamatórias) e proteínas que modulam o processo (citocinas anti-inflamatórias) (OZDEMIR, BROWN; MORGAN, 1997). Esta interação acaba por exacerbar a lesão inicial, comprometendo ainda mais a função pulmonar do recém-nascido. Vários trabalhos têm descrito a relação entre a DBP e a liberação de citocinas na tentativa de validar a identificação de um biomarcador que possa expressar maior probabilidade de desenvolvimento da doença (AMBALAVANAN *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2012; VENTO *et al.*, 2006).

1.3.2 Sepses

Apesar dos avanços relacionados ao manejo clínico do recém-nascido prematuro, a sepses continua sendo uma importante causa de morbi-mortalidade. Cerca de 21% dos recém-nascidos de muito baixo peso desenvolvem, no mínimo, um episódio de sepses durante o período de internação (STOLL *et al.*, 2004). Para confirmação do diagnóstico é necessário que a infecção bacteriana seja suspeitada ou confirmada através de cultura ou outros métodos (BONADIO *et al.*, 1993; GERDES, 1991). Descrita como sendo uma resposta inflamatória sistêmica, apresenta etiologia variada, com vários níveis de intensidade (BONE *et al.*, 2009; GOLDSTEIN; GIROIR; RANDOLPH, 2005). Baseado no tempo de manifestação da infecção, a sepses neonatal é classificada em precoce ou tardia (BIZARRO, 2005). A classificação é importante por orientar o esquema de antibioticoterapia a ser empregado, considerando a forma de transmissão e conseqüentemente os microrganismos prevalentes. A sepses precoce é detectada nas primeiras 72 horas de vida e resulta da transmissão vertical da bactéria no período intra-parto. A sepses tardia é definida como infecção que ocorre depois das primeiras 72 horas de vida e é atribuída à transmissão horizontal de micro-organismos após o nascimento. Recém-nascidos de muito baixo peso são especialmente suscetíveis à sepses tardia em decorrência da maior necessidade de ventilação mecânica, uso de cateteres

centrais, internação prolongada e demanda por procedimentos invasivos (STOLL *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da sepse inicia-se com o reconhecimento por parte do organismo acerca da presença de elementos estruturais de micro-organismos tais como endotoxinas ou toxinas secretadas que estimulam a liberação local e sistêmica de mediadores inflamatórios. A produção e liberação destes mediadores pró-inflamatórios, pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica característica da fase inicial da sepse (KUMAR *et al.*, 2001; COHEN, 2002). Durante muito tempo acreditou-se que a sepse era decorrente da resposta inflamatória exacerbada desencadeada pelo sistema imune do indivíduo afetado. Atualmente, os pesquisadores também descrevem a importância da resposta anti-inflamatória compensatória em pacientes que desenvolvem quadros graves (BALK, 2011). Estudos envolvendo identificação de citocinas pró-inflamatórias têm sido desenvolvidos para validação destes mediadores como marcadores diagnósticos e para prever a gravidade da doença em estágios precoces da infecção (BUCK *et al.*, 1994; MEADOW; RUDINSKY, 1995; PANERO *et al.*, 1997; Ng; LAM, 2010).

1.3.3 Retinopatia da prematuridade (ROP)

A retinopatia da prematuridade (ROP) foi descrita pela primeira vez em 1942 (TERRY, 1942) e posteriormente foi demonstrada, através de estudos clínicos, a associação entre oxigenoterapia e ROP (PATZ; HOECK; DE LA CRUZ, 1952). O equilíbrio entre a indicação terapêutica de oxigênio e a prevenção da ROP tem sido alvo de vários estudos e a definição dos níveis adequados de oxigênio de acordo com cada idade gestacional ainda é alvo de estudos clínicos (STENSON; BROCKLEHUST; TARNOW-MORDI, 2011). Apesar dos avanços nas práticas clínicas e melhora na monitorização da oferta de oxigênio, a ROP continua sendo uma das principais causas de cegueira em recém-nascidos prematuros com

imaturidade extrema de retina ao nascimento (GILBERT *et al.*, 2005). A retina imatura é susceptível não apenas aos altos níveis de oxigênio após o nascimento, mas também às variações de tensão de oxigênio, crescimento e fatores nutricionais intraútero.

O processo de vascularização da retina ocorre predominantemente no segundo e terceiro trimestre da gestação, atingindo a maturidade entre 36 a 40 semanas (ROTH, 1977). A angiogênese começa a acontecer por volta da 17ª semana de idade gestacional e é estimulada por um quadro de “hipóxia fisiológica” descrita em estudos animais (CHANG-LING; GOCK; STONE, 1995). Quando a demanda metabólica de maturidade neural da retina ultrapassa a oferta de oxigênio, a porção avascular da retina libera fatores vasoativos que estimulam a neoformação vascular (PIERCE *et al.*, 1996). Trabalhos recentes têm demonstrado a associação entre níveis elevados de citocinas nos primeiros três dias de vida de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso com critérios clínicos de infecção precoce e o desenvolvimento de retinopatia (SILVEIRA; FORTES FILHO; PROCIANOY, 2011)

1.3.4 Hemorragia Peri intraventricular (HPIV)

A hemorragia intraventricular apresentou declínio em sua incidência nos últimos anos. Entretanto, aproximadamente 20% dos recém-nascidos de muito baixo peso desenvolvem complicações secundárias à hemorragia ventricular (BATTON *et al.*, 1994; HEUCHAN *et al.*, 2002). SAVMAN e colaboradores investigaram a correlação entre as citocinas presentes no líquido de recém-nascidos com leucomalácia evidenciada por ultrassonografia transfontanelar. Os autores detectaram elevadas concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) no líquido de recém-nascidos que desenvolveram quadros de hidrocefalia pós-hemorragica, não havendo correlação destes níveis com desenvolvimento de leucomalácia ou comprometimento neuropsicomotor. Outro trabalho comparou a expressão de citocinas em pacientes com hidrocefalia pós-hemorragica que não desenvolveram leucomalácia (grupo controle) com pacientes que desenvolveram a doença. Os dois

grupos apresentaram aumento de IL-1 β , o grupo sem leucomalácea apresentou aumento de IL-18 e IFN- γ foi mais elevado no grupo que desenvolveu leucomalácea, apontando para uma relação entre esta citocina e o processo de mielinização durante o desenvolvimento neuronal (SCHIMTZ *et al.*, 2002). Sendo assim, a interpretação dos autores foi de que a expressão de citocinas estaria relacionada à reação advinda da hemorragia e não necessariamente da gravidade da lesão cerebral.

Em coorte de dois anos de seguimento de recém-nascidos prematuros, Silveira e colaboradores não observaram associação entre a gravidade da resposta inflamatória na vida precoce e pior neurodesenvolvimento aos dois anos de idade (SILVEIRA; PROCIANOY, 2011).

1.4 Papel das citocinas investigadas no estudo

A seguir, estão descritas as principais funções das citocinas avaliadas neste estudo.

1.4.1 Interleucina 2

São produzidas principalmente por células T ativadas, tendo como principal estímulo para sua produção a presença de bactérias e seus produtos. A produção de interferon (IFN) e IL-1 induz a síntese de IL-2 e suas atividades são mediadas por um receptor de membrana, expresso em células T ativadas. Devido ao fato de apresentar meia vida plasmática inferior a 10 minutos, normalmente a IL-2 não é detectada em lesões agudas (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). Sua aplicação terapêutica tem sido estudada em oncologia, imunodeficiência e rejeição a transplantes (CHAVES *et al.*, 2009).

1.4.2 Interleucina 4

É uma glicoproteína com propriedades anti-inflamatória produzida por linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Atua sobre macrófagos ativados reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

1.4.3 Interleucina 6

É a citocina mais estudada na população neonatal, pois seus níveis séricos aumentam precocemente durante infecções e em vigência de lesões pulmonares em recém-nascidos prematuros, precedendo o aumento da proteína C-reativa (PCR) e seguida pela liberação de TNF- α (PATTERSON *et al.*, 1998). É sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos após estimulação por produtos advindos de microorganismos (FAN; YU, 2012). Age como sinal na ativação de células T que induzem a liberação de anticorpos pelas células B e a diferenciação de células T citotóxicas. Este mecanismo estimula a liberação de outras citocinas, especialmente TNF e IL-1 β . A IL-6 é considerada um dos maiores indutores da síntese de proteínas hepáticas, o que pode interferir na produção da PCR e por este motivo pode ser detectada mais precocemente. Entretanto, não configura um bom biomarcador por apresentar meia-vida curta e retornar aos níveis séricos basais cerca de 24 horas após o tratamento (NG *et al.*, 1997). Nível elevado de IL-6 no sangue de cordão tem sido associado à presença de corioamnionite quando detectados altos níveis em sangue de cordão (YOON *et al.*, 2000). Em recém-nascidos com rotura prematura de membranas, a IL-6 demonstrou alta sensibilidade e especificidade para predizer cultura positiva de sangue de cordão (TASCI *et al.*, 2006). A IL-6 é uma citocina de fase aguda, cuja expressão após dano

pulmonar e sepse tem sido identificada em vários estudos (LAM; Ng, 2008; VALÉRIO *et al.*, 2012)

1.4.4 Interleucina 8

Trata-se de uma citocina pró-inflamatória, produzida por células placentárias, monócitos e macrófagos fetais cuja principal ação é o grande estímulo migratório para células do sistema imune, quimiotaxia, estando envolvida com a atração de neutrófilos ao sítio da lesão (KOTECHA *et al.*, 1995).

Assim como IL-6, a IL-8 apresenta meia-vida curta limitando sua aplicação clínica, podendo ser utilizada como marcador especialmente antes do tratamento da sepse (BERNER *et al.*, 1998). Os níveis de IL-8 aumentam após 90 minutos da infecção em recém-nascidos sépticos, entretanto, a concentração reduz 48 horas após o tratamento. Recém-nascidos com idade gestacional inferior a 32 semanas apresentam alterações nas concentrações de IL-8 (MATOBA *et al.*, 2009). Em recém-nascidos saudáveis variações dos níveis de IL-8 não têm sido detectadas (DEMBINSK *et al.*, 2002). Níveis aumentados de IL-8 têm sido detectados em sangue de cordão de recém-nascidos prematuros infectados e apresenta correlação com a duração da suplementação de oxigênio e ventilação mecânica em recém-nascidos que desenvolveram displasia broncopulmonar, quando comparados a pacientes com mesma idade gestacional que não desenvolveram a doença (JONSSON *et al.*, 1997).

1.4.5 Interleucina 10

Trata-se de uma citocina anti-inflamatória, que tem por ação primordial a regulação da intensidade da resposta inflamatória. É produzida por diferentes células do sistema imune, tais como monócitos, macrófagos e linfócitos T e B (LATIFI;

O'RIORDAN; LEVINE, 2002). Atua como supressor da produção de mediadores pró-inflamatórios tais como IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos e mastócitos (GM-CSF, do inglês: *granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor*) em células do sistema imune. Em modelos experimentais, a ação protetora de IL-10 tem sido demonstrada através da ação de inibição da liberação de IL-6 e TNF- α circulante em ratos (HOWARD *et al.*, 1992). Sua expressão é mais tardia quando comparada a IL-8 (DE WALL MALEFTY *et al.*, 1991). A produção de interleucinas regulatórias em recém-nascidos prematuros pode ser deficiente, estando estes pacientes mais predispostos a respostas inflamatórias exacerbadas.

1.4.6 Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α)

O TNF- α é produzido prioritariamente por macrófagos e parece ser o primeiro mediador de quadros agudos, liberado logo após a lesão tissular, que regula a liberação de IL-1 β (CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013). O pico de liberação ocorre uma hora após a inoculação experimental de endotoxina, com níveis próximos de zero após 3 horas (SIMON *et al.*, 1991). A liberação de TNF- α pode causar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular resultando em edema generalizado, redução da volemia sistêmica e choque, coagulação intravascular disseminada, falência múltipla de órgãos e morte no período neonatal (SIMONSEN *et al.*, 2014). Também é considerada uma citocina pirogênica e, juntamente com IL-1, é uma das primeiras citocinas identificadas no local da lesão. Ambas intensificam a resposta inflamatória, estimulando a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-8. O TNF- α tem sido utilizado como marcador de sepse precoce, especialmente quando associado a IL-6 (CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013). Entretanto, trabalhos anteriores não demonstraram diferença significativa nas concentrações de TNF- α entre recém-nascidos saudáveis e doentes (SANTANA *et al.*, 2001). A meia-vida curta e sua interação com diversos receptores tornam a detecção do TNF- α difícil e os trabalhos são divergentes em relação à sua utilização como biomarcador de sepse. Na displasia broncopulmonar,

aparece durante a fase precoce da resposta inflamatória de recém-nascidos com lesão pulmonar (PICKLER *et al.*, 2010).

1.4.7 Interferon gama (IFN- γ)

Trata-se de uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células T, B e *natural killer* (NK) e sua principal atividade é a imunomodulação, inibindo a proliferação de células que realizam a síntese de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e de algumas imunoglobulinas e é indutor da síntese de IL-2

1.4.8 Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)

Originalmente foi definido com fator estimulador de crescimento hematopoiético. Contribui para proliferação de células hematopoiéticas no sítio da lesão e atua como mediador inflamatório. São expressos em altas concentrações nos sítios de inflamação e são responsáveis pela regulação de células mielóides e por ativação de células mais maduras para gerar produção de mediadores pró-inflamatórias.

2 Justificativa

A proposta de investigação deste trabalho surgiu a partir da demanda de gerar dados objetivos acerca da relação entre a liberação precoce de citocinas e os desfechos clínicos prevalentes em recém-nascidos prematuros, bem como sugerir o impacto do estresse decorrente das intervenções nas primeiras horas de vida em recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas. Muitas pesquisas em relação aos níveis séricos de citocinas e a associação com os desfechos clínicos prevalentes em recém-nascidos de muito baixo peso têm sido conduzidas, especialmente em decorrência da vulnerabilidade deste grupo de pacientes em função do quadro de imaturidade sistêmica. Entretanto, analisando os dados em relação à população assistida nas unidades neonatais nas quais este estudo foi conduzido, em torno de 5% dos recém-nascidos admitidos apresentam muito baixo peso ao nascer. O grande contingente de admissões nas unidades neonatais é de recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas e existe uma percepção prática de que, apesar de necessárias, as intervenções preconizadas podem desencadear uma resposta inflamatória que gera impactos imediatos ou mesmo tardios decorrentes do nascimento. Muito se tem discutido acerca de cuidados humanizados e da importância de revisar as práticas adotadas pela equipe de saúde. Por este motivo, estudar o perfil de liberação de citocinas constitui fundamentação científica para adoção de práticas menos invasivas que levem em consideração o padrão de desenvolvimento ao nascimento e que estejam direcionadas à adoção de práticas que favoreçam a continuidade do desenvolvimento no ambiente extrauterino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar o perfil das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros através de coleta de sangue em papel filtro e sua relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população.

3.2 Objetivos secundários

- Padronizar o método de detecção de citocinas a partir de sangue capilar coletado em papel filtro em recém-nascidos prematuros;
- Avaliar os níveis séricos de citocinas nos diferentes tempos estudados: 10 minutos, 1 hora e 3 horas de vida;
- Estratificar a população de acordo com os desfechos displasia broncopulmonar, sepse, retinopatia da prematuridade, hemorragia periventricular e óbito na população estudada;

4 MÉTODO

Trata-se de um estudo analítico observacional prospectivo realizado na Maternidade Unimed BH - Unidade Grajaú. Para organização dos resultados e cumprimento dos objetivos propostos, o presente trabalho foi dividido em duas etapas.

4.1 Etapa 1: Padronização das dosagens de citocinas a partir de amostras colhidas em papel filtro

Essa etapa foi realizada utilizando amostra de conveniência composta por oito recém-nascidos prematuros, com idade gestacional entre 28 a 32 semanas, sem instabilidade hemodinâmica, na primeira semana de vida, internados na Unidade de Cuidados Progressivos Neonatais de uma maternidade privada de Belo Horizonte, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição e mediante assinatura do termo de consentimento livre esclarecido pelo responsável pelo paciente. Os critérios de exclusão foram recém-nascidos malformados, filhos de mães diabéticas ou portadoras de doenças endócrinas, filhos de mães usuárias de drogas ilícitas e instabilidade hemodinâmica no momento da coleta.

A obtenção da amostra em papel filtro foi realizada através de punção arterial, juntamente com os demais exames que já seriam coletados para monitoramento clínico de acordo com a avaliação do médico assistente.

Para comparação entre as dosagens em papel filtro e soro, foi coletado 1 mL de sangue de cada paciente, sendo 0,5 mL utilizado no preenchimento de cinco círculos (*spots*) do papel filtro e 0,5 mL transferido para o tubo coletor. O papel filtro ficou em ar ambiente durante 1 hora para secagem na posição horizontal e em seguida foi

congelado a 20°C negativos. O sangue foi centrifugado logo após a coleta e o soro congelado à mesma temperatura.

Para análise das amostras de sangue em papel filtro, foram realizadas eluições com solução tampão salina-fosfato (PBS) nas porções de 1:20 e 1:5 com o objetivo de testar a melhor estratégia de obtenção de eluato que possibilitasse a detecção dos analitos em estudo. Para a eluição de 1:20, os cartões foram picotados em círculos de 3 mm, colocados 3 picotes em cada microtubo e em seguida adicionados 750 µL de PBS. A mistura foi agitada vigorosamente durante duas horas à temperatura ambiente e em seguida centrifugada por 10 minutos a 2.500 rpm para recuperação do sobrenadante. Para obtenção do eluato 1:5 foram utilizados 18 picotes de 3 mm em cada microtubo, aos quais foram adicionados 750 µL de PBS. Empregou-se a técnica de *ELISA* – *Enzime-linked immunosorbent assay* (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) para identificação das citocinas. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O objetivo desta etapa foi verificar a possibilidade de detecção de citocinas com a metodologia de eluição proposta e a comparação dos resultados obtidos em eluato com os valores das dosagens do soro. Para tal, foram determinadas três citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF) e utilizada a técnica de *ELISA* por ser mais viável financeiramente.

Neste trabalho optou-se por realizar todas as etapas do ensaio em um único dia, desde a eluição até a reação de *ELISA*, com o objetivo de minimizar o risco de degradação da amostra.

Para realização da análise estatística nessa etapa, foi avaliado o perfil das variáveis através das medidas descritivas média, mediana e desvio padrão. Foi calculado o coeficiente de variação (CV) das variáveis, considerando-se CV maior que 30% indicativo de grande variação.

Para comparação de dosagem de IL-6 e TNF na eluição de 1:5 e 1:20 foi utilizado teste de Wilcoxon, adequado para dados pareados. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p foi menor que 0,05.

4.2 Etapa 2: Dosagem das citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros

A partir dos resultados obtidos na etapa 1, foi estudada uma amostra de 34 recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 a 32 semanas, admitidos na unidade neonatal das respectivas maternidades no período de julho de 2012 a dezembro de 2014. Foi avaliada a prevalência através de análise da série histórica de displasia broncopulmonar em uma das unidades nas quais o estudo foi realizado, sendo necessários 32 pacientes para que a correlação fosse estabelecida, considerando prevalência de 9%. O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e das instituições nas quais os dados foram coletados.

4.2.1 Critérios de inclusão

- Recém-nascidos pré-termo com idade gestacional entre 28 e 32 semanas;
- Transportados para a unidade neonatal com pressão positiva contínua em vias aéreas (CPAP);
- Nas três primeiras horas de vida;
- Provenientes da Maternidade Unimed BH – Unidade Grajaú;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais ou responsáveis.

4.2.2 Critérios de exclusão

- Recém-nascidos com malformações congênitas;
- Filhos de mães submetidas a anestesia geral;
- Filhos de mães usuárias de drogas ilícitas;
- Filhos de mães diabéticas;
- Filhos de mães portadoras de síndromes que cursam com doenças endócrinas ou com diagnóstico de doenças endócrinas em tratamento tais como: hipopituitarismo, tumores secretores de hormônios hipofisários, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipoparatiroidismo, hiperparatiroidismo, insulinoma, síndrome de Cushing, síndrome de Conn, doença de Addison e feocromocitoma;
- Recém-nascidos em parada cardiorrespiratória ao nascimento.

4.2.3 Coleta das amostras

As amostras de sangue capilar foram coletadas em papel filtro em três momentos distintos: 10 minutos de vida, 1 hora de vida e 3 horas de vida através de punção de calcanhar. A técnica utilizada para realização das punções seguiu as orientações adotadas pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD) no programa de triagem neonatal, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Procedures and Devices for the Collection for Diagnosis Capillary Blood Specimens; Approved standard – Sixth Edition, CSLI document H04-A6 (ISBN1-56328-667-8)*. Para cada tempo foram preenchidos 5 círculos do papel filtro, mantido na posição horizontal por três horas para secagem, identificado e congelado a 20°C negativos até o momento das

análises. As coletas foram realizadas juntamente com a monitorização necessária para acompanhamento clínico, evitando-se assim, punções exclusivas para fins da pesquisa. Todo material coletado nesta etapa foi obtido através de punção arterial. O eluato foi obtido a partir de metodologia testada previamente como componente deste trabalho (ARYA, 1988).

4.2.4 Ensaios laboratoriais: dosagem das citocinas

As dosagens de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF foram realizadas empregando-se o reagente comercialmente disponível Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 8 plex, Group I (BIO-RAD, Richmond, CA, USA). Trata-se de um ensaio que utiliza a metodologia xMAP (MAP, Perfil de Múltiplos Analitos ; x, sua variável, como por exemplo citocina). Esta permite a dosagem de múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas. Apresenta precisão intra e interensaio de 5 a 10% para citocinas. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata. As leituras das reações foram realizadas por meio de um sistema automatizado de análises laboratoriais (Luminex 100; Luminex, Austin, TX, USA) com software adequado.

4.2.5 Variáveis para análise

4.2.5.1 Variáveis explicativas

- a) IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF em três tempos diferentes: 10 minutos, uma hora e três horas de vida;
- b) Idade gestacional;
- c) Peso de nascimento;
- d) Gênero;
- e) Ápgar de primeiro e quinto minuto;
- f) Temperatura axilar à admissão na unidade neonatal;
- g) Tipo de parto;
- h) Uso de corticoide pré-natal;
- i) Fração inspirada de oxigênio (FIO₂) máxima;
- j) Tempo de utilização de Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas (CPAP);
- k) Tempo de utilização de ventilação mecânica;
- l) Uso de aminas;
- m) Hemotransfusão;
- n) Tempo total de internação;

4.2.5.2 Variáveis-desfecho

- a) Displasia broncopulmonar;

- b) Sepsis precoce e/ou tardia;
- c) Hemorragia peri intraventricular;
- d) Retinopatia da prematuridade;
- e) Óbito;
- f) Pacientes sem desfecho desfavorável.

Encontra-se na Tabela 2 e 3, os critérios utilizados para as definições consideradas no presente estudo.

Tabela 2: Variáveis clínicas utilizadas e definições

Variáveis	Definição
Idade gestacional (IG)	Idade gestacional em semanas completas identificadas a partir de ultrassonografia precoce (IG < 20 semanas).
Peso de nascimento (PN)	Peso de nascimento em gramas.
Gênero	Feminino ou masculino. Não houve nenhum paciente com genitália ambígua.
Ápgar 1º e 5º minuto	Nota atribuída pelo neonatologista em sala de parto para avaliação da vitalidade fetal.
Temperatura axilar (TAx)	Temperatura axilar no momento da admissão na unidade neonatal, agrupando em pacientes com temperatura axilar inferior ou igual e

	superior a 36,4°C.
Tipo de parto	Cesariana / Parto normal. Todos os partos foram realizados em bloco cirúrgico.
Uso de corticoide pré-natal	Administração de no mínimo uma dose de corticoide para acelerar o processo de maturação pulmonar.
Máxima fração inspirada de oxigênio	Todos os pacientes receberam suplementação de oxigênio através de suporte ventilatório não invasivo (CPAP).
Tempo de utilização de CPAP e /ou ventilação mecânica	Uso de CPAP ou ventilação mecânica em dias.
Uso de amins	Utilização ou não de suporte inotrópico (Sim/Não).
Necessidade de hemotransfusão	Utilização de sangue ou derivados (Sim/Não).
Tempo de internação	Número de dias de internação desde o nascimento.

Tabela 3: Variáveis desfecho utilizadas e definições

Variável	Definição
Displasia broncopulmonar	Pacientes em uso de qualquer forma de oxigênio suplementar após 28 dias de vida e/ou 36 semanas de idade gestacional corrigida.
Sepse precoce/tardia	Pacientes com sinais clínicos ou história sugestiva de sepsis precoce

	(nas primeiras 72 horas de vida) ou sepse tardia (piora clínica e laboratorial após 3 dias de vida).
Hemorragia peri-intraventricular	Hemorragia intraventricular de qualquer grau (I-IV) evidenciada através de ultrassonografia transfontanelar, sendo considerado maior grau detectado nos exames durante a internação
Retinopatia da prematuridade	Retinopatia de qualquer grau evidenciada nos exames de mapeamento de retina realizados durante a internação, sendo considerado o maior grau detectado.
Pacientes sem desfecho desfavorável	População que não apresentou nenhum dos desfechos supracitados ou óbito.

4.2.6 Análise estatística

Em um primeiro momento, a análise objetivou a caracterização da amostra total, com análise da frequência para as variáveis categóricas e as medidas descritivas (média, mediana, percentis 25 e 75, mínimo, máximo e desvio-padrão) para as variáveis quantitativas.

Antes de iniciar qualquer análise, testou-se a distribuição dos dados para definir qual classe de testes estatísticos que seriam empregados. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade dos dados.

Após realização do Teste de Normalidade, verificou-se que a distribuição dos níveis sanguíneos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α não é normal, indicando a necessidade de testes não paramétricos. Testes paramétricos foram utilizados para GM-CSF, por apresentar distribuição normal nos dados.

Para a comparação dos níveis sanguíneos das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α) em relação aos tempos avaliados, usou-se o teste de Friedman, adequado para comparações pareadas no caso não-paramétrico e o teste ANOVA de medidas repetidas para GM-CSF, adequado para dados pareados com distribuição normal. As comparações múltiplas (dois a dois) quando necessárias foram realizadas pelo teste de Wicoxon.

Para avaliação da expressão das citocinas em cada tempo por desfecho (DBP, sepse, ROP, HPIV, óbito e sem desfecho desfavorável) empregou-se o teste de Mann-Whitney para IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α e o teste t de Student para GM-CSF.

Em todos os testes estatísticos o nível de significância utilizado foi de 5%, ou seja, testes com valor p inferior a 5% foram considerados significativos.

O *software* utilizado para análise foi o SPSS versão 20

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da etapa 1

Foram utilizadas amostras biológicas de 8 recém-nascidos prematuros, sendo cinco do sexo masculino e três do sexo feminino, com idade gestacional entre 28 e 32 semanas, sem instabilidade hemodinâmica, na primeira semana de vida com o objetivo de identificar a presença das citocinas investigadas em diferentes concentrações de eluição comparando-as com as dosagens obtidas em soro.

Não houve recuperação das citocinas nas amostras de soro. IL-1 também não foi encontrada em nenhuma das eluições de papel filtro testadas. Foi possível identificar IL-6 e TNF em ambas eluições testadas no ensaio (1:5 e 1:20).

Em relação à dosagem de IL-6, observou-se coeficiente de variação muito alto (120,27%) na eluição de 1:5 e alto (84,09%) na eluição de 1:20. Em relação ao TNF, na eluição de 1:5 o coeficiente de variação foi baixo (24,48%) e na eluição de 1:20 foi de baixo a moderado conforme apresentado na tabela 4 (Tabela 4).

Tabela 4: Medidas descritivas e coeficiente de variação de IL-6 e TNF nas eluições de 1:5 e 1:20 (pg/mL)

Medidas	IL-6 1:5	IL-6 1:20	TNF-α 1:5	TNF-α 1:20
N	8	8	8	8
Média	33,870	84,417	113,058	120,396
Mediana	19,881	58,030	121,239	127,763
Desvio-padrão	40,735	80,406	27,671	32,176
Mínimo	9,969	24,960	59,111	59,111
Máximo	133,151	274,315	137,545	163,614
Coeficiente de variação (%)	120,27	95,25	24,48	26,73
Classificação da variação	Muito alta	Alta	Baixa	Baixa

Não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa na eluição de 1:20 coletada em duplicata quando aplicado o teste de Wilcoxon para comparações de medianas das dosagens de IL-6 e TNF ($p=0,686$ e $p=0,063$ respectivamente).

Quando comparadas as concentrações de IL-6 obtidas das eluições 1:5 e 1:20, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$), com maiores concentrações na eluição de 1:20 (58,080). A dosagem de TNF não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as eluições.

5.2 Resultados da etapa 2

Foram incluídos nesta etapa do estudo 34 recém-nascidos prematuros. Os dados demográficos, perinatais e neonatais estão descritos na tabela 5 e a frequência de desfechos clínicos estão descritos na tabela 6. Todos os pacientes da pesquisa utilizaram CPAP em sala de parto durante transferência e nas três primeiras horas de admissão na unidade neonatal. A FiO_2 variou de 40 a 100%, 91,2% das mães não apresentaram infecção do trato urinário (ITU) durante a gestação e 8,8% (3 mães) tinham registro de ITU tratada sem controle de cura no momento do parto. A média de utilização de CPAP entre os recém-nascidos foi de 10,21 dias. Nenhum dos pacientes incluídos na pesquisa foi intubado nas primeiras três horas de vida, mas alguns foram intubados posteriormente, sendo a média de utilização de ventilação mecânica de 12,65 dias nesta população. Ocorreram três óbitos na população estudada.

Tabela 5: Dados demográficos, perinatais e neonatais dos 34 pacientes envolvidos na pesquisa.

Características	Valores
Idade gestacional (semanas) Média (Mínima/Máxima)	30,56 (28–32)
Peso de nascimento (g) Média (Mínimo/Máximo)	1.385 (585–2710)
Gênero (%)-F/M	38,2/61,8
Ápgar 1° minuto-Média(Mínimo/Máximo)	7 (4-9)
Ápgar 5° minuto-Média (Mínimo/Máximo)	9 (5-10)
Idade materna–Média (Mínima/Máxima)	29,79 (17-44)
Desfecho do parto Vaginal/Cesárea (%)	8,8/88,2
Uso de corticóide pela mãe (%)	97,1
Amniorrexe prematura (%)	23,5
Temperatura de admissão $\leq 36,5^{\circ}\text{C}$ (%)	38,2
Uso de amins (%)	20,6
Hemotransfusão (%)	14,7
Utilização de CPAP (dias)–Média (Mínimo/Máximo)	10,21 (1-45)
Utilização de ventilação mecânica (dias)–Média (Min/Max)	12,65 (0-131)
Tempo de internação (dias)–Média (Mínimo/Máximo)	39,26 (5-131)

Tabela 6: Frequência de desfechos clínicos na população investigada

Desfecho	N / Ocorrência (%)
Displasia broncopulmonar	6 / 17,6
Sepse	12 / 35,3
Retinopatia da prematuridade*	9 / 26,5
Hemorragia peri intraventricilar**	7 / 20,6
Óbito	3 / 8,8
Nenhum desfecho desfavorável	16 / 47,1

* Um dos nove pacientes afetados apresentou a forma grave da doença demandando fotocoagulação

**Nenhum paciente apresentou HPIV grau III e IV

O nível sanguíneo de TNF- α na primeira hora de vida no grupo que desenvolveu sepse foi significativamente mais alto quando comparado ao grupo que não desenvolveu quadro de sepse (Tabela 7). Não foi evidenciada correlação entre o nível sanguíneo das citocinas nas primeiras três horas de vida e os demais desfechos analisados no estudo (Tabelas 8. 9 e 10).

Tabela 7: Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de sepse.

Variáveis	SEPSE						P
	Não			Sim			
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana	
IL-6(10 min)	22	4,25	0,00	12	20,90	2,50	0,327
IL-6 (1 H)		33,42	8,90		80,84	24,80	0,299
IL-6 (3 H)		42,58	7,50		191,82	16,80	0,204
IL-8 (10 min)	22	82,10	69,70	12	174,25	77,00	0,511
IL-8 (1 H)		125,47	114,80		242,11	151,80	0,317
IL-8 (3 H)		254,83	230,30		511,35	238,40	0,462
IL-10 (10 min)	22	7,56	0,00	12	12,25	15,90	0,204
IL-10 (1 H)		12,42	0,00		13,87	16,00	0,560
IL-10 (3 H)		9,80	2,40		11,16	13,20	0,749
IFN-γ (10 min)	22	88,37	0,00	12	135,12	79,80	0,094
IFN-γ (1 H)		115,00	0,00		119,44	105,40	0,317
IFN-γ (3 H)		99,00	0,00		267,47	134,80	0,133
TNF-α (10 min)	22	82,05	8,40	12	122,40	24,20	0,383
TNF-α (1 H)		40,95	0,00		102,49	15,60	0,048
TNF-α (3H)		160,32	0,00		107,76	58,60	0,396
GM-CSF (10 min)	22	396,26	310,00	12	466,13	452,8	0,547*
GM-CSF (1 H)		357,41	268,10		444,75	477,8	0,480*
GM-CSF (3 H)		362,68	322,70		379,29	389,20	0,881*

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

Tabela 8: Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de displasia broncopulmonar.

Variáveis	Displasia Broncopulmonar						P
	Não			Sim			
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana	
IL-6(10 min)	28	11,88	0,00	6	1,97	2,50	0,676
IL-6 (1 H)		52,32	8,10		31,88	32,60	0,157
IL-6 (3 H)		103,99	7,40		27,00	23,40	0,157
IL-8 (10 min)	28	119,61	77,00	6	91,37	49,60	0,676
IL-8 (1 H)		155,34	123,70		214,84	122,40	0,643
IL-8 (3 H)		340,41	223,60		339,88	286,60	0,290
IL-10 (10 min)	28	8,44	3,80	6	12,83	16,60	0,297
IL-10 (1 H)		10,81	4,90		24,64	17,60	0,129
IL-10 (3 H)		8,81	2,40		18,36	19,00	0,093
IFN-γ (10 min)	28	105,69	0,00	6	101,07	93,8	0,276
IFN-γ (1 H)		102,71	0,00		193,60	134,8	0,247
IFN-γ (3 H)		151,58	0,00		175,20	172,6	0,268
TNF-α (10 min)	28	115,81	33,10	6	5,23	219,8	0,159
TNF-α (1 H)		50,06	0,00		125,32	617,6	0,173
TNF-α (3 H)		154,39	9,20		77,92	224,6	0,942
GM-CSF (10 min)	28	459,84	388,3	6	239,33	219,8	0,177*
GM-CSF (1 H)		374,96	291,9		451,24	617,6	0,645*
GM-CSF (3 H)		377,94	348,5		313,76	224,6	0,661*

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

Tabela 9: Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de retinopatia da prematuridade

Variáveis	Retinopatia da Prematuridade						P
	Não			Sim			
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana	
IL-6(10 min)	27	9,97	0,00	7	10,74	0,00	0,771
IL-6 (1 H)		57,01	17,0		14,20	6,3	0,451
IL-6 (3 H)		109,56	8,0		14,77	12,10	0,874
IL-8 (10 min)	27	121,62	73,20	7	87,63	55,80	0,559
IL-8 (1 H)		163,99	122,40		165,97	93,50	0,538
IL-8 (3 H)		359,64	238,4		253,43	158,60	0,479
IL-10 (10 min)	27	9,77	12,6	7	7,09	0,00	0,478
IL-10 (1 H)		13,99	14,6		8,03	7,4	0,424
IL-10 (3 H)		10,25	8,8		10,27	7,10	0,874
IFN-γ (10 min)	27	125,06	0,00	7	27,0	0,00	0,379
IFN-γ (1 H)		134,57	85,40		35,07	0,00	0,241
IFN-γ (3 H)		161,45	6,00		126,83	125,0	0,803
TNF-α (10 min)	27	80,23	9,20	7	158,26	39,20	0,478
TNF-α (1 H)		73,72	5,00		6,33	0,00	0,281
TNF-α (3H)		144,21	15,40		136,43	9,20	0,874
GM-CSF (10 min)	27	382,93	316,00	7	567,49	652,2	0,233
GM-CSF (1 H)		388,07	300,80		377,57	364,4	0,956
GM-CSF (3 H)		367,25	318,80		372,57	406,5	0,969

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

Tabela 10: Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro hemorragia peri intraventricular.

Variáveis	Hemorragia peri intraventricular						P
	Não			Sim			
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana	
IL-6(10 min)	25	12,81	0,00	9	2,69	2,60	0,376
IL-6 (1 H)		60,00	14,8		15,55	13,40	0,726
IL-6 (3 H)		116,37	7,00		17,20	13,80	0,522
IL-8 (10 min)	25	120,59	73,20	9	98,04	55,80	0,908
IL-8 (1 H)		149,30	118,20		211,38	165,30	0,220
IL-8 (3 H)		354,70	228,20		295,43	266,60	0,757
IL-10 (10 min)	25	8,06	9,04	9	12,44	16,00	0,246
IL-10 (1 H)		10,62	12,68		20,03	16,30	0,236
IL-10 (3 H)		8,45	10,29		15,90	16,20	0,138
IFN-γ (10 min)	25	112,54	0,00	9	83,58	54,20	0,419
IFN-γ (1 H)		104,91	0,00		152,63	105,25	0,330
IFN-γ (3 H)		158,66	0,00		144,23	125,00	0,420
TNF-α (10 min)	25	120,88	21,00	9	28,00	8,20	0,645
TNF-α (1 H)		55,59	0,00		79,83	5,00	0,374
TNF-α (3 H)		147,45	3,4		128,28	41,9	0,470
GM-CSF (10 min)	25	440,74	386,60	9	365,88	340,00	0,601*
GM-CSF (1 H)		389,96	283,00		375,78	373,3	0,919*
GM-CSF (3 H)		378,52	318,80		336,03	392,6	0,729*

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

As citocinas IL-2 e IL-4 não foram detectadas em nenhum dos tempos investigados.

As medidas descritivas de IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α e GM-CSF nos tempos 10 minutos, 1 hora e 3 horas estão apresentadas nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11: Medidas descritivas das dosagens de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF dos recém-nascidos com 10 minutos de vida (pg/mL).

Variáveis	Média	Mediana	Desv.padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 75
IL-6	10,13	0,00	39,24	0	223,60	0	3,65
IL-8	117,99	77,0	160,88	0	918,0	40,05	146,20
IL-10	9,22	10,10	9,28	0	22,60	0	17,45
IFN- γ	104,87	0,00	243,19	0	1.226,80	0	137,20
TNF- α	96,29	10,10	192,35	0	801,60	0	102,35
GM-CSF	414,49	379,4	363,68	0	1.260,40	94,65	655,15

Tabela 12: Medidas descritivas das dosagens de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF dos recém-nascidos com 1 hora de vida (pg/mL)

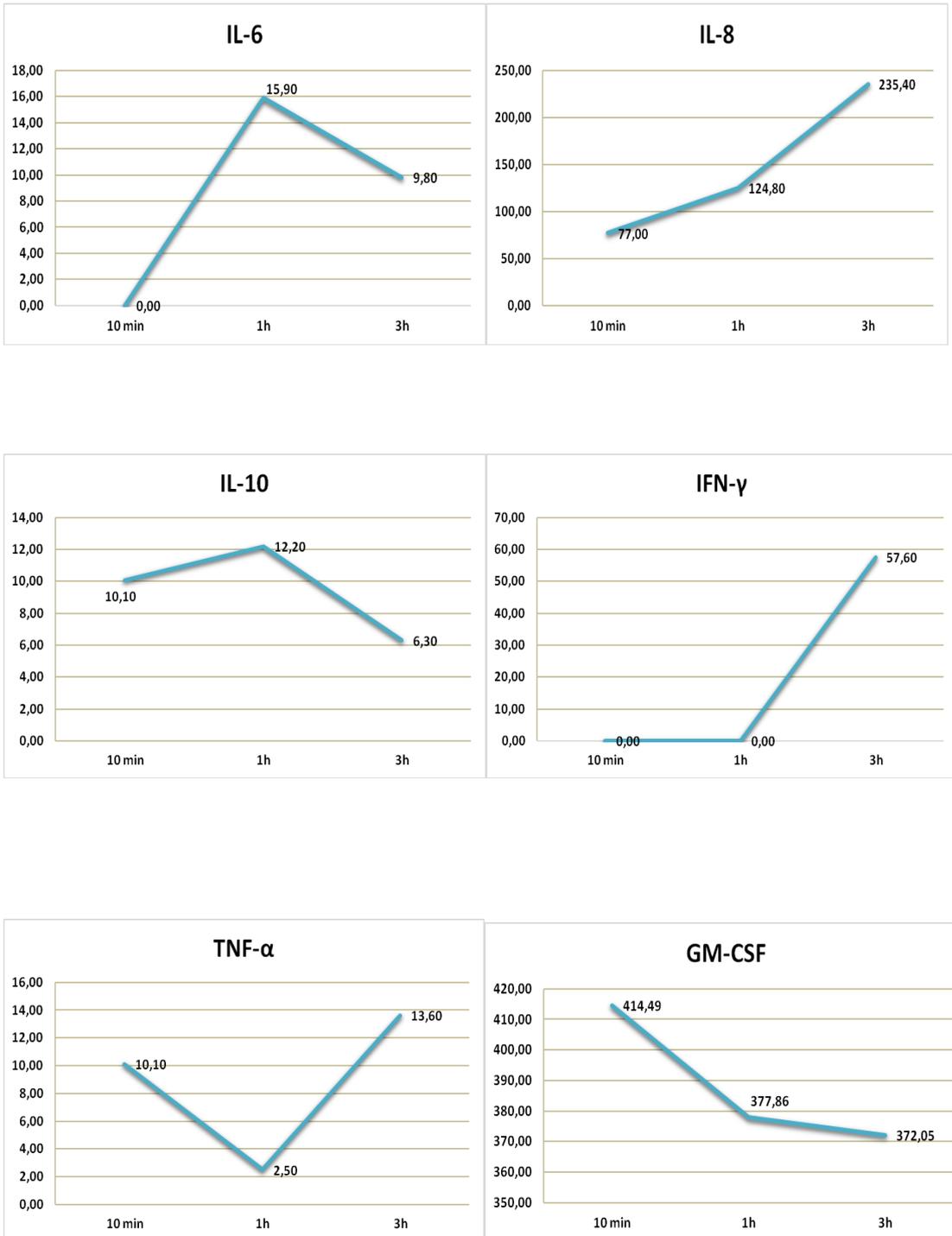
Variáveis	Média	Mediana	Desv.padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 75
IL-6	49,12	15,90	122,39	0	675,4	0	40,40
IL-8	164,72	124,8	167,11	0	855,8	60,10	212,7
IL-10	12,52	12,20	14,37	0	54,20	0	20,65
IFN- γ	113,05	0,00	174,45	0	694,80	0	167,05
TNF- α	59,66	2,5	127,44	0	507,00	0	31,50
GM-CSF	377,86	291,90	332,31	0	1.261,80	82,95	572,90

Tabela 13: Medidas descritivas das dosagens de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF dos recém-nascidos com 3 horas de vida (pg/mL).

Variáveis	Média	Mediana	Desv.padrão	Mínimo	Máximo	Percentil	
						25	75
IL-6	91,25	9,8	334,13	0	1.915,00	0	41,20
IL-8	342,97	235,40	451,41	36,80	2.712,60	143,20	377,50
IL-10	9,95	6,30	10,86	0	30,80	0	17,95
IFN- γ	150,59	57,60	280,13	0	1.533,40	0	205,00
TNF- α	141,75	13,6	205,20	0	681,60	0	301,35
GM-CSF	372,05	348,50	290,95	0	1.068,60	104,90	548,10

O comportamento das citocinas investigadas nas primeiras horas de vida está descrito na Figura 1, sendo evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os tempos para as citocinas IL-6, IL-8 e IFN- γ .

Figura 1: Variação das dosagens de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF nas primeiras três horas de vida.



Na população estudada, 13 pacientes apresentaram temperatura axilar inferior a 36,4°C no momento da admissão na unidade neonatal. Quando avaliada correlação entre os níveis séricos de citocinas e estes pacientes, observou-se que os valores de GM-CSF foram significativamente mais elevados no grupo que não apresentou hipotermia ($p= 0,005$).

Quando comparado o grupo que não demandou intubação durante a internação (16 pacientes) e o grupo intubado após a terceira hora de vida (18 pacientes), não foi evidenciada correlação estatisticamente significativa entre os níveis sanguíneos das citocinas nas primeiras três horas de vida.

A população foi estratificada de acordo com o peso de nascimento e dividida em dois grupos: maiores (13 pacientes) e menores de 1500 gramas (21 pacientes), não sendo identificados comportamentos diferenciados dos níveis sanguíneos das citocinas entre os grupos nos diferentes tempos estudados.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrada a possibilidade de detecção de citocinas nas três primeiras horas de vida de recém-nascidos prematuros a partir de sangue capilar coletado em papel filtro. Em decorrência da dificuldade de identificação de citocinas no soro na etapa de detecção, optou-se pela não realização de testes a partir de amostras de soro na população incluída no estudo. Foi estabelecida como eluição padrão da pesquisa a concentração de 1:20 por tratar-se de método previamente utilizado em outros trabalhos (ANEXO 4) e por ter apresentado concentrações de IL-6 mais elevadas na fase de testes, com diferença estatisticamente significativa quando comparada à eluição de 1:5 ($p=0,012$).

A utilização do papel filtro como estratégia para realização de monitoramento laboratorial tem sido testada nos últimos anos (SKOGSTRAND *et al.*, 2005; SKOGSTRAND *et al.*, 2008; McDADE *et al.*, 2007). Strongstrand e colaboradores (2008) realizaram dosagens simultâneas de 25 marcadores inflamatórios utilizando ensaios multiplex a partir de eluato extraído de sangue coletado em papel filtro. A metodologia descrita foi posteriormente utilizada por Ambalavanan e colaboradores em um estudo multicêntrico no qual foram incluídos 1067 recém-nascidos de extremo baixo. O objetivo inicial foi descrever a correlação entre a expressão das citocinas e o desenvolvimento de paralisia cerebral e complicações do sistema nervoso central (SKOGSTRAND *et al.*, 2005; AMBALAVANAN *et al.*, 2009;).

Entretanto, o número de estudos realizados utilizando essa metodologia é pequeno quando comparado aos ensaios realizados a partir de dosagens séricas (MEI *et al.*, 2001). A principal vantagem da coleta de amostras de sangue em papel filtro é o pequeno volume necessário, o que na população neonatal constitui aspecto relevante em decorrência da volemia total circulante e da grande demanda de múltiplas coletas para monitoramento clínico e laboratorial. A menor intensidade da dor causada aos recém-nascidos, a facilidade de coleta, armazenamento e transporte do material coletado são vantagens importantes quando o método é

comparado ao método tradicional de utilização de soro ou plasma (McDADE, 2014). Outro aspecto que fortalece a utilização do papel filtro é a possibilidade de estabilização das citocinas no papel filtro em relação às amostras analisadas a partir do soro. Comparações entre a concentração de citocinas e diferentes metodologias de manipulação das amostras foram realizadas com o objetivo de detectar a interferência da fase pré-analítica nos resultados encontrados (SKOGSTRAND *et al.*, 2008). Quando as amostras de sangue foram armazenadas durante um período de tempo antes da centrifugação, os valores encontrados de citocinas foram mais elevados que nas amostras nas quais o sangue foi centrifugado e o soro congelado imediatamente após a punção venosa. Para as amostras coletadas em papel filtro, estas variações foram menos significativas. Os autores se referiram ao método como sendo uma boa alternativa para minimizar as interferências da fase pré-analítica, que podem configurar viés aos estudos realizados a partir de amostras de soro ou plasma. Entretanto, no Brasil a dosagem de biomarcadores a partir de amostras coletadas em papel filtro ainda é muito restrita às investigações realizadas pela triagem neonatal, não sendo utilizada na prática clínica como método alternativo com vantagens bem estabelecidas, especialmente quando considerada a população de recém-nascidos prematuros.

O presente estudo avaliou a dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF em recém-nascidos prematuros em três momentos diferenciados: 10 minutos, 1 hora e três horas de vida. Esta é a primeira vez que citocinas são dosadas em estágios tão precoces de vida pós-natal, sendo a avaliação mais precoce descrita pela literatura realizada a partir de 4 horas de vida (AMBALAVANAN *et al.*, 2009). A dosagem de biomarcadores com potencial preditivo e/ou prognóstico tem sido alvo de muitos estudos em neonatologia, uma vez que pode possibilitar a identificação do grupo de pacientes com maior probabilidade de desenvolvimento de desfechos clínicos graves ou com potencial de complicação, estimulando o desenvolvimento e a adoção de medidas preventivas direcionadas para este grupo.

Em relação aos desfechos estudados na pesquisa, foi evidenciada correlação entre a expressão de TNF na primeira hora de vida e o desenvolvimento de sepse precoce ou tardia ao longo da internação, não sendo identificada correlação com DBP, ROP, HPIV e óbito. A sepse é uma das maiores causas de morbi mortalidade nas unidades neonatais, sendo sua identificação, prevenção e controle um grande desafio para a equipe de saúde. Foi considerado diagnóstico de sepse pacientes com quadro clínico sugestivo nas primeiras 72 horas de vida, com confirmação laboratorial ou não e pacientes com diagnósticos confirmados em exames laboratoriais após as 72 horas de vida. Prashant e colaboradores (2013) realizaram dosagens séricas de IL-6, IL-8, TNF- α e proteína C reativa (PCR) de recém-nascidos antes da administração de antibióticos, 24 e 48 horas após início de antibioticoterapia. Os pacientes foram divididos em três grupos: infectados, não infectados e controle. Houve elevação significativa das dosagens de TNF- α quando comparados os grupos de recém-nascido infectados e não infectados com o grupo controle. Os recém-nascidos que não sobreviveram apresentaram dosagens mais elevadas quando comparados aos que sobreviveram. A conclusão foi de que TNF- α apresenta alta sensibilidade no diagnóstico de inflamação e níveis aumentados podem predizer maior risco de óbito. Os autores sugerem a associação de dosagem de IL-6 e TNF- α para diagnóstico de sepse neonatal. Outros trabalhos também demonstraram o aumento dos níveis de TNF- α em pacientes com sepse clínica quando comparados ao grupo controle (PICKLER *et al.*, 2010). Entretanto, Santana e colaboradores, 2001 demonstraram que os níveis de TNF não foram significativamente diferentes entre recém-nascidos doentes e saudáveis. Essas diferenças entre os estudos podem ser decorrentes do fato de que a cinética de produção do TNF- α não está completamente compreendida em estágios de vida tão precoces (MACHADO *et al.*, 2014). A expressão de TNF- α parece ter correlação com a severidade da sepse e mortalidade (GIRARDIN *et al.*, 1990). No presente trabalho o número de óbitos foi pequeno por tratar-se de população com média de idade gestacional de 30 semanas e por este motivo não foi possível fazer a correlação entre o desenvolvimento de sepse e os óbitos. Apesar de o TNF- α ter uma correlação conhecida com o desenvolvimento de sepse, o achado do presente estudo de uma correlação com significância estatística já na primeira hora de vida

aponta para a possibilidade de utilização desse marcador para adoção de medidas preventivas a partir da identificação desse grupo de pacientes.

A maior parte dos trabalhos publicados foi desenvolvida com recém-nascidos de muito baixo peso e apresentam a correlação de citocinas com desfechos clínicos de etiologia inflamatória prevalentes no período neonatal, especialmente de DBP e sepsis (AMBALAVANAN *et al.*, 2009; LAUGHON *et al.*, 2011; Ng, LAM, 2010). No presente estudo, 17,6% da população estudada desenvolveu displasia broncopulmonar, mas não foi evidenciada correlação com as citocinas investigadas em nenhum dos tempos estabelecidos, o que pode ter relação com a média de idade gestacional da população estudada e a prevalência aumentada da doença entre pacientes com prematuridade extrema e extremo baixo peso. A relação das citocinas com o desenvolvimento de retinopatia da prematuridade, hemorragia intraventricular e enterocolite necrotizante também foi investigada em alguns trabalhos, mas não foi demonstrada no presente estudo (SILVEIRA; FORTES FILHO; PROCIANOY, 2011; MERHAR, 2011; MAHESHWARI, 2014). Na população estudada, apenas um dos nove pacientes com diagnóstico de retinopatia da prematuridade desenvolveu a forma grave da doença, não houve nenhum caso de hemorragia peri intraventricular grau III e IV e nenhum paciente desenvolveu enterocolite necrotizante.

Não foi detectada presença de IL-2 e IL-4 nas primeiras três horas de vida. IL-2 tem como estímulo primário para sua liberação a presença de bactérias e seus produtos e normalmente não é detectada em lesões agudas. Nenhuma das mães dos recém-nascidos incluídos nesta pesquisa teve diagnóstico clínico de corioamnionite e na maior parte dos casos, a causa da prematuridade foi doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). Não foi realizado exame anatomopatológico das placentas. A ausência de contexto infeccioso pode ser a explicação para a não identificação de IL-2. IL-4 é uma citocina anti-inflamatória e a hipótese para a não identificação da mesma neste estudo é o fato de que os estímulos decorrentes do nascimento, apesar de suficientes para induzir a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias, não são capazes de induzir uma contra resposta, uma vez que esta se relaciona à intensidade do estímulo.

Em relação ao comportamento das citocinas nos diferentes tempos, observou-se no presente estudo que ocorre liberação de IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF nas primeiras horas de vida. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados na expressão de IL-6, IL-8 e IFN- γ .

Existem controvérsias acerca do momento de liberação das citocinas. IL-6 apresentou concentrações diferenciadas nos três tempos, sendo as maiores concentrações detectadas com 1 hora de vida. Estudo prévio demonstrou que os níveis de IL-6 em sangue venoso foram significativamente mais elevados quando comparados às dosagens de sangue de cordão e apresentou alta especificidade na confirmação de infecção e alta sensibilidade em prever mortalidade após 48 horas de início da terapia antimicrobiana (PRASHAND *et al.*, 2013). Os níveis aumentados de IL-6 também são evidenciados em trabalhos que investigam sua correlação com DBP e sua produção no sítio da inflamação parece ser a chave para identificação da transição entre a fase aguda e crônica da inflamação (GABAY, 2006). IL-6 dosada nas primeiras 72 horas de vida teve correlação com desenvolvimento de ROP no estudo de Silveira e colaboradores (2011). IL-6 induz a liberação hepática de PCR e por este motivo, aumentos de IL-6 ocorrem antes que níveis elevados de PCR sejam detectados.

No presente estudo foram observados níveis progressivamente mais elevados de IL-8 ao longo das 3 primeiras horas de vida. Ambalavanam e colaboradores (2009) também observaram elevação das concentrações de IL-8 nos três primeiros dias de vida e demonstraram que IL-8 foi significativamente mais alta com 21 dias de vida em recém-nascidos que evoluíram a óbito. Um estudo realizado com recém-nascidos a termo e prematuros tardios demonstrou que a ventilação mecânica foi capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) duas horas após a intubação (BOHER *et al.*, 2010). Aumento dos níveis de IL-8 em recém-nascidos com sepse foi demonstrado quando comparados a recém-nascidos não infectados sugerindo que este aumento estaria relacionado à infecção, apresentando alta especificidade na confirmação de infecção com 24 e 48 horas e alta sensibilidade como preditor de mortalidade (PRASHAND *et al.*, 2013). Em estudo multicêntrico randomizado, a utilização das dosagens séricas de IL-8

combinadas com avaliações de PCR como algoritmo para investigação de sepse reduziu o uso de antibióticos desnecessários em recém-nascidos com suspeita de sepse precoce (FRANZ *et al.*, 2004).

IL-6 e IL-8 apresentam meia-vida curta e as concentrações circulantes reduzem significativamente com o tratamento antimicrobiano nos casos de sepse, tornando as citocinas indetectáveis após 24 horas de instituição do tratamento. Estas características limitam a utilização da dosagem destas citocinas como recurso diagnóstico na sepse. Entretanto, a observação do comportamento das mesmas em estágios precoces de vida pós-natal pode ser útil para realização de investigações futuras com agrupamentos de pacientes com patologias previamente definidas ou com outros perfis clínicos.

Nesse trabalho, o IFN- γ foi detectado apenas com 3 horas de vida. Em trabalhos que investigam a associação de citocinas com DBP, o IFN- γ apresentou correlação com DBP e óbito em pacientes de extremo baixo peso (AMBALAVANAN *et al.*, 2009).

A expressão de GM-CSF neste trabalho foi detectada nas três primeiras horas de vida sem alteração estatisticamente significativa entre os tempos. Na população estudada, 13 pacientes apresentaram hipotermia (temperatura axilar inferior a 36,4°C) à admissão na Unidade Neonatal, sendo identificada redução dos níveis dessa citocina quando comparada à população que não apresentou hipotermia. Sabe-se que a citocina GM-CSF apresenta ação reguladora de células mieloides e atua na ativação de células mais maduras. A possível explicação para o achado do presente estudo é de que a hipotermia atue na redução dos níveis de GM-CSF, reduzindo a ativação das células mieloides maduras, podendo potencializar processos inflamatórios por supressão. Um estudo realizado com modelos animais infectados submetidos a hipotermia demonstrou que o tratamento com GM-CSF induz o aumento da contagem de neutrófilos e reduzindo a mortalidade dos ratos, bem como a ativação de citocinas pró inflamatórias (TOROSSIAN *et al.*, 2003)

Alguns pacientes incluídos na pesquisa, apesar de não terem sido intubados nas primeiras três horas de vida, demandaram intubação posterior durante a internação

(18 pacientes). Foi investigado se esta população apresentava comportamento diferenciado em relação aos níveis séricos de citocinas quando comparada à população que não demandou ventilação mecânica em nenhum momento durante a internação (16 pacientes), não sendo identificadas diferenças estatisticamente significativas entre estas populações.

Como a maior parte dos trabalhos desenvolvidos em relação às dosagens de citocinas e sua correlação com os desfechos clínicos são realizadas em populações de recém-nascidos de extremo baixo peso, foi realizada estratificação da população estudada de acordo com o peso, comparando o comportamento e relação com os desfechos clínicos entre menores de maiores de 1500 gramas, não sendo identificadas diferenças de comportamento entre as populações de nenhuma das citocinas investigadas.

Quando comparados os valores séricos das citocinas investigadas no presente trabalho com aqueles demonstrados no estudo de Ambalavanam e colaboradores (2009), percebe-se que as dosagens das citocinas encontradas foram mais baixas na população entre 28 a 32 semanas, o que aponta para a relação entre a intensidade dos estímulos e a magnitude da resposta inflamatória, uma vez que, quanto maior o grau de prematuridade, mais intervenções são necessárias para garantia do suporte de vida e estabilização clínica. A descrição do comportamento das citocinas em estágios precoces de vida pós-natal pode possibilitar a correlação com as situações clínicas vivenciadas por este grupo de pacientes bem como possibilitar avaliações futuras em relação ao potencial estressor dos procedimentos realizados nas primeiras horas de vida. A detecção das citocinas nesse grupo de pacientes demonstra o potencial fisiológico de recém-nascidos prematuros de responder a insultos, que podem ter início na vida intrauterina, sendo potencializados pelos procedimentos pós-natais aos quais são submetidos, especialmente nas primeiras horas de vida.

Todos os pacientes incluídos nesta pesquisa receberam CPAP precoce em sala de parto e admissão na unidade neonatal e os níveis séricos de citocinas foram menores quando comparados aos encontrados no estudo de Ambalavanam e colaboradores (2009). Os efeitos do CPAP na inflamação pulmonar foram

demonstrados em modelos animais (JOBE *et al.*, 2002; POLGLASE *et al.*, 2009). Em recém-nascidos prematuros os trabalhos são limitados, mas a estratégia parece ser protetora quando comparada à expressão de citocinas em pacientes intubados.

7 CONCLUSÃO

É possível realizar dosagem de citocinas a partir de amostras de sangue coletadas em papel filtro e ocorre resposta imunológica nas três primeiras horas de vida em recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas. Foi demonstrada correlação entre os níveis séricos de TNF- α na primeira hora de vida e o desenvolvimento de sepse na população estudada e a elevação dos níveis séricos de GM-CSF apresentou correlação com hipotermia no momento da admissão na unidade neonatal. Mais estudos são necessários para evidenciar a correlação entre o comportamento das citocinas e as intervenções realizadas nas primeiras horas de vida.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nascimento prematuro representa uma ruptura das condições ideais de desenvolvimento. Sendo assim, o grande desafio da equipe de saúde é gerar condições para que o desenvolvimento sistêmico seja pouco afetado através da proposição de práticas que interfiram minimamente neste processo. Entretanto, o que se observa nas unidades de saúde são práticas muito voltadas para o fluxo de trabalho com poucas considerações acerca da individualidade do cuidado prestado e das características fisiopatológicas dessa população, que apresenta uma série de demandas específicas para que o desenvolvimento tenha continuidade de maneira adequada.

Neste trabalho foi utilizada metodologia de dosagem a partir de coleta de sangue em papel filtro. A coleta de sangue obtida através de punção capilar em papel filtro representa uma alternativa viável, de custo baixo, que tem como vantagens relevantes para a população neonatal o pequeno volume de sangue necessário ao preenchimento dos círculos quando comparado às dosagens séricas, a estabilização dos biomarcadores em papel filtro, a facilidade de armazenamento e transporte. Pesquisadores têm realizado análises utilizando material coletado em papel filtro há mais de 20 anos com boa recuperação. Recentemente, mais de 35.000 amostras de sangue foram coletadas em papel filtro para realização de estudos longitudinais nos Estados Unidos (Mcdade, 2011). No passado, estudos acerca do comportamento das citocinas pró-inflamatórias era restrito devido à técnica de análise disponível na qual apenas um analito podia ser investigado por vez, gerando uma demanda de grandes volumes de material biológico, o que inviabilizava avanços desse tipo de estudo na população neonatal. Com o desenvolvimento de ensaios *multiplex* em substituição aos ensaios convencionais tais como *ELISA*, tem sido possível detectar um grande número de citocinas com pequenos volumes de material biológico (BOSE; DAMMANN; LAUGHON, 2011).

Recém-nascidos com idade gestacional entre 28 e 32 semanas representam a maior parte das admissões das unidades neonatais e apesar de estarem menos expostos a complicações quando comparados àqueles com idade gestacional inferior a 28 semanas, são igualmente submetidos a inúmeros procedimentos desde o nascimento que podem desencadear respostas metabólicas, endócrinas e humorais, mesmo que os desfechos clínicos desfavoráveis avaliados durante a internação não sejam observados. No presente trabalho, foram incluídos pacientes com idade gestacional média de 30 semanas, população na qual a incidência de DBP, ROP, HPIV e óbito é baixa. Entretanto, o estudo descreve a possibilidade e praticidade da detecção de citocinas em papel filtro, evidencia a expressão das mesmas nas primeiras horas de vida e descreve a correlação dos níveis séricos de TNF- α e o desenvolvimento de sepse, bem como a correlação da redução dos níveis séricos de GM-CSF com a hipotermia na primeira hora de vida.

Nos últimos anos, muitas discussões têm sido realizadas acerca das práticas nas unidades neonatais. O aumento da sobrevida resulta na utilização de tecnologias e práticas cada vez mais invasivas e potencialmente danosas que comprometem a continuidade do desenvolvimento dos múltiplos sistemas bem como o processo de maturação e diferenciação celular. A evidência de que as condutas podem apresentar repercussão sistêmica corroboram para adoção de intervenções menos invasivas e configuram fundamentação teórica para mudanças nas práticas assistenciais, especialmente em sala de parto e admissão na unidade neonatal. O estresse precoce pode resultar em alterações sistêmicas afetando o desenvolvimento dos recém-nascidos. Trabalhos realizados com modelos animais demonstraram que a separação de ratos de suas mães em momentos críticos do desenvolvimento resultou em aumento da vulnerabilidade a doenças tais como redução da resistência à infecções virais e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (GHIA; BLENNERHASSET; COLLINS, 2008; FATURI *et al.*, 2010). Recém-nascidos prematuros, além de permanecerem separados de suas mães desde a sala de parto, são submetidos a uma série de intervenções necessárias ao suporte de vida. A grande maioria destas intervenções são potencialmente dolorosas, uma vez que até mesmo o toque pode ser interpretado pelo córtex imaturo como estímulo algico. Estas experiências no período neonatal precoce

alteram a arquitetura cerebral final, comprometendo o processo de proliferação, diferenciação, migração e apoptose neuronal (BARTOCCI *et al.*, 2006). A dor e o sistema imunológico se influenciam mutuamente e os trabalhos sugerem que a nocicepção é capaz de induzir a formação de citocinas pró-inflamatórias que potencializam o estímulo inicial (SHAVIT; FRIDEL; BEILIN, 2006).

Além disso, a fragilidade e escassez de modelos de seguimento (*followup*) no Brasil dificultam a identificação das complicações tardias decorrentes das intervenções no período neonatal precoce. Os diagnósticos de DBP, sepse, ROP e HPIV ocorrem durante a internação, o que não exclui a possibilidade de complicações neuropsicomotoras e comportamentais passíveis de identificação somente ao longo do desenvolvimento.

Sendo assim, gerar condições de nascimento que minimizem a liberação desses mediadores pode favorecer os processos adaptativos à vida extrauterina e minimizar complicações futuras, uma vez que o somatório de estímulos pode potencializar o desenvolvimento de complicações imediatas e tardias em recém-nascidos prematuros. A identificação precoce de biomarcadores pode ser ferramenta importante para identificação dos indivíduos com maior risco para desenvolvimento de desfechos desfavoráveis e conseqüentemente possibilitar a adoção de práticas preventivas e intervencionistas mais precoces e efetivas.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A amostra estudada não permitiu a correlação entre a expressão das citocinas nesta fase da vida pós natal com os desfechos clínicos prevalentes na população de recém-nascidos entre 28 e 32 semanas de idade gestacional., exceto nos casos de sepse.

A ausência de um grupo controle constituído por recém-nascidos a termo para que fossem estabelecidas comparações.

A ausência de coleta de sangue de cordão na população estudada, que poderia gerar dados acerca do impacto real dos procedimentos pós-natais no padrão de expressão das citocinas.

A utilização de reagentes ultrasensíveis poderia ter possibilitado a obtenção de valores detectáveis que nesta metodologia ficaram abaixo do limite de detecção inferior do teste.

10 **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Após constatação da possibilidade de detecção das citocinas utilizando a metodologia proposta, em trabalhos futuros pretende-se estabelecer análises comparativas com sangue de cordão e sangue de pacientes de termo, para investigar a correlação entre os níveis séricos e os procedimentos rotineiros realizados ao nascimento. Além disso, pretende-se que esse trabalho inaugure uma linha de pesquisa envolvendo áreas básicas e assistenciais, com ganhos substanciais para os pacientes e adoção de melhores práticas clínicas.

11 REFERÊNCIAS

1. AMBALAVANAN, N. et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1132-41, 2009.
2. ARYA, S.C. Testing for AIDS on samples of dried blood prepared on filter papers. **Vaccine**, v.6, p. 210, 1988.
3. AVITSUR, R.; MAAYAN, R.; WEIZMAN, A. Neonatal stress modulates sickness behavior: Role for proinflammatory cytokines. **J neuroimmunol**, v. 257, n. 1-2, p. 59-66, 2013.
4. BALK, R. Roger C Bone, MD and involving paradigms of sepsis. **Contrib Microbiol**, v. 17, p. 1-11, 2011.
5. BATTON, D. G. et al. Current gestational age-related incidence of major intraventricular hemorrhage. **J Pediatr**, V. 125, N. 4, P. 623–25, 1994.
6. BERNER, D. et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony stimulating factor, tumor necrosis factor- α , interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-8, and soluble intracellular adhesion molecule -1 in neonatal early onset sepsis. **Pediatr Res**, v. 44, n. 4, p. 469-77, 1998.
7. BIZARRO, M. J. et al. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, p. 595-602, 2005.
8. BOHRER, B. et al. Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro-and anti inflammatory cytokines. **J Pediatr**, v. 156, n. 1, p. 16-9, 2010.

9. BONADIO, W. A. et al. Reliability of observation variables in distinguishing infectious outcome of febrile young infants. **Pediatr Infect Dis**. V. 12, N. 2, P. 111-4, 1993.
10. BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, v. 136. N. 5, p. e28, 2009.
11. BOSE, C.L.; DAMMANN, C.E.L.; LAUGHON M.M. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. **Arch Dis Child Fetal Neonatal** Ed, v. 93,n. 6, p. F455-61, 2008.
12. BOSE, C. et al. Blood protein concentrations in the first two postnatal weeks that predict bronchopulmonary dysplasia among infants born before the 28th week of gestation. **Pediatr Res**, v. 69, n. 4, p. 347-53, 2011.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/Aids. Projeto AJUDE-Brasil: Avaliação epidemiológica de usuários de drogas injetáveis do Projetos de redução de Danos (PRD) apoiados pela CN-DST/Aids. Brasília, 2006. Disponível em : http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/51projeto_ajudeBrasil.pdf. Acesso em 16 jan. 2011.
14. BRYCE, J. et al. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? **Lancet**, v. 365, n. 9478, p. 2193-200, 2005.
15. BUCK, C. et al. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. **Pediatrics**, v. 93, n. 1, p. 54-8, 1994..
16. CARVALHO, C. G.; SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Ventilator-induced lung injury in preterm infants. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 25, n. 4, p. 319-26, 2013. .
17. CHANG-LING, T.; GOCK, B.; STONE, J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that physiological hypoxia is the stimulus

- for normal retinal vasculogenesis. Invest **Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, n. 7, p. 1201-14, 1995.
18. CHAVES, A. R. et al. Pharmacologic administration of interleukin-2. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1182, p. 1869-75, 2009.
19. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, 2002.
20. CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptor, effects, and inducers. **Clin Microbiol Ver**, v. 10, p. 742-80, 1997.
21. DE WALL MALEFYT, R, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: na autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, v. 174, n. 5, p. 1209-20, 1991.
22. DEMBINSKI, J. et al. Cell- associated interleukin-8 in coord blood of term and preterm infants. **Clin Diag Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 320-23, 2002.
23. FAN, Y.; YU, J-L. Umbilical bood biomarkers for preditiong early-onset neonatal sepsis. **World J Pediatr**, v. 8, n. 2, p. 101-08, 2012.
24. FANAROFF, A.A. et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. **Am J Obst Gynecol**. V. 196, n. 2, p. 147.e1-8, 2007.
25. FATURI, C. B. et al. Disruptions oj the mother-infant relationship amd stress-related behaviors: altered corticosterone secretion does not explain everything. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 34, n. 6, p. 821-34, 2010.
26. FRANZ, A. R. et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, radomized, controlled Trial. **Pediatrics**, v. 114, n. 1, p. 1-8, 2004.
27. GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. suppl 2, p. S3, 2006.

28. GERDES, J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. **Clin Perinatol**, V. 18, N. 2, P. 361-81, 1991.
29. GILBERT, C. et al. Characteristics of infants with severe retinopathy for screening programs. **Pediatrics**, v. 115, n. 5, p. e518-25, 2005.
30. GIRARDIN, F.P, et al. Serum tumor necrosis factor in newborn at risk for infections. **Eur Journal Pediatrics**, v. 149, n. 9, p. 45-47, 1990.
31. GOLDSTEIN, B.; GOROIR, K.; RANDOLPH, A. international pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatr Crit Care Med**, v. 6, n. 1, p. 2-8, 2005.
32. GRUNAU, R. Early pain in preterm infants: a model of long-term effects. **Clin Perinatol**, v. 29, n. 3, p. 373-94, 2002.
33. HEUCHAN, A. M. et al. Perinatal risk factors for major intraventricular haemorrhage in the Australian and New Zealand Neonatal Network, 1995–97. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 86, n. 2, p. F86-F90, 2002.
34. HORBAR, J.D. Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. **Pediatrics**, v. 110, n.1 Pt 1, p. 143-51, 2002.
35. HOWARD *et al.* Biological properties of interleukin 10. **J Clin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 239-47, 1992.
36. JOBE, A. H.; BANCALARI, E. Bronchopulmonary dysplasia. **Am J Respir Critl Care Med**, v. 163, n. 7, p. 1723-29, 2001.
37. JOBE, A. H. et al. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. **Pediatr Res**, v. 52, n. 3, p. 387-92, 2002.
38. JONSSON, B. et al. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of sibsequent chronic lung disease in preterm infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 77, n. 3, p. F198-201, 1997.

39. KOTECHA, S. et al. Increase in interleukin-8 and soluble intracellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who developed chronic lung disease. **Arch Dis Child Fetal Neonatal** Ed, v. 72, n. 2, p. F90-96, 1995.
40. KUMAR, A. et al. Myocardial dysfunction in septic shock: part II. Role of cytokines and nitric oxide. **J Cardiothorac Vasc Anesth**, v. 15, n. 4, p. 485-511, 2001.
41. LAM, H.S.; Ng P.C. Biochemical markers for neonatal sepsis. **Phatology**, v. 40, n. 1, p. 141-8, 2008.
42. LATIFI, S. Q; O'RIORDAN, M. A.; LEVINE, A. D. Interleukin 10 controls the onset of irreversible septic shock. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4441-46, 2002.
43. LAUGHON, M. M. et al. Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 183, n. 12, p. 1715-22, 2011.
44. LIN, E.; CALVANO, S.E.; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-26, 2000.
45. MACHADO, J. R. et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. **Mediators of inflammation**, v. 2014.
46. MAHESHWARI, A. et al. Cytokines Associated with Necrotizing Enterocolitis in Extremely Low Birth Weight Infants. **Pediatr Res**, v. 76, n. 1, p. 100-108, 2014.
47. March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Eds CP Howson, MV Kinney, JE Lawn. World Health Organization. Geneva, 2012.
48. MATOBA, N. et al. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. 1320-28, 2009.

49. MCDADE, T. W. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. **Am. J Hum Biol**, v. 26, n. 1, p. 1-9, 2014.
50. MCDADE, T. W.; BURHOP, J.; DOHNAL, J. High-sensitivity enzyme immunoassay for C-reactive protein in dried blood spots. **Clin Chem**, v. 50, n. 3, p. 652-4, 2004.
51. MCDADE, T.W.; WILLIAMS, S. SNODGRASS, J.J. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. **Demography**, v. 44, n. 4, p. 899-925, 2007.
52. MEADOW, W.; RUDINSKY, B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis: rarely has so little been known by so many about so much. **Clin Perinatol**, v. 22, n. 2, p. 519-36, 1995.
53. MEAGER, A. et al. Na assessment of biological potency and molecular characteristics of different innovator and noninnovator interferon-beta products. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 4, p. 383-92, 2010.
54. MEI, J. V. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. **J Nutr**, v. 131, n. 5, p. 1631s- 6s, 2001.
55. MERHAR, S. Biomarkers in neonatal poshemorrhagic hydrocephalus. **Neonatology**, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2011.
56. Ng, P.C. et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low weight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 77, n. 3, p. F221-F227, 1997.
57. Ng, P.C; LAM, H. S. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: Cytokines and beyond. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 3, p. 599-610, 2010.
58. OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Crit Care Med**, v. 30, n.1 sup, p. S58-S63, 2002.

59. OZDEMIR, A.; BROWM, M. A.; MORGAN, W. J. Merkers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. **Pediatr Pulmonol**, v. 23, n.4, p. 292-306, 1997.
60. PANERO, A. et al. Interlekin 6 in neonates with early and late onset infection. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 4, p. 370-75, 1997.
61. PATTERSON, A.M. et al. Ureaplasma urealyticum respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants. **Pediatr Infect Dis J**, V. 17, p. 321-28, 1998.
62. PATZ, A.; HOECK, L. E.; DE LA CRUZ, E. studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasias. I Nursery Observations. **Am J Ophthalmol**, v. 35, n. 9, p. 1248-53, 1952.
63. PICKLER, R. et al. Integrated review of cytokines in maternal Cord and newborn blood: part II – associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants. **Biol Res Nurs**, v. 11, n. 4, p. 377-86, 2010.
64. PIERCE, E. A.; FOLEY, E. D; SMITH, I. E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. **Arch Ophthalmol**, v. 114, n. 10, p. 1219-28, 1996.
65. POLGLASE, G. R. et al. Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation. **Pediatr Res**, v. 65, n. 1, p. 67-71, 2009.
66. PRASHANT, A. et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68426, 2013.
67. ROCHA, G. et al. Cord blood levels of IL-6, IL-8 and IL-10 may be early predictors of bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns small for gestational age. **Des Markers**, v.33, n.1, p. 51-60, 2012.

68. ROTH, A. M. Retinal vascular development in premature infants. **Am J Ophthalmol**, v. 84, n.5, p. 636-40, 1977.
69. SANTANA, C. et al. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. **Acta Paediatr**, v. 90, n. 10, p. 1176-81, 2001.
70. SAVMAN, K. et al. Cytokine response in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthaemorrhagic ventricular dilatation. **Acta Paediatr**, v. 91, n. 12, p. 1357–63, 2002.
71. SCHMITZ, T. et al. Interleukin-1 β , interleukin-18, and interferon- γ expression in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus – markers of white matter damage? **Pediatr Res**, v. 61, n. 6, p. 722-26, 2007.
72. SHAVIT, Y.; FRIDEL, K.; BEILIN, B. Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 1, n. 4, p. 433-51, 2006.
73. SILVEIRA, R. C.; FORTES FILHO, J. B.; PROCIANOY, R. S. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 3, p.1297-301, 2011.
74. SILVEIRA, R. C; PROCIANOY, R. S. High plasma cytokine levels, white matter injury and neurodevelopment of high risk preterm infants: assessment at two years. **Early Hum Dev**, v. 87, n. 6, p.433-7, 2011.
75. SILVEIRA, R. C; PROCIANOY, R.S. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1- β for early diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, v. 88, n. 6, p. 647-50, 1999.
76. SIMON, C. et al. Neonatal sepsis in intensive care unit and results of treatment. **Infec**, v. 19, n. 3, p. 146-49, 1991.

77. SIMONSEN, K. A. et al. Early-onset neonatal sepsis. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 1, p. 21-47, 2014.
78. SKOGSTRAND, K. et al. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. **J Immunol Methods**, v. 336, n. 1, p. 78-84, 2008.
79. SKOGSTRAND, K. et al. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. **Clin Chem**, v. 51, n. 10, p. 1854-66, 2005.
80. STENSON, B; BROCKLEHUST, P.; TARMOW0MORDI, W. Increased 36-week survival with high oxigensaturation target in extremely preterm infants. **N Engl J Med**, v. 364, n. 17, p. 1680-2, 2011.
81. STOLL, B. J. et al. Late onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, n.2 pt 1, p. 285-91, 2002.
82. TASCI, Y. et al. The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funistis and neonatal infection in term premature rupture of membranes. **Eur J Obstet Gynecol**, v. 128, n. 1-2, p. 34-39, 2006.
83. TERRY, T. L. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. **Am J Ophtalmol**, v. 25, p. 203-4, 1942.
84. TOROSSIAN, A. et al. Deleterious effects of mild hypothermia in septic rats are ameliorated by granulocyte colony-stimulating factor. **Anesthesiology**, v. 99, n. 5, p. 1087-92, 2003.
85. VALÉRIO, T. A. et al. Marcadores inflamatórios e oxidativos em sangue de cordão umbilical como preditores de gravidade de sepse neonatal. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 24, n. 1, p. 30-4, 2012.

86. VENTO, G. et al. Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. **Intensive Care Med**, v. 32, n. 5, p. 723-30, 2006.
87. YOON, B.H. et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 5, p. 1124-29, 2000.
88. WORTHMAN, C.M.; STARLING, J.F. Hormone measures in finger-prick blood spot samples: new Field methods for reproductive endocrinology. **Am J Phys Anthropol**, v. 104, n. 1, p. 1-22, 1997.

12 ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO 1: PARECERES ÉTICOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da intubação traqueal em sala de parto na resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica de recém-nascidos pré-termo.

Pesquisador: PEDRO G. VIDIGAL

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 02541712.7.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina ((UFMG))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 122.081

Data da Relatoria: 19/10/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal prospectivo de recém-nascidos pré-termo intubados em sala de parto e não intubados. A pesquisa será executada em duas unidades neonatais do Hospital Júlia Kubitscheck (FHEMIG) e Hospital Dia e Maternidade UNIMED. O estudo parte da hipótese que a intubação traqueal configura estímulo algíco intenso resultando na liberação de mediadores hormonais, metabólicos e imunológicos relacionados à dor. A presença de tais mediadores pode comprovar a percepção da dor pelos recém nascidos prematuros, fazendo com que sejam revistas as indicações de realização de procedimentos algícos sem analgesia.

A constatação de que recém nascidos sentem dor produziu a necessidade de medidas de avaliação da dor. Medidas através de escalas já existem, mas aparentam ser pouco confiáveis na avaliação da dor em recém-nascidos pré-termo (RNPT), onde o desenvolvimento cortical é incompleto. Nos RNPT as alterações comportamentais necessárias para avaliação da dor aparentam ser menos fiáveis e por isso medidas indiretas são imprescindíveis para diagnóstico e indicação do tratamento para dor. Os autores do projeto objetivam avaliar fatores metabólicos, hormonais e imunológicos, previamente alterados em adultos submetidos a estresse ou dor, em RNPT. Como estímulo estressor ou doloroso será usado a intubação em sala de parto. Esta é realizada obrigatoriamente RNPTs nascidos com dificuldades respiratórias onde a ventilação com bolsa e máscara foi ineficaz ou prolongada e em recém-nascidos de extremo baixo peso. Serão

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS -
FHEMIG



PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da resposta neuroendócrina, metabólica e hormonal de recém nascidos pré-termo à intubação traqueal em sala de parto

Área Temática:

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 05633112.5.0000.5119

Pesquisador: Yerkes Pereira e Silva

Instituição: Fundação Hospitalar do Estado de Mins Gerais ((FHEMIG))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 110.378

Data da Relatoria: 04/10/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo analítico observacional prospectivo a ser realizado em duas unidades neonatais de hospitais de Belo Horizonte - HJK e Hospital Unimed.

O estudo visa comparar o perfil hormonal, metabólico e imunológico entre os recém-nascidos pré-termo intubados em sala de parto e os não intubados. Para isto, serão realizadas dosagens de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, glucagon, insulina, catecolaminas, interleucinas IL-1 e IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) e lactato empregando-se ensaio imunoenzimático (ELISA). Sabe-se que a intubação traqueal é um procedimento doloroso e que as intervenções dolorosas não tratadas no período neonatal podem causar danos imediatos e tardios à arquitetura cerebral final do prematuro. Serão incluídos no estudo recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional maior ou igual a 28 semanas e inferior a 37 semanas, sendo estes divididos em dois grupos distintos: intubados em sala de parto sem pré-medicação e transferidos para a Unidade Neonatal (Grupo A, n=35) e não intubados transferidos para a Unidade Neonatal (Grupo B, n=35). O material biológico será colhido pela pesquisadora através de punção de calcanhar em papel de filtro nos tempos cinco, 10, 60 e 180 minutos pós intubação traqueal. No grupo B (recém-nascidos não intubados), proceder-se-á a uma coleta de material biológico após 15 minutos de vida nos mesmos intervalos.

O estudo se justifica pois a intubação traqueal configura estímulo algíco intenso resultando na descarga de mediadores hormonais, metabólicos e imunológicos relacionados à dor. A presença de tais mediadores pode comprovar a percepção da dor pelos recém nascidos prematuros, fazendo com que sejam revistas as indicações de realização de procedimentos algícos sem analgesia.

Objetivo da Pesquisa:

- Objetivo Primário:

Comparar o perfil metabólico, hormonal e imunológico entre os recém-nascidos pré-termo intubados ou não em sala de parto.

- Objetivo Secundário:

1. Validar as dosagens de ACTH, cortisol, glucagon, insulina, catecolaminas, IL-1 e IL-6, TNF e lactato em amostras sanguíneas colhidas em papel filtro de recém-nascidos pré-termos não intubados em sala de parto.
2. Definir a faixa de referência para o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, glucagon,

Endereço: Alameda Vereador Álvaro Celso, 100

Bairro: Bairro Santa Efigênia **CEP:** 30.150-260

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3239-9552 **Fax:** (31)3239-9532 **E-mail:** cep@fhemig.mg.gov.br; vandersonassis@yahoo.com.br

**2- PARECER FINAL COMITÊ DE ENSINO E PESQUISA
UNIVERSIDADE COORPORATIVA - UNIMED-BH**

PARECER GEUC - N° 2013006_00

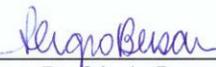
Interessado: Juliana de Oliveira Marcato

DECISÃO

O Comitê de Ensino e Pesquisa da Universidade Corporativa da Unimed-BH - CEP aprovou, no dia 21 de março de 2013, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação da resposta neuroendócrina, metabólica e hormonal de recém-nascidos pré-termo à intubação traqueal em sala de parto.”**

O relatório final da dissertação de mestrado deverá ser encaminhado ao CEP após o final da pesquisa.



Dr. Luis Fernando Rolim Sampaio

Dr. Sérgio Bersan

ANEXO 2 : APOIO INSTITUCIONAL NUPAD



DECLARAÇÃO DE APOIO INSTITUCIONAL

Declaramos que o projeto intitulado **“Efeitos da intubação traqueal na resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica de recém-nascidos pré-termo”**, coordenado pelo Prof. Pedro Gatimosim Vidigal, foi considerado exequível no âmbito do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG – NUPAD.

Conforme normas regimentais do NUPAD e cumpridas às diretrizes da sua Central de Projetos, o projeto receberá o apoio logístico, solicitado e aprovado pela coordenação do núcleo, detalhado no corpo do projeto base.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2012.



Prof. José Nélio Januario
Diretor Geral do NUPAD
Faculdade de Medicina - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG
Av. Alfredo Balena, 189 - 5º andar - Santa Efigênia - CEP: 30130-100 Belo Horizonte - Minas Gerais
Fone: (31) 3409-8900 - Fax: (31) 3409-8967 - E-mail: nupad@medicina.ufmg.br -
Site: www.nupad.medicina.ufmg.br



UFMG

ANEXO 3: APOIO FINANCEIRO DA FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DE MINAS GERAIS (FAPEMIG).

Formulário APQ

Page 1 of 3



APOIO PARA PROJETOS DE PESQUISA

Processo Nº: APQ-00863-11

Natureza da Solicitação: Demanda Universal

Identificação do Coordenador

Nome Completo
Yerkes e SilvaData de Nascimento
01/03/1972

Telefone de Contato

Telefone Celular
(31)9993-3384Endereço Residencial
Rua Montevideu, 402 Apto. 402Bairro
SionMaior Titulação
DoutorInstituição
Universidade de Minas GeraisBanco
748 - UNICREDAgência
4027Endereço eletrônico do Currículo Lattes

Dados do Coordenador

Instituição de Trabalho Atual
Fundação Hospitalar do Estado de Minas GeraisData de Admissão
14/06/2010Área de Conhecimento
MEDICINA

Dados do Auxílio e Projeto

Título do Projeto
Efeitos da intubação traqueal em sala de parto na resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica de recém-nascidos pré-termo.Duração
24Palavra-Chave 1
DorPalavra-Chave 2
Intubação traquealPalavra-Chave 3
-----Palavra-Chave 4
-----Palavra-Chave 5
-----Expectativa de Proteção Intelectual
Não

Instituições do Projeto

Instituição Executora / Proponente
Fundação Hospitalar do Estado de Minas GeraisInstituição Gestora
Fundação Arthur Bernardes

Resumo do Projeto

Trata-se de um estudo analítico observacional prospectivo a ser realizado em duas unidades neonatais de hospitais de Belo Horizonte, que tem como objetivo comparar o perfil hormonal, metabólico e imunológico entre os recém-nascidos pré-termo intubados em sala de parto e os não intubados. Serão realizadas dosagens de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, glucagon, insulina, catecolaminas, interleucinas IL-1 e IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) e lactato empregando-se o ensaio imunoenzimático (ELISA). Sabe-se que a intubação traqueal é um procedimento doloroso e que as intervenções dolorosas não tratadas no período neonatal podem causar danos imediatos e tardios à arquitetura cerebral final do prematuro. Serão incluídos no estudo recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional inferior a 37 semanas, sendo estes divididos em dois grupos distintos: intubados em sala de parto sem pré-medicação e transferidos para a Unidade Neonatal (Grupo A, n=35) e não intubados transferidos para a Unidade Neonatal (Grupo B, n=35). O material biológico será colhido pela pesquisadora através de punção de calcâneo em papel de filtro nos tempos cinco, 10, 60 e 180 minutos pós intubação traqueal. No grupo B (recém-nascidos não intubados), proceder-se-á a uma coleta de material biológico após 15 minutos de vida nos mesmos intervalos.

Produtos Finais Pretendidos

CPF
851.221.226-87Município (Nasc.)
ITAUUNATelefone Comercial
(31)3280-4094E-mail
yerkesps@uol.com.brCEP
30315560Município
BELO HORIZONTENome do Curso
Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do AdolescenteAno
2007Número da Conta
51560020PIS/PASEP
11416826135Regime de Trabalho
20 HorasÁrea do Conhecimento
MEDICINAPalavra-Chave 2
Recém-nascidoPalavra-Chave 4
-----Palavra-Chave 6
-----Pedido de Proteção Intelectual
Não

000/0010

ANEXO 4: PROTOCOLO DE ELUIÇÃO

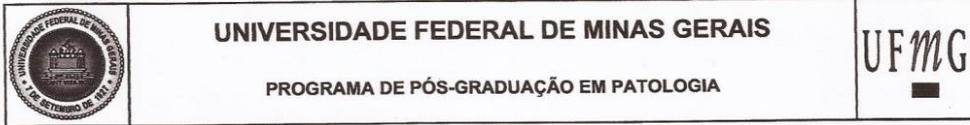
1. Lavar a tesoura com hipoclorito de sódio a 2%, água deionizada, etanol a 70% e depois com água deionizada estéril.
2. Retirar o pacote de sangue em papel de filtro da geladeira e deixar atingir temperatura ambiente antes de abrir. Renovar a sílica após o uso, caso o restante do sangue seja guardado novamente.
3. Cortar pedaços do papel de filtro com sangue (9x9 mm).
4. Colocar cada pedaço, picado em 2 ou 3 em um tubo eppendorf (de 1,5 ml), separado e identificado com o nome da amostra.
5. Adicionar 250 µL de PBS.
6. Agitar vigorosamente por 2 horas à temperatura ambiente, em agitador orbital na velocidade 8.
7. Centrifugar por 10 minutos, a 2.500 rpm.
8. Recuperar o sobrenadante e usá-lo como se tivesse na diluição de 1/20 do soro original.

OBSERVAÇÃO:

O ELISA, Western Blot ou qualquer outro método de detecção de anticorpos terá melhores resultados se o eluato for usado dentro de 24 horas após sua obtenção. Se o eluato for usado neste período, deverá permanecer em geladeira, entre 4-8 °C. Caso contrário, deverá ser congelado à temperaturas de 20 °C ou à temperaturas mais baixas.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/Aids. Projeto AJUDE-Brasil: Avaliação epidemiológica de usuários de drogas injetáveis do Projetos de redução de Danos (PRD) apoiados pela CN-DST/Aids. Brasília, 2006. Disponível em : <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/51projeto_ajudeBrasil.pdf>. Acesso em 16 jan. 2011.

ANEXO 5: FIXA DE APROVAÇÃO E ATA DE DEFESA



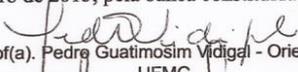
FOLHA DE APROVAÇÃO

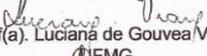
Perfil de citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros: utilização de amostras coletadas em papel filtro e relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população.

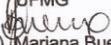
JULIANA DE OLIVEIRA MARCATTO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

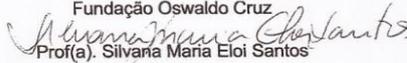
Aprovada em 13 de novembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


 Prof(a). Pedro Guatimosim Vidigal - Orientador
 UFMG


 Prof(a). Luciana de Gouveia Viana
 UFMG


 Prof(a). Mariana Bueno
 USP


 Prof(a). Andréa Teixeira de Carvalho
 Fundação Oswaldo Cruz


 Prof(a). Silvana Maria Eloi Santos
 UFMG


 Prof(a). Marcia Gomes Penido Machado
 UFMG

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

**ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA
JULIANA DE OLIVEIRA MARCATTO**

Realizou-se, no dia 13 de novembro de 2015, às 14:00 horas, Sala de video-conferência, 10. andar, Ala Oeste, Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Perfil de citocinas nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros: utilização de amostras coletadas em papel filtro e relação com desfechos desfavoráveis prevalentes nesta população.*, apresentada por JULIANA DE OLIVEIRA MARCATTO, número de registro 2011655956, graduada no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Pedro Guatimosim Vidigal - Orientador (UFMG), Prof(a). Luciana de Gouveia Viana (UFMG), Prof(a). Mariana Bueno (USP), Prof(a). Andréa Teixeira de Carvalho (Fundação Oswaldo Cruz), Prof(a). Silvana Maria Eloi Santos (UFMG), Prof(a). Márcia Gomes Penido Machado (UFMG).

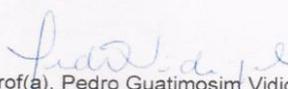
A Comissão considerou a tese:

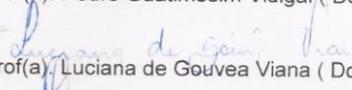
Aprovada

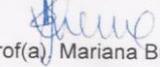
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

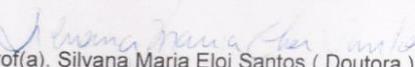
Belo Horizonte, 13 de novembro de 2015.

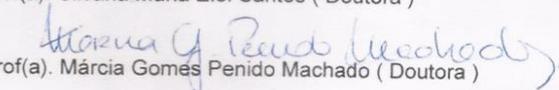

Prof(a). Pedro Guatimosim Vidigal (Doutor)


Prof(a). Luciana de Gouveia Viana (Doutora)


Prof(a). Mariana Bueno (Doutora)


Prof(a). Andréa Teixeira de Carvalho (Doutora)


Prof(a). Silvana Maria Eloi Santos (Doutora)


Prof(a). Márcia Gomes Penido Machado (Doutora)

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O bebê prematuro, ou seja, que nasceu antes do tempo previsto, necessita de cuidados especiais após o nascimento para se desenvolver de maneira adequada. Nós, médicos, enfermeiros e pesquisadores, estamos sempre procurando a melhor maneira de cuidar destas crianças.

Ao contrário do que se pensava, sabemos hoje que os recém nascidos sentem e expressam dor, sendo possível reconhecê-la especialmente através dos movimentos corporais e expressão facial. Entretanto, em algumas situações durante a internação, esta avaliação é difícil, sendo necessário encontrar outras maneiras de avaliar a presença da dor. Sabe-se que, como resultado do estresse causado pela dor, algumas substâncias podem ser liberadas na corrente sanguínea indicando a presença de dor.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa cujo título é “Efeitos da intubação traqueal em sala de parto na resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica de recém-nascidos pré-termo”. Em função da imaturidade dos pulmões, em algumas situações é recomendada a introdução de um tubo na traquéia do recém-nascido para que possamos ajudá-lo a respirar. Este procedimento chama-se intubação traqueal e queremos saber se durante a sua realização logo após o nascimento, ocorre a liberação de algumas substâncias na corrente sanguínea que possam representar a presença de dor. As substâncias analisadas serão o ACTH, cortisol, glucagon, insulina, glicose, catecolaminas, IL-1, IL-6, TNF e lactato. Para realização da análise destas substâncias será necessário retirar cinco gotas de sangue do pezinho do recém-nascido através da punção do calcanhar (semelhante ao teste do pezinho) com cinco, 10, 60 e 180 minutos após a introdução do tubo na traqueia para auxílio à respiração. Sempre que possível, o sangue será coletado de exames que já forem solicitados pelo médico durante a internação. O procedimento não gera riscos para o bebê, uma vez que a quantidade de sangue é muito pequena e as pessoas que realizarão a coleta são sempre enfermeiros treinados pelo grupo

de pesquisa que tem experiência mínima de três anos de atuação no cuidado de recém-nascidos. As únicas possibilidades de complicação são a presença de hematoma (roxos) no calcanhar do bebê e osteomielite (uma infecção do osso do calcanhar) caso não seja aplicada técnica corretamente. Vale ressaltar que estas punções são realizadas diariamente na unidade para avaliação dos níveis de glicose no sangue não sendo evidenciadas complicações. A dor gerada pelo procedimento é de intensidade leve e no momento das punções serão aplicadas medidas comportamentais de controle da dor tais como aconchego, posicionamento, controle da luminosidade.

Caso você não aceite que seu recém-nascido participe da pesquisa, não haverá nenhum prejuízo ao tratamento e os procedimentos realizados serão os determinados pela rotina do serviço. Esclarecemos que não haverá nenhuma outra modificação nos cuidados com seu bebê. Assim, todos os tratamentos e exames que serão realizados, são aqueles que já são feitos na assistência de rotina.

O benefício esperado ao final da pesquisa é comprovar que é necessário usar medicação para alívio da dor sempre que possível nestes bebês antes da introdução do tubo na traqueia para auxiliar a respiração.

O sangue será coletado em papel de filtro e após análise dos resultados todo material será descartado, não sendo utilizado com nenhuma outra finalidade.

Em qualquer etapa do estudo você poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa ou ao comitê de ética em pesquisa da UFMG e FHEMIG, para esclarecimento de eventuais dúvidas, ou ser informado dos resultados parciais da pesquisa, que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Esses contatos estão descritos ao final deste documento.

Será também garantida a retirada do seu consentimento a qualquer momento, se esse for o seu desejo, sem que isso acarrete nenhum prejuízo à continuidade e qualidade da assistência ao seu recém-nascido na instituição.

Assumimos o compromisso de que os dados obtidos e o material coletado será utilizado somente para esta pesquisa e que os resultados serão divulgados em

eventos e artigos científicos. As informações serão analisadas com o compromisso de não ser divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

Você não terá nenhum gasto e também não receberá nenhuma compensação financeira para participar da pesquisa.

Em caso de, pouco provável, dano pessoal causado diretamente pelos procedimentos ou tratamentos propostos, neste estudo (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legais estabelecidas.

Se você estiver suficientemente esclarecido e concordar com a inclusão de seu (a) filho (a) na pesquisa favor assinar o documento abaixo.

Consentimento Informado

Confirmando ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo “Efeitos da intubação traqueal em sala de parto na resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica de recém-nascidos pré-termo”. Discuti com o médico ou enfermeira sobre minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias do sigilo e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades no atendimento do meu recém-nascido neste serviço.

Assinei e recebi uma cópia deste termo.

Data e local: _____

Assinatura do responsável: _____

APÊNDICE B: FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA COLETA DE DADOS					
DATA DA COLETA ____/____/____		IDENTIFICAÇÃO DA MÃE			
HORA		NOME		HOSPITAL	
Nº DO PAPEL FILTRO		ENDEREÇO		Nº REGISTRO	
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO					
<input type="checkbox"/> MÃE DIABÉTICA		<input type="checkbox"/> MAL FORMAÇÃO CONGÊNITA		<input type="checkbox"/> ANESTESIA GERAL	
<input type="checkbox"/> DROGAS ILÍCITAS		<input type="checkbox"/> HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA		<input type="checkbox"/> MECÔNIO DEPRIMIDO	
<input type="checkbox"/> MEDICAÇÃO PARA INTUBAÇÃO EM S P		<input type="checkbox"/> HIPER/HIPO PITUITARISMO		<input type="checkbox"/> TUMOR DE HOPÓFASE	
<input type="checkbox"/> HIPER/HIPO TIREOIDISMO		<input type="checkbox"/> HIPER/HIPO PARATIREOIDISMO		<input type="checkbox"/> INSULINOMA/CUSHING/COHNN/ADSON FELCROMOCITOMA	
ANTECEDENTES				ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS	
FAMILIARES		PESSOAIS			
NÃO	SIM			NÃO	SIM
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----TB-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----DIABETES <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> G-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----HIPERTENSÃO-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----PRÉ-ECLÂMPSIA-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----ECLÂMPSIA-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----OUTRA CONDIÇÃO MÉDICA SEVERA-----		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
OUTRAS					
NÃO	SIM				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----CARDIOPATIA			
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----NEFROPATIA			
GEST. PRÉVIAS _____ ABORTOS _____ PARTOS _____ VAGINAL _____ CASÁRIA _____ FINAL DA GRAVIZ ANTERIOR ____/____/____ ANTECEDENTES GEMELARES SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>					

.....VIOLÊNCIA

GESTAÇÃO ATUAL								
DUM ___/___/___		FUM. AT.	FUM. PAS.	DROGAS	ALCOOL	VIOLÊNCIA		
DPP ___/___/___	1º TRIM	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N						
IG CONFIÁVEL POR <input type="checkbox"/> DUM <input type="checkbox"/> ECO < 20 S.	2º TRIM	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N						
GRUPO SANGUÍNIO _____ RH <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	3º TRIM	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N						
CONSULTAS PRENATAIS								
TOXOPLASMOSE <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	DIA/MÊS/ANO	I G	PESO	P A	B C F	MOVIM. FET.	PROTEI-NÚRIA	SINAIS DE ALARME, EXAMES E TRATAMENTOS
HIV <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
SÍFILIS <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
CITOMEGALOVÍRUS <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
ESTRÉPTO B <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
ITU <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
CORIOAMNIONITE <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> -	___/___/___							
OUTRO _____	___/___/___							
_____	___/___/___							
_____	___/___/___							

PARTO	
DATA: ___/___/___	HORA: _____

CONSULTAS PRÉ-NATAIS: _____

HOSPITALIZAÇÃO NA GRAVIDEZ: SIM NÃO _____ (DIAS)CORTICÓIDE PRÉ-NATAL: SIM NÃO TIPO: _____ DOSES: _____TRABALHO DE PARTO: ESPONTÂNEO INDUZIDO CESÁRIA PROGRAMADATERMINAÇÃO DO PARTO: ESPONTÂNEO CESÁRIA FÓRCEPS VÁCUO OUTROS

TEMPO EM TRAB. PARTO (HS) _____

RUPTURA DE MEMBRANAS ANTEPARTO: SIM NÃO ____/____/____ NÚMERO DE HORAS: _____ IG _____

IG NO PARTO: ____/____ (SEMANAS/DIAS)

APRESENTAÇÃO: CEFÁLICA PÉLVICA TRANSVERSAPOSIÇÃO NO PARTO: DEITADA SENTADA NA ÁGUA DE CÓCORASEPÍSIOTOMIA: SIM NÃOANESTESIA LOCAL: SIM NÃO _____LACERAÇÃO: SIM NÃO _____ (GRAU)OCITÓCITOS: PRÉ-PARTO SIM NÃO PÓS-PARTO SIM NÃOPLACENTA: COMPLETA SIM NÃO RETIDA SIM NÃO DESCOLAMENTO PREMATURO SIM NÃOLIGADURA DO CORDÃO: _____ (TEMPO) ASPECTO: FLÁCIDO ERÉTIL

MEDICAÇÕES RECEBIDAS:

ANTIBIÓTICOS SIM NÃO _____PERIDURAL SIM NÃO _____ANALGÉSICOS SIM NÃO _____RAQUIANESTESIA SIM NÃO _____ANESTESIA LOCAL SIM NÃO _____OPIÓIDE SIM NÃO _____ANESTESIA GERAL SIM NÃO _____TRANSFUSÃO SIM NÃO**RECÉM-NASCIDO**

SEXO: F M
 PESO AO NASCER: _____
 IDADE GESTACIONAL: _____ / _____ (SEMANAS/DIAS)
 PERÍMETRO CEFÁLICO: _____ ALTURA: _____
 ÁPGAR: 1º MIN. _____ 5º MIN. _____

PROCEDIMENTOS:

ESTIMULAÇÃO TÁTIL: SIM NÃO
 ASPIRAÇÃO: SIM NÃO
 OXIGÊNIO INALATÓRIO: SIM NÃO
 VPP COM MÁSCARA: SIM NÃO
 MASSAGEM CARDÍACA: SIM NÃO

INTUBAÇÃO:

SALA DE PARTO: SIM NÃO
 UNIDADE NEOANTAL: SIM NÃO
 Nº TUBO: _____ MARCA: _____
 NÚMERO DE TENTATIVAS: _____
 TEMPO DE DURAÇÃO DO PROCEDIMENTO: _____
 REAÇÃO: PRESENTE AUSENTE
 BRADICARDIA: PRESENTE AUSENTE
 QUEDA DE SATURAÇÃO: PRESENTE AUSENTE

TRANSPORTE

INCUBADORA: SIM NÃO _____
 MONITORAMENTO: SIM NÃO
 OXIGÊNIO: SIM NÃO
 CPAP: SIM NÃO
 PRONGA ADEQUADA: SIM NÃO
 INTUBADO: SIM NÃO

1ª VALORAÇÃO

TEMPERATURA AXILAR: _____ °C
 SATURAÇÃO O₂: _____ %
 FIO₂: _____
 CIANOSE: SIM NÃO
 SDR: SIM NÃO
 PALIDEZ: SIM NÃO
 DIURESE: SIM NÃO
 CONVULSÕES: SIM NÃO

PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA UNIDADE NEONATAL

LIMPEZA DA PELE: SIM NÃO
 SONDAGEM GÁSTRICA: SIM NÃO
 INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE VIT. K: SIM NÃO
 CREDÊ: SIM NÃO
 INTUBAÇÃO: SIM NÃO
 SURFACTANTE: SIM NÃO _____ (HS DE VIDA)

Hora do nascimento _____:_____	5 minutos _____:_____	10 minutos _____:_____	60 minutos _____:_____	180 minutos _____:_____
Hora da intubação _____:_____				
Procedimentos realizados até a coleta	Até 5 min. pós intubação	5-10 min.	10-60 min.	60-180 min.

ACOMPANHAMENTO DURANTE A INTERNAÇÃO ATÉ A ALTA

 RETINOPATIA : SIM NÃO GRAU MÁXIMO _____ (0-5)

 CIRURGIA CARDÍACA: SIM NÃO IG _____ PESO _____

 HEMORRAGIA PERIINTRAVENTRICULAR: SIM NÃO GRAU MÁX. _____ (1-4)

 ALEITAMENTO MATERNO: EXCLUSIVO PARCIAL ARTIFICIAL

 OUTROS: _____

APÊNDICE C: ARTIGO 1

TÍTULO: Utilização de sangue total colhido em papel filtro para detecção de citocinas em recém-nascidos prematuros: um recurso alternativo para monitoramento clínico.

Abstract

Objective: The amount of blood needed to perform laboratory tests may hinder clinical investigations with neonates. This study compared proinflammatory cytokine serum levels to levels measured in filter paper blood eluates and reviewed the efficacy of the second method in the clinical management of neonates.

Methods: This cross-sectional study enrolled eight preterm neonates with gestational ages ranging from 28 to 32 weeks. One milliliter of whole blood was drawn from each patient; half was placed on filter paper and half into a blood collection tube. Dried blood spots on filter paper were eluted with buffer solution at ratios of 1:20 and 1:5 and compared for cytokine levels. ELISA kits were used to quantify cytokines interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF).

Results: No cytokines were found in serum samples and IL-1 was not identified in any of the filter paper eluates. IL-6 and TNF were found in the eluates produced with both mixing ratios (1:5 and 1:20). The coefficient of variation (CV) was very high for IL-6 in the 1:5 elution solution and high in the 1:20 solution. CV was low for TNF in the 1:5 solution and moderate in the 1:20 elution solution. When the elution solutions (1:5 and 1:20) for IL-6 and TNF were compared, higher concentrations of IL-6 were observed in the 1:20 solution, while no statistically significant differences were found for TNF.

Conclusion: Paper filter extends the use of biomarker level measurements in neonate populations. This simple method stabilizes mediators and significantly improves patient clinical management and the identification of prognostic markers.

Keywords: Neonate; Preterm; Cytokines; Laboratory tests.

1. Introduction

Filter paper has been increasingly used in the collection of biological material and in laboratory workup methods.¹ The amount of blood needed to perform laboratory tests may hinder clinical investigations with neonates. Methods requiring small volumes of blood aid in the monitoring of clinically vulnerable patient populations submitted to extensive laboratory workup. This strategy also contributes to the viability of research on the mechanisms involved in the metabolic, endocrine, and humoral responses associated with the diseases prevalent in this population.

The first method used to measure phenylalanine levels from neonate dried blood spots on filter paper was developed in 1961.² In 1972, the method to measure thyroxine levels from dried blood spots on filter paper was developed, and in 1976 the first pilot neonatal screening program for congenital hypothyroidism was implemented in the United States.³ Neonatal screening for hypothyroidism and phenylketonuria became mandatory in Brazil in 1976. Today, eluates from dried blood spots collected on paper filter are widely used in neonatal screening programs.

As the thresholds of viability are expanded and the survival of increasingly premature infants is extended, more interventions, and blood tests in particular, are needed to provide patients with proper stabilization and life support. Immature immune systems, scarce vascular beds, and difficult-to-manage blood volumes are important aspects in the physiology of preterm neonates. Blood loss from multiple blood tests may result in systemic alterations such as cerebral blood flow impairment, anemia, and mesenteric ischemia.⁴

Two key goals are achieved with preterm neonate serology from dried blood spots on filter paper: less blood is drawn from the patients and tests currently not performed become possible. Ease of sample transportation, storage capabilities, and biomarker stability allow the organization of longitudinal studies to further the knowledge on disease mechanisms and prognostic factors for neonate populations.⁵

Interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), and Tumor Necrosis Factor (TNF) are pro-inflammatory cytokines that induce local inflammatory responses in sites of infection and injury, supporting functional restoration and healing processes. Excessive

production of these cytokines may lead to systemic manifestations such as hemodynamic instability and metabolic disorders.⁶ The measurement of cytokine levels in preterm infants may aid in the characterization of secondary inflammatory responses to a wide range of stimuli, while correlating it to clinical progress, prognosis and outcomes.^{7,8}

Research outcomes on the use of the filter paper method have been published in the literature for the last ten years.^{9,10,11} However, differences in elution procedures hinder the comparison between outcomes.^{12,13,14} Moreover, this method is rarely used in daily clinical monitoring, as it tends to be limited to neonatal screening, where it is an established practice.

This paper aimed to present a method to quantify IL-1, IL-6, and TNF in dried blood spots on filter paper and compare these findings to the levels seen in serum samples. This comparison opens the way for the establishment of correlations between observed cytokine levels, clinical progress, and outcomes seen in this population, in addition to supporting the use of the method in clinical practice and its future incorporation as a viable resource in neonatal care settings.

2. Method

This cross-sectional study enrolled a convenience sample of eight preterm neonates with gestational ages ranging from 28 to 32 weeks seen at a Neonatal Progressive Care Unit of a private hospital in Belo Horizonte, Brazil. Patients were on their first week of life and did not present hemodynamic instability. The Research Ethics Committee of the institution approved the study, and patient guardians gave informed consent to the participation of their children in the study. Individuals with malformations, born to mothers with diabetes or endocrine diseases, children of mothers taking illicit drugs, and subjects with hemodynamic instability at the time of blood collection were excluded.

Blood samples from arterial punctures, performed for the purposes of other tests ordered by the assisting physician as part of the patient follow-up protocol, were collected on filter paper.

One milliliter of whole blood was drawn from each patient, of which 0.5 mL was used to produce five spots on a piece of filter paper and 0.5 mL was transferred to a blood collection tube, in order to allow for comparisons between cytokine levels in dry blood spots and serum samples. The filter paper blood spots were left lying flat at room temperature for one hour and were then frozen at -20 °C. Fresh blood samples were centrifuged immediately after collection and the serum was frozen at the same temperature.

Dry blood spots on filter paper were eluted with phosphate buffered saline (PBS) at ratios of 1:20 to 1:5, in order to define the best strategy to produce eluates and detect the analytes targeted in the study. In the 1:20 preparation, filter paper specimens were punched in 3-mm discs; then, three discs were placed in each Eppendorf tube (9 mm) and mixed with 750 µL of PBS. The mixture was vigorously agitated for two hours at room temperature and then centrifuged for ten minutes at 2,500 rpm to allow the separation of the supernatant. In the 1:5 solution, eighteen 3-mm discs were placed in each Eppendorf tube and mixed with 750 µL de PBS. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) kits were used to quantify cytokines. All samples were assayed in duplicate. The purpose was to verify the feasibility of detecting cytokines using the proposed elution method. To this end, three cytokines were chosen and ELISA kits used in the analysis for cost-effectiveness reasons.

Unlike previous studies,⁹ the tests were performed entirely in one day, from elution to ELISA assaying, in order to mitigate the risk of sample degradation.

3. Statistical analysis

Descriptive statistics was used to analyze the variables included in the study in terms of their mean values, medians, and standard deviations. The coefficient of variation (CV) was calculated, and variables with a CV greater than 30% were considered to have undergone significantly high variation.

The Wilcoxon signed-rank test was used to compare IL-6 and TNF levels observed in the 1:5 and 1:20 elution solutions. Statistical significance was attributed to p values < 0.05.

4. Results

Fresh blood samples from eight preterm infants, five males and three females, were taken in their first week of life to measure cytokine levels from eluates obtained from solutions in two different concentration ratios, which were then compared to the levels observed in serum samples. The gestational age of the neonates included in the study ranged from 28 to 32 weeks. The enrolled subjects did not present hemodynamic instability at the time of the tests.

Serum samples failed to provide cytokine level readings, and IL-1 was not detected in any of the tested filter paper eluates. IL-6 and TNF were detected in the eluates from both solution concentrations (1:5 and 1:20).

The coefficient of variation for IL-6 was exceedingly high (120.27%) in the eluates from the 1:5 solution and high (84.09%) in the 1:20 solution eluates. The coefficient of variation for TNF was low (24.48%) in the eluates from the 1:5 solution and low to moderate (26.73% and 40.28%) in the 1:20 solution eluates (Table 1).

No statistically significant differences were found in the duplicates collected from the 1:20 solution when the Wilcoxon signed-rank test was used to compare between median levels of IL-6 and TNF ($p=0.686$ and $p=0.063$, respectively).

The levels of IL-6 observed in the eluates from the 1:5 and 1:20 solutions were statistically different ($p = 0.012$), with higher levels seen in the eluates from the 1:20 solution (58.080). TNF levels were not statistically different when the eluates from both solutions were compared.

5. Discussion

The main obstacle in preterm infant biomarker investigation is the amount of biological material required to test serum and plasma samples. In recent years, filter paper has been widely used by the scientific community, and several studies have demonstrated the use and applications of this method in clinical practice. However, the differences between elution protocols, studied populations, and patient clinical statuses have hindered the comparison of results and the adoption of this method in patient workup and bedside monitoring protocols.^{12,14} The method's main advantages

include the little amount of blood required for testing, the stability enjoyed by most mediators on filter paper, ease of transportation and storage, and the possibility of organizing retrospective longitudinal studies in the future, as signaled by reports of materials being retrieved after being stored frozen for more than 20 years.^{5,12}

Cytokines play a key role in the regulation of cell interaction and in the recruitment and activation of inflammatory processes. The associations between cytokine activity patterns and neonate clinical outcomes may provide useful input for decision-making and the detection of relevant prognostic markers.^{15,16,17,18} The first week of life of a preterm infant includes several interventions required to stabilize his/her condition after birth, and possibly an exacerbated release of proinflammatory cytokines.

The main purposes of the tests carried out in this study were to verify whether cytokine levels would be detected in eluates produced from solutions of different concentrations, to compare them to the levels seen in serum samples, and to describe the method so that it could be reproduced in future studies.

Cytokines IL-1, IL-6, and TNF were not found in the serum samples analyzed in the study. A likely explanation is that cytokines may react with a series of proteins, antibodies, and membrane receptors, which makes them undetectable by the antibodies in the assay kit.⁶ Skogstrand, K. *et al*¹³ showed that the handling of serum and plasma samples before testing may interfere with analyte level readings, thus making it more difficult to compare between results of different studies; the authors also pointed out that cytokines are more stable on filter paper than in fresh blood samples.

The coefficient of variation for IL-6 levels observed in blood eluates was high, while the CV for TNF ranged from low to moderate. This finding probably relates to the fact that the population enrolled in this stage of the study was made up of a specific group – neonates in their first week of life with gestational ages ranging from 28 to 32 weeks – however diagnosed with different conditions, with different clinical statuses, and at different stages in their conditions.

IL-6 and TNF were detected in the eluates from both solution concentrations. Unlike the initial hypothesis, IL-6 levels were statistically higher in the eluates from the 1:20

solution when compared to the 1:5 solution. This finding validates the method described by other authors in which paper filter eluates were used to detect biomarkers.^{14,19}

Paper filter stands out as an important tool in the measurement of clinically relevant biomarker levels, in addition to supporting improvements in patient management and in the identification of prognostic markers.^{20,21,22} The benefits of early detection include timely decision-making and avoidance of the complications secondary to the non-identification of the mediators associated with poor prognosis. In neonatal care, lower blood volume requirements and mediator stabilization rank among the most significant advantages of the filter paper method.

This study demonstrated the feasibility of measuring IL-6 and TNF levels using paper filter eluates and the application of the method in neonatal care units, offering an alternative to workup methods in which blood loss, stress, and pain are added to a roster of complications endured by neonates, such as anemia, hemodynamic instability, and infection. These adverse events may be mitigated or even entirely prevented with the use of less invasive, safer techniques in which less biological material is needed.

The assessment of the expression profile of proinflammatory cytokines may shed light on how these mediators impact inflammatory processes by promoting inflammation or protecting neonates from the more frequent complications faced by this population.

More studies on clinical monitoring practices using paper filter eluates are needed in order for the method to be incorporated as a valid alternative to serology tests, not only for cytokines, but also for hormonal and metabolic markers, in light of the benefits offered to the neonatal population in particular.

Acknowledgements

The authors would like to thank FAPEMIG for funding the study and the Center for Research and Action on Diagnostic Support (**Nupad**) at the School of Medicine of the

Federal University of Minas Gerais for donating the materials needed to collect blood spots on filter paper and for training the team involved in the study on the technique.

Table 1: Descriptive measurements and coefficients of variation for IL-6 and TNF levels on the 1:5 and 1:20 (pg/mL) elution solutions

Measurements	IL6 1:5	IL6 1:20-1	IL6 1:20- 2	TNF 1:5	TNF 1:20- 1	TNF 1/20-2
N	8	8	8	8	8	8
Mean	33.870	78.544	84.417	113.058	120.396	150.453
Median	19.881	58.080	58.030	121.239	127.763	134.285
Standard deviation	40.735	66.045	80.406	27.671	32.176	60.599
Minimum value	9.969	24.960	24.960	59.111	59.111	85.312
Maximum value	133.151	234.047	274.315	137.545	163.614	274.292
Coefficient of variation (%)	120.27	84.09	95.25	24.48	26.73	40.28
Magnitude of variation	Very High	High	High	Low	Low	Moderate

Referências Bibliográficas

1. Weinstein M, Vaupel JW, Wachter KW: Biosocial Surveys. Whashington, DC:National Academies Press; 2008.
2. Guthrie R. The origin of newborn screening. *Screening*. 1992; 1:5-15.
3. Kaye CI, Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Hope N, Sonya P, et al. Newborn screening fact Sheets. *Pediatrics*. 2006; 118(3):e934-63.
4. Clohert JP, Stark AR, Eichenwald EC. *Manual de neonatologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2009.
5. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr (USA)*. 2001; 131: 1631S–36S.
6. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit care med (USA)*. 2000; 28(4suppl):N3-12.
7. Vento G, Capoluongo E, Matassa PG, Concolino P, Vendettuoli V, Vaccarella C, et al. Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlation with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Med (USA)*. 2006; 32 (5):723-30.
8. Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R, Herva R, Kaukola T, Hallman M. Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr (USA)*. 2009; 154(1):39-43.e3.
9. McDade TW, Burhop J, Dohnal J. High-sensitivity enzyme immunoassay for C-reactive protein in dried blood spots. *Clin Chem*. 2004; 50(3):652–54.
10. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*. 2007;44(4):899–925.

11. McDade TW, Tallman PS, Adair LS, Borja J, Kuzawa CW. Comparative insights into the regulation of inflammation: Levels and predictors of interleukin-6 and interleukin-10 in young adults in the Philippines. *Am J Phys Anthropol.* 2011; 146(3):373–84.
12. Skogstrand K, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sorensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neutrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with x MAP technology. *Clinical Chem.* 2005; 51(10): 1854–66.
13. Skogstrand K, Ekelund CK, Thorsenb P, Vogelb I, Jacobsson B, Nogaard-Pedersen B, et al. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *J immunol methods.* 2008; 336(1):78-84.
14. Miller EM, McDade TW. A highly sensitive immunoassay for interleukin-e in dried blood spots. *Am J Hum Biol.* 2012; 24(6):863-5.
15. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(1):19–26.
16. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179 (1):194–202.
17. Nelson KB, Grether JK, Dambrosia JM, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, et al. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res.* 2003; 53(4):600–7.
18. Kaukola T, Satyaraj E, Patel DD, Tchernev VT, Grimwade BG, Kingsmore SF, et al. Cerebral palsy is characterized by protein mediators in cord serum. *Ann Neurol* 2004; 55 (2):186–94.

19. Aabye MG, Latorre I, Diaz J, Maldonado J, Mialdea I, Eugen-olsen J, et al. Dried plasma spots in the diagnosis of tuberculosis: IP-10 release assay on filter paper. *Eur Respir J*. 2013;42(2):495-503
20. Nelson KB, Grether JK, Croen LA, Dambrosia JM, Dickens BF, Jelliffe LL, et al. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol*. 2001;49(5):597–606.
21. Huang HC, Wang CL, Huang LT, Chuang H, Liu CA, Hsu TY, et al. Association of cord blood cytokines with prematurity and cerebral palsy. *Early Hum Dev*. 2004; 77(1-2):29–36.
22. Minagawa K, Tsuji Y, Ueda H, Koyama K, Tanizawa K, Okamura H, et al. Possible correlation between high levels of IL-18 in the cord blood of pre-term infants and neonatal development of periventricular leukomalacia and cerebral palsy. *Cytokine*. 2002; 17(3):164–70.

APÊNDICE D – ARTIGO 2

Title: Correlation of cytokines using blood samples collected on filter paper and unfavorable outcomes in preterm neonates.

Juliana de Oliveira Marcatto, MD¹; Marcus Vinicius Andrade, MD, PhD^{2,3}; Camilla R L Machado, RN²; Luciana de Gouvêa Viana, MD, PhD^{1,3}; Pedro Guatimosim Vidigal, MD, PhD¹.

1. Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
2. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
3. Clinical Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Abstract

Objective: this study aims to assess the serum levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in preterm neonates.

Method: this study enrolled 34 preterm neonates with gestational ages ranging between 28 and 32 weeks. Cytokine levels were measured ten minutes, one hour, and three hours after the birth from blood samples collected on filter paper. BIO-RAD Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 8-Plex immunoassay kits were used to perform the tests; readings were interpreted on a Luminex 100 analyzer equipped with the required software packages.

Results: Levels of IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF were detected within the first three hours of life of the subjects. Significant differences were observed between sampling times for cytokines IL-6, IL-8, and IFN- γ . Serum TNF- α levels within the first hour of life of the neonates were correlated with sepsis ($p=0.048$). Lower GM-CSF levels within the first hour of life of the subjects were associated with hypothermia ($p=0.005$) at the time of admission to the neonatal unit.

Conclusion: the detection of cytokine levels from blood samples collected on filter paper proved a viable method. Its advantages include ease of collection, storage, and transportation, and the low volume of blood required to perform the tests. TNF- α may be regarded as a marker for the onset of sepsis in this population. The lower levels of GM-CSF observed in hypothermic patients suggest a correlation with neonatal handling stress within the first hours of life.

Keywords: Cytokine; Preterm; Nursing Care; Sepsis.

Running title: Cytokines and unfavorable outcomes in preterm neonates.

Corresponding author:

Juliana de Oliveira Marcatto

Rua Guilherme de Almeida, 435, apto 102. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil -
30350-230

Phone: +55 31 9998 0379

E-mail: julianaoliveiramarcatto@gmail.com

Introduction

Preterm neonates require a wide array of interventions intended to provide life support and assist them in the process of adapting to extrauterine life (1). Respiratory, hemodynamic, and metabolic support offered at the time of birth in the delivery room extends into the neonatal unit, particularly during admission and within the subject's first hours of life [(2). These interventions are potentially stressful and may induce the release of cytokines, which play a role in the mediation of the inflammatory response and attract other cells to the site of injury [(3). A significant number of studies have been carried out on the associations between serum cytokine levels and prevalent preterm neonate clinical outcomes (4,5,6,7). The early identification of potential markers related to major diseases affecting this population as well as outcomes may enable the adoption of preventive measures and the introduction of changes to care practices.

Plasma and serum measurements are the gold standard in biomarker identification. However, the cost and complexity of arterial and venous blood sampling procedures, along with the meticulous handling and transportation of blood samples required after collection, may pose obstacles to the use of these test methods (7,8). On top of these considerations, the amount of blood needed to perform laboratory tests in neonates requires special attention, since multiple sampling procedures may result in significantly reduced total blood volume, increased risk of anemia and other specific medical conditions associated with prematurity, such as fluid and electrolyte imbalances and cerebral blood flow impairment. The use of dry blood spots on filter paper offers significant advantages when compared to more traditional blood collection methods. The volume of blood required from the patients is minimal. The samples are obtained via heel stick, a minimally invasive procedure, and require no processing. Besides, blood samples drawn with this method can be easily transported and stored, in addition to providing for optimal mediator stability, cytokines in particular(9).

This study aimed to assess the levels of cytokines interleukin (IL) 2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) within the first three

hours of life of preterm neonates with gestational ages ranging from 28 to 32 weeks from dried whole blood samples on filter paper. Published studies on the cytokine levels of preterm neonates within their first three hours of life are scarce. Likewise, no correlations have been established between cytokine levels and patient outcomes in such early stages of life. In addition to proposing these correlations, this study also included associations with clinical situations arising from patient care, such as hypothermia.

Method

Patients

This prospective observational analytic study was carried out in a private maternity hospital in Belo Horizonte, Brazil. Thirty-four preterm neonates with gestational ages ranging from 28 to 32 weeks in their first three hours of life seen at the institution between July 2013 and December 2014 were enrolled in the study. The study was approved by the Ethics Committees of the Universidade Federal de Minas Gerais and of the Hospital in which it was carried out. The guardians of the neonates included in the study signed an informed consent. Neonates with congenital malformations or cardiac arrest at birth, individuals born to diabetic mothers, mothers offered general anesthesia, illicit drug users, or parents with syndromes in which there is endocrine involvement were excluded.

Blood sample collection

Capillary blood samples were collected on filter paper at three different times: at ten minutes of life, at one hour of life, and at three hours of life via heel stick. Heel punctures were performed in accordance with the neonatal screening guidelines of the Center for Research and Action on Diagnostic Support (NUPAD) of the School of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, based on the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Procedures and Devices for the Collection for Diagnosis Capillary Blood Specimens; Approved standard – Sixth Edition, CSLI document H04-A6 (ISBN1-56328-667-8). Five blood spots were collected on filter paper in each sampling procedure. The pieces of filter paper were left in a horizontal position to air dry for three hours. Then they were tagged and

frozen at -20 °C until the time of analysis. The samples used in the study were collected during the procedures performed as part of regular clinical patient follow-up, thus avoiding unnecessary additional punctures. The material collected in this stage was obtained through artery punctures. Blood eluates were obtained with a method previously tested in this study (9-mm discs of filter paper eluted with 250 µL of buffer solution) (10).

Laboratory tests and analyzed variables

All samples were assayed in duplicate. IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α and GM-CSF levels were measured using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 8-Plex immunoassay kits, Group I (BIO-RAD, Richmond, CA, USA). This assay uses xMAP technology to allow the quantification of multiple cytokines with intra and inter-assay precision of 5-10% for cytokines. Assay readings were interpreted on an automated analyzer (Luminex 100; Luminex, Austin, TX, USA) equipped with the required software packages. Explanatory variables included gestational age, weight at birth, gender, 1-minute and 5-minute Apgar scores, axillary temperature on admission to the neonatal unit, delivery mode, use of steroids prenatally, maximum fraction of inspired oxygen (FIO₂), time on continuous positive airway pressure (CPAP), time on ventilator, use of amines, blood transfusion, and length of hospitalization. In terms of outcome variables, the correlation between cytokine levels and bronchopulmonary dysplasia (BPD), sepsis, peri-intraventricular hemorrhage (PIVH), retinopathy of prematurity (ROP), and death was analyzed.

Statistical analysis

The entire sample was characterized. Frequencies of occurrence were used to report the findings from categorical variables and descriptive measurements (mean, median, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum values, standard deviation) were applied to quantitative variables. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess data normality. The levels of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ and TNF- α did not follow a normal distribution, which indicated the need for non-parametric tests. GM-CSF levels followed a normal distribution and were analyzed using parametric tests. The Friedman test was used to compare between

the cytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ and TNF- α) levels observed at each sampling time and ANOVA was used to analyze GM-CSF levels. When needed, multiple pairwise comparisons were performed using the Wilcoxon signed-rank test. Cytokine levels at each sampling time by outcome (BPD, sepsis, ROP, PIVH, death, or favorable outcome) were analyzed using the Mann-Whitney U test for IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ and TNF- α , and Student's t-test for GM-CSF. Statistical significance was attributed to test results with a *p*-value under five percent. Software package SPSS version 20.0 was used in statistical analysis.

Results

Table 1 contains the demographic, perinatal, and neonatal data for the 34 infants included in the study; **Table 2** describes the frequencies of occurrence of each clinical outcome. All patients included in the study were on CPAP in the delivery room, during transference, and for the first three hours after they were admitted to the neonatal unit. FiO₂ ranged from 40% to 100%; 91.2% of the mothers did not have urinary tract infections (UTI) during pregnancy; and 8.8% (n=3) had records of treated UTI but unclear disease statuses at the time of delivery. The neonates included in the study were on CPAP for a mean of 10.21 days. None of the patients were intubated within their first three hours of life, but some required intubation at a later time. Mechanical ventilation was used for a mean of 12.54 days.

Table 1: Demographic, perinatal, and neonatal data of the 34 individuals enrolled in the study.

Variables	Values	
Gestational age (weeks) - Mean (Min-Max)	30.56	(28-32)
Birth weight (g) - Mean (Min-Max)	1,385	(585-2,710)
Gender (%) - F/M	38.2 / 61.8	
1-minute Apgar score - Mean (Min-Max)	7	(4-9)
5-minute Apgar score - Mean (Min-Max)	9	(5-10)
Age of the mother - Mean (Min-Max)	29.79	(17-44)
Vaginal delivery/C-section (%)	8.8 / 88.2	
Mothers on steroids (%)	97.1	

Premature rupture of membranes (%)	23.5	
Temperature \leq 36.5°C on admission (%)	38.2	
Use of amines (%)	20.6	
Blood transfusion (%)	14.7	
Time on CPAP (days) – Mean (Min-Max)	10.21	(1-45)
Time on mechanical ventilation – Mean (Min-Max)	12.65	(0-131)
Length of hospitalization (days) – Mean (Min-Max)	39.26	(5-131)

CPAP: Continuous Positive Airway Pressure; Min: minimum; Max: máximo; F: female; M: male

Table 2: Frequency of clinical outcomes in the studied population.

Outcome	Frequency	
	n	%
Bronchopulmonary dysplasia	6	17.6
Sepsis	12	35.3
Retinopathy of prematurity*	9	26.5
Intraventricular hemorrhage**	7	20.6
Death	3	8.8
No unfavorable outcome	16	47.1

*One of the nine patients with ROP had a severe form of disease and required photocoagulation

** None of the patients had PIVH grade III or IV

TNF- α levels within the first hour of life in the group developing sepsis were significantly higher when compared to the group of individuals who did not have sepsis (**Table 3**). No correlation was found between cytokine levels within the first three hours of life and the other outcomes analyzed in the study.

Table 3: Comparison between serum cytokine levels of patients with and without sepsis.

Variables	SEPSIS						<i>P</i>
	No			Yes			
	N	Mean	Median	N	Mean	Median	
IL-6 (10 min)	22	4.25	0.00	12	20.90	2.50	0.327
IL-6 (1 h)		33.42	8.90		80.84	24.80	0.299
IL-6 (3 h)		42.58	7.50		191.82	16.80	0.204
IL-8 (10 min)	22	82.10	69.70	12	174.25	77.00	0.511
IL-8 (1 h)		125.47	114.80		242.11	151.80	0.317
IL-8 (3 h)		254.83	230.30		511.35	238.40	0.462
IL-10 (10 min)	22	7.56	0.00	12	12.25	15.90	0.204
IL-10 (1 h)		12.42	0.00		13.87	16.00	0.560
IL-10 (3 h)		9.80	2.40		11.16	13.20	0.749
IFN- γ (10 min)	22	88.37	0.00	12	135.12	79.80	0.094
IFN- γ (1 h)		115.00	0.00		119.44	105.40	0.317
IFN- γ (3 h)		99.00	0.00		267.47	134.80	0.133
TNF- α (10 min)	22	82.05	8.40	12	122.40	24.20	0.383
TNF- α (1 h)		40.95	0.00		102.49	15.60	0.048
TNF- α (3 h)		160.32	0.00		107.76	58.60	0.396
GM-CSF (10 min)	22	396.26	310.00	12	466.13	452.8	0.547*
GM-CSF (1 h)		357.41	268.10		444.75	477.8	0.480*
GM-CSF (3 h)		362.68	322.70		379.29	389.20	0.881*

*Student's t-test. The Mann-Whitney U test was used in all other variables.

The descriptive measures for IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF at ten minutes, one hour, and three hours are in **Table 4**.

Table 4: Descriptive measures of neonatal IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF levels 10 minutes, one and three hours after birth (pg/mL).

Variables	Time	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	25 th Percentile	75 th Percentile
IL-6	10 min	10.13	0.00	39.24	0	223.60	0	3.65
	1 h	49.12	15.90	122.39	0	675.4	0	40.40
	3 h	91.25	9.8	334.13	0	1.915.00	0	41.20
IL-8	10 min	117.99	77.0	160.88	0	918.0	40.05	146.20
	1 h	164.72	124.8	167.11	0	855.8	60.10	212.7
	3 h	342.97	235.40	451.41	36.80	2.712.60	143.20	377.50
IL-10	10 min	9.22	10.10	9.28	0	22.60		17.45
	1 h	12.52	12.20	14.37	0	54.20	0	20.65
	3 h	9.95	6.30	10.86	0	30.80	0	17.95
IFN- γ	10 min	104.87	0.00	243.19	0	1.226.80	0	137.20
	1 h	113.05	0.00	174.45	0	694.80	0	167.05
	3 h	150.59	57.60	280.13	0	1.533.40	0	205.00
TNF- α	10 min	96.29	10.10	192.35	0	801.60	0	102.35
	1 h	59.66	2.5	127.44	0	507.00	0	31.50
	3 h	141.75	13.6	205.20	0	681.60	0	301.35
GM-CSF	10 min	414.49	379.4	363.68	0	1.260.40	94.65	655.15
	1 h	377.86	291.90	332.31	0	1.261.80	82.95	572.90
	3 h	372.05	348.50	290.95	0	1.068.60	104.90	548.10

The IL-6, IL-8, and IFN- γ levels found in each sampling time were statistically different.

Thirteen patients had axillary temperatures below 36.4°C on admission to the neonatal unit. The comparison of cytokine serum levels found in individuals with hypothermia versus unaffected subjects revealed that GM-CSF levels were significantly higher in the group not presenting hypothermia ($p = 0.005$) (**Table 5**).

Table 5: Comparison between serum cytokine levels one hour after birth of patients with and without hypothermia on admission to the neonatal unit.

Variables	Hypothermia						<i>P</i>
	No			Yes			
	N	Mean	Median	N	Mean	Median	
IL-6 (1 H)	21	60.21	17.90	13	32.32	5.40	0.207
IL-8 (1 H)	21	146.95	114.80	13	191.12	148.60	0.221
IL-10 (1 H)	21	15.24	15.90	13	9.31	0.00	0.316
IFN- γ (1 H)	21	134.62	42.70	13	88.57	0.00	0.650
TNF- α (1 H)	21	83.17	10.30	13	28.08	0.00	0.316
GM-CSF (1 H)*	21	499.96	401.30	13	212.00	209.60	0.005

*Student's t-test. The Mann-Whitney U test was used in all other variables

No statistically significant differences were found in cytokine levels within the first three hours of life of individuals requiring intubation (n=16) during hospitalization versus subjects intubated after the first three hours of life (n=18).

The population was stratified by weight at birth and divided into two groups, one with individuals weighing 1,500 grams or more (n=13) and another with infants weighing less than 1,500 grams (n=21). No statistically significant differences were found between the groups in terms of the cytokine levels observed at different sampling times

Discussion

The present study demonstrated the viability of detecting cytokines in capillary blood samples on filter paper collected within the first three hours of life of preterm neonates.

The use of filter paper in workup monitoring has been tested in recent years (8,9,11). The small amounts of blood required in this test method proved particularly advantageous for neonates, given the concerns over infant circulating blood volumes and the numerous blood tests performed in this population for clinical monitoring and follow-up purposes. Less pain, along with easier sample collection, storage, transportation and cytokine stabilization also appears as advantage of the collection of blood samples on filter paper (8,12,13).

Many studies in neonatology have targeted biomarkers with potential uses in identifying patients at greater risk of developing severe clinical outcomes or complications and driving the adoption of preventive measures directed to specific patient groups.

In regards to the outcomes considered in this study, a correlation was observed between TNF- α levels in the first hour of life and development of early and late sepsis during hospitalization; no correlations were found with BPD, ROP, PIVH, or death. Sepsis ranks among the main causes of morbidity and mortality in neonatal units. The identification, prevention, and management of cases of sepsis is a significant challenge for health care teams. Prashant *et al.* (2013) analyzed IL-6, IL-8, TNF- α , and C-reactive protein (CRP) serum levels in neonates before and after treatment with antibiotics and 24 and 48 hours after the administration of antimicrobial drugs. The authors reported that TNF- α was highly sensitive in diagnosing inflammation, although it could not be used to differentiate neonates with and without infection; high levels of TNF- α were also associated with higher risk of death. An association between IL-6 and TNF- α was also suggested for the diagnosis of neonatal sepsis (14). Other studies have also reported increased TNF- α levels in patients with clinical sepsis versus controls (15,16). TNF- α expression appears to be correlated with sepsis severity and death (17). The number of deaths in this study was not significant, given that the included subjects had a mean gestational age of 30 weeks. Therefore, no correlation was observed between sepsis and death.

Most published papers included very low birth weight neonates to report correlations between cytokine levels and prevalent clinical outcomes with an inflammatory etiology, BPD, and sepsis in particular (18,19,20). BPD was diagnosed in 17.6% of

the subjects enrolled in our study, but no correlations were found with the investigated cytokines at any of the different sampling times. The association between cytokines and the development of retinopathy of prematurity, intraventricular hemorrhage, and necrotizing enterocolitis has also been investigated by other authors, but was not observed in this study (6,21,22). Only one of nine patients diagnosed with retinopathy of prematurity in our group developed severe ROP; none had PIVH grade III or IV; and none had necrotizing enterocolitis.

IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF were detected within the first hours of life of the subjects included in the study. The IL-6, IL-8, and IFN- γ levels observed at different sampling times were statistically different.

There is some controversy as to the timing of cytokine release. IL-6 levels were different at the three sampling times, with higher levels being detected one hour after birth, whereas gradually higher levels of IL-8 were observed throughout the first three hours of life of the subjects. IL-6 and IL-8 have a short half-life, and circulating levels drop dramatically with the administration of antimicrobial therapy to patients with sepsis, reaching virtually undetectable levels 24 hours after the start of treatment (23). These characteristics limit the use of these cytokines as diagnostic markers for sepsis. However, the observation of variations in their levels might be useful in the identification of practices to induce inflammatory responses, although they are not described as a disease with an established pathophysiology, as is also the case of neonate handling and clinical procedures deemed risk-free by health care teams.

IFN- γ was detected only at three hours of life. Other authors looking into the associations between cytokines and BPD reported correlations between IFN- γ , BPD, and death (18).

GM-CSF levels observed at different sampling times were not statistically different. However, a correlation was found between lower GM-CSF serum levels and hypothermia in the 13 patients with axillary temperatures below 36.4°C on admission to the neonatal unit versus individuals not diagnosed with hypothermia. GM-CSF stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells and induces the maturation and release of the medullary neutrophil pool into peripheral blood. In vitro studies performed with neonate neutrophils revealed that both factors, in addition to acting

on the bone marrow, improve the functional status of mature neutrophils by enhancing chemotaxis, phagocytosis, bactericide properties, and oxidative metabolism. Hypothermia was found to reduce GM-CSF levels, which could possibly lead to more severe cases of neutropenia and, consequently, increased chances of sepsis (24).

Some of the individuals included in the study only needed intubation after their first three hours of life when they were admitted to the neonatal unit. Their serum cytokine levels were compared to those of the patients who never required mechanical ventilation during hospitalization, but no statistically significant differences were found.

Most of the studies on cytokine levels and their correlations with clinical outcomes have included extremely low birth weight infants. The population enrolled in this study was stratified for bodyweight and comparisons were made between the cytokine levels and clinical outcomes of individuals weighing less than 1,500 grams and 1,500 grams and more, but no statistically significant differences were identified.

Conclusion

The assessment of neonatal cytokine levels may shed light on the stress infants are exposed to as a result of the procedures they undergo within the first hours of their lives. Cytokine levels demonstrate how preterm neonates respond physiologically to insults initiated during intrauterine life and inflicted within hours of birth. The correlation between neonatal sepsis and high levels of TNF- α is a promising finding for monitored neonates at risk. Hypothermia leads to lower levels of GM-CSF, which by in turn favors the onset of neutropenia. Preventing hypothermia includes the adoption of proper infant handling procedures, particularly for preterm neonates within their first hours of life.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments section, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged

You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged in this section (agency and grant number).

What is already known on this topic: some cytokines have been correlated with prevalent neonatal outcomes such as sepsis, bronchopulmonary dysplasia, and retinopathy of prematurity; the method using dried whole blood spots on paper filter has been utilized previously.

What this study adds: cytokine levels observed within the first three hours of life; the correlation between GM-CSF and hypothermia, indicating the need to review care practices in order to prevent it from occurring.

References

1. Bryce J, Black RE, Walker N, Bhutta ZA, Lawn JE, Steketee RW. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? *Lancet* 2005;365(9478): 2193-200.
2. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, et al. Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics* 2002;110(1pt1):143-51.
3. Carvalho CG, Silveira RC, Procianoy RS. Ventilator-induced lung injury in preterm infants. *Rev Bras Ter Intensiva* 2013;25(4):319-26.
4. Bose CL, Damman CEL, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93(6):F455-61.
5. Lam HS, Ng PC. Biochemical markers for neonatal sepsis. *Pathology* 2008;40(2):141-8.

6. Silveira RC, Fortes Filho JB, Procianoy RS. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(3):1297-301.
7. Savman K, Blennow M, Hagberg H, Tarkowski E, Thoresen M, Whitelaw A. Cytokine response in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Acta Paediatr* 2002;91(12):1357-63.
8. McDade TW, Willians S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007;44(4):899-925.
9. Skogstrand K, Thorse P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sørensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem* 2005;51(10):1854-66.
10. Arya S.C. Testing for AIDS on samples of dried blood prepared on filter papers. *Vaccine* 1988;6;210.
11. Skogstrand K, Ekelund CK, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Nørgaard-Pedersen, et al. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *J Immunol Methods* 2008;336(1):78-84.
12. McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am. J Hum Biol* 2014;26(1):1-9.
13. Worthman CM, Starling J.F. Hormone measures in finger-prick blood spot samples: new Field methods for reproductive endocrinology. *Am J Phys Anthropol* 1997;104(1):1-22.
14. Prashant A, Vishwanath P, Kulkarni P, Sathya Narayana P, Gowdara V, Nataraj SM, et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. *PLoS One* 2013;8(7):e68426.

15. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1- β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatrica* 1999;88(6):647-50.
16. Pickler R, Brown L, McGrath J, Lyon D, Rattican D, Cheng CY, et al. Integrated review of cytokines in maternal Cord and newborn blood: part II – associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants. *Biol Res Nurs*, 2010;11(4):377-86.
17. Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. Serum tumor necrosis factor in newborn at risk for infections. *Eur Journal Pediatrics* 1990;149(9):45-47.
18. Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2009;123(4):1132-41.
19. Laughon MM, Langer JC, Bose CL, Smith PB, Ambalavanan N, Kennedy KA, et al. Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(12):1715-22.
20. Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: Cytokines and beyond. *Clin Perinatol* 2010;37(3):599-610.
21. Merhar S. Biomarkers in neonatal posthemorrhagic hydrocephalus. *Neonatology* 2011;101(1):1-7.
22. Maheshwari A, Schelonka RL, Dimmit RA, Carlo WA, Munoz-Hernandez B, Das A, et al. Cytokines Associated with Necrotizing Enterocolitis in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatr Res* 2014;76(1):100-108.
23. Castagnola E, Dufour C. Role of G-CSF GM-CSF in the management of infections in preterm newborns: an update. *Early Hum Dev* 2014;90(2):S15-17.

24. Carr R, Modi N, Doré C. G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. Cochrane Database Syst Ver 2003;3:CD003066.

Licence for publication statement

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ and co-owners or contracting owning societies (where published by the BMJ on their behalf), and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Archives of Disease in Childhood and any other BMJ products and to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence.

Competing Interest: None declared

Funding statement: this work was supported by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais grant number [APQ-00863-11] and by Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Contributorship statement:

- Juliana de Oliveira Marcatto: Doctoral student, responsible for the study/research; collected data, aided in tests/analyses, and co-wrote of the papers.
- Luciana de Gouvêa Viana: Professor, research co-advisor; aided in tests/analyses and co-wrote the papers.

- Pedro Guatimosim Vidigal: Professor, research advisor; aided in tests/analyses and co-wrote the papers.
- Marcus Vinicius Andrade: Professor, responsible for the laboratory; carried out tests/analyses and co-wrote the papers.
- Camilla R L Machado: Master's student; aided in tests and co-Wrote the papers.