

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ROZILDA LOPES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE DANO DE DNA NO PROGNÓSTICO DE SEPSE
NEONATAL

CRICIÚMA, JANEIRO 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROZILDA LOPES SOUZA

**AVALIAÇÃO DE DANO DE DNA NO PROGNÓSTICO DE SEPSE
NEONATAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de
Andrade**

Co-orientador: Prof^o. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA, JANEIRO 2009.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S729a Souza, Rozilda Lopes.

Avaliação de dano de DNA no prognóstico de sepse neonatal / Rozilda Lopes Souza; orientadora: Vanessa Moraes de Andrade. – Criciúma: Ed. do autor, 2009.

39f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2009.

1. Sepse. 2. Neonatologia. 3. Recém-nascidos. I. Título.

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



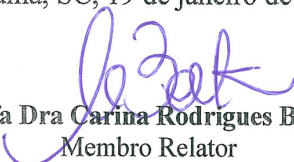
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

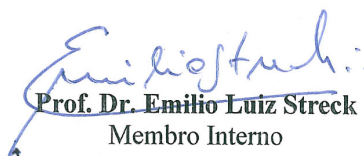
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata **ROZILDA LOPES DE SOUZA** sob o título “Avaliação de dano de DNA no prognóstico de sepse neonatal” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido ao candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito **A** .

Criciúma, SC, 19 de janeiro de 2009.


Profa Dra Carina Rodrigues Boeck
Membro Relator


Profa Dra Alessandra Peres
Membro Externo


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Membro Interno


Profa Dra Vanessa Moraes de Andrade
Orientador


Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Coordenador do PPGCS

*Dedico esta dissertação ao meu marido **Luciano** pelo apoio, compreensão e dedicação durante esta etapa de minha vida, contribuindo com a conquista de meus objetivos. E ao meu filho **Davi** que mesmo sendo um pequeno ser em meu “ventre” é a maior razão da minha vida.*

Agradecimentos.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela força a qual me fez chegar até o fim.

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão e por acreditarem em minha vitória.

Ao meu marido Luciano pelo apoio e por compreender minha ausência algumas vezes.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram em especial à minha orientadora Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade, pelo seu empenho na conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Felipe Dal Pizzol pela grande contribuição.

RESUMO

A sepse é uma síndrome complexa causada pela resposta inflamatória sistêmica descontrolada do indivíduo de origem infecciosa, caracterizada por manifestações múltiplas, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou mesmo a sua morte. Sepse neonatal pode ser classificada como sepse de origem materna ou precoce que se manifesta nas primeiras 48 horas de vida e sepse de origem ambiental ou tardia, que aparece após 48 horas de vida. Este trabalho teve como objetivo avaliar através do ensaio cometa os parâmetros de danos de DNA em sangue de neonatos com diagnóstico de sepse neonatal, visando estabelecer um possível marcador para avaliar o prognóstico da sepse neonatal. Foi um estudo tipo coorte, as amostras de sangue foram obtidas de 48 recém-nascido submetidos a cuidados intensivos numa unidade neonatal, foram coletadas amostras de sangue como rotina na admissão do recém-nascido e uma quantidade extra de 15 uL de sangue foi coletado para análise do Cometa, após foi coletado amostra por mais 04 dias sendo o material obtido da punção capilar na realização do HGT de rotina. Um total de 48 amostras sendo 24 com diagnóstico de sepse segundo classificação de Bell (Bell et al.,1978) e o restante como grupo controle. O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh et al (1988) com as modificações sugeridas por Tice et al. (2000). A análise estatística foram comparadas pelo test de Student com significância de 0,05 e análise do cometa através da curva ROC. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos sepse e controle. Concluímos que apesar de todas as aplicações do ensaio cometa em mais de 20 áreas de conhecimento científico, para o diagnóstico de sepse neonatal ele não pode ser aplicado como marcador para diagnóstico de sepse neonatal.

Palavras-chave: sepse neonatal; teste cometa; dano em DNA.

ABSTRACT

The sepsis syndrome is a complex question by uncontrolled systemic inflammatory response of the individual from infectious origin, characterized by multiple events, which can determine failure or dysfunction of one or more organs or even death. Neonatal sepsis can be classified as sepsis of maternal origin that manifests itself early in the first 48 hours of life and environmental origin of sepsis or delayed, appearing after 48 hours of life. This work was evaluated by comet assay the parameters of data from DNA in blood of neonates with a diagnosis of neonatal sepsis, to establish a possible marker to evaluate the prognosis of neonatal sepsis. It was a cohort study, blood samples were obtained from 48 newborns undergoing intensive care in a neonatal unit, blood samples were collected as the routine admission of the newborn and an extra amount of 15 uL of blood was collected for analysis of Comet, after sample was collected for another 04 days and the material obtained by capillary puncture in the completion of HGT routine. A total of 48 samples and 24 diagnosed with sepsis second classification of Bell (Bell et al., 1978) and the rest as the control group. The comet assay was performed as described by Singh et al (1988) with the modifications suggested by Tice et al. (2000). The statistical analysis were compared by test of significance of 0.05 with Student and analysis of the comet through the ROC. There were no statistically significant differences between groups and sepsis control. We conclude that despite all the applications of the comet test in more than 20 areas of scientific knowledge for the diagnosis of neonatal sepsis can not be used as a marker for diagnosis of neonatal sepsis.

Keywords: neonatal sepsis; comet assay, damage to DNA.

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO.....	09
1. Sepses Neonatal.....	09
2. Diagnóstico de Sepses Neonatal.....	12
3. Estresse Oxidativo e Dano de DNA em Neonatos.....	15
4. Ensaio Cometa.....	19
5. OBJETIVO GERAL.....	22
5.11. Objetivo Específico.....	22
6. RESULTADO.....	23
NO SENSITIVE OF THE COMET ASSAY TO DETECT NEONATAL SEPSIS.	23
7. DISCUSSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

INTRODUÇÃO

1. Sepses neonatal

A Sepses é uma síndrome complexa causada pela resposta inflamatória sistêmica descontrolada do indivíduo, de origem infecciosa, caracterizada por manifestações múltiplas, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou mesmo a sua morte (Carvalho e Trotta, 2003).

Sepses e Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) são caracterizadas pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e pela excessiva ativação de células inflamatórias, resultando numa anarquia metabólica no qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele criou”. A principal consequência desta resposta inflamatória é o comprometimento de muitos órgãos e o quadro de choque com evolução para a síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos que é acompanhado de alta mortalidade (Pereira Junior et al., 1998). Segundo o Consenso de 1991 o termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica é usado para descrever uma síndrome caracterizada por 2 (dois) ou mais dos seguintes sintomas: febre ou hipotermia, taquicardia com taquipnéia ou hiperventilação, aumento anormal das células brancas e células imaturas (August e Max, 2001).

A sepses neonatal é causa importante de morbidade e mortalidade em unidades de neonatologia. Apesar da evolução na terapêutica da sepses e no suporte de recém nascidos de risco, o período neonatal ainda concentra a maior faixa de mortalidade infantil. Entretanto, a maior dificuldade ainda reside na inexistência de testes diagnósticos que diferenciem corretamente sepses neonatal de início precoce dentre outras situações não infecciosas cujas manifestações clínicas podem ser indistinguíveis (Cancelier, 2006).

A Sepsis neonatal pode ser classificada como sepsis de origem materna ou precoce que se manifesta nas primeiras 48 horas de vida e está associada às complicações obstétricas pré-natais ou intra-parto, ou sepsis de origem ambiental ou tardia, que aparece após 48 horas de vida, estando o agente etiológico associado ao meio ambiente hospitalar, à equipe assistencial e ao visitante da unidade neonatal (Kopelman et al., 2005). Alguns fatores aumentam o risco de infecção de início precoce no recém-nascido e o mais evidente deles é a colonização materna pelo *Estreptococo do grupo B (EGB)* no momento do parto (Schrag et al., 2002). Um estudo com base populacional com 18.299 recém-nascidos para diagnosticar sepsis de início precoce, utilizando antibioticoterapia profilática em mães com suspeita de infecção, concluíram que recém-nascidos cujas mães foram tratadas eram menos susceptíveis a serem sintomáticos, necessitarem de ventilação assistida e/ou desenvolverem infecção bacteriana (Scobar et al., 2000).

Na vida intra-uterina e durante o nascimento, o feto e o recém-nascido podem ser colonizados por microorganismos, por meio de contaminação no trajeto do parto com a flora do trato genital materno (*Lactobaccillus sp*, *Corynebacterium sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus A,B e D*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomates*, *bacilos entéricos gram-negativos, anaerobios, vírus e fungos*) ou pela via transplacentária (*Listeria monocytogenes tipo B*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Streptococcus pneumoniae*). Dentre os fatores de risco de infecção neonatal destaca-se: rotura prematura da membrana, infecção urinária materna e prematuridade (Marcondes et al., 2003). Um estudo transversal com 786 neonatos prematuros tiveram uma prevalência de sepsis neonatal precoce de 6,3%, tendo como fatores de risco significativamente associados a idade materna avançada, ruptura prematura da membrana e carioamnionite (Salem et al., 2006).

A incidência de sepse é variável em diferentes países, incidência de 1-10/1000 nascidos vivos, 13-27/1000 em RN pré-termo com < 1500g e mais freqüente no sexo masculino, com níveis mais elevados em sepse precoce com mortalidade 13 a 50% (Rodwell et al.,1988).

No período de maio de 1994 a maio de 1996 a sepse constituiu-se a infecção mais freqüente na UTI neonatal do Hospital São Paulo da UNIFESP/EPM e acometeu 143 dos 1868 nativos sendo a incidência de 77 por mil nascidos vivos. De janeiro de 1997 a setembro de 2000 foram tratados 164 episódios de sepse em recém-nascidos com peso abaixo de 1500g, sendo 38 de origem materna com início até 48 horas (11% hemocultura positiva) e 126 de origem ambiental após 48 horas (37 % de hemocultura positiva) (Kopelmam et al., 2005).

Diversos estudos colaborativos concluíram que a incidência de sepse em recém-nascidos (RN) de mães com bolsa rota por tempo superior a 24 h é de aproximadamente 1%, na presença de sinais e sintomas de carioamnionite, o risco de sepse comprovada eleva-se para 3% a 5%. Infecção intra-amniótica clinicamente evidente, também denominada carioamnionite clínica, complica de 1% a 10% das gestações, podendo resultar em morbidade materna e morbi-mortalidade perinatal mais elevada. O diagnóstico clínico de carioamnionite algumas vezes é difícil, com achados não específicos devendo-se suspeitar dessa infecção na presença de febre materna, hipertonia uterina, líquido amniótico purulento ou com odor fétido, leucocitose materna ou ainda taquicardia fetal. Na carioamnionite o risco de sepse é de 10% a 15% no RN a termo e de 35% a 50% no prematuro (Yadavi et al., 2005).

2. Diagnóstico de sepse neonatal

O diagnóstico de sepse neonatal precoce é difícil e os sinais clínicos podem ser mínimos ou inespecíficos. Muitas vezes as manifestações clínicas de uma cardiopatia congênita grave, por exemplo, revelam um quadro de sepse bacteriana. Os fatores de risco neonatais estão diretamente relacionados a antecedentes gestacionais e do parto. A prematuridade é sem dúvida o fator de risco mais importante, responsável pela maior incidência de sepse neonatal precoce e está frequentemente associada à pré-eclampsia materna, baixo peso ao nascer, asfixia perinatal, infecções estreptocócicas maternas (Procianoy e Leone, 2004).

Destacar um quadro infeccioso é o objetivo primordial quando se depara com neonatos que apresentam sinais e sintomas inespecíficos, ou fatores de risco maternos para sepse neonatal. Habitualmente, quando há suspeita clínica de sepse, são solicitados vários testes diagnósticos, iniciando-se pelo hemograma e contagem de plaquetas, proteínas de fase aguda e mais recentemente dosagem de interleucinas (Ng, 2004).

O diagnóstico de sepse neonatal é difícil em neonatos admitidos em unidades de cuidados intensivos devido aos sinais clínicos serem inespecíficos, por isso indicadores fiáveis de sepse seriam úteis para um diagnóstico preciso, resultando numa diminuição do uso desnecessário de antibióticos (Schultz et al., 2002). Não há nenhum exame laboratorial com 100% de especificidade e sensibilidade, por isso a necessidade de pesquisas por um exame confiável. A sensibilidade de cada teste laboratorial está longe de 100%. As medições de antagonistas dos receptores de IL-1, IL-6, IL-8, ainda são confinadas a laboratórios de investigação (Akenzura et al., 1974; Placzek et al., 1983; Barner et al., 1998; Kuster et al., 1998)

Os exames laboratoriais coadjuvantes, empregados para o diagnóstico de sepse neonatal não são específicos, uma vez que avaliam a resposta inflamatória promovida pelo agente causador, não identificando o agente etiológico. Porém a utilização de uma associação de exames laboratoriais tem apresentado alta sensibilidade e boa acurácia em diversos estudos publicados nas duas últimas décadas. Entre os testes diagnósticos destacam-se: hemocultura, exame de líquido, urocultura, teste hematológico (leucograma, plaquetas, VHS (Velocidade de Hemossedimentação)) e testes imunológicos (Proteína C reativa, citocinas), estes testes são reagentes da fase aguda, como resposta a diversos estímulos inflamatórios (Procianoy e Leone, 2004).

O diagnóstico de infecção em prematuros pode ser muito difícil, a apresentação clínica da infecção neonatal é sutil e não-específica, apresentando sinais tais como icterícia, temperatura corporal instável, dificuldade respiratória, alterações do ritmo cardíaco, e dificuldade na alimentação (Baltimore, 2003; Polin, 2003).

As hemoculturas são padrão ouro para o diagnóstico, porém apresentam uma baixa sensibilidade e não estão disponíveis no momento para influenciar a terapêutica inicial. Dada a rápida progressão e a alta mortalidade de prematuros por sepse, o uso de agentes antimicrobianos de largo espectro é frequentemente administrado na primeira suspeita clínica de infecção, mesmo sabendo que prematuros tem maior risco de desenvolver toxicidade pela droga, devido a imaturidade do sistema hepático e renal (McCracken et al., 1987; Philip et al., 1980).

Um estudo clínico retrospectivo realizado por Kingsmore e colaboradores (2008) a fim de identificar biomarcadores séricos para o diagnóstico de infecção em neonatos prematuros utilizou a técnica de microarranjos (microarray) para avaliar o

nível de 142 proteínas séricas em 107 neonatos infectados e não infectados. As análises revelaram alterações significativas nos níveis de 8 proteínas nos neonatos infectados, as quais estão associadas com inflamação, coagulação e fibrinólise, mostrando que o uso de imunoenaios pode ter uma utilidade clínica como adjuvante para o rápido diagnóstico da infecção.

Vários estudos vêm sendo realizados para tentar estabelecer que teste ou combinação de testes possam diagnosticar precoce e corretamente os quadros de sepse neonatal. E ainda mais, naqueles neonatos com fatores de risco maternos, mas sem sinais clínicos de infecção, que marcadores seriam considerados indispensáveis para dar início à antibioticoterapia (Gerdes, 1991; Ng, 2004). Sabe-se que o diagnóstico precoce da sepse neonatal e o correto tratamento podem ajudar significativamente no prognóstico da sepse, bem como evitar as possíveis seqüelas.

Segundo Rodwell (1988), a fim de sistematizar os achados clínicos e o diagnóstico de sepse neonatal, alguns autores, em seus estudos estabeleceram critérios para o diagnóstico na ausência de microorganismos em exames de culturas. Foram considerados sinais clínicos de infecção a presença de um ou mais destes itens:

- 1- leucopenia ou leucocitose
- 2- neutropenia ou neutrofilia
- 3- aumento de neutrófilos imaturos
- 4- aumento de neutrófilos imaturos/neutrófilos totais
- 5- neutrófilos imaturos/neutrófilos segmentados >0,3.
- 6- neutrófilos com granulação tóxica ou vacuolização
- 7- plaquetopenia.

Essas espécies passam a ser prejudiciais ao nosso organismo quando ocorre um aumento excessivo dos mesmos ou quando ocorre a diminuição dos agentes antioxidantes endógenos, e em ambas as situações é denominado estresse oxidativo.

Dentre os mediadores envolvidos na resposta sistêmica da sepse tem-se dado atenção especial para as EROs. Durante a sepse as EROs são produzidas no compartimento vascular e nos órgãos-alvo podendo ser os efetores de diversas alterações patológicas envolvidas na gênese da doença. A produção de EROs pode contribuir para o dano em órgãos-alvo e para a regulação da produção de citocinas inflamatórias, tendo assim papel relevante na gênese da sepse (Zhang et al., 2000).

O estresse oxidativo se refere à situação onde há desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio, e as defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode causar dano em todo tipo de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Um estresse oxidativo severo produz danos irreversíveis que levam a morte celular, podendo ocorrer tanto por necrose como por apoptose (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Sabendo-se que o estresse oxidativo pode causar danos em nível de DNA, um estudo utilizando amostras de sangue de cordão umbilical de neonatos saudáveis demonstrou um aumento no dano oxidativo no DNA de células mononucleares do sangue umbilical, bem como alterações em outros índices relacionados com o status redox, evidenciando dessa forma, que um súbito aumento na oxigenação expõe o neonato ao estresse oxidativo e conseqüentemente a dano em nível de DNA (Zhao et al., 2004).

O neonato apresenta níveis basais de marcadores de estresse oxidativo mais elevados, em parte pela transição da vida intra-uterina, na qual existem baixos níveis de oxigênio liberado aos tecidos. Esse estado pró-oxidante pode determinar

estresse oxidativo nos neonatos, particularmente importante nos prematuros que acumulam deficiência de surfactante, baixos níveis de antioxidantes e baixa capacidade de indução das enzimas anti-oxidantes (Saugstad, 1996).

Já se sabe que os radicais livres de oxigênio em situações fisiológicas de desequilíbrio oxidativo podem produzir graves alterações em DNA. A relação mutação/estresse oxidativo abre uma nova dimensão na concepção de enfermidades hereditárias, e que muitas patologias não catalogadas como estresse oxidativo, podem ter sua origem na alteração do material hereditário em determinadas situações pró-oxidativas (Roche e Alvira, 1996).

O processo de parto é acompanhado por um aumento da agressão oxidativa. O feto é transferido de um ambiente intrauterino em hipóxia com DO_2 de 20-25 mm Hg para outro ambiente extrauterino com DO_2 de 100 mm Hg. Este súbito aumento na concentração de oxigênio alveolar e pO_2 arterial aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio no pulmão e em outros órgãos. Esta alteração resulta em grande estresse oxidativo para neonatos no nascimento (Muller, 1987). Uma produção intensiva maior de EROs sobrecarrega a capacidade antioxidante dos tecidos comprometendo assim a estrutura e função de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Çimen, 2008).

A resposta inflamatória determina a liberação de radicais livres de oxigênio, os quais mantêm um círculo vicioso de lesão-inflamação-ativação de fatores nucleares. Nesse ponto, muito se tem estudado a respeito do estresse oxidativo na sepse. A sepse gera um estado de desequilíbrio entre produção de oxidantes e anti-oxidantes, gerando um excesso de radicais livres de oxigênio. Essas moléculas têm a função de destruir o agente agressor, entretanto não são específicas e acabam por determinar lesão também no hospedeiro (Macdonald et al., 2003). O dano oxidativo

neonatal tem sido relacionado à retinopatia da prematuridade, displasia broncopulmonar, persistência do canal arterial, enterocolite necrosante e leucomalácia periventricular, todas as patologias estritamente associadas à prematuridade (Saugstad, 2005). Porém alguns estudos realizados enfocam as doenças crônicas ou complicações da prematuridade, sendo estes plausíveis de questionamentos quanto aos valores elevados de estresse oxidativo serem causa ou consequência de dano tecidual (Romeo et al., 1999). Um estudo utilizando o teste cometa foi realizado com o intuito de avaliar e comparar o nível de dano de DNA em crianças bem nutridas e mal nutridas com infecção em comparação com crianças saudáveis bem e mal nutridas. Este estudo mostrou que a infecção severa está associada com o aumento significativo no dano em DNA, sendo acentuado este dano em crianças mal nutridas (Betancourt, 1995).

Tsukahara et al (2004) realizou um estudo com o objetivo de elucidar o status de estresse oxidativo e sua relação com o grau de prematuridade e condições clínicas de neonatos. Os resultados obtidos revelaram que os níveis de 3 marcadores urinários de estresse oxidativo foram significativamente maiores nos neonatos prematuros doentes quando em comparação aos neonatos prematuros saudáveis e recém-nascidos a termo evidenciando um dano oxidativo em nível de DNA, lipídios e proteínas.

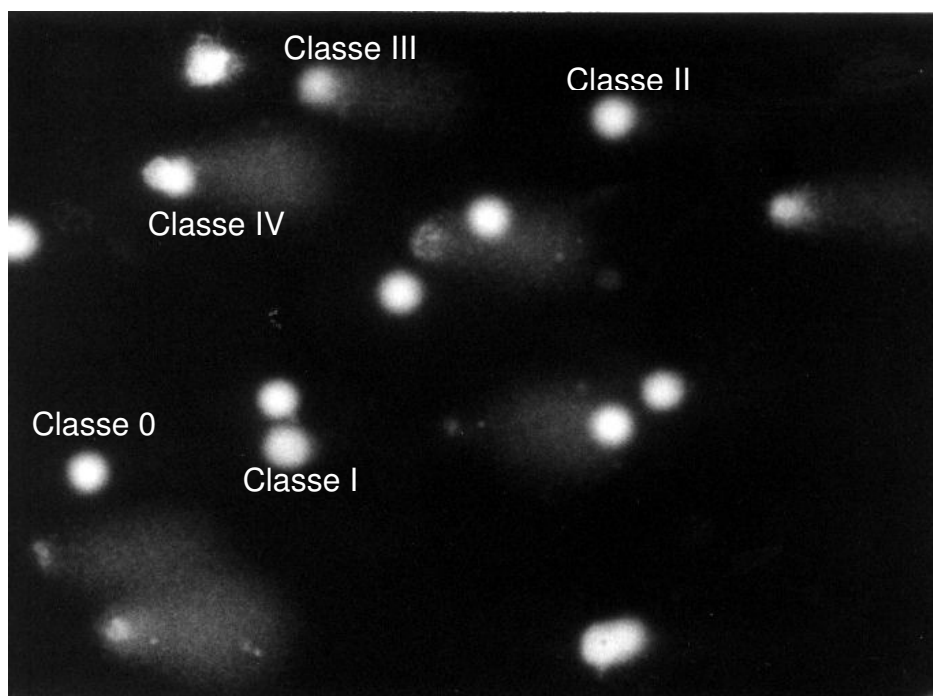
4. Ensaio cometa

O Ensaio Cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. É uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais (Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estas, a necessidade de somente um pequeno número de células e de não serem necessárias células em divisão.

A metodologia do teste consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado (neutra ou alcalina). Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo celular. Imediatamente ao desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração para fora do núcleo dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Finalmente as lâminas são coradas através do emprego de substâncias capazes de se associar ao DNA, como agentes intercalantes (p.ex., brometo de etídio) ou redutores como o nitrato de prata.

Após a eletroforese, as células são analisadas em microscópio óptico e as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas

visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estarem associados ao núcleo por uma cadeia simples (Fairbairn et al., 1995). Para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado (McKelvey-Martin et al., 1993), mas somente é de consenso que a visualização do "cometa", significa dano ao nível do DNA, podendo ser quebra simples, duplas e/ou lesões álcali-lábeis (McKelvey-Martin et al., 1993; Fairbairn, 1995; Tice, 1995).



Visualização no microscópio de eritrócitos de tainha com vários tipos de classes de danos, onde a "cabeça" representa o núcleo original e a "cauda" os fragmentos de DNA

O ensaio cometa vem sendo cada vez mais utilizado como teste de genotoxicidade para o biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais.

Constatando que a sepse neonatal é uma patologia grave que afeta principalmente recém-nascidos prematuros internados em unidades de tratamento intensivo neonatal, visto que não se tem um método de diagnóstico específico,

principalmente na sepse de início precoce, e que recém-nascidos doentes, com complicações no parto associadas a complicações maternas apresentam um aumento de EROs. Buscamos através deste trabalho, avaliar através do Ensaio Cometa os parâmetros de danos de DNA em sangue de recém-nascidos internados na unidade de terapia intensiva do Hospital Materno Infantil Santa Catarina, com diagnóstico de sepse, visando estabelecer um possível marcador para avaliar o prognóstico da sepse neonatal.

5. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar, através do Ensaio Cometa, os parâmetros de danos de DNA em sangue de neonatos com diagnóstico de sepse, visando estabelecer um possível marcador para avaliar o prognóstico da sepse neonatal.

5.1 Objetivos Específicos

- Determinar o nível basal de danos de DNA em neonatos com fator de risco para sepse através do Ensaio Cometa.

- Determinar a relação entre dano de DNA nos neonatos internados na UTI Neonatal do HMISC, e a sua evolução clínica, conduta terapêutica.

6. RESULTADOS

No sensitivity of the Comet assay to detect neonatal sepsis

Original Research Communication: Capsules

Natalia C. Carvalho^a, Rozilda L. de Souza^a, Felipe Dal-Pizzol^b, Vanessa M. Andrade^{a,*}

^aLaboratório de Imunologia e Mutagênese, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil;

*Corresponding author:

Prof. Vanessa Moraes de Andrade
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)
88806-000 Criciúma - SC - Brazil
Phone: +55 48 3431 2759
Fax: +55 48 3443 4817
E-mail: vmoraesdeandrade@yahoo.com.br

Abstract

No sensitivity of the Comet assay to detect neonatal sepsis

Natalia C. Carvalho^a, Rozilda L. de Souza^a, Felipe Dal-Pizzol^b, Vanessa M. Andrade^{a,*}

Objective: Determined whether the DNA damage detected from Comet assay help in diagnosis of neonatal sepsis.

Design and Methods: Sepsis was diagnosed according to clinical and laboratory findings and positive culture results in 24 of the 48 newborns of the study. Hematological parameters, baseline demographic data and genotoxic evaluation were investigated.

Results: There were no significant differences between case and controls for hematological, demographic and genotoxic data.

Conclusion: For the diagnosis of neonatal sepsis the Comet assay was not a good tool.

Keywords: Neonatal sepsis; Comet assay; exposure biomarker.

Introduction

According to World Health Organization there are about 5 million neonatal deaths a year, 98% occurring in developing countries. Infection, prematurity, and birth asphyxia are the main causes [1]. Sepsis and septic shock remain the most common cause of death in neonates and children in the world, with > 4,300 deaths annually and estimated annual total costs of \$1.97 billion. Neonatal sepsis is defined as a clinical syndrome of bacteremia with systemic signs and symptoms of infection in the first 4 weeks of life [2]. Though most of these infections and deaths occur in the developing countries; neonatal sepsis remains a major cause of admission to neonatal intensive care units and mortality in the developed world [1].

The diagnosis of sepsis is difficult because clinical signs, particularly early in the course of disease, are subtle and nonspecific, and laboratory tests including blood culture, the “gold standard”, are not always reliable and the results of the tests are available only after 48-72h hours. The neonates with “risk factors” for neonatal sepsis are thus treated with broadspectrum antibiotics and require prolonged hospitalization. Recent studies propose new diagnostic laboratory markers used alone or in combination to improve sensitivity and specificity for early detection of sepsis [3-6].

The alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) technique is a useful tool for assessing DNA damage in human populations and is regarded as a biomarker of exposure. This method has several advantages: a high sensitivity for detecting DNA

damage expressed as single strand breaks and alkali-labile sites, data from individual cells are obtained, the amount of blood required for this method is very small (μL), it is relatively easy to perform, and results are obtained in a short time [7]. Thus, in the present study we have used the Comet assay in blood cells of neonates with or without sepsis with the aim to determine another cheaper and faster biomarker to diagnostics neonatal sepsis.

Patients and Methods

Patient Population, Samples and Laboratory Test Results

Blood samples were obtained from forty-eight acutely ill newborns undergoing intensive care in the neonatal units of the Hospital Materno Infantil Santa Catarina, Criciúma, Santa Catarina, Brazil. These infants were either admitted to the neonatal unit with a suspected diagnosis of infection or developed clinical signs which suggested that infection may be complicating their management. Details of history and clinical examination were obtained. As part of their acute management, these infants had blood samples taken for routine laboratory analysis, and an extra aliquot of $15\mu\text{L}$ blood was collected for the Comet assay analysis.

Based on the 2002 Consensus Conference on definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics [2], sepsis was defined as proven when a blood culture or bacterial culture from a normally sterile site was positive for a likely pathogen and, if bacterial cultures were negative, as highly probable in the presence of a clinical and biological syndrome associated with infection. Twenty-four newborns fulfilled these criteria were included in the sepsis group. Controls were the remaining 24 newborns with risk factors for neonatal sepsis but that did not develop proven or highly

probable sepsis. Patients diagnosed with sepsis were followed after the initiation of treatment and the course of illness was recorded. Also four new blood samples were taken in the four consecutive days after the patient inclusion at study. Ethical approval was obtained from the Institutional Ethics Committee.

Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Tice et al. [8]. Blood cells (5 μ L) were embedded in 95 μ L of 0.75% low-melting point agarose and when the agarose had solidified the slides were placed in lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris; pH 10.0-10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) for a minimum of 1 hour and a maximum of two weeks. After treatment with lysis buffer, the slides were incubated in freshly-made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH >13) for 20 min and the DNA was electrophoresed for 20 min at 25 volts (0.90 V/cm) and 300 mA. After electrophoresis, the slides were neutralized in Tris 400mM (pH 7.5), rinsed three times in distilled water, and left to dry overnight at room temperature. After electrophoresis and neutralisation a silver staining protocol published by Villela et al. [9] was applied.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each patient using a optic microscope. Two parameters were evaluated: (1) damage index (DI), for which each cell was allocated to one of five classes (from no damage = 0, to maximum damage = 4) according to tail size and shape. The values obtained for each volunteer could range from 0 (0 \times 100) to 400 (4 \times 100); and (2) damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells.

Statistical Analysis

Demographic and clinical characteristics of the study groups were compared by Student's *t* test and a two-sided significance level of 0.05 or less was considered statistically significant. The accuracy of each parameter of DNA damage of Comet assay in distinguishing septic neonates from controls was examined separately by receiver operator characteristic (ROC) curve

Results

Characteristics of study and control groups are shown in Table 1. Were included 48 newborns in the study, 24 cases of proven neonatal sepsis and 24 controls. There were no statistically significant differences between the two groups in relation to demographic data showing that both controls and septic neonates were similar and just the illness differ between the two groups. DNA damage analyzed by the two parameters of Comet assay (DI and DF) in peripheral blood of neonates, in the same way, not presented statistical significance. The data were collected during 5 days but for all this period the results were similar and not presented in the table 1. We have also calculated the ROC curves from the two studied markers (DI and DF). DF and DI had equivalent lower areas under the ROC curve (0.493 and 0.498, respectively).

Discussion

Clinical diagnosis of sepsis in newborn infants is not easy because symptoms and signs are non-specific. There is no laboratory test with 100% specificity and sensitivity, search has continued for a reliable test.

In this study, DNA damage was measured via the alkaline Comet assay, a method that is widely used to assess *in vivo* DNA damage. In previous studies this method has been used to measure endogenous DNA damage after treatment with genotoxic agents, after the ingestion of food additives and in the presence of dietary antioxidants [10]. This is the first study that emphasized the use of this methodology for diagnostic of sepsis. Since today the Comet assay has become one of the most popular methods to assess DNA damage, with more than 4700 manuscripts published in more than 150 different journals we had aimed in this study to apply this assay for the sepsis diagnostic. So, we determined whether the damage in DNA observed in the Comet assay could help in diagnosis and prognosis of neonatal sepsis. Our results show that there were no significant differences between septic and controls neonates for both parameters of Comet assay. Also, when the ROC curve was performed the data presented lower values, indicating that definitely this assay not can be applied for sepsis diagnosis.

Previous studies aiming sepsis diagnoses was performed and find good results. Cancelier et al. [6] have determined whether levels of IL-6, IL-10 and oxidative parameters in umbilical cord blood contribute as an indicator of neonatal sepsis in recognized high-risk neonates and they concluded that all these markers were significantly higher in infants with neonatal sepsis, even in the proven sepsis group. Ersoy et al. [3] have determined whether initial antithrombin levels help in diagnosis of neonatal sepsis and they conclude that lower initial levels of this endogenous anticoagulant in neonatal sepsis are associated with a severe disease and increased mortality. More recently, Kingsmore et al. [4] have used immunoassays multiplexed on microarrays to identify differentially expressed serum proteins in clinically infected and non-infected neonates, they founded that this array

was effective for measurement of more than 100 cytokines in small volumes of serum available from neonates and have revealed significant alterations in levels of eight serum proteins in infected neonates, which are associated with inflammation, coagulation and fibrinolysis. In this way, the immunoassay showed clinical utility for a rapid diagnosis of infection in neonates. Nevertheless, in our study we concluded that in spite of all applications of the Comet assay in more than 20 areas of scientific knowledge, for the diagnosis of neonatal sepsis it can not be applied.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:220-224.
2. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8.
3. Ersoy B, Nehir H, Altinoz S, Yilmaz O, Dundar PE, Aydogan A. Prognostic of initial antithrombin levels in neonatal sepsis. *Indian Pediatr* 2007;44:581-584.
4. Kingsmore SF, Kennedy N, Halliday HL et al. Identification of diagnostic biomarkers for infection in premature neonates. *Mol Cell Proteomics* 2008;10:1863-1875.

5. Arnon S, Litmanovitz I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:223-227.
6. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med* 2009; in press.
7. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 2008;23:191-205.
8. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single-cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–221.
9. Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 2006;605:78-86.
10. Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2004;566:209-229.

Table I. Characteristics of the study population groups

Parameter	Cases (n= 24)	Controls (n= 24)	P
Gestational age (mean weeks)	34	36	>0.05
Sex (Male/Female)	16/8	18/6	>0.05
Weight (g)	2141	2519	>0.05
Mode of delivery (vaginal/cesarean)	16/8	13/11	>0.05
Apgar score (first minute)	6.26	7.04	>0.05
DNA Damage Frequency (mean \pm SD)	5.3 \pm 6.5	7.5 \pm 12.7	>0.05
DNA Damage Index (mean \pm SD)	6.09 \pm 8.0	10.6 \pm 19.4	>0.05

SD:Standard Deviation

7. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou avaliar o prognóstico da sepse neonatal, medindo dano de DNA através do ensaio cometa. O diagnóstico de sepse neonatal não é fácil porque os sinais e sintomas não são específicos. Não há testes laboratoriais com 100% de especificidade e sensibilidade sendo necessário continuarem a busca por testes fidedignos. No presente estudo o dano de DNA foi mensurado pelo teste cometa, um método que é muito utilizado para avaliar dano em DNA *in vivo*. Em estudos prévios este método tem sido utilizado para mensurar danos endógenos ao DNA e após tratamento com agentes genotóxicos, após ingestão de alimentos antioxidantes (Faust al., 2004). Este é o primeiro estudo que enfatizou a utilização desta metodologia para o diagnóstico da sepse. Hoje em dia o ensaio cometa se tornou um dos mais populares métodos para avaliar danos no DNA, com mais de 4.700 manuscritos publicados em mais de 150 revistas diferentes (Rojas, 2008).

Nós objetivamos neste estudo aplicar este teste para o diagnóstico de sepse. Assim foi determinado que o dano observado no teste cometa não é sensível para o diagnóstico de sepse neonatal. Nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os neonatos sépticos e controles para os dois parâmetros de ensaio Cometa utilizados. Além disso, quando a curva ROC foi interpretada os dados apresentaram valores mais baixos, indicando que definitivamente este ensaio não pode ser aplicado para o diagnóstico de sepse.

Além da análise do teste cometa dos grupos analisados, foi relacionado também toda a parte clínica dos pacientes sépticos e controle sendo relacionado com os exames laboratoriais, hemoculturas, uso de drogas vaso ativas, sinais vitais e desfecho do paciente. Esses dados foram analisados no programa SPSS, sendo

que não houve diferenças significativas destes dados entre o grupo controle e sepsis. Acreditamos que a semelhança entre os dois grupos ocorreu devido ao tipo de amostra do grupo controle por serem pacientes de uma unidade de terapia intensiva neonatal, sendo a maioria neonatos prematuros com alguma patologia associada, que sofre todo o tipo de estresse de uma unidade de terapia intensiva neonatal.

A busca por um marcador ideal, de alta sensibilidade e especificidade é um desafio em várias doenças estudadas pela Medicina. A sepsis neonatal precoce, por desenvolver-se logo após o nascimento e estar associada a fatores de risco identificáveis na sala de parto, pode ser suspeitada e investigada antes mesmo do início das manifestações clínicas no recém-nascido. Essa característica do período neonatal difere dos quadros infecciosos em outras faixas etárias e mesmo da sepsis neonatal tardia, quando os fatores de risco, mesmo identificáveis, não são suficientes para determinarem triagem diária para sepsis. O diagnóstico precoce e correto da sepsis neonatal vem sendo almejado pelos neonatologistas há anos. Quando se pensa em uma entidade mórbida que tem taxas de letalidade tão altas quanto 70% e sabe-se que a precocidade da instauração de um tratamento eficaz pode modificar esse desfecho, consegue-se ter uma idéia da importância do tema atualmente (Weber, Candiani, Garcia et al, 2003).

Estudos prévios visando diagnóstico de sepsis foram realizados e encontraram bons resultados. Cancelier et al. (2009) determinou se em sangue de cordão umbilical os níveis de IL-6, IL-10 e parâmetros oxidativos contribuíam como um indicador reconhecido de sepsis neonatal reconhecendo neonatos de alto risco e eles concluíram que estes marcadores foram significativamente mais elevados em lactentes com sepsis neonatal, igual no grupo com sepsis comprovada. Ersoy et al.

(2007) determinou se os níveis iniciais de antitrombina ajudam no diagnóstico da sepse neonatal e concluíram que níveis mais baixos deste anticoagulante endógeno na sepse neonatal estão associados com uma doença grave e aumento da mortalidade. Mais recentemente, Kingsmore et al. (2008) trabalhando com microarrays, com o objetivo de identificar diferentes formas de expressão de proteínas em neonatos clinicamente infectados e não infectados, observaram que este imunoenensaio de proteínas séricas pode ter utilidade clínica para ajudar no rápido diagnóstico de infecção e diferenciação do agente em neonatos com descompensação clínica. Assim estes estudos demonstram que eles podem ser úteis no prognóstico clínico da sepse neonatal. E desta forma, concluímos que, apesar de todas as aplicações do Ensaio Cometa em mais de 20 áreas do conhecimento científico, para o diagnóstico da sepse neonatal este não pode ser aplicado como um marcador para diagnóstico de sepse.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABDALLA DSP; OGA S; ZANINI AC. Radicais livres e antioxidantes. **Fundamentos de toxicologia**. 2ed. São Paulo. Atheneu 38-55. 2003.
- AKENZURA GI; HUI YT; MILNER R; ZIPURSKY A. Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. **Pediatrics** 54: 38-42. 1974.
- AUGUS DC, MAX RS. Epidemiology of sepsis. Neonatal sepsis: epidemiology and management . **Pediatric Critical Care Medicine** 29 : 109-16. 2001.
- BALTIMORE RS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. **Clinics in perinatology** 18: 361-81. 2003.
- BARNER R; NEIMEYER CM; FUNKE A; SCHWAB C; RAW U. Plasma levels of G-CSF, IL-1,IL-6,IL-8, TNF alpha and ICAM in early onset neonatal sepsis. **Pediatric Research** 44: 469-477. 1998
- BETANCOURT M; ORTIZ R; SLEZ CG; CORK L; RODRIGUEZ L; VILLASEFIOR L. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet. **Mutation Research** 331: 65-67. 1995.
- CANCELIER ACL. Parâmetros de estresse oxidativo e interleucinas 6 e 10 em sangue de cordão umbilical para diagnóstico se depse neonatal. Dissertação de mestrado. UNESC SC. 2006.
- CANCELIER ACL; PETRONILHO F; REINKE A; CONSTANTINO LS; MACHADO RA; RITTER C; DAL PIZZOL F. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. **Pediatric Critical Care Medicine** 55: 1-22. 2009.
- CARVALHO PRA; TROTTA EA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria** 79:195-204. 2003.

- ÇIMEN MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta** 390: 1-11. 2008.
- ERSOY B; NEHIR H; ALTINOZ S; YILMAZ O; DUNDAR PE. Aydogan A. Prognostic of initial antithrombin levels in neonatal sepsis. **Indian Pediatrics** 44: 581-584. 2007.
- FARBAIRN DW; OLIVE PL; O'NEIL KL. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research** 339: 37-59. 1995.
- FAUST F; KASSIE F; KNASMULLER S; BOEDECKER RH; MANN M; MERSCH-SUNDERMANN V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research** 566: 209-229. 2004.
- GERDES JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. **Clinic in Perinatology** 18: 361-81. 1991.
- HALLIWELL B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. **Jornal of Neurochemistry** 97: 1634-1658. 2006.
- HALLIEWLL B; GUTTERIDGE JMC. Free rad in boil and Medicine. 3^a edição, **Oxford University press**, London.1999.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. 3^a edição, **Oxford University Press**, New York. 2007.
- KINGSMORE SF; KENNEDY N; HALLIDAY HL; VELKINBURGH SZ; GABRIEL V; GRANT J; BEARVIS WD; TCHERNEV LP; LEJNINE S; GRIMWADE B; SORETTE M; EDGAR JDM. Identification of diagnostic biomarkers for infection in premature neonates. **American society for biochemistry and molecular biology** 7:1863-1875. 2008.

- KOPELMAN BI; SANTOS AMN; GOULART AN; ALMEIDA MFB; MIYOSHI MH; GUINSBURG R. **Diagnóstico e Tratamento em Neonatologia**, editora Atheneu. São Paulo, 2005.
- KUSTER H; WEISIS M; WILLEITNER AE; DETELEFSEN S; JEREMIAS I; ZBOJAN J. IL-1 receptor antagonista and IL-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. **Lancet** 352:1271-1277. 1998.
- MACDONALD J; GALLEY H F; WEBESTER NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia** 90: 221-32. 2003.
- MARCONDES E; VAZ FAC; RAMOS JLA; AKAY Y. *Pediatria Básica: **Pediatria Geral e Neonatal***. 9ª ed. Editora Savier. SP. 2003.
- MCCRACKEN GJ; FREIJ B. Perinatal bacterial diseases. **Textbook of pediatric Infections Diseases**. 2 nd. WB Saunders Philadelphia 940-66. 1987.
- MCKELVEY-MARTIN VJ; GREEN MHL; SCHMEZER P, POOL-ZOBEL BL; DE MEO MP; COLLINS A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutation Research** 288: 47-63. 1993.
- MULLER DPR. Free radical problems of the newborn. **The Proceeding of the Nutrition Society** 46: 69-75. 1987.
- Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition** 89: 229-235. 2004.
- PEREIRA JUNIOR GA; MANSON F; ALBEID M; OSTINI FM; SOUZA SH; FILHO AB. Fisiopatologia da Sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina Ribeirão Preto** 31: 349-362.1998.
- PHILIP, A.G. and HEWITT, J.R. Early diagnosis of neonatal sepsis. **Pediatrics** 65:1036-41. 1980.

- POLIN, R.A. The "ins and outs" of neonatal sepsis. **The Journal of Pediatrics** 143: 3-4. 2003.
- PROCIANOY SR; SILVEIRA RC. A influência do tempo de coleta sobre os níveis de interleucina-6 na sepse neonatal precoce. **Jornal de Pediatria** 80: 407-10. 2004.
- PROCIONY RS; LEONE CR. **Programa de Atualização em Neonatologia (PRORN)** Organizado pela Sociedade Brasileira de Pediatria. Editora Artmed/Panamericana. Porto Alegre. 2004.
- ROCHE E; ALVIRA DR. Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. **Medicina Clinica** (Barc) 106:144-153. 1996.
- RODWELL RL; LESLIE AL; TUDEHOPE D. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic score system. **The Journal of Pediatrics** 112: 761-767. 1988.
- ROMEO C; EATON S; QUANT PA; SPITZ L; PIERRO A. Neonatal oxidative liver metabolism: effects of hydrogen peroxide, a putative mediator of septic damage. **The Journal of Pediatrics Surgery** 37: 1107-1111. 1999.
- ROJAS E. Special issue on the 20th anniversary of the comet assay. **Mutation Research**. 2008.
- SAKER M; MOKHTARI NS; MERZOUK SA; MERZOUK H; BELARBI B; NARCE M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. **European journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 2008.
- SALEM SY; SHEINER E; VARDI EZH; VARDI IS; MAZOR M. Risk factors for early neonatal sepsis. **Archives of gynecology and obstetrics** 274: 198–202. 2006.
- SAUGSTAD O. Mechanisms of injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. **Acta Paediatrica** 85: 1-4. 1996.

- SAUGSTAD O D. Oxidative stress in the newborn. A 30-years perspective. **Biology Neonate** 88: 228-236. 2005.
- SCHRAG S, GORWTZ R, FULTZ-BUTTS K, SCHUCHAT A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. **Revised guide lines from CDC**. MMWR. Recomm Rep 51:1-22. 2002.
- SCHULTZ C, ROTT C, TEMMING P, SCHLENKE P, MOLLER JC, BUCSKY P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. **Pediatric Research** 51: 371-322. 2002.
- SCOBAR GJ; LI DK; ARMSTRONG MA; GARDER MN; FOLCK BF; VERDI JE; B; XIONG B; BERGEN R. Neonatal Sepsis Workups in Infants ≥ 2000 Grams at Birth: A Population-Based Study. **Pediatrics** 106: 256-263. 2000.
- SHOJI S; KOLETZKO B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** 10: 324-328. 2007.
- SINGH NP; MCCOY MT; TICE RR; SCHNEIDER EL; A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** 175: 184-191.1988.
- TICE RR. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. **Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: **Plenum Press** 69-79. 1995.
- TSUKAHARA H; JIANG M; OHTA N; SATO S; TAMURA S; HIRAOKA M; MAEDA M; MAYUMI M. Oxidative stress in neonates: Evaluation using specific biomarkers.**Life Sciences** 75: 933-938. 2004.
- YADAV AK; WILSON CG; PRASAD PL; MENON PK. Polymerase Chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. **Indian pediatrics** 42: 681-685. 2005.

WEBER MAR; CANDIANI CL; GARCIA JLA; CASTRELLÓN PG. Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. **Salud publica de México** 45: 90-95.2003.

ZHANG H, SLUTSKY AS, VINCENT JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. **Intensive Care Medicine**26: 474-476. 2000.

ZHAO J; LUI XJ; MAD JW; ZHENG RL. DNA damage in healthy term neonate. **Early Human developemert** 77: 89-98. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)