

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

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

Milene Piorkowsky Almeida de Sá

Orientadora: Prof^a Adjunta Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Botucatu – SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

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

Milene Piorkowsky Almeida de Sá

Orientadora: Profª Adjunta Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Botucatu – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Sá, Milene Piorkowsky Almeida de.

Estresse oxidativo em recém-nascidos de mães hipertensas: relação com o prognóstico neonatal no curto prazo / Milene Piorkowsky Almeida de Sá. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010

Orientador: Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Assunto CAPES: 40101150

1. Pré-eclâmpsia. 2. Recém-nascidos – Doenças. 3. Óxido nítrico.

Palavras-chave: Doenças neonatais; Estresse oxidativo; Óxido nítrico; Pré-eclâmpsia; Recém-nascido prematuro.

Projeto financiado pela FAPESP

(Processo: 2008/01180-4)

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.” (John Ruskin)

Dedicatória

*Aos meus pais, Uriel e
Miriam, pelo amor, carinho, apoio,
paciência e por estarem comigo em
todos os momentos da minha vida.
Obrigada por tudo!!!*

Agradecimentos
Especiais

Com carinho especial

Ao meu marido Mário, que mesmo de longe, transmitiu seu amor, carinho, compreensão e apoio. Dividindo comigo todos os momentos difíceis ou felizes.

À minha irmã Aline e ao cunhado Fabrício, pessoas muito queridas que sempre me apoiaram com seu amor.

À Dra Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo, a quem admiro por seus ensinamentos, amizade, dedicação, incentivo e confiança. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho!

Agradecimientos

A Deus pela minha existência e pela sua presença em minha vida.

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

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

À família do meu marido: Luiz Antônio de Sá, Elizabete Mantoanelli de Sá, Mônica Regina de Sá, Heitor Mário Saint Clair de Sá, Thaíze Quintanilha de Sá, Giovana Quintanilha de Sá, Raphaela de Sá Agostinho e Anderson Luiz Nardine. Obrigada pelo carinho e apoio durante toda essa jornada.

À querida professora e amiga Letícia Cláudia de Oliveira Antunes que sempre transmitiu seus conhecimentos com paciência e carinho, acreditando no meu progresso.

Às minhas amigas Maria Aparecida Mello Narukawa e Sílvia Fiorillo Cabrera que sempre me apoiaram nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho.

À querida amiga Ludymila Lewinsohn que me acolheu em sua casa com tanto carinho, sem medir esforços para esclarecer minhas dúvidas e me ajudar em qualquer situação.

Às amigas Rosa Juliana Madoglio e Adriana Saito que estiveram sempre ao meu lado na batalha da coleta dos dados.

Às ex-residentes Rosângela, Lívia, Ana Paula, Betânia, Maisa, Josie e Paulinha, pelo apoio, carinho e amizade.

À equipe da UTI Neonatal, BI e UCE pela ajuda, compreensão e carinho.

Às enfermeiras do Centro Obstétrico, que deram uma ajuda de fundamental importância.

À Cilmery Kurokawa que me ensinou com carinho e paciência como fazer as coisas acontecerem, se tornando uma amiga muito especial. Muito Obrigada!

Às funcionárias do laboratório de Pediatria, sempre tão solícitas.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação.

Aos funcionários do departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Aos funcionários do departamento de Pediatria.

A todos aqueles não citados, mas que de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, muito obrigada!

Sumário

Sumário

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Capítulo I	
Revisão da Literatura	15
Referências Bibliográficas	27
Capítulo II - Manuscrito	
Resumo	35
Abstract	36
1.Introdução	37
2.Método	39
2.1Delineamento do Estudo e Tamanho Amostral	39
2.2Seleção dos Sujeitos	40
2.3Critérios de Inclusão e Exclusão	40
2.4 Conceitos	41
2.5Variáveis de Estudo e Momentos de Avaliação	42
2.5.1Variáveis Laboratoriais	42
2.5.2Variáveis Clínicas	42
2.5.3Desfechos	43
2.6Coleta e Processamento das Amostras Biológicas	44
2.7Dosagens Bioquímicas	44
2.8Análise Estatística	46
3.Resultados	46
4.Discussão	53
5.Conclusão	59
Referências Bibliográficas	60
Anexos	66

Lista de Figuras

Figura 1. Concentração de óxido nítrico conforme a gravidade da pré-eclâmpsia.....	52
Figura 2. Prognóstico neonatal nos grupos estudados.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados demográficos e gestacionais dos grupos estudados.....	47
Tabela 2. Dados de nascimento dos grupos estudados.....	48
Tabela 3. Gravidade, principais doenças e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos estudados.....	49
Tabela 4. Dados da assistência neonatal nos grupos: Pré-eclâmpsia e Controle	50
Tabela 5. Parâmetros hematológicos em sangue de cordão nos grupos estudados.....	50
Tabela 6. Concentrações de Óxido nítrico em placenta (μM), sangue de cordão umbilical (μM) e sangue () e urina ($\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina) dos recém-nascidos nos grupos estudados.....	51
Tabela 7. Correlação de Spearman entre os valores de Óxido nítrico em placenta, sangue de cordão umbilical e sangue dos recém-nascidos nos grupos estudados (μM).....	52

Capítulo I
Revisão da Literatura

- Hipertensão Arterial e Gravidez

A hipertensão arterial é a principal causa de morbidade e mortalidade tanto materna como perinatal. Ocorre em 5% a 10% de todas as gestações, com cifras crescentes nos países em desenvolvimento (PRADO et al., 2002; RAIJMAKERS et al., 2004; FERRÃO et al., 2006; BERNARDI, 2007; NASH, 2007).

Durante a gravidez a hipertensão arterial pode manifestar-se de quatro formas: hipertensão arterial crônica (pré-existente), hipertensão gestacional (sem a ocorrência de proteinúria), pré-eclâmpsia/eclâmpsia (com ocorrência de proteinúria) e hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia (PERAÇOLI & PARPINELLI, 2005; FERRÃO et al., 2006).

A pré-eclâmpsia é definida como a associação de hipertensão arterial (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg) e proteinúria (300 mg ou mais em urina de 24 horas) que ocorre após a 20ª semana de gestação e que é reversível após a gravidez (KOHLMANN et al., 1999; RAIJMAKERS et al., 2004; BERNARDI, 2007; NASH, 2007).

A etiologia desta doença não está completamente esclarecida e acredita-se que fatores genéticos, imunológicos e também o estresse oxidativo estejam envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia (XIONG et al., 2002; PERAÇOLI & PARPINELLI, 2005; NASH, 2007; OREY et al., 2007; PERES, 2007).

Uma das hipóteses para a gênese da pré-eclâmpsia é a falha da invasão trofoblástica nas artérias espiraladas do endométrio. Durante a gestação normal as artérias espiraladas são invadidas pelo trofoblasto, que provoca a perda de tecido músculo-elástico tornando a parede vascular mais fina e distensível. Os vasos

permanecem dilatados permitindo o aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário necessário para o crescimento adequado da placenta e do feto. Na gestação com pré-eclâmpsia, a invasão trofoblástica não ocorre em grande parte dessas artérias que consequentemente não se dilatam. Isso resulta em vasoespasmo generalizado, com alterações estruturais e lesão da parede vascular, o que contribui para inadequado fluxo sanguíneo e isquemia placentária (RUBIN & FARBER, 2002; VAZQUEZ, FORTE & TEDESCO, 2004). A redução da perfusão e hipóxia placentária propiciam a ocorrência do estresse oxidativo, com produção de radicais livres que podem alcançar a circulação materna e causar agressão endotelial, entretanto, normalmente não ocorre lesão oxidativa devido à atuação do sistema antioxidante. Quando a capacidade antioxidante está prejudicada, a pré-eclâmpsia pode se instalar (MARTINS et al., 2000).

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia envolve lesão endotelial difusa que compromete a integridade do sistema vascular, a manutenção da anticoagulação e a produção de vasodilatadores endógenos, como o óxido nítrico. Pode ocorrer aumento da permeabilidade e reatividade vascular, além de ativação da coagulação, resultando em lesão de vários órgãos como: rins, sistema nervoso central, fígado e placenta (MORAES et al., 2000).

A pré-eclâmpsia ocorre predominantemente em mulheres primíparas, embora as múltíparas também possam desenvolver a doença. Fatores imunológicos, genéticos e a obesidade aumentam a predisposição para essa doença, assim como a gravidez múltipla (FERRÃO et al., 2006; NASH, 2007).

As complicações maternas mais freqüentes são a eclâmpsia, síndrome HELLP, descolamento prematuro de placenta, coagulopatias, insuficiência hepática e renal (COELHO et al., 2004; FERRÃO et al., 2006; COSTA et al., 2007). Na eclâmpsia a

paciente (com pré-eclâmpsia e sem doenças neurológicas prévias) apresenta uma ou mais crises convulsivas e/ou coma (KOHLMANN et al., 1999; PERAÇOLI & PARPINELLI, 2005; BERNARDI, 2007). Já a síndrome HELLP caracteriza-se por plaquetopenia, hemólise e elevação das enzimas hepáticas (PRADO et al., 2002; RAIJMAKERS et al., 2004).

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

A pré-eclâmpsia associa-se com frequência ao baixo peso ao nascer, destacando-se dentre as repercussões imediatas dessa doença para o concepto: prematuridade, restrição do crescimento intra-uterino, sofrimento fetal, maior risco de doenças pulmonares agudas e crônicas, e de morte perinatal. No longo prazo existe preocupação com as crianças nascidas de baixo peso, pois essas apresentam maior risco de desenvolver hipertensão e dislipidemia na idade adulta (OLIVEIRA et al., 2002; CABAR et al., 2004; FERRÃO et al., 2006).

Radicais Livres e Estresse Oxidativo

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Por isso, os radicais livres são instáveis e ligam-se facilmente a outras moléculas, doando ou capturando elétrons, ou seja, atuando como agentes redutores ou oxidantes. O ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o óxido nítrico (NO) são exemplos de radicais livres. Existem outras substâncias, que apesar de não serem radicais livres, são igualmente reativas e designadas como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies

reativas de nitrogênio (RNS), dentre as quais se destacam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito (OONO).

Radicais livres são produzidos por diversos mecanismos, tanto em condições fisiológicas como o metabolismo celular, de ácidos graxos e de prostaglandinas, bem como em situações de isquemia-reperfusão, hipoxia-hiperóxia, inflamação-infecção (TRINDADE & RUGOLO, 2007).

Após um período de isquemia tecidual, no momento da restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), formas tóxicas de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) são produzidas através de dois mecanismos: da xantina oxidase e dos neutrófilos ativados (RUBIN & FARBER, 2002).

Alguns metais participam das reações que geram lesões oxidativas, destacando-se dentre esses o ferro, metal pesado mais abundante no organismo, que em excesso é capaz de catalisar reações de oxidação. Estas promovem acúmulo do radical hidroxila, que é altamente reativo e causa peroxidação lipídica nas membranas celulares, inclusive na membrana mitocondrial. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VANDERLELIE et al, 2005).

A formação de radicais livres induzida pelo metabolismo aeróbio, determinou no organismo humano o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade do oxigênio e promover a homeostase (SAUGSTAD, 1996; VANCINI et al., 2005). Em condições normais, os radicais livres produzidos são eliminados pelas defesas anti-oxidantes do organismo, representadas pelas enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, bem como por nutrientes: glutathione, selênio, zinco, vitaminas C e E.

Quando ocorre falha no sistema antioxidante, e conseqüentemente desequilíbrio entre a produção e a remoção de ROS/RNS, desencadeia-se o estresse oxidativo, com elevação da concentração de ROS/RNS, bem como da peroxidação lipídica. Essas alterações são capazes de provocar danos nas estruturas celulares de diversos tecidos e órgãos, alterando funções vitais e determinando morte celular. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VANCINI et al., 2005; TRINDADE & RUGOLO, 2007)

Os radicais livres causam lesões em vários órgãos e tecidos incluindo: cérebro, retina, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões. Existe forte evidência de que as ROS estão envolvidas na patogênese de doenças do adulto como câncer e aterosclerose, bem como do recém-nascido prematuro, incluindo a displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterocolite necrosante, hemorragia peri-intraventricular e leucomalácia periventricular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; TRINDADE & RUGOLO, 2007; TSUKAHARA, 2007).

- Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico resulta da combinação de dois dos mais abundantes gases da atmosfera, o Oxigênio (O₂) e o Nitrogênio (N), sendo considerado um radical livre, pois possui oito elétrons de O₂ e sete de N e tem um elétron desemparelhado. Apesar de ser um poluente atmosférico, o NO tem efeitos em diversos tecidos humanos, atuando no controle da circulação placentária e nas contrações uterinas durante o parto, bem como na regulação do tono vasomotor, na neurotransmissão, na resposta imune e na adesão de células inflamatórias à parede dos vasos. (COSTA et al., 2003; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; FIORETTO, 2003; ALVES & ISHIKI, 2005)

O NO é sintetizado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o O₂, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas de NOS, que são agrupadas em duas categorias: (COSTA et al., 2003; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; ALVES & ISHIKI, 2005)

- *NOS Constitutiva*: enzimas presentes nas células endoteliais (Endotelial (eNOS)) e nos neurônios (Neuronal (nNOS)), cuja liberação depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina e, uma vez liberadas sintetizam NO por curtos períodos.
- *NOS Induzível* (iNOS): Enzimas liberadas, independente da concentração de cálcio, em resposta a estímulos patológicos com microorganismos invasores e que são expressas por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. Apresentam maiores concentrações no organismo e sintetizam o NO por longos períodos.

O NO faz parte dos mecanismos de defesa do organismo, sendo utilizado em funções fisiológicas que requerem respostas rápidas. Porém, o NO pode produzir substâncias tóxicas e provocar lesão celular, como o dióxido de nitrogênio, um gás altamente citotóxico. É importante salientar que o efeito do NO pode ser benéfico ou maléfico, de acordo com sua quantidade e o tecido em questão (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; GURGUEIRA & CARVALHO, 2003)

Devido à sua instabilidade e toxicidade, o NO apresenta meia vida extremamente curta (aproximadamente 4 a 6 segundos no plasma, 10 a 60 segundos nos tecidos e 5 a 10 segundos *in vitro*) sendo rapidamente convertido em nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻), produtos de menor toxicidade ao organismo. Esses produtos podem ser encontrados em fluidos corporais como plasma e urina, sendo que a proporção de NO₃⁻ e NO₂⁻ é variável e a soma de ambos é a melhor maneira de avaliar a produção total de

óxido nítrico (NATHAN, 1992; NIMS et al., 1995; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; BARRETO, CORREIA & MUSCARÁ, 2005).

- Estresse Oxidativo na Pré-eclâmpsia

Embora a etiologia da pré-eclâmpsia não esteja esclarecida, gestantes portadoras dessa doença apresentam níveis significativamente maiores de estresse oxidativo e menores de vitamina C e E quando comparadas com gestantes normais, sugerindo que a pré-eclâmpsia está associada com desequilíbrio entre produção de pró-oxidantes e anti-oxidantes, o que propicia peroxidação lipídica de membranas celulares causando lesão ao endotélio vascular (SERDAR et al, 2003; MEHENDALE et al, 2007). Segundo Raijmakers e colaboradores (2007) a condição de estresse oxidativo aumentado na pré-eclâmpsia persiste até dois meses após o parto.

A possibilidade de prevenção da pré-eclâmpsia com suplementação de anti-oxidantes é uma perspectiva de grande interesse atual, que está sendo investigada em estudos multicêntricos randomizados (RAIJMAKERS et al, 2004).

- Pré-eclâmpsia e Estresse Oxidativo na Placenta

A placenta é o órgão responsável pela interação e trocas materno-fetais, desempenhando várias funções: respiratória, nutritiva, excretora, endócrina e imunológica. É um órgão muito vascularizado e com grande número de mitocôndrias.

Na gestação normal ocorre aumento do estresse oxidativo, pois existe maior consumo de oxigênio resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Porém, esse estresse oxidativo é compensado pelo aumento das defesas antioxidantes. Na pré-eclâmpsia, a perfusão sanguínea placentária é inadequada, propiciando a ocorrência de áreas de isquemia e reperfusão, com aumento na formação de ROS e, ao mesmo tempo, o sistema de defesa antioxidante é deficitário. Vários estudos mostram aumento de peroxidação lipídica e oxidação proteica, bem como diminuição das enzimas anti-oxidantes em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia. Assim, o estresse oxidativo placentário é considerado elemento fundamental na patogênese dessa doença. (VANDERLELIE et al, 2005; CHAMY et al., 2006; BERNARDI, 2007)

- Óxido Nítrico na Gestação

Mesmo sendo um radical livre, o NO não possui apenas funções nocivas ao organismo, estando demonstrado que atua de forma decisiva em alguns processos fisiológicos, entre eles a reprodução humana (MOTE et al., 2008).

A NOS tem importante papel na fisiologia uterina, atuando na vasodilatação (essencial para a implantação do embrião) e inibição plaquetária (durante o período menstrual), fundamentais para o adequado funcionamento do endométrio. (NORMAN & CAMERON, 1996)

Durante a gestação o NO limita a agregação das plaquetas na circulação materna e fetal, regula o fluxo sanguíneo útero-placentário, além de contribuir para a vasodilatação sistêmica materna e suprimir as contrações do miométrio. (NORMAN & CAMERON, 1996; COSTA et al., 2007)

O processo gestacional provoca no organismo materno uma adaptação fisiológica vascular acompanhada pelo aumento da produção de NO endógeno, que

inclui além do aumento do volume sanguíneo, a redução da resistência vascular. (LOWE, 2000).

Existem evidências que, durante a gestação normal a produção de NO está elevada, tendo este importante atuação na vasodilatação renal (GRANGER et al., 2001).

Vários autores têm pesquisado o papel do óxido nítrico no processo de desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Porém, os resultados ainda são controversos, uma vez que revelam tanto a produção de NO exacerbada como deficitária (NORMAN & CAMERON, 1996; LOWE, 2000; GRANGER et al., 2001; COSTA et al., 2007).

A inibição crônica da enzima óxido nítrico sintase, pelo tratamento de ratas prenhes com Nw-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME), é aceita como método experimental para induzir hipertensão arterial, resultando em condição semelhante à pré-eclâmpsia (YALLAMPALLI & GARFIELD., 1993; SALAS, 1998; KANASHIRO et al., 2000). Ratas submetidas à inibição crônica dessa enzima durante a gestação desenvolvem as principais condições patológicas associadas à pré-eclâmpsia, tais como hipertensão arterial, proteinúria, lesão renal e hepática, restrição de crescimento intra-uterino e maior morbidade fetal e neonatal (BUHIMSCHI et al., 1995; MOLNÁR et al., 1994; HELMBRECHT et al., 1996; GRANGER et al., 2001; SOUZA, 2009).

- Estresse Oxidativo no Período Perinatal e Pré-eclâmpsia

A transição fetal/neonatal promove mudanças fisiológicas e metabólicas no organismo, que são acompanhadas pelo aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo. Quando o recém-nascido é prematuro existe elevado risco de lesão celular devido ao estresse oxidativo, tendo como principais motivos: a imaturidade e

deficiência do sistema anti-oxidante, a deficiência de surfactante propiciando doença pulmonar e necessidade do uso de oxigênio. Assim, aumentam as chances dessas crianças desenvolverem doenças como a retinopatia da prematuridade, displasia broncopulmonar e hemorragia peri-intraventricular. (LACKMANN et al., 1996; PAPP et al., 1999; TSUKAHARA et al., 2004; TRINDADE & RUGOLO, 2007)

A assistência neonatal envolve com frequência situações que aumentam o risco de ocorrência de estresse oxidativo, incluindo: o uso de elevada concentração de oxigênio na reanimação em sala de parto e/ou na ventilação mecânica; a nutrição parenteral, cujos componentes lipídico, proteico e vitamínico são fontes de ROS; as transfusões sanguíneas que propiciam sobrecarga de ferro; a fototerapia, utilizada no tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal, pode desencadear dano fotodinâmico aos tecidos e a presença frequente de infecção/inflamação. Essas situações sobrepõem-se nos cuidados diários ao recém-nascido, em especial o prematuro, fazendo com o que esse indivíduo em desenvolvimento e com limitados mecanismos de defesa, esteja especialmente vulnerável à lesão oxidativa. (AYCICEK & EREL, 2007; TRINDADE & RUGOLO, 2007)

Na presença de pré-eclâmpsia, um aspecto preocupante para o recém-nascido é que algumas alterações bioquímicas evidenciadas na placenta, também estão presentes em sangue de cordão, traduzindo a exposição do concepto à condição de estresse oxidativo materno. (CHAMY et al, 2006; MEHENDALE et al, 2007). Assim, a pré-eclâmpsia, além de associar-se ao baixo peso ao nascer, prematuridade e restrição do crescimento intra-uterino, pode causar desequilíbrio na condição oxidante/antioxidante, propiciando o desenvolvimento de doenças neonatais associadas ao estresse oxidativo, especialmente nos prematuros, como síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, hemorragia periintraventricular, retinopatia da prematuridade e

enterocolite necrosante. (XIONG et al., 2002; TSUKAHARA et al., 2004; WEINBERGER et al., 2006; BERNARDI, 2007)

Entretanto, há estudos que não mostram aumento do estresse oxidativo na circulação fetal e/ou da morbidade neonatal em recém-nascidos de mães pré-eclâmplicas. (TASTEKIN et al, 2005; BRAEKKE et al, 2006)

No enfoque a longo prazo é crescente o reconhecimento da importância do ambiente intra-uterino na programação da saúde futura do indivíduo, ou seja, a “Origem fetal das doenças do adulto”. Vários estudos epidemiológicos mostram a associação do baixo peso ao nascimento com a ocorrência de síndrome metabólica, buscando-se atualmente elucidar os mecanismos dessa programação. Estudos experimentais mostram que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo importante na programação de doenças futuras, seja por atuação direta na modulação da expressão gênica, ou indiretamente pelo efeito de moléculas oxidadas que alteram a estrutura e função celular, tendo como alvo de lesão oxidativa, as células β do pâncreas e o endotélio vascular. (LUO et al, 2006)

- Considerações Finais

Os conhecimentos atuais apontam para a atuação do NO e do estresse oxidativo na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, e acredita-se que o concepto está exposto ao estresse oxidativo materno que pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças neonatais. Porém a relação pré-eclâmpsia / estresse oxidativo /óxido nítrico e doenças neonatais não está bem definida e o impacto clínico das alterações bioquímicas necessita de mais investigação. Estudos recentes sugerem que, a dosagem das concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo na urina pode ser uma alternativa

válida e de grande interesse em recém-nascidos, por ser menos invasiva em relação à dosagem sérica. (SICIARZ et al, 2001, KUMAR et al, 2008)

- Referências Bibliográficas

1. Alves S, Ishiki LS. Atuação do Óxido Nítrico fora do sistema nervoso. *Rev Neurociências*. 2005; 13: 105-109.
 2. Aycicek A, Erel O. Estado oxidante/antioxidante total em recém-nascidos icterícos antes e depois da fototerapia. *J Pediatr*. 2007; 83: 319-22.
 3. Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN. Óxido Nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim Nova*. 2005; 28: 1046-1054.
 4. Bernardi FBC. Metabolismo do óxido nítrico e parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia [dissertação]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2007.
 5. Braekke K, Harsem N, Staff A . Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006; 128:209-215.
 6. Buhimschi I, Yallampalli C, Chwalisz K, Garfield RE. Pré-eclâmpsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Hum Reprod*. 1995; 10:2723-30.
 7. Cabar FR, Nomura RMY, Costa LCV, Alves EA, Zugaib M. Cesária prévia como fator de risco para o descolamento prematuro da placenta. *RBGO*. 2004; 26: 709-14.
 8. Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JÁ, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclâmpsia. *Biol Res*. 2006; 39: 229-236.
-

-
9. Coelho TM, Martins MG, Viana E, Mesquita MRS, Camano L, Sass N. Proteinúria nas síndromes hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. *Rev Assoc Méd Bras*. 2004; 50: 207-13.
 10. Costa FS, Cunha SP, Reis FJC, Rodrigues JÁ, Rocha RS. Óxido nítrico e peptídeo atrial natriurético na predição de complicações da gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007; 29: 41-7.
 11. Costa MT, Fabeni RC, Aptekmann KP, Machado RR. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural*. 2003; 33: 967-974.
 12. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39: 343-350.
 13. Ferrão MHL, Pereira ACL, Gersgorin HCTS, Paula TAA, Correa RRM, Castro ECC. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52: 390-4.
 14. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*. 1997; 43: 61-8.
 15. Fioretto JR. Uso do óxido nítrico em pediatria. *J Pediatr. (Rio J)* 2003; 79: S177-S186.
 16. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Rev Ass Med Brasil*. 2000; 46: 265-71.
 17. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension*. 2001; 38: 718-722.
 18. Gurgueira GL, Carvalho WB. Óxido Nítrico Inalatório: considerações sobre sua aplicação clínica. *J Pneumol*. 2003; 29: 325-331.
-

19. Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW. L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175: 800-5.
 20. Kanashiro CA, Cockrell KL, Alexander BT, Granger JP, Khalil RA.. Pregnancy associated reduction in vascular protein kinase C activity rebounds during inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 278: R295-303.
 21. Kohlmann Jr. O, Guimarães AC, Carvalho MHC, Chaves Jr. HC, Machado CA, Praxedes JN et al . III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Endocrinol Metab* [serial on the Internet]. 1999 Aug [cited 2007 Aug 20] ; 43: 247-249. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php>
 22. Kumar A, Panigrahi I, Basu S, Dash D. Urinary malondialdehyde levels in newborns following delivery room resuscitation. *Neonatology.* 2008; 94: 96-9.
 23. Lackmann GM, Hesse L, Töllner. Reduced iron associated antioxidants in premature newborns suffering intracerebral hemorrhage. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 407-9.
 24. Lowe DT. Nitric Oxide Dysfunction in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 2000; 4: 441-458.
 25. Luo J, Engelman JA, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev Genet.* 2006; 7: 606-619.
 26. Martins FANC, Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Pré-eclâmpsia como resposta inflamatória exacerbada à gestação. *Rev Ginec & Obst.* 2000; 11 (4): 244-48.
-

-
27. Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* (2007), doi: 10.1016/j.ijgo.2007.08.011.
 28. Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170: 1458-66.
 29. Moraes EA, Cury L, Kahhale S, Zugaib M. Genética e pré-eclâmpsia na gravidez: princípios básicos. *Rev Ginec & Obst.* 2000; 11 (4): 240-43.
 30. Mote JD et al. Óxido Nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Med Int Mex.* 2008; 24: 397-406.
 31. Nash P. Experimental and Clinical Studies of Oxidative Stress in Pre-Eclampsia [dissertação]. Uppsala: Faculty of Medicine Uppsala University; 2007.
 32. Nathan C. Nitric Oxide as a secretory product os mammalian cells. *FASEB Journal.* 1992; 6: 3051-64.
 33. Nims RW, Darbyshire JF, Saavedra JE, Danae C, Ingeborg H, George W. C, et al. Calorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. *Methods.* 1995; 7: 48-54.
 34. Norman JE, Cameron IT. Nitric Oxide in the human uterus. *Rev Reprod.* 1996; 1: 61-68.
 35. Oliveira LH, Xavier CC, Lana AMA. Alterações morfológicas placentárias de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional. *J Pediatr. (Rio J)* 2002; 78: 397-402.
 36. Orey RB et al. Diagnóstico, fatores de risco e patogênese da pré-eclâmpsia. *Rev HCPA.* 2007; 27: 43-46.
-

-
37. Papp A, Nemeth I, Karg E, Papp E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 738-43.
 38. Peraçoli JC, Parpinelli MA. Síndromes hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27: 627-34.
 39. Peres LAB. Pré-eclâmpsia: papel do estresse oxidativo e resposta imune. *J Bras Nefrol.* 2007; 29 (3): 164-70.
 40. Prado RS, Figueiredo EL, Magalhães TVB. Descolamento de retina na doença específica da gravidez. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79: 183-4.
 41. Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and Preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension.* 2004; 44: 374-80.
 42. Raijmakers MTM, Roes EM, Poston L, Steegers EAP, Peters WHM. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol.* (2007), doi: 10.1016/j.ejogrb.2007.08.005.
 43. Rubin E, Farber JL. Lesão Celular. In: Rubin E, Farber JL, editors. *Patologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 2-33.
 44. Salas SP. Role of nitric oxide in maternal hemodynamics and hormonal changes in pregnant rats. *Biol Res.* 1998; 31: 243-50.
 45. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr.* 1996; 85: 1-4.
 46. Serdar Z, Gur E, Colakoethullary M, Develioethlu O, Sarandol E. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2003; 268: 19-25.
-

-
47. Siciarz A, Weinberger B, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Urinary thiobarbituric acid-reacting substances as potential biomarkers of intrauterine hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2001; 155: 718-22.
 48. Souza CO. Efeitos da silibinina sobre modelo de pré-eclâmpsia induzida em ratas por tratamento com N[□]-Nitro-L-arginina metil Ester. [Dissertação]. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2009, 70p.
 49. Tastekin A, Ors R, Demircan B, Saricam Z, Ingec M, Akcay F. Oxidative stress in infants born to preeclamptic mothers. *Pediatr Int.* 2005; 47: 658-62.
 50. Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *Neoreviews.* 2007; 8: 522-32.
 51. Tsukahara H, Jiang MZ, Ohta N, Sato S, Tamura S, Hiraoka M, et al. Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. *Life Sci.* 2004; 75: 933-8.
 52. Tsukahara H. Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 339-51.
 53. Vancini RL, Lira CAB, Aboulafia J, Nouailhetas VLA. Radical livre, estresse oxidativo e exercício [monografia da internet]. São Paulo: UNIFESP; 2005 [acesso 14 jul 2007]. Disponível em: www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf.
 54. Vanderlelie J, Venardos K, Clifton V, Gude N, Clarke F, Perkins A. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta.* 2005; 26: 53-8.
 55. Vazquez ML, Forte WCN, Tedesco JJA. Quantificação das populações e subpopulações de linfócitos em gestantes com pré-eclâmpsia. *RBGO.* 2004; 26: 619-24.
-

56. Weinberger B, Nisar S, Anwar M, Ostfeld B, Hegyi T. Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome. *Pediatr Int.* 2006; 48: 479-83.
57. Xiong X, Demianczuk NN, Saunders LD, Wang FL, Fraser WD. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 203-9.
58. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169: 1316-20.
-

Capítulo I I
Manuscrito

*Níveis de Óxido Nítrico e Morbidade
Neonatal em Prematuros de Mães
com Pré-eclâmpsia*

Níveis de óxido nítrico e morbidade neonatal em prematuros de mães com pré-eclâmpsia

RESUMO

Introdução: A pré-eclâmpsia é uma das complicações gestacionais mais frequentes e o radical livre óxido nítrico (NO) pode estar envolvido na fisiopatologia desta doença. O excesso de radicais livres pode gerar estresse oxidativo que contribui para a ocorrência de várias doenças neonatais, porém, a relação pré-eclâmpsia / estresse oxidativo /óxido nítrico/ doenças neonatais não está bem definida. **Objetivo:** Investigar se os níveis de NO na placenta e no recém-nascido caracterizam o estresse oxidativo na pré-eclâmpsia e relacionam-se com a morbidade e prognóstico neonatal. **Método:** Estudo observacional de prematuros menores que 34 semanas de mães com pré-eclâmpsia, pareados pela idade gestacional com prematuros de mães normotensas, nascidos na Maternidade do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, entre julho de 2008 e dezembro de 2009. Óxido nítrico foi dosado em placenta, sangue de cordão umbilical, urina do primeiro dia de vida, sangue e urina do recém-nascido no 4º dia. As variáveis bioquímicas e clínicas, de nascimento e neonatais foram comparadas nos 2 grupos: Pré-eclâmpsia e Normotensas. **Resultados:** Foram estudados 30 prematuros de mães com pré-eclâmpsia e 30 de mães normotensas, com idade gestacional de 30 ± 2 semanas. Não houve diferença nas condições de nascimento e na morbimortalidade dos prematuros, mas os filhos de mães com pré-eclâmpsia tiveram maior necessidade de surfactante e ventilação mecânica. Os níveis séricos e urinários de NO não diferiram nos 2 grupos, sendo significativamente mais baixos na placenta do que no sangue de cordão e dos recém-nascidos. A pré-eclâmpsia foi grave em 40% dos casos, mas mesmo nestes os níveis de NO não diferiram. **Conclusão:** Na pré-eclâmpsia os níveis placentários e neonatais de NO não diferiram e não se relacionaram com a morbidade e o prognóstico neonatal.

Palavras – Chave: Estresse Oxidativo; Óxido nítrico; Pré-Eclâmpsia; Doenças Neonatais; Recém-nascido prematuro

Nitric oxide levels and neonatal morbidity in preterm infants of pre-eclamptic mothers.

ABSTRACT

Introduction: Pre-eclampsia is one of the most common complications of pregnancy and the free radical nitric oxide (NO) may be involved in the pathophysiology of the disease. Excessive levels of free radicals can produce oxidative stress contributing to the development of several neonatal diseases. However, the pre-eclampsia/oxidative stress/NO/neonatal diseases relationship has not been well established. **Objective:** To investigate whether NO levels in the placenta and in newborns characterize oxidative stress in pre-eclampsia and whether they are related to morbidity and neonatal prognosis. **Method:** Observational study on preterm newborns, younger than 34 weeks, of mothers with pre-eclampsia, paired by gestational age with preterm newborns from normotensive mothers and born at the University Maternity Hospital of the Botucatu School of Medicine - UNESP from July 2008 to December 2009. Nitric oxide was dosed in the placenta, umbilical-cord blood, first-day-of-life urine and the newborn's fourth-day urine and blood. Biochemical and clinical variables from birth and the newborn, were compared in the 2 groups: Pre-eclampsia and Normotensive. **Results:** Thirty preterm newborns of mothers with pre-eclampsia and 30 newborns of normotensive mothers with gestational age of 30 ± 2 weeks were studied. There was no difference in birth conditions or morbidity and mortality of preterm newborns, but the offspring of mothers with pre-eclampsia required more surfactant and mechanical ventilation. Serum and urine NO levels did not differ in the two groups and were significantly lower in the placenta than in umbilical-cord blood and in newborns. Pre-eclampsia was severe in 40% of cases, but even in those, NO levels did not differ. **Conclusion:** In pre-eclampsia, placental and neonatal NO levels did not differ and were not related to neonatal morbidity or prognosis.

Key words: Oxidative Stress; Nitric oxide; Pre-Eclampsia; Neonatal Diseases; Preterm infant.

1. Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação gestacional frequente, de etiologia desconhecida e fisiopatologia não completamente esclarecida. Considera-se que a combinação de fatores imunológicos, genéticos e ambientais propiciem a falha na invasão trofoblástica e no remodelamento das artérias espiraladas, resultando em inadequada perfusão, isquemia e hipóxia placentária (ROBERTS & COOPER, 2001; KHARFI et al, 2003). Em decorrência das alterações placentárias vários mediadores, incluindo citocinas e radicais livres, podem ser liberados, causando lesão endotelial e vasoconstrição sistêmica e culminando na ocorrência da doença (LYALL & MYATT, 2002). Assim, uma forte hipótese é que o estresse oxidativo esteja envolvido no desenvolvimento da pré-eclâmpsia (FERRÃO et al., 2006; NASH, 2007; PERES, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há aumento de radicais livres, tanto das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila) como as de nitrogênio (óxido nítrico), associado à redução da capacidade antioxidante do organismo. A peroxidação lipídica, importante manifestação do estresse oxidativo, ocorre quando radicais livres reagem com ácidos graxos polinsaturados presentes na membrana celular, causando alterações em sua estrutura e permeabilidade. Essas alterações podem provocar danos nas estruturas celulares de diversos tecidos e órgãos, alterando funções vitais e determinando morte celular. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VANCINE et al., 2005; TRINDADE & RUGOLO, 2007).

Durante a gestação há aumento do consumo de oxigênio, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo, porém, o sistema antioxidante atua normalmente mantendo o equilíbrio. Em gestações complicadas pela PE as defesas antioxidantes estão reduzidas e a perfusão placentária é inadequada, o que favorece o surgimento de áreas de isquemia e

reperfusão, com aumento na concentração de radicais livres. Estudos em placentas de gestantes com PE evidenciam o estresse oxidativo pelo aumento da peroxidação lipídica e oxidação protéica, bem como diminuição de enzimas antioxidantes. (CHAMY et al., 2006; BERNARDI, 2007)

Existem evidências de que as mesmas alterações observadas nas placentas estejam presentes em sangue de cordão umbilical, traduzindo a exposição do concepto à condição de estresse oxidativo materno. (CHAMY et al., 2006; MEHENDALE et al., 2007) Assim, a PE, além de associar-se ao baixo peso ao nascer, prematuridade e restrição de crescimento intrauterino, pode causar desequilíbrio na condição oxidante/antioxidante. Essa situação propicia o desenvolvimento de doenças neonatais associadas ao estresse oxidativo, especialmente nos prematuros, como síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, hemorragia perintraventricular e enterocolite necrosante. (XIONG et al., 2002; TSUKAHARA et al., 2004; WEINBERGER et al., 2006; BERNARDI, 2007). Alterações hematológicas, incluindo neutropenia e plaquetopenia são frequentes em recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia, mas o mecanismo dessas alterações não é conhecido (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989).

O óxido nítrico é um radical livre, que faz parte do mecanismo de defesa do organismo, mas pode ser tóxico ao produzir substâncias que provocam lesão celular. É sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e atua no controle da circulação placentária, nas contrações uterinas durante o trabalho de parto e parto, no tono vasomotor, na neurotransmissão, na resposta imune e na adesão de células inflamatórias à parede dos vasos. A participação do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia é classicamente referida na literatura, (NORMAN & CAMERON, 1996; LOWE, 2000; DOMINGUEZ et al., 2003; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; COSTA et al.,

2007), mas os resultados dos estudos são contraditórios, sendo detectados níveis aumentados (SHAAMASH et al, 2000), normais (ORANGE et al, 2003) ou diminuídos (SANDRIM et al, 2008; ARIS et al, 2009) no sangue materno e na placenta.

Os conhecimentos atuais mostram relação entre pré-eclâmpsia, estresse oxidativo, óxido nítrico, e doenças neonatais, mas esta relação precisa ser melhor esclarecida. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o óxido nítrico como marcador de estresse oxidativo na pré-eclâmpsia. Especificamente, determinar os níveis de óxido nítrico em placenta, sangue da veia umbilical, sangue e urina de prematuros de mães com pré-eclâmpsia comparados aos de mães normotensas, e avaliar a relação dos níveis de óxido nítrico com a morbidade neonatal e com a presença de neutropenia e/ou plaquetopenia ao nascimento.

2. Método

2.1 Delineamento do Estudo e Tamanho Amostral

Foi realizado estudo longitudinal e observacional, em recém-nascidos prematuros de mães portadoras de pré-eclâmpsia, atendidos na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), no período de julho de 2008 a dezembro de 2009, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

A amostra compreendeu o número máximo de recém-nascidos que preencheram os critérios de inclusão no período de estudo, tendo como base o total de 1100 - 1200 nascimentos/ano, que é relativamente estável no serviço e incidência de 4 a 5% de pré-eclâmpsia. Assim, foi estimada uma população-alvo de 50 recém-nascidos/ano filhos de mães com pré-eclâmpsia, mas devido ao rigoroso critério de inclusão e pareamento com o grupo controle foi previsto estudar uma amostra de 30 prematuros.

O grupo controle foi constituído com igual número de prematuros (n= 30) de mães que apresentaram trabalho de parto prematuro ou amniorrexe prematura, sem outras doenças ou complicações na gestação. O pareamento dos grupos foi efetuado conforme a idade gestacional (em semanas).

2.2 Seleção dos Sujeitos

Foram selecionadas gestantes com idade gestacional (IG) inferior a 34 semanas, com diagnóstico de pré-eclâmpsia, internadas na enfermaria de obstetrícia ou no pré-parto, tendo como motivo da internação: trabalho de parto ou resolução da gestação. O mesmo critério de seleção foi aplicado ao grupo controle, que teve como única diferença a ausência de hipertensão arterial na gestação. Todas as gestantes foram entrevistadas pela pesquisadora, informadas quanto aos objetivos da pesquisa, e após foi solicitado o consentimento materno para que o recém-nascido participasse do estudo, obtendo-se então a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

2.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo os casos que preencheram os seguintes critérios:

- Diagnóstico de pré-eclâmpsia materna confirmado na Unidade
 - Diagnóstico de trabalho de parto prematuro ou amniorexe prematura sem corioamnionite clínica
 - Ausência de outras patologias na gestação
 - Feto único
 - Nascimento ocorrido entre 27 e 34 semanas de gestação
 - Peso de nascimento entre 600 e 1800g
 - Obtenção de sangue de cordão umbilical e/ou de amostra de tecido placentário
-

Foram excluídos os recém-nascidos que apresentaram:

- Diagnóstico clínico e/ou sorológico de infecção congênita
- Síndrome genética, má-formação congênita múltipla, má-formação renal
- Uso de diuréticos nos primeiros 4 dias de vida
- Transfusões antes do 4º dia de vida
- Óbito antes de 24 horas de vida

2.4 Conceitos

- Hipertensão Arterial: pressão arterial de pelo menos 140 x 90 mmHg, avaliada após um período de repouso, com a paciente em posição sentada e considerando-se pressão diastólica o valor obtido no desaparecimento da bulha cardíaca (NHBPEP, 2000).

- Proteinúria: presença de pelo menos uma cruz de proteína em amostra de urina ou 300mg em urina de 24 horas (NHBPEP, 2000).

- Pré-eclâmpsia: quando a gestante não apresenta história de hipertensão arterial anterior à gestação e após a 20ª semana de gestação manifesta hipertensão arterial associada à proteinúria (NHBPEP, 2000).

- Pré-eclâmpsia Grave: quando presentes uma ou mais das situações seguintes: pressão arterial de pelo menos 160 x 110 mmHG; proteinúria de pelo menos 2g em urina de 24 horas; sintomas de eclâmpsia iminente (alterações clínicas do sistema nervoso central, visuais e gástricas; eclâmpsia (manifestação de crise convulsiva e/ou coma, na ausência de patologia do sistema nervoso central); síndrome HELLP (presença de hemólise, elevação de enzimas hepáticas e plaquetopenia); oligúria, cianose e edema agudo de pulmão (NHBPEP, 2000).

- Rotura Prematura de Membranas: rotura espontânea das membranas ovulares antes do início do trabalho de parto. Quando ocorre antes da 37ª semana é denominada de pré-termo (CUNNINGHAM et al., 2005).

- Parto Prematuro: aquele que acontece a partir da viabilidade fetal (20-22 semanas completas) e antes de atingir sua maturidade cronológica (37 semanas) (VALADARES & PEREIRA, 2009).

2.5 Variáveis de Estudo e Momentos de Avaliação

2.5.1 Variáveis Laboratoriais

Foram coletadas amostras de tecido placentário e de sangue da veia do cordão umbilical imediatamente após o nascimento, de urina do recém-nascido no primeiro dia de vida e de sangue e urina do recém-nascido no quarto dia de vida. Como marcador de estresse oxidativo foi determinada a concentração de óxido nítrico. Também foi realizado hemograma completo com contagem de plaquetas em sangue de cordão umbilical.

2.5.2 Variáveis Clínicas

Durante a permanência do recém-nascido na Unidade Neonatal foram obtidos dados demográficos, da evolução clínica e da assistência médica ministrada. Os dados de interesse para o estudo foram obtidos do prontuário da mãe e do recém-nascido e anotados no protocolo da pesquisa:

- maternos: idade, paridade, realização de pré-natal, presença ou não de hipertensão arterial crônica, gravidade da pré-eclâmpsia, uso de corticosteróide antenatal, diagnóstico de sofrimento fetal e tipo de parto.

- neonatais: idade gestacional (determinada pela melhor estimativa obstétrica), gênero, medidas antropométricas ao nascimento, adequação do peso para a idade gestacional, necessidade e procedimentos de reanimação neonatal, boletim de APGAR no primeiro e quinto minutos de vida, boletim de Silvermann – Andersen (BSA) para avaliar o grau de desconforto respiratório ao nascimento e escore de gravidade SNAP-PEII aplicado nas primeiras 12 horas de vida (RICHARDSON et al. 2001)

- morbidade neonatal: síndrome do desconforto respiratório, síndrome do pulmão úmido, pneumonia precoce (diagnosticada nos primeiros três dias de vida), persistência do canal arterial, dependência de oxigênio aos 28 dias de vida, displasia broncopulmonar (definida pela necessidade de oxigênio com 36 semanas de idade gestacional corrigida), sepse precoce (manifesta até 72 horas de vida), sepse tardia (após 72 horas de vida), hemorragia peri-intraventricular (classificada em 4 graus de gravidade conforme critérios de PAPILE et al, 1979), leucomalácia periventricular, enterocolite necrosante (conforme critérios de WALSH & KLIEGMAN, 1986), retinopatia da prematuridade.

- assistência neonatal: uso de drogas vaso-ativas, transfusão de hemácias, uso de surfactante exógeno, assistência respiratória (oxigênio, CPAP nasal, ventilação mecânica convencional, outras modalidades ventilatórias), nutrição parenteral, antibioticoterapia, fototerapia e tempo de internação.

- óbito intra-hospitalar.

2.5.3 Desfechos

- Bom prognóstico: alta sem sequelas

- Mau prognóstico: sequelas e/ou morte

Sequelas foram definidas pela presença de uma ou mais das seguintes doenças que comprometem o prognóstico do recém-nascido: Displasia broncopulmonar, hemorragia peri-intraventricular graus 3 ou 4, leucomalacia periventricular, enterocolite necrosante (graus 2 ou 3) e retinopatia da prematuridade.

2.6 Coleta e Processamento das Amostras Biológicas

Fragmento de 5 cm de tecido placentário foi coletado na base do cordão umbilical, abaixo das membranas coriônicas na face fetal da placenta, logo após a dequitação e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Amostras sanguíneas de 2,5 ml foram obtidas por punção da veia do cordão umbilical e venopunção periférica do recém-nascido no quarto dia de vida, coletadas em tubos com EDTA e imediatamente centrifugadas a 2000xg por 10 minutos, para a separação do plasma, que foi distribuído equitativamente em dois criotubos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Amostras de 5 ml de urina foram obtidas, por meio de saco coletor, no primeiro e quarto dias de vida, colocadas em dois criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sem centrifugação.

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

2.7 Dosagens Bioquímicas

A dosagem do óxido nítrico foi realizada por método colorimétrico utilizando-se kit específico para determinação de nitrato/nitrito (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, USA).

As amostras de urina foram diluídas dez vezes e as de plasma foram diluídas 1:2. O tecido placentário foi homogeneizado em salina tamponada com fosfato (PBS) da Laborclin (Brasil, Pinhas -PR). Para cada 50 mg de placenta foi adicionado 1mL de PBS e obtido o homogenato através de trituração do tecido placentário com o homogeneizador Ultra Turrax T25 da marca Ika-Weke, com velocidade de 13 500 rotações por minuto. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos em gelo para obtenção do sobrenadante, que foi diluído na proporção de 1 volume de sobrenadante do homogenato para 4 volumes de PBS e a seguir realizada a dosagem do óxido nítrico.

A dosagem de NO foi efetuada pela quantificação total de nitrato e nitrito, que são os metabólitos finais do óxido nítrico. As amostras foram tratadas com nitrato redutase para conversão do nitrato a nitrito, sendo este último quantificado por reação colorimétrica pelo método de Griess, no qual a concentração de nitrito (cromóforo púrpura) é obtida pela medição fotométrica da absorbância em 540 nm.

Para a determinação da curva padrão utilizou-se o padrão de nitrato nas concentrações de 0 a 35 μM . A determinação das concentrações de nitrato/nitrito das amostras utilizou-se a seguinte equação:

$$[\text{Nitrate} + \text{Nitrite}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y\text{-intercept}}{\text{slope}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{l}}{\text{volume of sample used} (\mu\text{l})} \right) \times \text{dilution}$$

Esse método tem boa acurácia, com coeficiente de variação inter-ensaio de 3,4% e intra-ensaio de 2,7%, e limite mínimo de detecção de 2,0 μM .

Os resultados obtidos nas amostras urinárias foram corrigidos pela creatinina urinária, conforme classicamente recomendado na avaliação de biomarcadores, a fim de controlar o efeito da diluição da urina (McClintock et al, 2007).

2.8 Análise Estatística

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

A comparação entre grupos quanto às variáveis numéricas foi realizada pelo teste t de Student para distribuição normal ou pelo teste de Mann-Whitney para distribuição não normal. Para variáveis categóricas foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

A análise de variância univariada (ANOVA) foi empregada para investigar associação entre momentos e grupos quanto aos níveis de óxido nítrico, utilizando-se ANOVA para medidas repetidas na comparação dos momentos de dosagens. Correlação de Spearman foi utilizada para investigar a força de associação dos valores séricos e urinários do óxido nítrico.

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

3 Resultados

No período de julho de 2008 a dezembro de 2009 foram selecionadas 70 gestantes com gestação única e nascimento previsto até 34 semanas de gestação, que concordaram em participar do estudo, das quais 34 apresentavam pré-eclâmpsia. Do total de 70 recém-nascidos, devido ao rigoroso pareamento pela idade gestacional foi possível estudar 60 prematuros, sendo 30 filhos de mães portadoras de pré-eclâmpsia (grupo pré-eclâmpsia) e 30 filhos de mães normotensas (grupo controle).

No grupo pré-eclâmpsia um recém-nascido não foi incluído por problemas técnicos na coleta ao nascimento, um recém-nascido foi excluído por ter sido submetido à

exsanguíneo transfusão nas primeiras 72 horas de vida e dois recém-nascidos por não se conseguir o pareamento pela idade gestacional com o grupo controle. No grupo controle seis recém-nascidos foram excluídos: cinco por falta de pareamento e um devido ao óbito nas primeiras 24 horas de vida.

Os dados demográficos maternos não diferiram entre os grupos, e não houve predomínio de primigestas no grupo pré-eclâmpsia. O uso de corticóide antenatal foi frequente e semelhante nos dois grupos, o número de consultas de pré-natal foi maior no grupo pré-eclâmpsia e o percentual de membrana rota foi significativamente maior no grupo controle. Cesariana foi a principal via de nascimento, com predomínio no grupo pré-eclâmpsia, no qual quase todas as cesarianas foram realizadas em caráter de urgência, com predomínio de indicação materna, enquanto que no grupo controle predominou a indicação fetal (Tabela 1).

Tabela 1. Dados demográficos e gestacionais dos grupos estudados.

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Idade (anos) $\bar{x} \pm DP$	27,2 \pm 7	25,4 \pm 7	0,308
Adolescentes n (%)	3 (10)	6 (20)	0,309
Primigestas n (%)	11 (37)	13 (43)	0,792
Tabagistas n (%)	7 (23)	11 (37)	0,398
Alcoolistas n (%)	1 (3)	3 (10)	0,612
Nº de consultas pré-natal $\bar{x} \pm DP$	6 \pm 2	4,4 \pm 2	0,016
Corticóide antenatal n (%)	25 (83)	25 (83)	0,729
Membrana rota n (%)	1 (3)	15 (50)	< 0,001
Sofrimento fetal n (%)	14 (47)	8 (27)	0,180
Trabalho de parto n (%)	4 (13)	21 (70)	< 0,001
Cesariana n (%)	29 (97)	16 (53)	< 0,001
Cesariana de urgência n (%)	28/29 (97)	11/16 (69)	0,017
Cesariana por indicação fetal n (%)	12 (41)	12 (75)	0,064

A Tabela 2 mostra que não houve diferença entre os grupos estudados quanto aos dados de nascimento. Destaca-se em ambos os grupos, a baixa idade gestacional, a elevada necessidade de reanimação neonatal e a presença de desconforto respiratório representada pelos valores relativamente altos do Boletim de Silvermann- Andersen. No grupo pré-eclâmpsia a média de peso da placenta foi menor que no grupo controle, mas essa diferença não atingiu significância estatística.

Tabela 2. Dados de nascimento dos grupos estudados

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Idade gestacional (sem) x ± DP	30,3 ± 2	30,0 ± 2	0,603
Peso de nascimento (g) x ± DP	1236 ± 333	1337 ± 288	0,213
Comprimento (cm) x ± DP	37,4 ± 3	38,6 ± 2,5	0,130
Perímetro cefálico (cm) x ± DP	27,3 ± 2,4	27,7 ± 2	0,564
Peso da placenta (g) x ± DP	274 ± 85	330 ± 81	0,066
Necessidade de reanimação n (%)	21 (70)	18 (60)	0,588
Uso de O ₂ inalatório n (%)	28 (93)	24 (80)	0,254
Ventilação com pressão positiva n (%)	19 (63)	18 (60)	1,000
Gênero masculino n (%)	19 (63)	14 (47)	0,299
Pequeno para idade gestacional n (%)	10 (33)	7 (23)	0,567
Apgar 1º minuto md (P25; P75)	4 (3; 7)	4 (4; 7)	0,647
Apgar 5º minuto md (P25; P75)	8 (7; 9)	8 (7; 9)	0,544
BSA md (P25; P75)	5 (4;6)	6 (4; 6)	0,141

BSA = Boletim de Silvermann-Andersen

A gravidade dos recém-nascidos, expressa pelo SNAP-PE II, bem como a morbidade neonatal e mortalidade intra-hospitalar não diferiram entre os dois grupos, como se observa na Tabela 3. Embora o percentual de hemorragia periintraventricular tenha sido alto no grupo controle a diferença não foi significativa e apenas 3 dos 8 casos foram classificados como graves, ou seja graus III ou IV. No grupo pré-eclâmpsia ocorreram 3 casos, sendo um grau IV e não houve casos de leucomalácia

periventricular. A leucomalácia periventricular ocorreu em apenas um prematuro do grupo controle.

Tabela 3. Gravidade, principais doenças e mortalidade dos recém-nascidos nos grupos estudados.

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
SNAP-PE md (P25; P75)	17 (13; 30)	13 (8; 28)	0,273
S. Desconforto respiratório n (%)	18 (60)	15 (50)	0,604
S. do pulmão úmido n (%)	7 (23)	9 (30)	0,770
Pneumonia n (%)	0 (--)	5 (17)	0,052
Persistência do canal arterial n (%)	12 (40)	12 (40)	0,792
Sepse precoce n (%)	0 (--)	1 (3)	1,000
Sepse tardia n (%)	4 (13)	4 (13)	1,000
Enterocolite necrosante n (%)	4 (13)	2 (7)	0,671
Hemorragia periintraventricular n(%)	3 (10)	8 (27)	0,182
Oxigênio aos 28 dias n (%)	9 (30)	4 (13)	0,210
Oxigênio com 36 semanas n (%)	3 (10)	3 (10)	1,000
Óbito intrahospitalar	2 (6,7)	2 (6,7)	1,000

A Tabela 4 mostra os principais dados da assistência neonatal ministrada aos dois grupos de prematuros, destacando-se o uso mais frequente de surfactante exógeno e de transfusões sanguíneas no grupo pré-eclâmpsia, este último com significância estatística. Ventilação mecânica foi usada em quase 2/3 do grupo pré-eclâmpsia e em apenas 1/3 do grupo controle, enquanto que neste último grupo houve percentual maior de prematuros que necessitaram apenas de CPAP nasal, porém, essa diferença não atingiu significância estatística. O tempo de internação não diferiu nos dois grupos.

Tabela 4. Dados da assistência neonatal nos grupos: Pré-eclâmpsia e Controle

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Surfactante exógeno n (%)	11 (37)	4 (13)	0,074
Ventilação mecânica n (%)	19 (63)	12 (40)	0,121
Somente CPAP nasal n (%)	8 (27)	16 (33)	0,065
Droga vasoativa n (%)	9 (30)	7 (23)	0,770
Nutrição parenteral n (%)	20 (67)	23 (77)	0,567
Antibióticos n (%)	17 (57)	23 (77)	0,171
Transfusão de hemácias n (%)	11 (37)	3 (10)	0,033
Fototerapia n (%)	27 (90)	26 (87)	1,000
Dias de oxigênio md (P25; P75)	5 (3; 30)	5 (2; 17)	0,633
Dias de UTI md (P25; P75)	18,5 (6; 29)	12,5 (7; 28)	0,487
Dias de internação md (P25; P75)	28,5 (17,5; 49,5)	36 (19; 43)	0,732

Os principais parâmetros do hemograma realizado em sangue de cordão umbilical dos grupos pré-eclâmpsia e controle estão apresentados na Tabela 5. Verifica-se que as únicas diferenças entre os grupos foram menor quantidade de leucócitos e menor percentual de neutrófilos no grupo pré-eclâmpsia. A frequência de neutropenia (definida pelo número de neutrófilos menor que $1500/\text{mm}^3$) e de plaquetopenia (plaquetas $< 150.000/\text{mm}^3$) não diferiu nos grupos.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos em sangue de cordão nos grupos estudados

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Hemoglobina (g/dl) $x \pm DP$	$16,9 \pm 1,8$	$16,3 \pm 2,1$	0,310
Hematócrito (%) $x \pm DP$	52 ± 6	50 ± 6	0,152
Leucócitos md (P25;P75)	6.600 (5.400; 11.050)	10.500 (6.375;12.800)	0,050
Neutrófilos (%) $x \pm DP$	33 ± 17	44 ± 10	0,007
Plaquetas (n) $x \pm DP$	186.966 ± 70.855	198.179 ± 87.286	0,596
Plaquetopenia n (%)	9 (30)	7 (23)	0,770
Neutropenia n (%)	9 (30)	3 (10)	0,107

As concentrações de óxido nítrico em placenta, sangue de veia umbilical e do recém-nascido, bem como na urina do 1º e 4º dias de vida não diferiram entre os grupos pré-eclâmpsia e controle (Tabela 6). Em ambos os grupos as concentrações placentárias ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) e urinárias ($\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina) foram significativamente menores em comparação ao sangue de cordão e do recém-nascido, conforme mostrado na tabela 6 pelas letras (sendo $a < b$).

Tabela 6. Concentrações de Óxido nítrico em placenta (μM), sangue de cordão umbilical (μM) e sangue (μM) e urina ($\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina) dos recém-nascidos nos grupos estudados.

Variável	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)	Valor de p
Placenta md (P25; P75)	6,95 (4,19; 10,05) a	5,56 (0,62; 7,94) a	0,094
Sangue de cordão md (P25; P75)	29,66 (21,90; 41,22) b	28,00 (17,62; 48,29) b	0,646
Sangue do 4º dia md (P25; P75)	57,73 (22,55; 109,40) b	43,31 (20,59; 106,66) b	0,634
Urina do 1º dia md (P25; P75)	3,30 (0; 6,44) a	4,16 (1,56; 5,37) a	0,569
Urina do 4º dia md (P25; P75)	6,57 (0; 8,59) a	2,85 (0,35; 8,20) a	0,559

Letras diferentes indicam diferença significativa

Nos dois grupos não houve correlação entre as concentrações séricas e urinárias do óxido nítrico, tanto no primeiro como no quarto dia de vida, entretanto as concentrações em placenta e sangue mostraram correlação significativa, conforme se verifica na Tabela 7.

Tabela 7. Correlação de Spearman entre os valores de Óxido nítrico em placenta, sangue de cordão umbilical e sangue dos recém-nascidos nos grupos estudados (μM).

Correlações (r) Valor p	Pré-eclâmpsia (n=30)	Controle (n=30)
Placenta x Cordão (r)	0,05	0,43
p	0,824	0,038
Placenta x Sangue 4 ^o d (r)	0,60	0,44
p	0,009	0,042
Cordão x Sangue 4 ^o d (r)	0,03	0,49
p	0,913	0,050

O grupo pré-eclâmpsia foi estratificado em pré-eclâmpsia grave (n=14) e pré-eclâmpsia não grave (n=16) e não houve diferença significativa nas concentrações de óxido nítrico em função da gravidade da doença, conforme se observa na Figura 1.

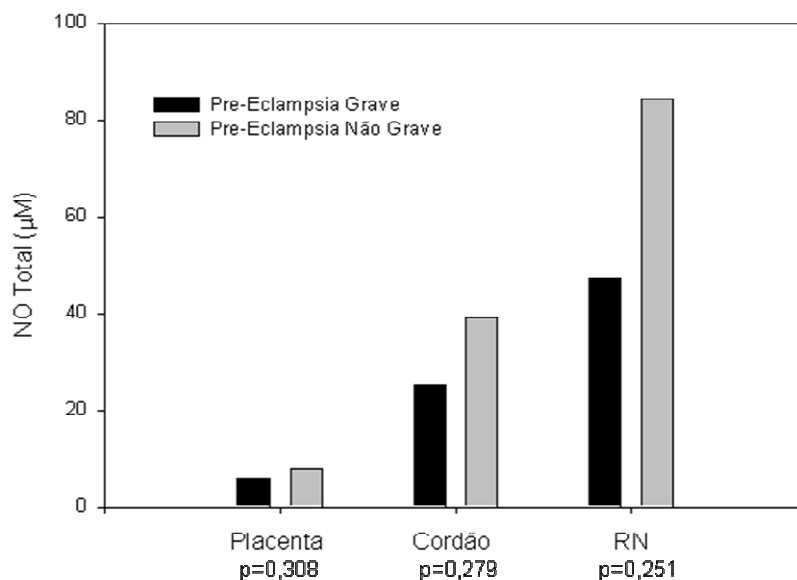


Figura 1. Concentração de óxido nítrico conforme a gravidade da pré-eclâmpsia.

A maioria dos prematuros nos dois grupos estudados teve bom prognóstico no curto prazo, ou seja, 83% do grupo pré-eclâmpsia e 73% do grupo controle tiveram alta sem seqüelas, sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,531$), como mostra a Figura 2.

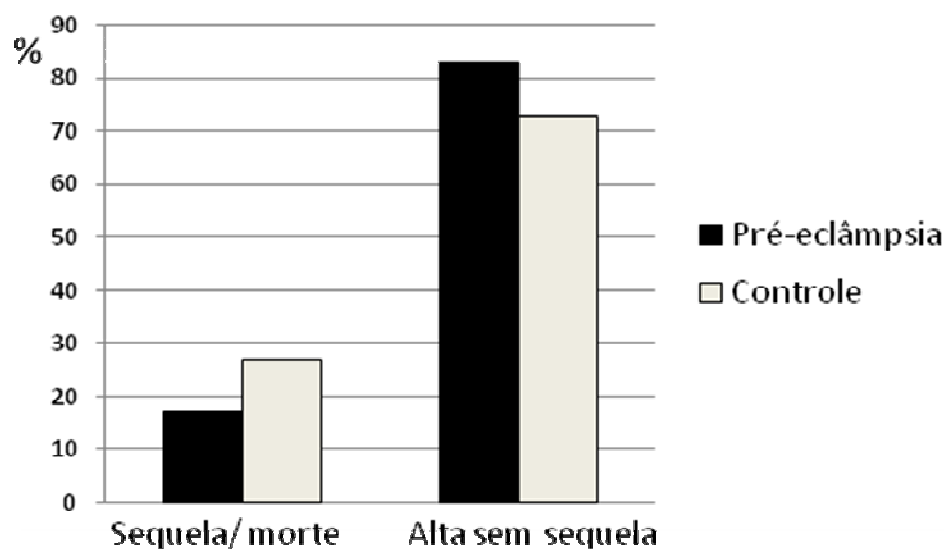


Figura 2. Prognóstico neonatal nos grupos estudados

4 Discussão

Um aspecto de grande atenção neste estudo foi garantir a homogeneidade da amostra estudada, o que é difícil, especialmente em se tratando de nascimentos prematuros. As características maternas foram similares, destacando-se no grupo pré-eclâmpsia elevada taxa de cesariana, conforme descrito na literatura em que se observa valores superiores a 70% (ALANIS et al, 2008). No grupo controle a maior proporção de rotura prematura de membranas, situação de risco infeccioso que poderia interferir na

avaliação dos níveis de óxido nítrico, assim, para evitar a interferência da infecção na avaliação do estresse oxidativo, foram excluídos os casos de corioamnionite.

Outro aspecto importante foi a homogeneidade da amostra quanto às condições de nascimento, pois na reanimação neonatal os recém-nascidos são expostos a maior estresse oxidativo devido ao uso de oxigênio a 100% (TRINDADE & RUGOLO, 2007). O uso de oxigênio em sala de parto foi frequente neste estudo, mas não diferiu entre os grupos.

A morbidade neonatal foi elevada, mas sem diferença significativa entre os prematuros de mães com pré-eclâmpsia e do grupo controle. As complicações mais frequentes foram aquelas classicamente associadas à prematuridade, isto é, síndrome do desconforto respiratório, persistência do canal arterial, hemorragia periintraventricular, displasia broncopulmonar e enterocolite necrosante.

Há controvérsias quanto ao efeito da pré-eclâmpsia na maturação pulmonar fetal. Alguns estudos mostram maturação pulmonar acelerada em prematuros de mães com pré-eclâmpsia (GLUCK & KULOVICH, 1973; KULOVICH & GLUCK, 1979), o que não se confirma em outros estudos (BANIAS et al, 1992; SCHIFF et al, 1993).

No presente estudo a SDR foi a principal doença neonatal e não diferiu no grupo pré-eclâmpsia comparado ao controle, sugerindo que a pré-eclâmpsia não interfere na maturação pulmonar fetal. Entretanto, o uso de surfactante e de ventilação mecânica, embora sem significância estatística, foi mais frequente nos prematuros de mães com pré-eclâmpsia, denotando maior gravidade da doença pulmonar nesse grupo, apesar da elevada frequência do uso de corticóide antenatal, acima de 80%, nos dois grupos de estudo.

Recém-nascidos de mães com síndrome hipertensiva gestacional apresentam com frequência alterações hematológicas, representadas por neutropenia e

plaquetopenia cuja incidência varia de 30% até mais que 50% na pré-eclâmpsia (KOENIG et al, 2004; SOLA-VISNER et al, 2008). No presente estudo verificou-se diminuição significativa do número de leucócitos e do percentual de neutrófilos no grupo pré-eclâmpsia, e neste grupo, 30% dos recém-nascidos tiveram neutropenia, comparado com 10% no grupo controle. Estudo multicêntrico da Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais sobre a associação de sepse neonatal com pré-eclâmpsia, em prematuros de muito baixo peso, mostrou nos filhos de mães com pré-eclâmpsia, maior frequência de neutropenia e associação desta com maior risco de óbito. (PROCIANOY et al, 2010).

O objetivo primário desse estudo foi avaliar os níveis de óxido nítrico na pré-eclâmpsia, uma vez que os resultados na literatura são contraditórios, e também por ser intrigante o papel desse radical livre, que por suas propriedades vasodilatadora e antiagregante plaquetário participa das adaptações hemodinâmicas da gestação, mas também parece estar envolvido na gênese da pré-eclâmpsia (DOMINGUEZ et al, 2003).

Estudos experimentais mostram que na gestação ocorre aumento na produção e na resposta ao óxido nítrico, enquanto que o bloqueio crônico da produção de NO produz todos os sintomas e consequências da pré-eclâmpsia, incluindo: hipertensão, proteinúria, lesão de órgãos, restrição do crescimento intrauterino e aumento na morbidade fetal e neonatal, sugerindo que a diminuição da concentração de NO está relacionada com a gênese da pré-eclâmpsia (GRANGER et al, 2001). Entretanto, os resultados dos estudos em humanos não são uniformes, e não há consenso quanto ao papel do NO na pré-eclâmpsia. Uma possibilidade seria que a lesão endotelial inicial na pré-eclâmpsia desencadearia um mecanismo compensatório induzindo enzimas da via ciclo-oxigenase e do óxido nítrico, para aumentar a produção de mediadores vasodilatadores. Esse mecanismo compensatório pode funcionar por longo período,

retardando o aparecimento da doença e poderia explicar os resultados contraditórios dos níveis de NO durante a gestação (DOMINGUEZ et al, 2003). Outra possibilidade seria o aumento no estresse oxidativo com produção do anion superóxido que reagiria com o NO aumentando o consumo deste o que causaria menor relaxamento e maior vasoconstrição placentária (HOWLADER et al, 2009). Seja qual for o mecanismo, o feto deve sofrer repercussões desse desequilíbrio em sua relação simbiótica com a mãe, assim, o interesse em investigar a relação dos níveis de óxido nítrico ao nascimento e primeiros dias de vida com o prognóstico neonatal no curto prazo.

Os resultados dos estudos sobre NO placentário na pré-eclâmpsia são bastante variáveis.

Di Iorio et al. (1998), comparando gestantes com pré-eclâmpsia e normotensas, não evidenciaram diferenças nas concentrações de NO em sangue materno e de cordão umbilical, porém, a concentração placentária da enzima NO sintase esteve aumentada na pré-eclâmpsia, traduzindo aumento do NO na placenta.

Aris et al., (2009) verificaram diminuição da concentração placentária de NO em mulheres com pré-eclâmpsia, que foi atribuída ao efeito inibitório do peróxido de hidrogênio na produção do NO. Segundo Peixoto (2006), a diminuição da concentração placentária de NO pode traduzir o consumo dessa substância na tentativa de dilatar o leito vascular placentário, contrabalançando a vasoconstrição causada pela pré-eclâmpsia.

No presente estudo as concentrações placentárias de NO não diferiram entre os grupos pré-eclâmpsia e controle. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Nishizawa et al. (2009), que não evidenciou diferenças nas concentrações de NO e da NO sintase em placentas de gestantes com e sem pré-eclâmpsia, concluindo ser improvável que alteração na produção de NO seja a causa primária da pré-eclâmpsia e

que a ativação da produção dessa substância pode ocorrer em resposta aos sintomas maternos.

Em sangue da veia umbilical e do recém-nascido as concentrações de óxido nítrico no presente estudo foram significativamente mais elevadas que as placentárias, porém, sem diferença entre os grupos pré-eclâmpsia e controle. No estudo de Di Iorio et al. (1998), as concentrações de NO em sangue de cordão também não diferiram nos prematuros de mães com pré-eclâmpsia, quando comparados às normotensas, mas os valores foram inferiores aos obtidos no presente estudo, com medianas entre 10 e 12 $\mu\text{M/l}$ nos grupos pré-eclâmpsia e normotensa, respectivamente. Há que se considerar que a idade gestacional média no estudo de Di Iorio et al. foi 34 semanas, enquanto que no presente estudo foi 30 semanas. Portanto, a diferença entre os dois estudos pode ser explicada pelo decréscimo na produção de NO com a progressão da gestação (RUTHERFORD et al, 1995).

Lyall et al (1995), em estudo com 32 gestações complicadas pela pré-eclâmpsia e 36 controles, coletaram amostras de sangue da veia umbilical de 13 recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia e 17 recém-nascidos de mães sem pré-eclâmpsia, e encontraram aumento de NO em sangue de cordão umbilical na pré-eclâmpsia em comparação aos controles (35,5 μM vs 24 μM), sugerindo ser esta uma resposta compensatória para melhorar o fluxo sanguíneo fetal. Resultados semelhantes foram obtidos por Shen et al (1998).

Diferenças nas idades gestacionais, inadequado pareamento dos grupos, falta de informação sobre a gravidade e o tratamento da pré-eclâmpsia, bem como ausência de dados clínicos para que se possa interpretar o significado das alterações bioquímicas são limitações dos poucos estudos disponíveis sobre NO em recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia.

Um aspecto que pode ter contribuído no presente estudo para a ausência de diferenças nos níveis de NO entre os prematuros de mães com e sem pré-eclâmpsia foi o fato de não ter ocorrido maior frequência de restrição do crescimento intrauterino no grupo com pré-eclâmpsia, sugerindo que apesar da gravidade da doença na maioria dos casos, não houve maiores repercussões para o concepto, exceto a prematuridade. Corroborando esta hipótese o estudo de Rutherford et al (1995) mostrou que em gestações de 29-32 semanas, complicadas pela pré-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino, em comparação com gestações normais de termo, a atividade da enzima NO sintase está aumentada na placenta e diminuída na artéria umbilical, traduzindo a disfunção endotelial.

Não foram encontrados na literatura estudos focalizando o NO urinário em recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia.

As concentrações urinárias de NO encontradas neste estudo foram baixas quando comparadas às concentrações séricas, mas foram próximas às referidas por Fakouh et al (2006) em 82 prematuros de mães sem pré-eclâmpsia, nas primeiras 72 horas de vida, cujos valores foram 220,5 $\mu\text{M}/\text{mmol}$ creatinina (2,49 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina).

Tsukahara et al (2004) avaliaram as concentrações urinárias de biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo o óxido nítrico, em três grupos de recém-nascidos: prematuros doentes (idade gestacional média de 29 semanas); prematuros estáveis (média de 32 semanas) e recém-nascidos de termo saudáveis. As concentrações de NO na urina nestes 3 grupos foram 2,4; 2,6 e 2,8 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina, respectivamente.

Em recém-nascidos de termo saudáveis, Murat et al (2005) documentaram níveis menores de óxido nítrico urinário (0,094 $\mu\text{M}/\mu\text{mol}$ creatinina, ou seja, 1,06 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina/dl), enquanto que níveis aumentados de NO urinário foram descritos em recém-nascidos infectados (25,45 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinina) (ERGENEKON et al., 2000).

Considerando o NO urinário como biomarcador de estresse oxidativo, os dados do presente estudo e os poucos disponíveis na literatura sugerem que prematuros de mães com pré-eclâmpsia não foram submetidos ao aumento do estresse oxidativo. Essa hipótese tem como respaldo outros achados deste estudo, tais como: a similaridade das concentrações de óxido nítrico nos diversos momentos de avaliação e a evolução clínica satisfatória e semelhante nos dois grupos.

O presente estudo tem algumas limitações, pois focalizou apenas o óxido nítrico, o que impossibilitou avaliar a interação dos mecanismos de estresse oxidativo e de proteção antioxidante na patogênese das doenças neonatais. Entretanto, foram investigados aspectos pouco descritos na literatura sobre prematuros de mães com pré-eclâmpsia, tais como a morbidade neonatal, as concentrações séricas de óxido nítrico no recém-nascido e outros aspectos ainda não avaliados pela literatura como as concentrações urinárias de NO. Com metodologia criteriosa e rigoroso pareamento entre os grupos, os resultados obtidos acrescentaram novas informações que podem auxiliar na melhor compreensão das repercussões fetais, dessa complexa e ainda pouco esclarecida doença materna, a pré-eclâmpsia.

5. Conclusão:

As concentrações de NO em placenta e sangue de veia umbilical, em sangue e urina do recém-nascido não caracterizaram aumento do estresse oxidativo em recém-nascidos de mães portadoras de pré-eclâmpsia e não se relacionaram com a morbidade neonatal. Prematuros de mães com pré-eclâmpsia apresentaram bom prognóstico neonatal no curto prazo, sem diferença em relação aos prematuros do grupo controle.

Referências Bibliográficas

1. Alanis MC, Robinson CJ, Hulsey TC, Ebeling M, Johnson DD. Early-onset severe preeclampsia: induction of labor VS elective cesarean delivery and neonatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 262e-6.
 2. Aris A, Benali S, Ouellet A, Moutquin JM, Leblanc S. Potential biomarkers of preeclampsia: Inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta.* 2009; 30: 342-7.
 3. Baniyas BB, Devoe LD, Nolan TE. Severe preeclampsia in preterm pregnancy between 26 and 32 weeks gestation. *Am J Perinatol.* 1992; 9: 357-60.
 4. Bernardi FBC. Metabolismo do óxido nítrico e parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia [dissertação]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2007.
 5. Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JÁ, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res.* 2006; 39: 229-236.
 6. Costa FS, Cunha SP, Reis FJC, Rodrigues JÁ, Rocha RS. Óxido nítrico e peptídeo atrial natriurético na predição de complicações da gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 29: 41-7.
 7. Cunningham FG, Leveno JK, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap III LC, Wenstrom KD. Preterm premature rupture of the membranes (PPROM). In: Williams Obstetrics. 22nd Ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p.177.
-

8. Di Iorio R, Marinoni E, Emiliani S, Cosmi EV. Nitric Oxide in preeclampsia: lack of evidence for decreased production. *EUR J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 76: 65-70.
 9. Dominguez DMR, Bacallao LG, Hernández SC, Corredera MAS. El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia. *Ver Cubana Invest Biomed.* 2003; 22(2): 130-40.
 10. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab.* 2003; 39: 343-350.
 11. Ergenekon E, Gücüyener K v lc m, Erba D, Koç E, Öztürk G, Atalay Y Id z. Urinary Nitric Oxide in Newborns with Infections. *Biol Neonate.* 2000; 78: 92-97.
 12. Farkouh CR, Merrill JD, Ballard PL, Ballard RA, Ischiropoulos H, Lorch SA. Urinary Metabolites of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Preterm and Term Infants. *Biol Neonate.* 2006; 90: 233-42.
 13. Ferrão MHL, Pereira ACL, Gersgorin HCTS, Paula TAA, Correa RRM, Castro ECC. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. *Rev Assoc Med Bras.* 2006; 52: 390-4.
 14. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras.* 1997; 43: 61-8.
 15. Gluck L, Kulovich MV. Leathin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1973; 115: 539-46.
 16. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension.* 2001; 38: 718-722.
-

-
17. Howlader ZH, Parveen S, Tamanna S, Khan TA, Begum F. Oxidative stress and antioxidante status in neonates born to pré-eclamptic mother. *J Trop Ped.* 2009; 55: 363-7.
 18. Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Masse J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem* 2003; 36: 323-31.
 19. Koenig JM, Christensen RD. Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. *N Engl J Med.* 1989; 321 (9): 557-62.
 20. Koenig JM, Yoder MC. Neonatal neutrophils: the good, the bad and the ugly. *Clin Perinatol.* 2004; 31: 39-51.
 21. Kulovich MV, Gluck L. The lung profile II complicated pregnancy. *AM J Obstet Gynecol.* 1979; 135: 64-70.
 22. Lowe DT. Nitric Oxide Dysfunction in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 2000; 4: 441-458.
 23. Lyall F, Myatt L. The role of the placenta in pre-eclampsia – a workshop report. *Placenta* 2002; 23: S142-5.
 24. Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 173: 714-18.
 25. McClintock DE, Ware LB, Eisner MD, Wickersham N, Thompson BT, Matthay MA, National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. Higher Urine Nitric Oxide is associated with improved outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Resp and Crit Care Med.* 2007;175:256-62.
 26. Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* (2007), doi: 10.1016/j.ijgo.2007.08.011.
-

-
27. Murat E, Söylemezoglu O, Bakkaloglu SA, Buyan N, Ozkaya O, Hasanoglu E. Plasma and urine nitric oxide levels in healthy Turkish children. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20: 1605-1609.
 28. Nash P. *Experimental and Clinical Studies of Oxidative Stress in Pre-Eclampsia* [dissertação]. Uppsala: Faculty of Medicine Uppsala University; 2007.
 29. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: S1-S22.
 30. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Tada S et al. Analysis of nitric oxide metabolism as a placental or maternal factor underlying the etiology of pré-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2009; 68: 239-247.
 31. Norman JE, Cameron IT. Nitric Oxide in the human uterus. *Rev Reprod.* 1996; 1: 61-68.
 32. Orange SJ, Painter D, Horvath J, Yu B, Trent R, Hennessy A. Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30 (5-6): 376-81.
 33. Papile LA, Munsick G, Weaver N, Pecha S. Cerebral intraventricular hemorrhage (CVH) in infants less than 1500 grams: developmental follow-up at one year. *Pediatr Res.* 1979; 13:528.
 34. Peixoto AB. *Avaliação de mediadores inflamatórios localizados na decídua de gestantes com pré-eclâmpsia/eclampsia.* [Dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2006.
 35. Peres LAB. Pré-eclâmpsia:papel do estresse oxidativo e resposta immune. *J Bras Nefrol.* 2007; 29(3): 164-70.
 36. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Rugolo LMSS, Leone CR, Lopes JMA, Almeida MFB for the Brazilian Network on Neonatal Research. Maternal preeclampsia and neonatal sepsis in very low birth weight infants: a multicenter study. *J Pediatr.* 2010 (in press).
-

37. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPP-II: simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001; 138: 92-100.
 38. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pré-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53-6.
 39. Rutherford RAD, McCarth A, Sullivan MHF, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies. *British Journal of Pharmacology.* 1995; 116: 3099-3109.
 40. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension* 2008; 52 (2): 402-7.
 41. Schiff E, Friedman AS, Mercer BM, Sibai BM. Fetal lung maturity is not accelerated in preeclampsia pregnancies. *AM J Obstet Gynecol.* 1993; 169: 1096-101.
 42. Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlof AM, Zakhari MM, Ibrahim AO, El Sien HM. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 68: 207-14.
 43. Shen W, Yang M, Luo Y. The changes of maternal and umbilical serum nitric oxide in patients with pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1998; 33: 1997-200.
 44. Sola-Visner M, Saxonhouse MA, Brown RE. Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early Hum Dev.* 2008; 84: 499-506.
 45. Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *Neoreviews.* 2007; 8: 522-32.
 46. Tsukahara H, Jiang MZ, Ohta N, Sato S, Tamura S, Hiraoka M, et al. Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. *Life Sci.* 2004; 75: 933-8.
-

47. Valadares JD, Pereira AK. Prematuridade. In: Cabral ACV. Fundamentos e prática em Obstetrícia. São Paulo: Atheneu, 2009. p.325.
 48. Vancini RL, Lira CAB, Aboulaflia J, Nouailhetas VLA. Radical livre, estresse oxidativo e exercício [monografia da internet]. São Paulo: UNIFESP; 2005 [acesso 14 jul 2007]. Disponível em: www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf .
 49. Walsh, MC, Kliegman, RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986, 33:179-201.
 50. Weinberger B, Nisar S, Anwar M, Ostfeld B, Hegyi T. Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome. *Pediatr Int.* 2006; 48: 479-83.
 51. Xiong X, Demianczuk NN, Saunders LD, Wang FL, Fraser WD. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 203-9.
-

Anexo 1**TERMO DE CONSENTIMENTO****Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos de Mães Hipertensas: Relação com Prognóstico Neonatal no Curto Prazo**

Nome e endereço do pesquisador: Milene Piorkowsky Almeida de Sá

R. Maria José, 1-34 Apto. 52 Bauru-SP Fone: (14) 33137693

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

R. Dr. Cardoso de Almeida, 1000 Ap.62 Botucatu-SP Fone: (14) 38154647

Esta pesquisa será realizada na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP para investigar se algumas substâncias que são produzidas devido à hipertensão na gestação estão aumentadas na placenta, no sangue do cordão umbilical e na urina do recém-nascido; e também investigar se essas substâncias são responsáveis pelas doenças dos recém-nascidos. As substâncias que vamos dosar chamam-se marcadores de estresse oxidativo, o que significa, são substâncias que normalmente existem em pequena quantidade no organismo e quando elas aumentam podem causar lesão nas células e então o bebê fica doente.

Após o nascimento, vamos coletar uma pequena quantidade (3,5 ml) de sangue do cordão umbilical e um pedaço da placenta para dosagem das substâncias que são marcadores de estresse oxidativo. Depois vamos obter 5 ml de urina do bebê, colhida de saco coletor, colhida no primeiro e quarto dia de vida, para dosagem das mesmas substâncias. No 4º dia de vida, quando é colhido sangue para avaliar a icterícia do recém-nascido, iremos dosar também as substâncias que estamos investigando nesse estudo. O recém-nascido receberá todos os cuidados necessários e padronizados no Serviço e não será submetido a nenhum procedimento diferente devido a sua participação nesse estudo.

Vamos avaliar se o bebê irá apresentar doenças durante a internação e quais são essas doenças.

Esse estudo não tem qualquer risco para a mãe nem para o bebê, e embora não proporcione benefício imediato para o bebê, poderá beneficiar no futuro, muitos outros recém-nascidos de mães hipertensas, pois os resultados que iremos obter nos permitirão conhecer melhor os mecanismos pelos quais a hipertensão materna repercute na condição de saúde do recém-nascido

Eu _____ entendo que, qualquer informação obtida sobre mim e meu bebê, será confidencial. Eu também entendo que nossos registros de pesquisa estão disponíveis para revisão dos pesquisadores. Esclareceram-me que minha identidade não será revelada em nenhuma publicação desta pesquisa; assim, consinto na publicação para propósitos científicos.

Eu entendo que estou livre para recusar a participação neste estudo ou para desistir a qualquer momento e que a minha decisão não afetará meu tratamento, nem o do meu bebê.

Eu certifico que li ou foi-me lido o texto de consentimento e entendi seu conteúdo. Este termo constará de 2 cópias e minha assinatura confirma que concordei livremente em participar deste estudo.

Assinatura do participante da pesquisa: _____

Data: _____

Eu certifico que expliquei a(o) Sr.(a) _____, acima, a natureza, propósito, benefícios e possíveis riscos associados à sua participação nesta pesquisa, que respondi todas as questões que me foram feitas e testemunhei assinatura acima.

Assinatura do Pesquisador: _____

Data: _____

Anexo 2

PROTOCOLO DE PESQUISA

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

RN N°: _____

Registro: _____

Dados Maternos:

Nome: _____ Idade: _____

Estado civil _____ Escolaridade _____ Procedência _____

N° de Gestações: ____ N° de partos: ____ N° de aborto: ____

Hipertensão Arterial Crônica: Sim () Não ()

Gestação Atual:

Pré-Natal: sim () não () N° de Consultas: _____ Local _____

Gravidade da pré-eclâmpsia / eclâmpsia:

Grau de Proteinúria: _____ Maior PA na gestação: _____

Convulsões: sim () não () Síndrome HELLP: sim () não ()

Medicamentos para hipertensão/ PE: _____

Uso atual de medicamentos () não () sim _____

DUM ___/___/___ US () não () sim Data: ___/___/___

Fumo: sim () não () Álcool: sim () não () Drogas: sim () não ()

Corticosteróide antenatal: () sim () não Ciclo completo () sim () não

Indução do parto: sim () não () Inibição do parto: sim () não ()

Membrana: () íntegra () rota _____ horas

Trabalho de parto () sim () não Sofrimento fetal () sim () não ()
Desconhecido

Tipo de Parto: vaginal () cesáreo () urgente () sim não () Motivo _____

Dados do Recém-Nascido:

Data Nascimento: ___/___/___ Masculino () Feminino ()

IG DUM: _____ US: _____ New Ballard: _____ AIG () PIG () GIG ()

Peso Nascimento: _____g Comprimento: _____cm

Perímetro Cefálico: _____ cm

Perímetro Torácico: _____ cm

Peso da placenta: _____ g

Reanimação Neonatal? Sim () Não ()

Oxigênio? Sim () Não ()

Ventilação P. Positiva? Sim () Não ()

Intubação? Sim () Não ()

Massagem Cardíaca? Sim () Não ()

Drogas? Sim () Não ()

Apgar: 1º min _____ 5º min _____

BSA: _____

SNAP- PE: _____

Internação: UTIN () _____ d Berçário () _____ d Alojamento Conjunto () _____ d

Morbidade Neonatal: (S= sim N= não)

() Doença Membrana Hialina () Dist. Resp. Adaptativo

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

() Pneumonia precoce (1^{as} 48hv) () Pneumonia tardia (Após 48hv)() Sepsis precoce (1^{as} 48hv) () Sepsis tardia (Após 48hv)

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

() Enterocolite Necrosante () Dist. Metabólico _____

() Retinopatia da Prematuridade Grau _____

() Leucomalácia periventricular () Hemorragia Intracraniana Grau: _____

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

Motivo: _____ Necrópsia () sim () não

Assistência Neonatal:

Jejum _____ d NPP: sim () não () Tempo de uso _____ d

Tipo de Aleitamento: _____ Início dieta: _____ d

Drogas Vasoativas () não () sim _____

Surfactante () não () sim 1ª dose com _____ hs vida nº doses _____

Diuréticos () não () sim início: ___/___ término ___/___

Indometacina () não () sim Cirurgia PCA () não () sim

Antibioticoterapia: Tipo: _____ Tempo de uso: _____

Transfusão de GV () não () sim data: _____ Plaquetas () não () sim data: _____

Fototerapia: Tempo de uso: _____ d

Assistência Respiratória () sim () não

- () O₂ Tempo de uso _____ dias
- () CPAP nasal Início ____ dv Tempo de uso _____ dias
- () VMC Início ____ dv Tempo de uso _____ dias
- () Outras modalidades _____ Tempo uso ____ dias

Dosagens Laboratoriais:

MARCADOR	Placenta	Sangue cordão	1º dv (Urina)	4º dv	
				Sangue	Urina
Estresse Oxidativo					
Óxido Nítrico					

Hemograma (sangue de cordão umbilical):

Htc ____ Hb ____ GB _____ Diferencial: _____

Plaquetas _____

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

Peso: _____ g Comp: ____ cm PC ____ cm

Diagnósticos finais:

Anexo 3



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 11 de fevereiro de 2008

Of. 004/08-CEP

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

Prezada Profª. Ligia

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

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

Atenciosamente,

Suell Aparecida Garcia
Secretária do CEP/Subst.

Anexo 4



Encaminhamento de Termo de Outorga

Processo	2008/01180-4
Outorgado	Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo CPF: 925.127.988-87
Instituição	Faculdade de Medicina de Botucatu/FMBO/UNESP
Linha de fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular

São Paulo,

Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Anexo 5



Processo: 2008/01180-4
 Data impressão: 02/10/2008 11:00:52
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

Termo de Outorga

Processo 2008/01180-4

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante desde Termo, concede:	
Outorgado	Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo CPF: 925.127.988-87
Instituição	Faculdade de Medicina de Botucatu/FMBO/UNESP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
Projeto	Estresse Oxidativo em Recém-Nascidos de Mães Hipertensas: Relação com Prognóstico Neonatal no Curto Prazo
Grande Área	Ciências da Saúde
Área	Medicina
Sub-área	Saúde Materno-Infantil
Vigência	01/08/2008 a 31/07/2010
Relatórios Científicos até	30/07/2009,30/08/2010
Prestação de Contas até	30/07/2009,30/08/2010

Observações
<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas. - O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s). - Imediatamente após a apresentação do relatório científico estabelecido pela FAPESP como relatório final, o saldo acaso existente será automaticamente cancelado. - A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituição na CNEN. - As instruções para prestação de contas deverão ser consultadas através do portal da FAPESP no endereço: www.fapesp.br/formularios. - "O primeiro ano de execução do projeto de pesquisa relacionado a este processo será financiado com recursos remanescentes do convênio firmado entre a FAPESP e o CNPq no âmbito do Programa de Políticas Públicas para o Sistema Único de Saúde (PPP-SUS) 2004-2005 (convênio 0175-00104, processo A-04/266) e os anos subsequentes serão financiados com recursos da FAPESP. Quando da submissão do Relatório Científico referente ao primeiro ano de atividades, devem ser considerados os objetivos informados por V. Sas. constantes do Anexo I."

Anexo 6



Processo: 2008/01180-4
Data impressão: 02/10/2008 11:00:52
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

Relação dos Benefícios e Materiais Concedidos

Custeio	
Material de Consumo no País	
Material estritamente necessário para a realização deste projeto.	
	No total de: R\$ 22.823,00
Serviços de Terceiros no País	
(B) Calibração de Equipamentos	
	No total de: R\$ 600,00
Reserva Técnica no País	
Conforme normas de 01/01/2007.	
	No total de: R\$ 3.513,45

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](#)