

*Livia Helena de Moraes Pereira*

***Avaliação do Perfil Inflamatório da Síndrome da Resposta  
Inflamatória Fetal em Autopsias Perinatais***

*Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração "Patologia Geral", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.*

**Orientadora:** Rosana Rosa Miranda Corrêa

**Co-orientadoras:** Camila Lourencini Cavellani

Janaína Grazielle Pacheco Olegário

Uberaba, MG

Outubro, 2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

P492a

Pereira, Livia Helena de Morais

Análise do perfil inflamatório da síndrome da resposta inflamatória fetal em autopsias perinatais / Livia Helena de Morais Pereira. - - 2010.

93 f. : tab. ; graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Rosa Miranda Corrêa.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Camila Lourencini Cavellani.

1. Interleucina-6. 2. Proteína C. 3. Fator de necrose tumoral alfa. 4. Edema. I. Título. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Corrêa, Rosana Rosa Miranda. IV. Cavellani, Camila Lourencini.

CDU 616-002

Aos meus pais, **Geraldo e Maria Helena**, por acreditarem em mim, me apoiar e proporcionar todas as condições para que eu pudesse concluir mais esse estudo.

Ao meu namorado, **Leonardo**, pelo companheirismo, carinho, incentivo e escuta que me auxiliaram muito nesses anos.

Aos meus irmãos, **Rangel e Leandro**, minha cunhada **Aida** e afilhado **Gabriel**, pela ternura e carinho.

## *Agradecimientos*

*A Deus, por me acompanhar e nortear, todos os dias da minha vida, e por ter proporcionado mais essa experiência, que contribuiu muito para meu aprendizado.*

*À professora Rosana, por ter concedido a oportunidade de fazer o mestrado, por ter sido um exemplo de professora e pesquisadora, por auxiliar sempre em todos meus momentos de dúvida e por ter sido tão atenciosa, dedicada e comprometida com nosso trabalho.*

*À Janaína, que esteve presente desde o início do mestrado, me ajudando em todos os momentos de desenvolvimento da tese, sempre com paciência e competência, sendo peça fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Por ser uma pessoa muito querida e que muito me ensinou.*

*Aos professores Vicente de Paula Antunes Teixeira, Marlene Antônia dos Reis e Camila Lourencini Cavellani, por compartilharam seus conhecimentos e experiências, e pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.*

*Aos Amigos da pós-graduação, pela aprendizagem e apoio constante, pelos ótimos momentos de convivência, pelas caminhadas matinais e pelos pastéis de fim de tarde...  
Em especial: Janaína, Débora, Camila Souza, Ana Paula, Laura, Humberto, Luciana,  
Livia Oliveira e Renata.*

*Aos funcionários da Disciplina de Patologia Geral da UFTM: Aloísio, Edson, Elenemar, Liliane, Lourimar, Maria Helena, Pedro, Soninha e Vandair, por sempre ajudarem e serem prestativos.*

*Às secretárias da pós-graduação, Denise e Nelma, sempre simpáticas e prestativas.*

*Aos membros da **comissão examinadora** deste trabalho na qualificação e defesa, pela disponibilidade e por todas as considerações que certamente contribuirão para melhorar nosso estudo.*

*Às crianças que participaram deste estudo, por toda sua importância neste trabalho.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

### ***Apoio Financeiro***

*O presente trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da fundação de ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).*

## ***Sumário***

Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas e Gráficos.....	xiii
Resumo .....	xiv
Abstract .....	xvi
Introdução.....	18
Hipótese .....	30
Objetivos	
1. <i>Objetivo Geral</i> .....	30
2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	30
Material e Métodos	
1.0 <i>Aspectos éticos do projeto</i> .....	31
2.0 <i>Caracterização da amostra</i> .....	31
3.0 <i>Morfologia, Imunohistoquímica e Morfometria</i> .....	34
4.0 <i>Análise estatística</i> .....	41
Resultados objetivo 1.....	43
Discussão objetivo 1.....	49
Conclusão Objetivo 1.....	59
Resultados objetivo 2.....	61

Discussão objetivo 2.....	66
Conclusões Objetivo 2.....	77
Considerações finais.....	78
Referências Bibliográficas.....	79

## ***Lista de Abreviaturas***

$\chi^2$	Qui-quadrado
$\mu\text{m}$	micrômetros
“t”	Teste “t” de Student
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise da variância
g	gramas
H	Teste de Kruskal-Wallis
AP	Anóxia Perinatal
HE	Hematoxilina-eosina
HC-UFTM	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
IA	Infecção Ascendente
IG	Idade Gestacional
Max	Máximo
MF	Malformação
Med	Mediana
Min	Mínimo
n	Número de casos
PE	Peso esperado para população
rP	Coefficiente de correlação de Pearson
rS	Coefficiente de correlação de Spearman
T	Mann-Whitney
$X \pm DP$	Média $\pm$ Desvio padrão

## ***Lista de Figuras***

**Figura 1.** Análise da porcentagem de colágeno e do número de focos de eritropoiese extramedular. Campo corado pelo Picro-sírius demonstrando área de colágeno com coloração avermelhada intensa (PS, aumento 10x) (1A), e a mesma área vista sob luz polarizada (PS, aumento 10x) (1B). Na quantificação do número de focos de eritropoiese extramedular, estes são observados com coloração arroxeada (HE, aumento 20x) (1C), e a mesma imagem com o esquema da ocular integradora de pontos demonstra como a contagem foi realizada (HE, aumento 20x) (1D).....36

**Figura 2.** Análise da intensidade de esteatose, demonstrando ausência de vacuolização lipídica (Grau 0) (HE, aumento 40x) (2A); vacúolos opticamente vazios no interior de hepatócitos próximos à veia centrolobular na esteatose discreta (Grau 1) (HE, aumento 40x) (2B); vacúolos nos hepatócitos das zonas II e III, ocupando o espaço entre a veia centrolobular e o espaço porta na esteatose moderada (Grau 2) (HE, aumento 20x) (2C); e vacúolos nos hepatócitos das zonas I, periportal ou II, e III, na esteatose acentuada (Grau 3) (HE, aumento 20x) (2D).....37

**Figura 3:** Análise das áreas imunomarcadas através do sistema analisador de imagens *Leica Qwin Plus*, que funciona com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz comum e um computador com o sistema analisador (3A). Em (3B) área inicial mostrada pela câmera com a barra de ferramentas à esquerda para configuração da imagem. (3C) Observa-se campo capturado com área imunomarcada com coloração

acastanhada, e em (3D) o mesmo campo teve sua área imunomarcada marcada em azul, que posteriormente foi convertida em porcentagem pelo sistema analisador de imagens.....40

**Figura 4.** Análise da marcação de citocinas e proteína pró-inflamatórias encontradas no fígado por meio do analisador de imagens Leica Qwin Plus, em que são observadas as expressões dos imunomarcados e do controle negativo. Em (A) hepatócitos imunomarcados por IL-6 e em (B) controle negativo correspondente. Em (C) hepatócitos imunomarcados por TNF- $\alpha$  e em (D) controle negativo correspondente. Em (E) hepatócitos imunomarcados por PCR e em (F) controle negativo correspondente (PAP, aumento 620 vezes).....46

## ***Lista de Tabelas e Gráficos***

<b>Tabela 1.</b> Análise da porcentagem de colágeno e grau de esteatose no fígado de crianças autopsiadas.....	47
<b>Tabela 2.</b> Análise da porcentagem de IL-6, TNF- $\alpha$ e PCR no fígado de crianças autopsiadas.....	62
<b>Tabela 3.</b> Distribuição do peso perinatal esperado para a IG entre os grupos de causas de morte nas autopsias perinatais.....	63
<b>Gráfico 1 -</b> Correlação entre a IG e o colágeno, grau de esteatose e ; e correlação da e as citocinas e proteína pró-inflamatórias.....	47
<b>Gráfico 2 -</b> Gráficos de correlação entre o colágeno e as citocinas e proteína pró-inflamatórias; e entre grau de esteatose e as citocinas e proteína pró-inflamatórias.....	48
<b>Gráfico 3 -</b> Gráficos de correlação entre o peso corporal e as citocinas proteína pró-inflamatória e entre a IG e as citocinas e proteína pró-inflamatória.....	64

## Resumo

**Introdução:** A Síndrome da Resposta Inflamatória Fetal (FIRS) é uma resposta inflamatória sistêmica descrita pela elevação das concentrações de Interleucina 6 (IL-6) no plasma fetal, e que é frequentemente associada ao parto prematuro, a ruptura prematura das membranas, a funisite, a corioamnionite e a consequências adversas perinatais. Várias citocinas e proteínas pró-inflamatórias estão envolvidas com o desencadeamento da FIRS, dentre elas a IL-6, o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a Proteína C Reativa (PCR). O fígado é um importante órgão a ser avaliado devido a sua atuação no sistema metabólico, sofrendo modificações durante o desenvolvimento fetal, podendo apresentar alteração funcional. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi de comparar as porcentagens expressas de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR no fígado de crianças autopsiadas no período perinatal de acordo com os seguintes parâmetros: peso fetal, idade gestacional, causa de morte e tipo de estresse; e avaliar as alterações morfológicas encontradas. **Materiais e métodos:** Foram analisadas 48 autopsias pediátricas, dividindo de acordo com três tipos principais de causa de morte: Malformação (MF), Infecção Ascendente (IA) e Anóxia Perinatal (AP). Os casos com MF foram classificados como tendo estresse agudo, e as outras duas causas de morte como estresse crônico. Para avaliação morfológica foi utilizada a coloração pela hematoxilina-eosina para análise da esteatose e para a quantificação das áreas de eritropoiese extramedular no fígado. Para análise do colágeno hepático foi utilizada a coloração pelo método do Picro-sírius. A porcentagem de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR foram mensuradas pela técnica de imunohistoquímica usando anti-IL-6, anti-TNF-  $\alpha$  e anti-PCR, respectivamente. **Resultados:** O peso de todas as crianças foi maior do que o esperado para a idade gestacional. A porcentagem de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior em casos com AP ( $p \leq 0,001$ ), e apresentou correlação positiva e significativa com a porcentagem de colágeno ( $r_s: 0,120, p \leq 0,001$ ). A porcentagem de PCR apresentou correlação positiva e

significativa com a esteatose (rS: 0,110,  $p \leq 0,001$ ) e foi significativamente maior em casos com IA, estresse crônico e nas crianças a termo ( $p \leq 0,001$ ). As porcentagens de IL-6 foram significativamente maiores em casos com MF, estresse agudo e prematuro ( $p \leq 0,001$ ), e apresentou correlação positiva e significativa com a eritropoiese extramedular (rS:0,300, $p \leq 0,001$ ). Houve correlação significativa e positiva entre a idade gestacional e a porcentagem de TNF- $\alpha$  (rS: 0,0497, p: 0,00403) e de PCR (rS: 0,227, p: 0,000), e negativa entre a porcentagem de IL-6 e a idade gestacional. **Conclusão:** A expressão de citocinas e PCR são intimamente relacionadas com as causas de morte e ocorrem ao longo das modificações intrauterinas, e com a maturidade dos órgãos fetais. O peso corporal foi maior do que o esperado para a idade gestacional, associado com as alterações observadas dos mediadores inflamatórios, principalmente o TNF- $\alpha$  e a PCR, que estão mais relacionadas ao estresse crônico, sugerindo o diagnóstico de FIRS. A IL-6, o TNF- $\alpha$  e a PCR possuem um papel fundamental no desencadeamento de alterações hepáticas, pois são uns dos responsáveis por induzir o desenvolvimento exacerbado de eritropoiese extramedular, colágeno e esteatose, respectivamente. Portanto, esse estudo fornece mais informações para o entendimento das alterações observadas em autópsias perinatais, mostrando o perfil inflamatório da FIRS e suas repercussões hepáticas.

**Palavras-chave:** Interleucina 6, Proteína C reativa, Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ , edema, fígado, autopsia perinatal.

## Abstract

**Introduction:** Fetal inflammatory response syndrome (FIRS) is a systemic inflammatory response described by high concentrations of interleukin 6 (IL-6) in fetal plasma, and is often associated with preterm birth, premature rupture of membranes, funisitis, chorioamnionitis and perinatal adverse consequences. Many cytokines and pro-inflammatory proteins are involved in triggering the FIRS, among them IL-6, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and C-Reactive Protein (CRP). The liver is an important organ to be evaluated because of its role in the metabolic system, undergoing modifications during fetal development, and may have abnormal function. **Objective:** The objective of this study was to compare IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP percentages expressed in the liver of children autopsied in the perinatal period in accordance with the following parameters: fetal weight, gestational age, cause of death and type of stress; and to evaluate the morphological changes found. **Materials and methods:** Forty-eight pediatric autopsies were analyzed, divided according to three main causes of death: Malformation (MF), Ascending infection (AI) and Perinatal Anoxia (PA). Cases with M were classified as having acute stress, and the other two causes of death as chronic stress. Hematoxylin-eosin staining was used for morphological analysis of steatosis and to quantify the areas of extramedullary erythropoiesis in the liver. Picosirius staining was used to analyse hepatic collagen. The percentage of IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP were measured by immunohistochemical technique using anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$  and anti-CRP, respectively. **Results:** The weight of all children was higher than expected for gestational age. The percentage of TNF- $\alpha$  was significantly higher in cases with PA ( $p \leq 0.001$ ) and correlated positively and significantly with the percentage of collagen ( $r_s: 0.120, p \leq 0.001$ ). The percentage of CRP presented positive and significant correlation with steatosis ( $r_s: 0.110, p \leq 0.001$ ) and was significantly higher in cases with AI, chronic stress and in term infants ( $p$

$\leq 0.001$ ). The percentages of IL-6 were significantly higher in cases with M, acute stress and preterm ( $p \leq 0.001$ ) and correlated positively and significantly with extramedullary erythropoiesis ( $r_s: 0.300, p \leq 0.001$ ). There was significant and positive correlation between gestational age and percentage of TNF- $\alpha$  ( $r: 0.0497, p: 0.00403$ ) and CRP ( $r: 0.227, p: 0.000$ ), and negative between the percentage of IL-6 and gestational age. Conclusion: The expression of cytokines and CRP are closely related to the causes of death, and occur along intrauterine modifications, and with the maturity of fetal organs. Body weight was higher than expected for gestational age, associated with changes of inflammatory mediators observed, mainly TNF- $\alpha$  and CRP, which are more related to chronic stress, suggesting the diagnosis of FIRS. IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP have a key role in triggering liver alterations, because they are one of the factors responsible for inducing the development of exaggerated extramedullary erythropoiesis, collagen and steatosis, respectively. Therefore, this study provides more information for understanding the observed changes in perinatal autopsies, showing the inflammatory profile of FIRS and its liver repercussions.

Keywords: Interleukin 6, C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , edema, liver, perinatal autopsy.

# 1 **Introdução**

2

## 3 *Autopsia Perinatal*

4           As causas de morte no período perinatal estão relacionadas a variáveis como a  
5 idade gestacional (IG), as características étnicas (Alexander e cols. 2006), as diferenças  
6 sócio-econômicas entre os países e o atendimento em hospitais de referência, que  
7 superestimam a taxa de causa de morte (Ngoc e cols. 2006). Entre as principais causas de  
8 morte perinatais no mundo estão as infecções e a asfixia perinatal, seguidas por  
9 prematuridade e malformações congênitas (Mattos e cols. 1987; Sims e Collins 2001, Ngoc  
10 e cols. 2006).

11           Apesar da redução, a mortalidade perinatal ainda é elevada no Brasil, com  
12 diferenças importantes nacionais e regionais, muitas vezes atribuídas à forma de  
13 classificação desses óbitos. As principais causas de morte perinatal no Brasil são as de  
14 origem materna, como as doenças hipertensivas, seguidas por malformações congênitas,  
15 hipóxia intra-uterina, prematuridade e infecções (Fonseca e Coutinho 2008).

16           Durante a gestação, diversas complicações, funcionam como indutoras de estresse,  
17 em que o feto pode desenvolver mecanismos de compensação funcional ou alterações  
18 morfológicas em diversos órgãos (Delprado e Baird 1984b; Jones e cols. 2006). O estresse  
19 antes do nascimento tem grande influência na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal,  
20 podendo elevar as concentrações de glicocorticóides na circulação fetal (Kapoor e cols.  
21 2006). Níveis aumentados de glicocorticóides promovem a gliconeogênese, a mobilização  
22 de aminoácidos e a redistribuição da gordura corporal, e são capazes de manter os níveis  
23 circulantes de glicose necessários para uma resposta ao estresse (Whirledge e Cidlowski

1 2010). Os glicocorticóides são importantes no desenvolvimento dos órgãos fetais, como o  
2 cérebro, o fígado e os pulmões, contudo taxas excessivas estão relacionadas a diabetes, a  
3 resistência à insulina, a doenças cardiovasculares e ao comprometimento neuroendócrino  
4 (Kapoor e cols. 2006).

5

## 6 *Análise do Fígado*

7 O fígado é um dos principais órgãos a ser avaliado devido a sua atuação no sistema  
8 metabólico, sofrendo modificações durante o desenvolvimento fetal (David 1985). No  
9 período perinatal, o fígado pode manifestar características de alterações nutricionais,  
10 hematopoiéticas, relacionadas à hipóxia, traumas e doenças metabólicas (Wigglesworth  
11 1996). Várias intercorrências perinatais podem repercutir neste órgão, com alterações  
12 principalmente localizadas nos hepatócitos, porém as alterações morfológicas não são bem  
13 conhecidas (Arai e cols. 2010).

14 Frente à infecção ascendente intra-uterina e à hipóxia, o fígado pode sofrer  
15 alterações funcionais, com prejuízo na produção de enzimas e cofatores imprescindíveis  
16 para o adequado metabolismo e síntese protéica (Ragonesi e cols. 1997), desenvolvendo  
17 alterações como degenerações e morte celular (Wigglesworth 1996).

18 A esteatose é o acúmulo de lipídeos no interior de células que não possuem função  
19 de armazenagem, principalmente nos hepatócitos. Várias são as causas que desencadeiam  
20 esse depósito, como a obesidade, a resistência a insulina, o estresse oxidativo, dentre  
21 outros. Em especial, o estresse oxidativo possui a capacidade de ativar o ligante Fas e o  
22 fator nuclear kappa B, promovendo a degeneração e morte dos hepatócitos, além da  
23 ativação da síntese de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

1 (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6). O excesso de ácido graxo livre é beta-oxidado, gerando  
2 maior quantidade de metabólitos reativos de oxigênio, que por sua vez destroem os  
3 antioxidantes naturais do fígado como a vitamina E e a glutatona, aumentando ainda mais  
4 o estresse oxidativo. O resultado é um quadro de esteatose, que pode evoluir para morte  
5 celular (Hijona e cols. 2010).

6 O excesso de depósito de colágeno representa o aumento do estroma conjuntivo de  
7 um órgão, decorrente de cicatrização normal e/ou exagerada, ou de um processo reacional  
8 em que a produção de matriz extracelular não está relacionada a um processo reparativo.  
9 Isso acontece durante o período gestacional como parte do processo de amadurecimento  
10 hepático, onde ocorre uma elevação da síntese dos constituintes da matriz extracelular  
11 (Kamiya, Gonzáles e Nakauchi 2006). Em consequência das modificações na remodelação  
12 do órgão e das alterações na função das células parenquimatosas pelo colágeno, podem  
13 surgir transtornos funcionais importantes nos locais acometidos (Pereira 2004). Entretanto  
14 foi encontrado na literatura apenas um estudo que avaliou as áreas de excesso de colágeno  
15 em recém nascidos, sem relação com anomalias renais (Nadeev e Shkurupii 2006).

16 A morte de células hepáticas, e como consequência o depósito excessivo de  
17 colágeno, pode estar associada às alterações da hematopoiese extramedular (Andrade  
18 2005). A hematopoiese é definida, em mamíferos, como a expansão e diferenciação dos  
19 precursores hematopoiéticos na medula óssea (Cumano e Godin 2007). As células  
20 sanguíneas são produzidas continuamente no decorrer da vida, e durante o  
21 desenvolvimento intra-uterino, a eritropoiese compreende a maior parte da hematopoiese  
22 do fígado fetal (Tamiolakis e cols. 2007).

23 Em condições de estresse fetal é possível que haja uma ativação de neutrófilos e  
24 macrófagos, e uma redução da eritropoiese acompanhada de aumento de granulócitos, de

1 células da linhagem monocítica e de células progenitoras CD34. Situações como pré-  
2 eclampsia, que representam um quadro de estresse crônico, interferem na hematopoiese  
3 intra-hepática devido ao aumento que ela provoca na granulopoiese, na redução da  
4 eritropoiese e no desencadeamento da ativação de células tronco e endoteliais (De Jongh e  
5 cols. 1999).

6 Alguns estudos sugerem que nesses casos há um processo inflamatório persistente e  
7 uma produção reduzida de eritrócitos, favorecendo a morbidade fetal (Tamiolakis e cols.  
8 2004). Dentre as citocinas que podem interferir na hematopoiese extramedular dos  
9 neonatos, a IL-6 é uma das principais e ainda pode estar envolvida com a função imune e  
10 com a resposta de fase aguda (De Jongh e cols. 1999).

11

## 12 ***SIRS e FIRS***

13 A inflamação é uma resposta desenvolvida pelo corpo decorrente de agressões  
14 sofridos e é caracterizada por sinais e sintomas clínicos, tais como rubor, calor, edema, dor  
15 e perda da função, associada a leucocitose, anemia, febre e alterações gerais (Erdei, Tóth e  
16 Vászrhelyi 2003). A resposta inflamatória é mediada por citocinas, quimiocinas, peptídeos  
17 antimicrobianos e outros mediadores inflamatórios, que atuam nos tecidos e nos vasos  
18 sanguíneos (Janeway e cols. 2005).

19 Em 1992, o *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care*  
20 *Medicin* descreveu a reação inflamatória desencadeada pelo organismo frente a agressão  
21 infecciosa ou não-infecciosa e passou a denominá-la Síndrome da Resposta Inflamatória  
22 Sistêmica (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS) (Salles e cols. 1997;  
23 Romero e cols. 2007).

1 A SIRS é caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como  
2 Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) e TNF- $\alpha$ , e anti-inflamatórias, como a IL-10 e o  
3 fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Saito e cols. 2008). Seu diagnóstico é  
4 baseado em dois ou mais sinais e sintomas, como alteração da temperatura, hipertermia ou  
5 hipotermia, elevação da frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto;  
6 taquipnéia ou hipocapnia, e leucocitose ou leucopenia (Murckart e Bhagwanjee 1997).  
7 Essas alterações são consideradas como consequência da ação de citocinas e mediadores  
8 pró-inflamatórios (Erdei, Tóth e Vásárhelyi 2003). Quando a SIRS está associada a um  
9 quadro de infecção sua denominação mais usual é Sepsis (Saito e cols. 2008).

10 Em 1997, o mesmo grupo de pesquisadores que descreveram a SIRS, relatou  
11 alterações semelhantes em fetos, porém usando principalmente os critérios dos níveis  
12 elevados de citocinas no plasma, em especial de IL-6. Esse evento foi denominado como  
13 Síndrome da Resposta Inflamatória Fetal (FIRS - Fetal Inflammatory Response  
14 Syndrome). A descrição da inflamação fetal foi baseada nos níveis de IL-6 acima de 11  
15 pg/ml, avaliado em gestantes que apresentaram trabalho de parto pré-termo e com ruptura  
16 prematura das membranas (Romero e cols. 2007).

17

### 18 ***FIRS***

19 A FIRS é uma resposta inflamatória sistêmica que foi originalmente descrita pela  
20 elevação das concentrações de IL-6 no plasma fetal. Atualmente ela é descrita como a  
21 elevação de IL-6 no plasma do cordão umbilical e/ou funisite. Outra abordagem para o  
22 diagnóstico da FIRS é a utilização dos níveis da Proteína C Reativa (PCR) no sangue do  
23 cordão umbilical, que tem sido encontrada elevada em casos de funisite, sepsis neonatal e

1 infecção congênita (Madsen-Bouterse e cols. 2010).

2 A FIRS desenvolve no feto uma resposta sistêmica que, frequentemente, esta  
3 associada ao parto prematuro, à ruptura prematura das membranas, a funisite, a  
4 corioamnionite e a consequências adversas perinatais, como morbidades e mortalidade  
5 neonatal (Lee e cols. 2007). A identificação destas entidades permite demonstrar a  
6 incidência desse quadro inflamatório. Cerca de 25 % de gestações prematuras possuem  
7 funisite (Yoon e cols. 2000), e em partos a termo cerca de 10 a 15% das crianças possuem  
8 corioamnionite. Nas gestações em que há ruptura prematura das membranas, 50% das  
9 crianças desenvolvem FIRS (Romero e cols. 2000; Romero e cols. 2004).

10

### 11 ***Fatores predisponentes e agentes causadores***

12 Fatores que predis põem a FIRS estão relacionados à inflamação intra-amniótica e a  
13 invasão microbiana, sendo que este último está relacionado com o aumento da intensidade  
14 da resposta inflamatória (Lee e cols. 2007).

15 Os agentes causadores da FIRS podem ser não-infecciosos e infecciosos. Entre as  
16 causas não infecciosas destacam-se o trauma, a queimadura, a pancreatite, a hipóxia  
17 crônica (Lee e cols. 2007, Surbek e cols. 2007), a anemia hemolítica aloimune (Lee e cols.  
18 2007) e o estresse do parto (Bracci 2000).

19 Entre as causas infecciosas, os principais microorganismos causadores são as  
20 bactérias e fungos vaginais, que ascendem por diversos motivos, tais como, pelas  
21 alterações na estrutura do órgão genital, ou do sistema de defesa uterino, ou ainda, por uma  
22 intensa resposta de citocinas aos microrganismos (Simhan e cols. 2003). Um dos

1 microrganismos mais encontrados é o *Ureaplasma urealyticum* (Romero e cols. 1998),  
2 encontrado em cerca de 70% das placentas com corioamnionite, e pode ser responsável  
3 pelo desenvolvimento de doenças pulmonares crônicas (Dammann e cols. 2003). Esses  
4 microrganismos parecem ser mais frequentes em mães consideradas não brancas, com  
5 idade menor de 20 anos de idade, e que tiveram um parto prematuro (Goldenberg e cols.  
6 2008).

7 Na invasão microbiana do espaço intra-uterino, os microorganismos entram em  
8 contato com o feto por portas de acesso, como a pele, os ouvidos, a via respiratória e/ou  
9 digestiva (Lee e cols. 2007). Por esse motivo, há a liberação de endotoxinas pelas  
10 bactérias, que desencadeiam a liberação de citocinas e proteínas inflamatórias através do  
11 organismo fetal e/ou materno (Bracci, 2000; Romero e cols. 2007; Lee e cols. 2008). O  
12 estresse sofrido pelo feto ativa o sistema complemento, que é capaz de induzir uma  
13 resposta inflamatória fetal observada pela produção de citocinas e alterações no padrão  
14 funcional de neutrófilos. Quanto mais o feto é exposto a condições agressivas ao seu  
15 organismo, mais ele é capaz de responder com a síntese de substâncias pró-inflamatórias,  
16 como o TNF- $\alpha$ , a IL-6, a IL-1 $\beta$  e a IL-8, sendo que essas citocinas inflamatórias são  
17 consideradas bons marcadores da FIRS. Além disso, as citocinas podem atuar nas células  
18 hepáticas e desencadear a síntese de proteínas de fase aguda, tais como, a PCR, a proteína  
19 amilóide A associada (SAA) e a procalcitonina (PCT) (Goepfert e cols. 2004).

20 A IG parece estar relacionada com a resposta inflamatória, visto que existem relatos  
21 da associação de recém-nascidos de muito baixo peso e pequenos para a IG com a  
22 inflamação (Bracci 2000). O baixo peso ao nascer, outra consequência da FIRS, pode estar  
23 relacionado com a PCT e a PCR, desenvolvendo alteração no estado nutricional do recém  
24 nascido, ainda não elucidada (Simhan e cols. 2003).

1           A FIRS ainda se relaciona com as morbidades neonatais graves, como síndrome da  
2 angústia respiratória, pneumonite, displasia bronco-pulmonar, hemorragia intraventricular,  
3 leucomalácia periventricular, enterocolite necrotizante, paralisia cerebral, sepse neonatal, e  
4 pode até evoluir para o óbito (Mazor, Smolin e Burshtein 2006, Lee e cols. 2007, Romero e  
5 cols. 2007).

6

### 7 *Alterações morfológicas da FIRS*

8           A funisite, inflamação dos vasos do cordão umbilical (Surbek e cols. 2007), e a  
9 corioamnionite, inflamação aguda das membranas (Redline 2006), são consideradas as  
10 duas marcas de identificação histopatológica da FIRS (Romero e cols. 2007).

11           As alterações morfológicas ocorridas no feto são causadas por dois motivos: o  
12 primeiro é a infecção da cavidade amniótica e posteriormente do líquido amniótico por  
13 microrganismos, e o segundo engloba diversas causas não associadas à infecção, como  
14 traumas, hipóxia crônica e anemia hemolítica aloimune, que desencadeiam um quadro de  
15 inflamação. As consequências são baseadas nas alterações morfológicas desenvolvidas  
16 pelos fetos e recém nascidos, e são provocadas pelas elevadas variações dos níveis de  
17 citocinas e proteínas pró-inflamatórias (Bracci 2000; Lee e cols. 2007; Romero e cols.  
18 2007).

19

### 20 *Marcadores da FIRS e alterações hepáticas*

21           Alguns mediadores se destacam como marcadores da inflamação, como o TNF- $\alpha$ ,  
22 que contribui para o aumento do infiltrado inflamatório sustentando a resposta

1 inflamatória. A IL-6 atua na ativação do TNF- $\alpha$ , e juntos podem inibir a lipase  
2 lipoprotéica, desenvolver a resistência a insulina e a ineficiência da conversão de  
3 carboidratos. Esse quadro pode desencadear a esteatose e, com a persistência do estímulo,  
4 promover um processo reparativo com depósito de colágeno hepático (Bieghs e cols.  
5 2010).

6 Além disso, a IL-6 em quadros inflamatórios é relacionada com a síntese elevada de  
7 componentes da eritropoiese extramedular, principalmente nos casos de redução do aporte  
8 de oxigênio. E induz a produção pelos hepatócitos da PCR, que também atua promovendo  
9 a esteatose (Yang e cols. 2010). O fígado pode sofrer alterações ao longo do período  
10 gestacional em decorrência dos diferentes estímulos estressantes, como o desencadeamento  
11 da resposta inflamatória sistêmica que repercute no desenvolvimento fetal e que pode estar  
12 relacionada com a morte perinatal. Elevações crônicas de IL-6 podem levar a  
13 hiperinsulinemia, redução do peso corporal, diminuição do estímulo insulínico na captação  
14 de glicose para os músculos esqueléticos e inflamação acentuada no fígado (Hijona e cols.  
15 2010).

16 As citocinas produzidas na FIRS apresentam íntima relação entre si. O TNF- $\alpha$  pode  
17 estimular a produção de IL-6, ou em situação inversa, o quadro inflamatório já  
18 estabelecido pela IL-6 desencadeia a elevação de TNF- $\alpha$ . Como consequência da elevação  
19 da IL-6, há estimulação hepática para a produção de PCR (Marchini, 2000; Romero e cols.  
20 2000; Romero e cols. 2007).

21

## 22 ***Principais citocinas envolvidas na FIRS e comprometimento do peso corporal***

23 As citocinas são peptídeos solúveis de pequeno tamanho, com função inicial de

1 comunicação intercelular. O endotélio, macrófagos, monócitos e linfócitos são  
2 responsáveis pela sua produção. Elas possuem um importante papel no controle da resposta  
3 inflamatória através dos mecanismos de resposta imune inata, resposta imune adaptativa, e  
4 de crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas (Gotsch e cols. 2007). As  
5 citocinas pró-inflamatórias que atuam mais frequentemente na FIRS são a IL-1, IL-6, TNF-  
6  $\alpha$  e IL-8 (Marchini e cols. 2000; Romero e cols. 2000).

7 O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória polipeptídica produzida por diversas  
8 células estimuladas por agentes estranhos, como endotoxinas bacterianas, virais e  
9 complexos imunes. É considerado um mediador de choque séptico e de morte fetal através  
10 da ativação da transcrição do fator nuclear kB (NF- kB), o qual estimula a produção de IL-  
11 6 e participa na indução do parto prematuro, através da produção elevada de  
12 prostaglandinas (Romero e cols. 2000).

13 A produção de IL-6 é desencadeada pela variação de atividade das células  
14 endoteliais, dos monócitos/macrófagos e dos fibroblastos, decorrentes geralmente da  
15 invasão microbiana. A IL-6 pode atuar no sistema imune fetal, ativando a diferenciação e a  
16 proliferação de leucócitos (Marchini e cols. 2000; Romero e cols. 2007) e ainda é  
17 responsável por desencadear a produção pelas células hepáticas de PCR, pré-albumina e  
18 PCT (Marchini e cols. 2000).

19 A PCR é uma proteína de fase aguda, produzida pelos hepatócitos, que se eleva em  
20 casos de processo inflamatório, principalmente pelo estímulo de IL-6, e pode ser utilizada  
21 como um marcador para a inflamação. Em casos de infecções bacterianas invasivas, seus  
22 níveis tornam se bastante elevados (McWilliam e Riordan 2010).

23 A FIRS pode vir a acometer diversos órgãos, tais como o timo, o fígado, os rins, os

1 pulmões, o coração, o cérebro, as adrenais, a pele e o sistema hematopoiético (Gotsch e  
2 cols. 2007). O fígado desempenha um papel central na manutenção do balanço energético  
3 do organismo como um todo, através do controle do metabolismo de carboidratos, lipídios  
4 e proteínas, além de estar intimamente relacionado com a síntese de citocinas e proteínas  
5 pró-inflamatórias (Moshage e cols. 1988; Rankin e cols. 2009). Em particular, o fígado de  
6 crianças no período perinatal pode manifestar alterações morfológicas e funcionais  
7 decorrentes de complicações causadas por situações de estresse, como a hipóxia  
8 intrauterina, traumas, doenças metabólicas e microorganismos causadores de infecções  
9 ascendentes (Wigglesworth 1996). A síntese enzimática e de cofatores pode estar  
10 comprometida prejudicando o metabolismo das proteínas, que pode culminar com  
11 degeneração e necrose (Ragonesi, Bertini e Camano 1993; Wigglesworth 1996).

12 A PCR, a IL-1 $\beta$ , a IL-6 e a PCT são apontadas como as responsáveis pela perda de  
13 peso dos fetos e dos recém-nascidos, afetando-os no seu estado nutricional (Marchini e  
14 cols. 2000; Lee e cols. 2007). No entanto, a ação de citocinas no estado nutricional do feto  
15 e do recém nascido, como a IL-6, e de proteínas pró-inflamatórias, como a PCR, podem  
16 determinar uma desnutrição protéico-calórica, que é responsável por desenvolver uma  
17 deficiência protéica grave (Scrimshaw e Viteri 2010). Esse quadro, conhecido como  
18 *kwashiorkor*, possui uma característica marcante, a anasarca. (Tahmeed Ahmed e cols.  
19 2009).

20 Não foram encontrados estudos anátomo-patológicos que definissem a FIRS e seus  
21 parâmetros de diagnóstico como causa de morte. Um estudo realizado em nosso  
22 departamento demonstrou que crianças apresentavam peso corporal ao nascer acima do  
23 esperado para a IG. Essas crianças sofreram diferentes tipos de estresse, como anóxia intra-  
24 uterina, infecções e malformações congênitas, que desencadearam uma série de alterações

1 em diferentes órgãos, dentre eles o fígado (Corrêa 2007). Acredita-se que a expressão dos  
2 marcadores para a FIRS no fígado de crianças autopsiadas justifica o aumento de peso  
3 encontrado, e que estes marcadores sofrem variação de acordo com o tipo de causa de  
4 morte. A identificação da FIRS através de autopsias pediátricas pode ser um avanço no  
5 diagnóstico de doenças inflamatórias responsáveis por complicações hepáticas que  
6 determinam o prognóstico fetal, principalmente nos casos em que faltam elementos para  
7 completar o diagnóstico do FIRS, como exames plasmáticos relacionados aos mediadores  
8 envolvidos e o exame da placenta.

9           Portanto, o presente estudo tem como objetivo descrever as alterações hepáticas  
10 encontradas em crianças autopsiadas e mapear a expressão e a repercussão das principais  
11 citocinas e proteínas inflamatórias envolvidas no diagnóstico de FIRS, e sua influência no  
12 peso fetal, de acordo com o tipo de causa de morte e de estresse perinatal.

13

1

## *Hipótese*

2

3

4

5

6

## *Objetivo Geral*

7

8

9

10

11

12

## *Objetivos específicos*

13

14

15

16

17

18

19

1. Comparar as alterações morfológicas hepáticas de crianças autopsiadas no período perinatal, e sua relação com citocinas e proteínas inflamatórias envolvidas no diagnóstico de FIRS, como a IL-6, o TNF- $\alpha$  e a PCR;
2. Comparar as quantidades de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR no fígado de crianças autopsiadas no período perinatal de acordo com os seguintes parâmetros: o peso fetal, a idade gestacional, a causa de morte e o tipo de estresse.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

## ***Material e Métodos***

### ***1.0 Aspectos éticos do projeto***

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), protocolo número 1316 (Anexo I).

### ***2.0 Caracterização da Amostra***

#### ***Revisão dos protocolos de autópsias e do prontuário clínico***

Foram avaliados 541 protocolos de autópsias realizadas pela Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, durante os anos de 1990 a 2009. Na faixa etária pediátrica foram autopsiados 206 casos, sendo que destes, 155 eram de crianças no período perinatal. Foram incluídos os casos de autópsias perinatais, realizadas no período de 22 semanas de gestação até sete dias de vida pós-natal (OMS 1996), com protocolos e prontuários completos e, blocos e lâminas disponíveis nos arquivos da Disciplina de Patologia Geral. Foram excluídos os casos de autópsias perinatais com prontuários e protocolos incompletos e blocos e lâminas não disponíveis nos arquivos analisados, além daqueles casos em que o fígado estava autolisado. Os casos foram pareados de acordo com a IG, e de acordo com a causa de morte, sendo obtidos 48 casos de autópsias perinatais para a análise morfológica (Anexo II).

## 1 ***Seleção dos grupos para análise morfológica do fígado***

2 Foram incluídos para análise morfológica 48 casos com causa de morte classificada  
3 nos grupos de Malformações Congênicas, Anóxia Perinatal antes do parto e Infecção  
4 Ascendente. Foram excluídas da análise as autópsias com outras causas de morte. Os  
5 grupos de causa de morte foram definidos de acordo com os critérios estabelecidos na  
6 literatura (Hey, Lloyd e Wigglesworth 1986).

7

## 8 ***Grupos***

9 *Malformações Congênicas (MF)*: defeitos morfológicos de um órgão ou de grande  
10 extensão corporal causados por uma alteração intrínseca no desenvolvimento do embrião.  
11 Neste grupo foram incluídos os casos com malformações congênicas cujo mecanismo que  
12 levou a morte foi hipóxia aguda, como as renais com hipoplasia pulmonar e as do sistema  
13 nervoso central, sendo excluídos os casos de malformações cujo mecanismo de causa de  
14 morte foi hipóxia crônica.

15 *Anóxia Perinatal (AP)*: interferências em todas as trocas gasosas originadas antes do parto,  
16 com alterações após o nascimento, podendo ser provocada por redução de oxigênio,  
17 retenção de gás carbono e acidose. É caracterizada por pequenas áreas hemorrágicas na  
18 pleura visceral e parietal, congestão no fígado, no baço e na adrenal, mecônio ou debris  
19 amniótica no pulmão.

20 *Infecção Ascendente (IA)*: infiltração de células polimorfonucleares nas membranas  
21 placentárias e/ou cordão umbilical e vasos fetais do prato coriônico. O diagnóstico de

1 Infecção fetal foi realizado através da análise do feto ou neonato e da placenta (Dollner e  
2 cols. 2002).

3 *Outros diagnósticos:* óbito devido a outras condições fetais e neonatais não incluídas nos  
4 grupos anteriores.

5 Os casos incluídos neste estudo foram subdivididos de acordo com o tipo de  
6 estresse perinatal, em:

7 *Estresse agudo:* resposta a agressões que ocorrem no momento ou após o parto, podendo  
8 ser o agente desencadeador da morte fetal. São classificadas nesse grupo as crianças com  
9 causa de morte por Malformação Congênita, pois são capazes de se desenvolver até o  
10 período próximo ao termo, tornando-se inviáveis no momento do nascimento por não  
11 terem condições de se adaptarem ao ambiente extra-uterino.

12 *Estresse crônico:* resposta a agressões de longa duração que iniciam no período intra-  
13 uterino e permanecem até o nascimento, podendo ser o agente desencadeador da morte  
14 fetal. São classificadas nesse grupo as crianças com causa de morte por Infecção  
15 Ascendente e Anóxia Perinatal (Corrêa 2007).

16

### 17 ***Revisão dos protocolos de autópsia***

18 Foram coletadas dos protocolos de autópsia informações como as medidas  
19 antropométricas, o peso, a IG, as intercorrências clínicas, além das características  
20 morfológicas macroscópicas e microscópicas do fígado da criança autopsiada. A IG foi  
21 determinada através do comprimento hálux-calcâneo (Streeter 1920; Zago e cols. 2000).  
22 Foram consideradas prematuras as crianças com IG abaixo de 37 semanas (OMS e FIGO

1 1976), e natimortos, as crianças com IG maior que 20 semanas e com índice de Apgar zero  
2 no primeiro minuto (Apgar 1953; Faye-Petersen e cols. 1999). Os pesos encontrados foram  
3 comparados com o de estudos populacionais, de acordo com os valores estabelecidos para  
4 IG (Gruenwald e Minh 1953). Os fetos com peso ao nascer inferior à 2500g foram  
5 classificados como baixo peso (Kramer 1987). As crianças foram classificadas de acordo  
6 com a relação do peso com a idade gestacional em pequenos para idade gestacional - PIG  
7 (peso abaixo do percentil 10), adequados para idade gestacional AIG (peso entre os  
8 percentis 10 e 90) e grandes para idade gestacional - GIG (peso acima do percentil 90)  
9 (Battaglia e Lubchenco, 1967) (Anexo III).

10

### 11 ***3.0 Morfologia, Imunohistoquímica e Morfometria***

#### 12 ***Análise Morfológica***

13 O fígado foi o órgão escolhido para a análise morfológica, sendo excluídos os casos  
14 com autólise. Os casos foram pareados pela IG e causa de morte. Foram examinados  
15 fragmentos do fígado das crianças autopsiadas, fixados pelo formaldeído tamponado a  
16 10%, posteriormente submetidos aos procedimentos de rotina até inclusão em parafina.  
17 Foram realizados cortes com espessura entre 4 e 5 µm e fixados em lâminas de vidro com  
18 Poli-L Lisina®. Após secagem em estufa, foram armazenadas para posterior utilização.

19

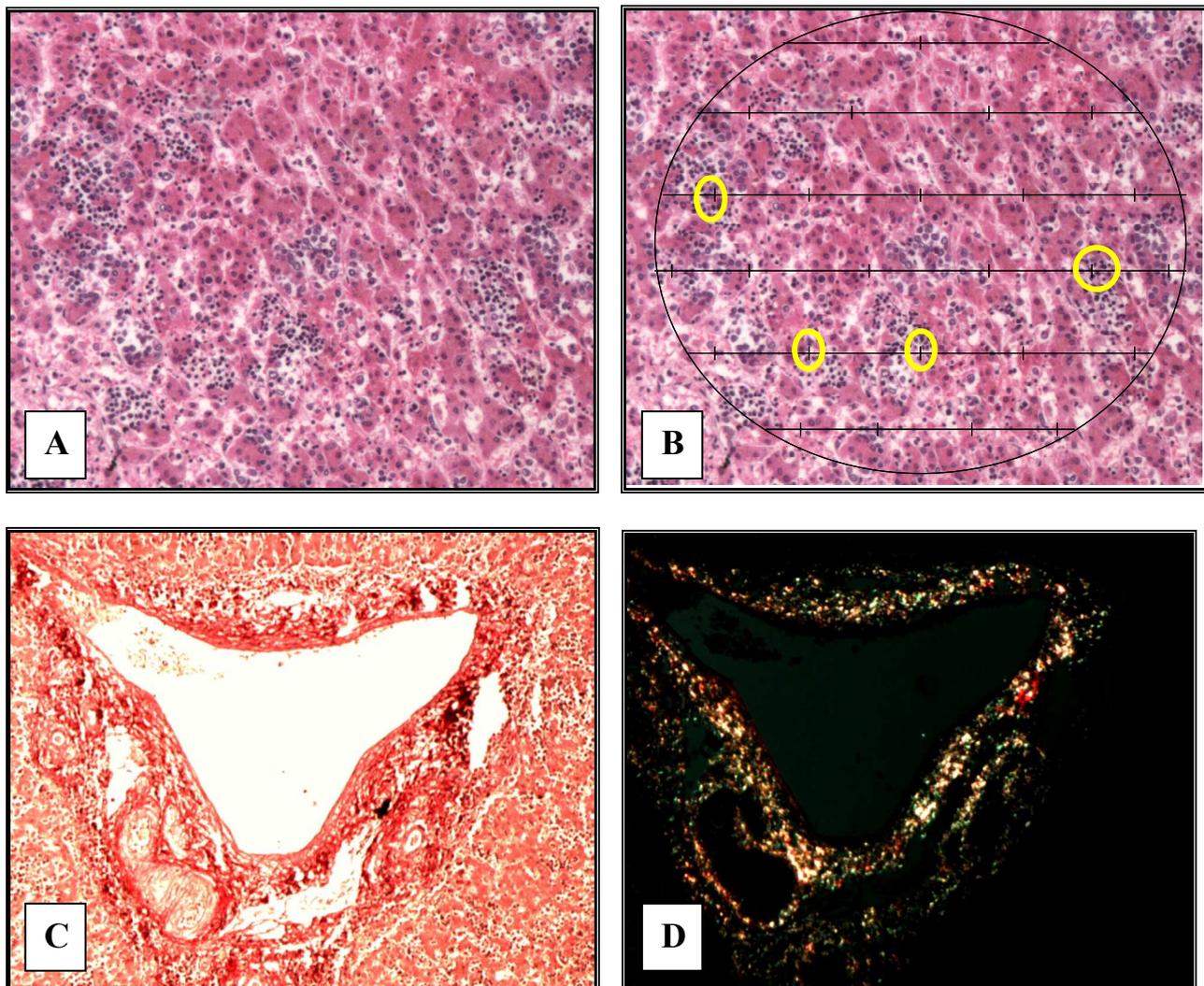
#### 20 ***Parâmetros morfológicos analisados***

21 Foram avaliadas as seguintes alterações: a intensidade de esteatose, a porcentagem  
22 de colágeno e o número de focos de eritropoiese extramedular no fígado.

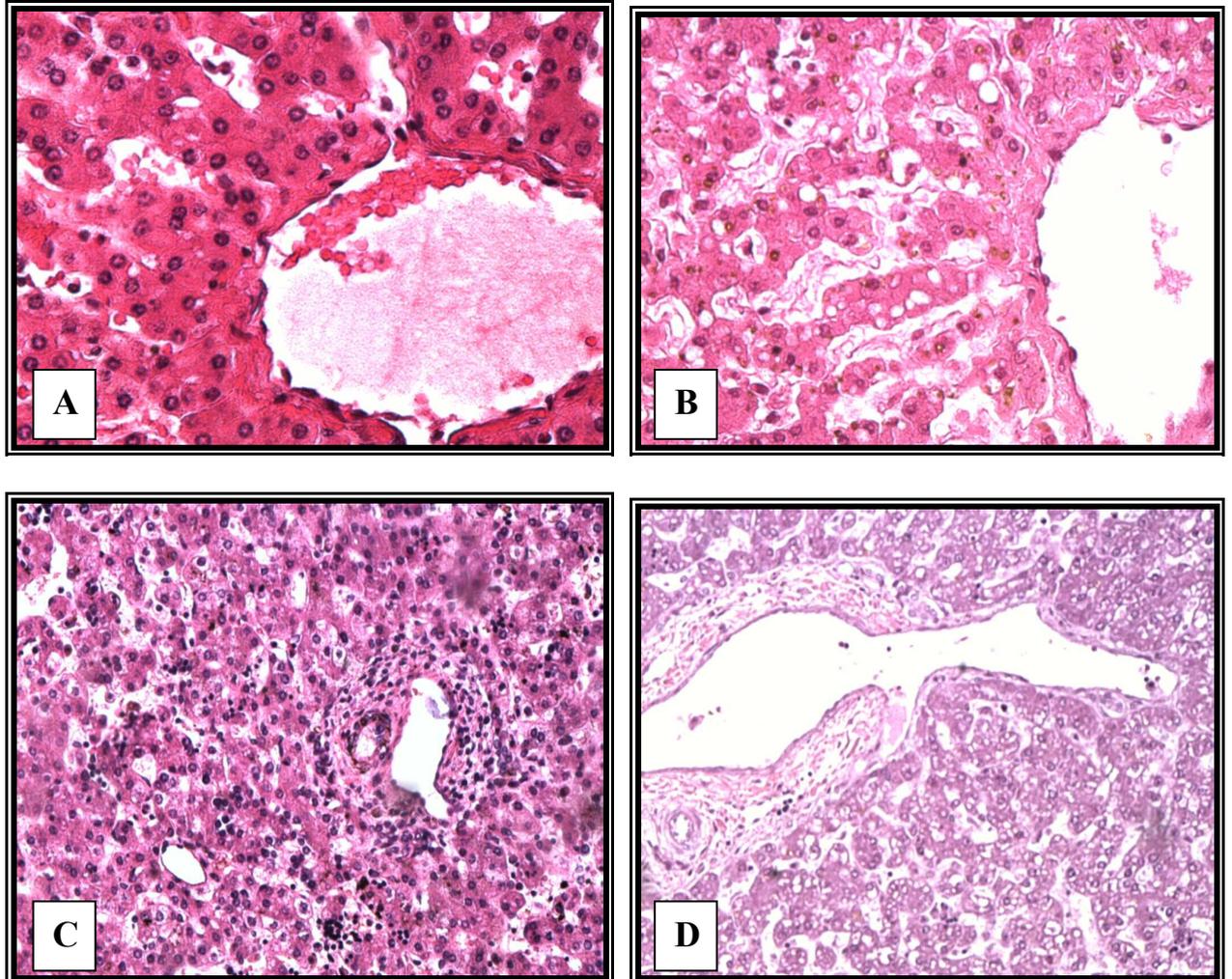
1            Para análise morfométrica das áreas de, foi utilizada a coloração pela Hematoxilina  
2 & Eosina (Figura 1A). Foram realizadas dez medidas, em dez campos, no aumento de dez  
3 vezes usando uma ocular integradora de pontos. A quantificação em cada campo foi feita  
4 através da contagem do número de pontos da ocular integradora coincidentes com o  
5 número de focos de eritropoiese extramedular (Figura 1B). Posteriormente os resultados  
6 foram convertidos em porcentagem, correspondente ao número total de focos por campo  
7 analisado.

8            Para análise do colágeno foram excluídos os casos com malformações congênitas  
9 renais que estavam relacionados com o aumento do depósito de no fígado, sendo obtidos  
10 41 casos. A quantificação do colágeno foi realizada em lâminas coradas pelo Picro-sírius  
11 (Figura 1C) examinada sob a luz polarizada, no aumento de 200 vezes (Figura 1D). A  
12 determinação do número de campos foi realizada através do Método da Média Acumulada  
13 (Williams 1977). Foram analisados 25 campos por corte, sendo o colágeno quantificado  
14 nas três zonas hepáticas, e excluída a região da cápsula hepática. Os campos para esta  
15 quantificação de colágeno foram capturados por meio de uma câmera acoplada a um  
16 microscópio e a um computador com o software para análise das imagens, “KS 300 – Carl  
17 Zeiss”. Os resultados foram expressos em média de porcentagem de fibras colágenas por  
18 campo analisado.

19            Para análise da esteatose foi utilizada a coloração pela Hematoxilina & Eosina e a  
20 objetiva de 10x. A intensidade foi classificada em: ausente (Grau 0); discreta (Grau 1),  
21 com vacúolos opticamente vazios no interior de hepatócitos próximos à veia centrolobular,  
22 zona III; moderada (Grau 2), com vacúolos nos hepatócitos das zonas II e III, ocupando o  
23 espaço entre a veia centrolobular e o espaço porta; e acentuada (Grau 3), com vacúolos nos  
24 hepatócitos das zonas I, periportal, II, e III (Brunt 1999) (Figura 2).



**Figura 1.** Análise do número de focos de eritropoiese extramedular e da porcentagem de colágeno. Na quantificação do número de focos de eritropoiese extramedular, estes são observados com coloração arroxeadada (HE, aumento 20x) (1A), e a mesma imagem com o esquema da ocular integradora de pontos demonstra como a contagem foi realizada (HE, aumento 20x) (1B). Campo corado pelo Picro-sírius demonstrando área de colágeno com coloração avermelhada intensa (PS, aumento 10x) (1C), e a mesma área vista sob luz polarizada (PS, aumento 10x) (1D).



**Figura 2.** Análise da intensidade de esteatose, demonstrando ausência de vacuolização lipídica (Grau 0) (HE, aumento 40x) (2A); vacúolos opticamente vazios no interior de hepatócitos próximos à veia centrolobular na esteatose discreta (Grau 1) (HE, aumento 40x) (2B); vacúolos nos hepatócitos das zonas II e III, ocupando o espaço entre a veia centrolobular e o espaço porta na esteatose moderada (Grau 2) (HE, aumento 20x) (2C); e vacúolos nos hepatócitos das zonas I, periportal ou II, e III, na esteatose acentuada (Grau 3) (HE, aumento 20x) (2D).

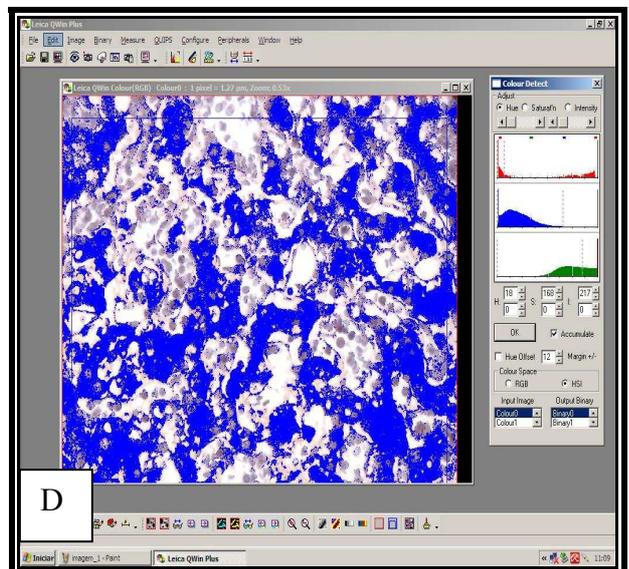
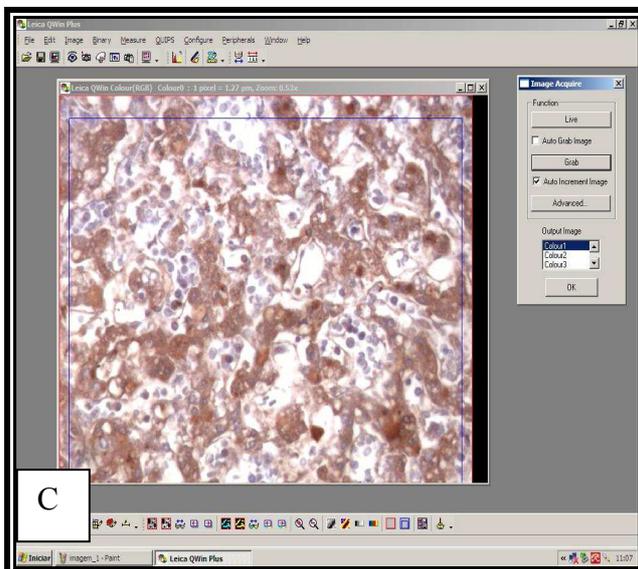
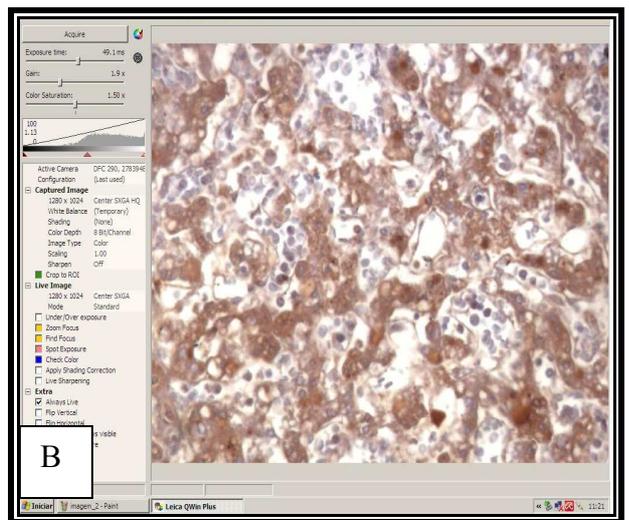
## 1 *Métodos imunohistoquímicos*

2 Para avaliação da expressão das principais citocinas e proteína relacionada à FIRS  
3 foram utilizados os anticorpos primários anti - IL6 (1:600 Abcam<sup>®</sup>), anti – TNF -  $\alpha$  (1:50  
4 DBS<sup>®</sup>) e anti - PCR (1:1000 Abcam<sup>®</sup>).

5 Os cortes de 4 a 5  $\mu\text{m}$  foram fixados nas lâminas com Poli-L Lisina<sup>®</sup>,  
6 posteriormente desparafinizados em xilol, hidratados em álcoois decrescentes até água  
7 destilada. No processo de recuperação antigênica foi utilizado o tampão Tris-EDTA pH 9  
8 para os anticorpos anti - TNF- $\alpha$  e anti - IL-6, e para o anti - PCR foi utilizado o tampão  
9 citrato pH 6. Os cortes histológicos colocados no tampão permaneceram por vinte minutos  
10 em panela a vapor, a 97°C e depois foram resfriados em temperatura ambiente. A lavagem  
11 das lâminas foi feita com tampão PBS 0,05M + Triton<sup>®</sup> X – 100 0,05%.

12 Para inibição da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio a 3%,  
13 que permaneceu sobre os cortes por cerca de duas horas. Posteriormente os cortes foram  
14 lavados com tampão PBS 0,05M + Triton<sup>®</sup> X – 100 0,05% e incubados com BSA 2% para  
15 redução da marcação inespecífica por mais uma hora. Os anticorpos primários foram  
16 colocados sobre as lâminas por um período médio de 12 horas. O material foi lavado  
17 novamente e incubado com o anticorpo secundário por cerca de trinta minutos. O  
18 complexo Avidina-Biotina foi, então, adicionado e permaneceu sobre os cortes por trinta  
19 minutos. Após esta fase, o material foi incubado com o substrato da peroxidase (DAB), à  
20 temperatura ambiente e, passado o tempo necessário à revelação, as lâminas foram  
21 colocadas em água destilada, processadas histologicamente e montadas em Entelan<sup>®</sup>  
22 (Anexo IV).

1            Posteriormente, por meio de técnicas de morfometria foi realizada a quantificação  
2 da imunomarcção no fígado. A mensuração foi efetuada utilizando-se uma câmara de  
3 vídeo conectada a um microscópio de luz comum e a um computador com um sistema  
4 analisador de imagens (Leica QWin Plus) (Figura 3). Para a determinação do número de  
5 medidas foi utilizado o Método da Média Acumulada (Williams 1977). Em todos os  
6 parâmetros avaliados foi padronizado a contagem de 67 medidas por lâmina, devido a  
7 similaridade do número de campos para cada marcador feito pela média acumulada. Os  
8 resultados foram expressos em porcentagem da área imunomarcada por campo.



**Figura 3:** Áreas imunomarcadas através do sistema analisador de imagens *Leica Qwin Plus*, que funciona com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz comum e um computador (3A). Em (3B) área inicial mostrada pela câmera com a barra de ferramentas à esquerda para configuração da imagem. (3C) Observa-se campo capturado com área imunomarcada com coloração acastanhada, e em (3D) o mesmo campo teve sua área imunomarcada marcada em azul, que posteriormente foi convertida em porcentagem pelo sistema analisador de imagens.

#### 1 **4.0 Análise estatística**

2 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através do teste de  
3 Kolmogorov-Smirnov e pela análise das variâncias. Em casos de distribuição normal e  
4 variâncias semelhantes, foi utilizado o teste "t" de Student na comparação entre dois  
5 grupos. Neste tipo de distribuição, os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio  
6 padrão ( $X \pm DP$ ). Quando a distribuição não foi normal, ou quando ela foi normal, mas  
7 com variâncias não semelhantes, foram utilizados testes não paramétricos: o teste de  
8 Mann-Whitney (T) na comparação entre dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis (H) na  
9 comparação entre três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn quando necessário.  
10 Neste tipo de distribuição os resultados foram expressos em mediana e valores mínimos e  
11 máximos (Med – Mín – Máx). A correlação entre duas variáveis foi realizada através do  
12 coeficiente de correlação de Pearson, quando normal, e quando apresentava pelo menos  
13 uma variável com distribuição não normal foi analisada pelo coeficiente de correlação de  
14 Spearman (Sr). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que o  
15 nível de significância foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

16

1 ***Objetivo específico 1:***

2 Comparar as alterações morfológicas hepáticas de crianças autopsiadas no período  
3 perinatal, e sua relação com citocinas e proteínas inflamatórias envolvidas no  
4 diagnóstico de FIRS, como a IL-6, o TNF- $\alpha$  e a PCR.

5

## 1 **Resultados**

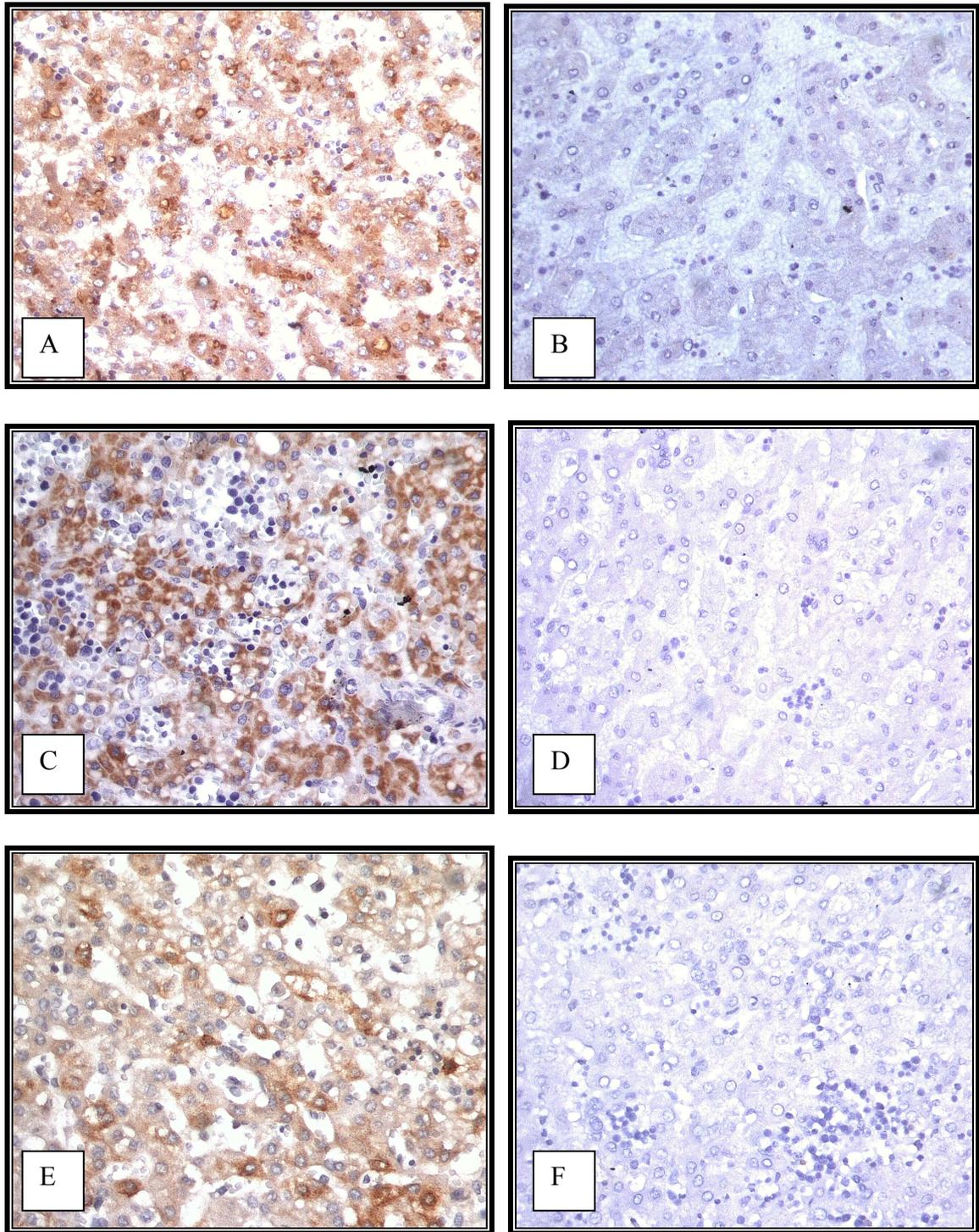
2 Dos 48 casos analisados, 21 (43,75%) eram de causa de morte por AP, 15 (31,  
3 25%) eram por IA e 12 (25%) eram casos de MF. A média de IG desses grupos foi,  
4 respectivamente, 32,64; 31,73 e 33,58 semanas.

5 Os casos de crianças com AP apresentaram menor porcentagem de eritropoiese  
6 extramedular (Tabela 1A). A porcentagem de eritropoiese foi maior nos casos com estresse  
7 agudo (Tabela 1B), prematuros (Tabela 1C) e classificados como PIG e GIG (Tabela 1D).  
8 Não houve diferença significativa da porcentagem de eritropoiese em relação ao baixo  
9 peso ao nascimento (Tabela 1E). Houve correlação negativa e significativa entre a IG e a  
10 porcentagem de eritropoiese extramedular (rS: -0,139, p=0,002). Em relação à eritropoiese,  
11 houve correlação positiva e significativa com a porcentagem de IL-6 (rS: 0,300, p≤0,001),  
12 negativa e significativa com a porcentagem de PCR (rS: -0,122, p=0,00754), e negativa  
13 com a porcentagem de TNF- $\alpha$  (rS: -0,0412, p=0,367).

14 A porcentagem de colágeno foi menor nos casos com baixo peso ao nascimento, e  
15 houve uma tendência a uma maior porcentagem nos casos PIG (Tabela 1D e 1E). Houve  
16 correlação positiva e significativa entre a IG e a porcentagem de colágeno (rS: 0,138,  
17 p≤0,001). Em relação à porcentagem de colágeno, as correlações foram: positiva com  
18 porcentagem de IL-6 (rS: 0,0730; p=0,055), positiva e significativa com porcentagem de  
19 TNF- $\alpha$  (rS: 0,120, p≤0,001), e negativa com a porcentagem à PCR (rS: -0,0169, p=0,64).

20 O grau de esteatose foi maior nos casos AP (0,952±1,253) e IA (0,933±1,182)  
21 (Tabela 1A), com estresse crônico (Tabela 1B), nas crianças a termo (Tabela 1C), nos  
22 casos PIG (1,00±1,42) e GIG (0,92±1,25) (Tabela 1D), quando comparados aos casos AIG  
23 (0,73±1,06). As crianças com baixo peso apresentaram porcentagem significativamente

1 menor de esteatose (Tabela 1E). Houve correlação positiva e significativa entre o grau de  
2 esteatose e a IG (rS: 0,271;  $p \leq 0,001$ ), o peso corporal (rS: 0,197;  $p \leq 0,001$ ), o peso  
3 hepático (rS: 0,116;  $p \leq 0,001$ ). A correlação foi positiva entre o grau de esteatose com a  
4 IL-6 (rS: 0,0331,  $p = 0,06$ ), positiva e significativa com a PCR (rS: 0,110,  $p \leq 0,001$ ), e  
5 negativa entre a esteatose e o TNF- $\alpha$  (rS: -0,0328,  $p = 0,06$ ).



**Figura 4.** Análise da marcação de citocinas e proteína pró-inflamatórias no fígado, em que são observadas as expressões dos cortes imunomarcados e do controle negativo. Em (A) hepatócitos imunomarcados por IL-6 e em (B) controle negativo correspondente. Em (C) hepatócitos imunomarcados por TNF- $\alpha$  e em (D) controle negativo correspondente. Em (E) hepatócitos imunomarcados por PCR e em (F) controle negativo correspondente (PAP, aumento 620 vezes).

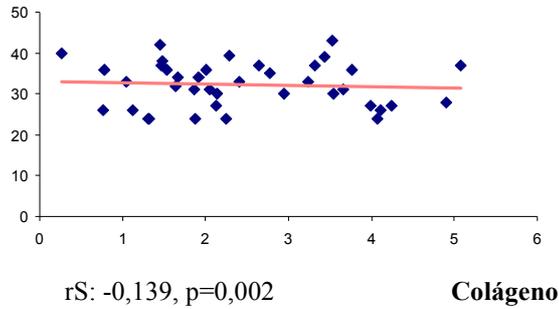
Tabela 1. Análise da porcentagem de eritropoiese extramedular, de colágeno e grau de esteatose no fígado de crianças autopsiadas.

Grupos	N (%)		% Eritropoiese			% Colágeno			Grau de Esteatose		
	48		Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
<b>A- Causa de morte</b>											
AP	21 (43,75)	8 <sup>1</sup>		4	36	2,43	0,02	22,08	0,00 <sup>5</sup>	0,00	3,00
IA	15 (31,25)	8		4	60	2,17	0,09	32,29	0,00 <sup>4</sup>	0,00	3,00
MF	12 (25,00)	12 <sup>1</sup>		4	80	2,37	0,44	14,25	0,00 <sup>4,5</sup>	0,00	3,00
				H = 11,581; p=0,003			H = 0,341; p=0,843		H=116,893; p≤0,001		
<b>B- Tipo de Estresse</b>											
Crônico	36 (75,00)	8		4	60	2,30	0,02	32,29	0,50	0,00	2,00
Agudo	12 (25,00)	12		4	80	2,37	0,44	17,25	0,00	0,00	1,00
				T = 32974,000; p=0,002		T = 23075,000; p=0,632			T=1468305,000; p≤0,001		
<b>C- IG</b>											
Termo	11 (22,92)	8		4	48	2,49	0,05	32,29	1,00	0,00	3,00
Prematuro	37 (77,08)	12		4	80	2,18	0,02	22,08	0,00	0,00	3,00
				T = 21320,500; p ≤ 0,001		T = 64867,000; p=0,293			T=1483983,000; p≤0,001		
<b>E - Peso para IG</b>											
PIG	6 (12,50)	20 <sup>2</sup>		4	80	2,41	0,17	32,29	0,00	0,00	3,00
GIG	12 (25,00)	16 <sup>3</sup>		4	68	2,10	0,02	18,29	0,00	0,00	3,00
AIG	30 (62,50)	8 <sup>2,3</sup>		4	48	2,32	0,09	22,08	0,00	0,00	3,00
				H = 69,765; p≤0,001		H = 5,094; p=0,078			H= 5,692, p= 0,058		
<b>F- Baixo Peso</b>											
Sim	31 (64,58)	8		4	80	2,30	0,02	32,29	0,00	0,00	3,00
Não	17 (35,42)	8		4	68	3,13	0,03	26,35	1,00	0,00	3,00
				T = 35427,000; p=0,646		T = 142608,500; p=0,005			T= 2301182,000; p≤0,001		

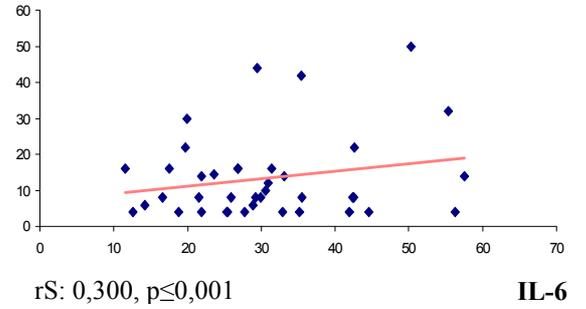
<sup>1 a 5</sup> Dunn, p: <0,05. AP: Anóxia Perinatal, IA: Infecção Ascendente, MF: Malformação, IG: Idade Gestacional, PIG: Pequeno para a Idade Gestacional, GIG: Grande para a Idade Gestacional, AIG: Adequado para a Idade Gestacional, Med: Mediana; Min: Mínimo; Max: Máximo.

Gráfico 1 - Correlação entre a IG e o colágeno, grau de esteatose e eritropoiese extramedular; e correlação da eritropoiese extramedular e as citocinas e proteína pró-inflamatórias em crianças autopsiadas.

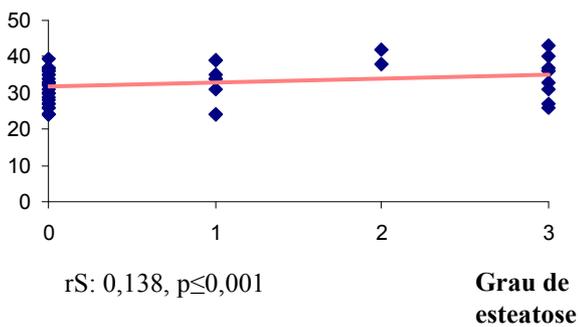
**Idade gestacional**



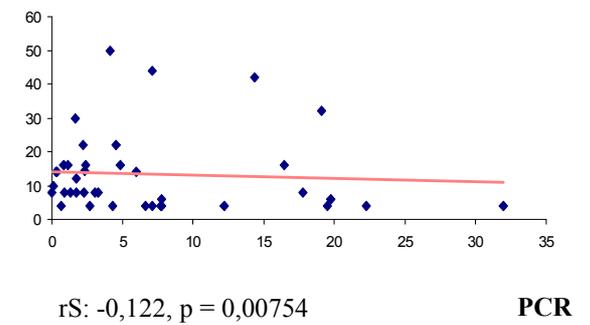
**Eritropoiese Extramedular**



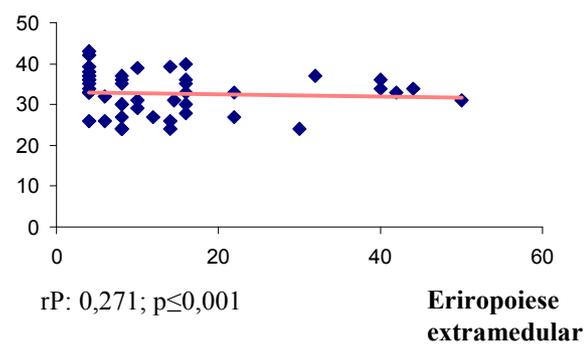
**Idade Gestacional**



**Eritropoiese extramedular**



**Idade Gestacional**



**Eritropoiese extramedular**

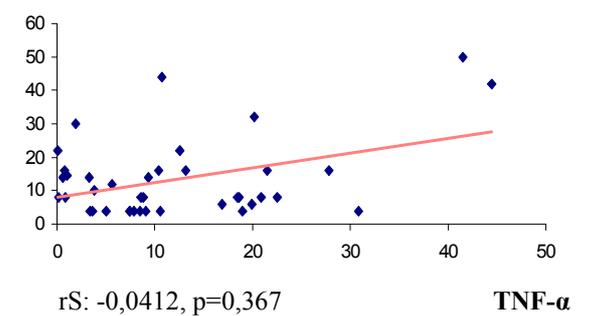
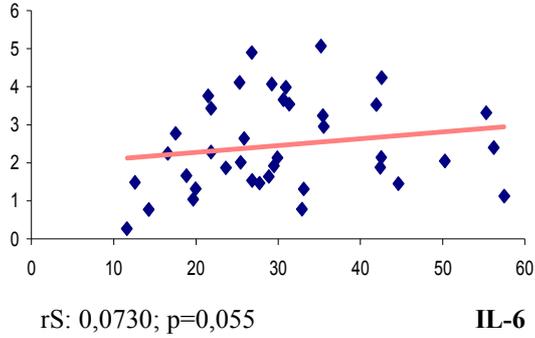
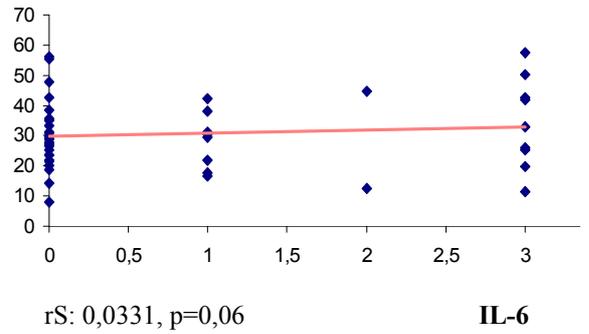


Gráfico 2 - Correlação entre o colágeno e as citocinas e proteína pró-inflamatórias; e entre grau de esteatose e as citocinas e proteína pró-inflamatórias em crianças autopsiadas

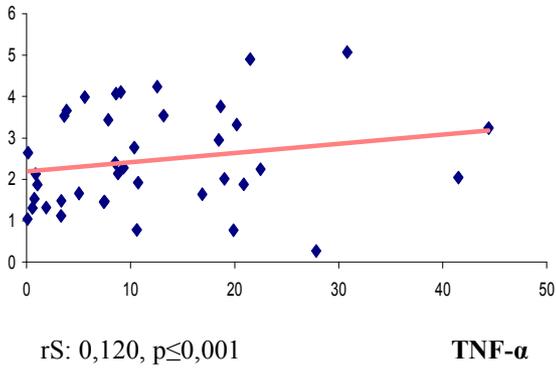
**Colágeno**



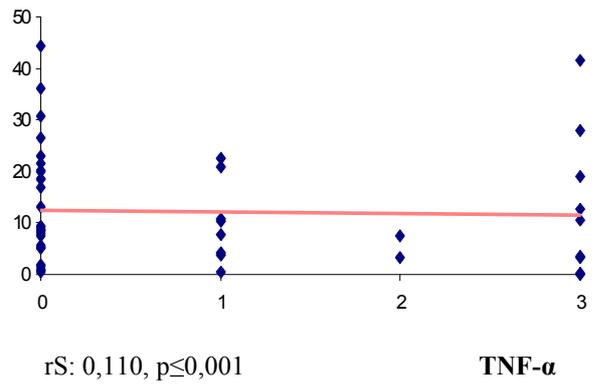
**Grau de esteatose**



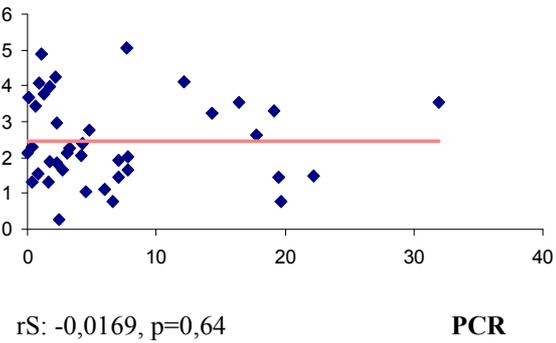
**Colágeno**



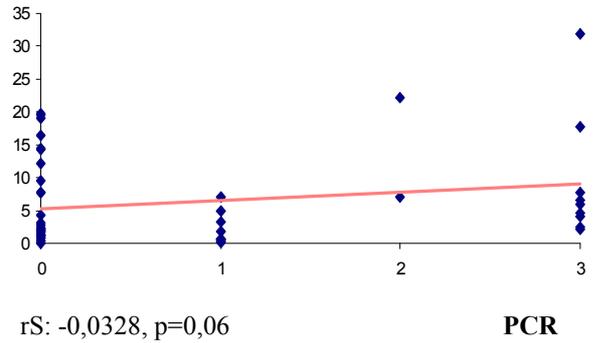
**Grau de esteatose**



**Colágeno**



**Grau de esteatose**



## ***Discussão***

1           Em nossos resultados o número de focos de eritropoiese hepática foi maior nas  
2 crianças com causa de morte por Malformação. Muitos trabalhos relacionam o aumento do  
3 número de focos de eritropoiese extramedular ao estresse crônico, como o associado à  
4 infecção e a hipóxia (Naughton e cols. 1979, Tamiolakis e cols. 2004, Pfisterer, Faber,  
5 Horn 2005). Na infecção, o aumento da eritropoiese hepática representa uma fase tardia da  
6 resposta fetal que ocorre quando há infecção do líquido amniótico (Miranda e cols. 2006).  
7 Na hipóxia, marcadores hepáticos como *Notch/Delta*, teriam como única função a  
8 manutenção do estoque de células tronco hematopoiéticas no fígado, que funcionaria como  
9 uma resistência do feto ao estresse causado por hipóxia. Nestes casos, há aumento dos  
10 níveis de eritropoetina que induz a expressão de moléculas Delta 4, proteína ativada nas  
11 células tronco hematopoiéticas, aumentando a quantidade de eritrócitos para aliviar a  
12 hipóxia enquanto os estímulos permanecem (Dando e cols. 2005).

13           Mesmo estando de acordo na literatura esse aumento da eritropoiese nos casos de  
14 estresse intra-uterino, alguns trabalhos demonstram que a intensidade do estímulo pode  
15 interferir na eritropoiese extramedular. Em estudos com fetos que morreram devido a  
16 prematuridade, àqueles cujas mães tinham pré-eclampsia apresentaram uma redução em  
17 cerca de 25% da eritropoiese hepática, em comparação àqueles que tinham mães sem  
18 complicações gestacionais (Tamiolaki e cols. 2004). Estes dados demonstram que o maior  
19 número de intercorrências contribui para redução da eritropoiese hepática. Como todos os  
20 nossos casos eram graves e culminaram com o óbito, o estresse instalado pode ter reduzido  
21 a eritropoiese hepática.

22           Em nossos casos, a maioria dos malformados apresentava malformação do sistema  
23 renal. Nos casos com agenesia renal e outras doenças congênitas graves do rim, o fígado é

1 capaz de compensar a redução ou a ausência de produção de eritropoetina (Fahnenstich e  
2 Dame 1996). Em autopsias realizadas em crianças com vinte semanas a um ano de idade  
3 foram encontrados muitos casos com displasia renal, e dentre esses casos, cerca de 98%  
4 apresentaram hematopoiese extramedular aumentada (Kakkar, Menon e Radotra 2006).  
5 Dessa forma, o aumento da eritropoiese nos casos malformados pode significar um  
6 mecanismo compensatório frente às alterações na produção de eritropoetina.

7       Existem ainda evidências de que a supressão da eritropoiese hepática ocorre devido  
8 ao aumento da concentração de glicocorticóides no plasma fetal. Estudos experimentais  
9 demonstram que a retirada da hipófise em fetos de ratas aumenta significativamente a  
10 eritropoiese hepática, e que os efeitos são semelhantes em fetos de mães bilateralmente  
11 adrenalectomizadas, sendo revertido pela administração de cortisol. Esses efeitos podem  
12 ser explicados pelo fato de precursores de eritrócitos no fígado fetal apresentarem sítios de  
13 ligação com características de receptores para corticóide, principalmente nas gestações a  
14 termo (Moritz e cols. 1997). Considerando que em nossos casos os malformados foram  
15 considerados como estresse agudo, em que a causa de óbito atuou predominantemente  
16 durante o nascimento, estas crianças podem ter apresentado menores níveis de cortisol que  
17 os demais grupos analisados, e, portanto, maior número de focos de eritropoiese hepática.  
18 Este mecanismo também explicaria a redução do número de focos de eritropoiese nos  
19 casos de IA e AP analisados.

20       Os casos PIG e GIG apresentaram maior quantidade de focos de eritropoiese  
21 extramedular, quando comparados ao AIG. As crianças PIG e GIG, em condições de  
22 hipóxia fetal crônica, podem apresentar aumento da utilização de ferro, e  
23 conseqüentemente eritropoiese elevada (Karaduman, Ergin e Kiliç 2001), capaz de induzir  
24 a diferenciação das células-tronco na direção da eritropoiese (Meberg, Jakobsen e

1 Halvorsen 1982). O estresse oxidativo é maior e mais persistente nos casos PIG (Gveric-  
2 Ahmetasevic e cols. 2009) e também nos casos de crianças GIG (Chiavaroli e cols. 2009).  
3 Todos os nossos casos apresentavam condições graves de estresse, que culminaram com o  
4 óbito. Independente da causa, os PIG e GIG apresentaram maior número de focos de  
5 eritropoiese no fígado, demonstrando que estas crianças necessitam de uma avaliação mais  
6 detalhada nos casos de óbito, assim como um melhor acompanhamento e investigação  
7 daquelas que sobrevivem, visando elucidar os mecanismos que tornam as alterações nestas  
8 crianças mais frequentes.

9 Houve uma correlação negativa e significativa entre a eritropoiese extramedular e a  
10 IG. A contagem eritroblástica hepática diminui à medida que o período gestacional  
11 aproxima-se do final, havendo uma substituição da eritropoiese hepática pela medular, com  
12 o aumento de eritrócitos e de hemoglobina (Ragonesi, Bertini e Camano 1997). Diante  
13 disso, crianças prematuras tendem a apresentar eritropoiese hepática mais elevada do que  
14 crianças a termo, em decorrência da prematuridade da medula óssea, que irá assumir  
15 completamente a função hematopoiética apenas ao final do período gestacional.

16 Mecanismos fisiológicos de resposta à combinação de citocinas pró-inflamatórias,  
17 que são potencializadas pela ação do cortisol como a IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ , e hormônios,  
18 modulam a hematopoiese, principalmente dos eritrócitos hepáticos (Lim e cols. 2000;  
19 Chagraoui e cols. 2003; Dolznig e cols. 2005). Para confirmação deste mecanismo, um  
20 estudo propõe que seriam necessários estudos semelhantes ao nosso, mas que além da  
21 contagem do número de focos de , realizassem as análises de expressão de citocinas (Lee e  
22 cols. 2002).

23 Houve correlação positiva e significativa entre a porcentagem de eritropoiese  
24 extramedular e a IL-6. As concentrações de IL-6 no sangue do cordão umbilical são

1 preditoras de aumento de células sanguíneas nucleadas (Gotsch e cols. 2007). A IL-6 pode  
2 ser considerada um fator de crescimento que estimula as células tronco pluripotentes e  
3 multipotentes a se proliferarem (Dorshkind 1990), pois possui a atividade biológica  
4 sinergicamente com a IL-3, induzindo a formação de multi-linhagens de colônias da  
5 hematopoiese (Naka, Nishimoto e Kishimoto 2002).

6 Houve uma correlação negativa e significativa entre a eritropoiese extramedular e a  
7 PCR. Esperava-se encontrar níveis elevados de PCR, visto que a IL-6 aumentada induz a  
8 síntese dessa proteína de fase aguda. Um estudo que utiliza células neoplásicas como um  
9 exemplo de inflamação crônica, considera o aumento de IL-6 como um forte indicador de  
10 mau prognóstico, por aumentar o crescimento destas células, o que também pode ser  
11 considerado para a PCR (Bataille e cols. 1992). Uma possível explicação para essa redução  
12 é que a IL-6 também pode expor os hepatócitos à lesão e a morte celular por apoptose,  
13 reduzindo o número de hepatócitos viáveis para síntese de PCR (Tsochatzis e cols. 2009).

14 Com relação à porcentagem de colágeno, ela foi menor nos casos com baixo peso  
15 ao nascimento, e houve uma tendência a uma maior porcentagem nos casos FIG. Alguns  
16 estudos demonstram que é possível que crianças com privação de nutrientes durante a  
17 gestação apresentem inicialmente redução do peso corporal, sendo consideradas como  
18 baixo peso, evoluindo para redução das medidas fetais, e passando a serem denominadas  
19 FIG. A privação alimentar afeta os níveis de hormônios como a insulina, hormônio do  
20 crescimento, somatomedina e glicocorticosteróides, interferindo no crescimento e ganho de  
21 peso fetal, e no desenvolvimento hepático, bem como na formação de sua matriz  
22 extracelular (Reif e cols. 1993), como demonstrado pelos nossos achados. Contudo,  
23 crianças FIG sofrem um estresse oxidativo exacerbado, principalmente durante o período  
24 perinatal, devido à insuficiência do sistema antioxidante (Gveric-Ahmetasevic e cols.

1 2009). Dessa forma, as alterações celulares podem ser mais evidentes nos casos FIG, e a  
2 morte mais acentuada de hepatócitos pode justificar o aumento de colágeno nestes casos.

3 Houve correlação positiva e significativa entre a IG e a porcentagem de colágeno.  
4 De uma forma geral, como parte do processo de amadurecimento hepático ocorre uma  
5 elevação da síntese dos constituintes da matriz extracelular em maior intensidade com a  
6 progressão da gestação (Kamiya, Gonzáles e Nakauchi 2006). O colágeno IV e a  
7 fibronectina aumentam em até quatro vezes sua quantidade no período perinatal, de acordo  
8 com modelos experimentais em ratos (Reif e cols. 1990).

9 Em relação à porcentagem de colágeno, a correlação foi positiva com a  
10 porcentagem de IL-6, e positiva e significativa com a porcentagem de TNF- $\alpha$ . A literatura  
11 demonstra que em ratos *knockout* para IL-6 existe uma redução na quantidade da resposta  
12 inflamatória e uma menor formação de tecido conjuntivo, principalmente de colágeno tipo  
13 I (Junge e cols. 2009). Isso demonstra que em quadros inflamatórios com elevação de IL-6,  
14 também há elevação de colágeno. O mesmo ocorre com o TNF- $\alpha$ , citocina mediadora do  
15 sistema imune e da inflamação, que em situações de danos teciduais tende a promover a  
16 reparação do local com o depósito de material de cicatrização (Zylberberg e cols. 1999).

17 A correlação entre colágeno e PCR foi negativa. Contradizendo nossos achados,  
18 alguns trabalhos experimentais com camundongos revelam que a PCR pode induzir a  
19 síntese de colágeno por meio da ativação do fator de crescimento transformador beta-1  
20 (TGF- $\beta$ 1). O TGF- $\beta$ 1 é considerado um poderoso estímulo para a formação de colágeno *in*  
21 *vitro*, principalmente de colágeno tipo I e III, que são depositados nos espaços  
22 perisinusoidais e, além disso, também pode estimular as células estelares hepáticas  
23 (Kanzler e cols. 1999). Uma possível hipótese seria que o dano celular provocado pelo

1 quadro inflamatório e posterior depósito de colágeno impediria a síntese da PCR, por  
2 diminuir a quantidade de hepatócitos envolvidos em sua síntese.

3 A produção de colágeno no fígado parece ser modificada por intercorrências  
4 perinatais ao longo do período gestacional. O estresse crônico é capaz de garantir uma  
5 resposta inflamatória sistêmica, com participação de citocinas importantes como a IL-6 e o  
6 TNF- $\alpha$ , que permitem a evolução para um quadro cicatricial, elevando as taxas de colágeno  
7 no fígado.

8 Em nossos casos a esteatose foi maior nos casos com causa de morte por IA e AP.  
9 O acúmulo lipídico nos hepatócitos pode ocorrer pelo aporte exagerado de gordura, pela  
10 utilização das reservas lipídicas periféricas ou pela peroxidação lipídica (Savransky e cols.  
11 2007). Condições de estresse crônico, como a hipóxia e a sepse, estão relacionadas com o  
12 estresse oxidativo persistente, que induz a liberação de citocinas inflamatórias e promove a  
13 peroxidação lipídica no fígado, promovendo a formação de radicais livres e a lesão do  
14 parênquima hepático (Savransky e cols. 2007; Persico e Iolascon 2010). Além disso,  
15 alguns estudos descrevem que nesse tipo de lesão hepática são encontrados altos níveis de  
16 alanina transaminase (Savransky e cols. 2007), esteatose hepática, inflamação lobular e  
17 fibrose (Tian JL, 2010).

18 Os resultados mostraram que a esteatose foi mais frequente em fetos a termo e que  
19 apresentou correlação positiva e significativa com a IG. Estudos que mostram a variação  
20 de vacuolização lipídica de acordo com a IG em fetos humanos não foram encontrados.  
21 Em estudos experimentais em ratos, os vacúolos lipídicos foram observados pela primeira  
22 vez no 15º dia de gestação, e seu número e tamanho aumentou até o final da gestação  
23 (Daimon e cols. 1982). O metabolismo fetal e, conseqüentemente, seu crescimento,  
24 dependem diretamente dos nutrientes que atravessam a placenta. Na gravidez, há

1 adaptações no metabolismo materno, a fim de fornecer substrato suficiente para o  
2 desenvolvimento fetal. O aumento da atividade lipolítica de adipócitos maternos tem sido  
3 observado em mulheres grávidas, sendo responsável pelo aumento de ácidos graxos livres  
4 durante as últimas semanas de gestação (Benassayag e cols. 1997). No final da gravidez,  
5 haveria a síntese de lipídios pelos tecidos fetais, que associado com a transferência de  
6 lipídeos maternos, aumentaria a oferta de ácidos graxos para o fígado fetal causando o  
7 acúmulo nos hepatócitos fetais (Reif 1993).

8 As crianças PIG e GIG apresentaram maiores graus de esteatose. Em modelos de  
9 restrição de crescimento intra-uterino e ganho de peso insuficiente foi observado  
10 infiltração gordurosa hepática, provavelmente resultante de uma combinação de aumento  
11 do fluxo de ácidos graxos a partir de tecido adiposo, juntamente com a síntese diminuída  
12 da lipoproteína beta que transporta triglicerídeos, favorecendo seu acúmulo (Reif e cols.  
13 1993). Esse modelo reproduz os casos considerados PIG, e apresenta resultados  
14 semelhantes aos que encontramos.

15 Supondo que os casos GIG tenham relação com o acúmulo de gordura corporal, é  
16 possível que a esteatose ocorra em maior quantidade em decorrência do maior aporte de  
17 gordura no organismo (Hay e cols. 2008), ou pelo estresse oxidativo a que essas crianças  
18 possam estar expostas. O estresse oxidativo pode atuar nas crianças pequenas e nas grandes  
19 para a IG e favorecer a peroxidação lipídica, que lesa os hepatócitos e promove a esteatose  
20 (Savransky e cols. 2007; Persico e Iolascon 2010).

21 As crianças com baixo peso apresentaram menor grau de esteatose, e houve  
22 correlação positiva e significativa entre o peso corporal e a esteatose hepática. A esteatose  
23 hepática em crianças é associada principalmente a obesidade, e também ao aumento de  
24 triglicerídeos, síndrome de resistência à insulina, diabetes e lesão de células hepáticas

1 durante o estresse oxidativo (Roberts 2003; Nanda 2004). Em adultos tem se relacionado a  
2 perda de peso corporal com a diminuição em até 70% da esteatose hepática (Tilg e  
3 Moschen 2010). Estes dados estão de acordo com este estudo, que comprova esta  
4 tendência de variação da esteatose em relação ao peso, mesmo durante o desenvolvimento  
5 intra-uterino.

6 Contudo, alguns trabalhos encontraram que em casos de restrição alimentar em  
7 ratos ocorre o desenvolvimento de esteatose hepática, que se agrava à medida que a  
8 restrição é prolongada (Reif e cols. 1993). Dessa forma, as crianças com baixo peso  
9 apresentam distribuição da esteatose de forma semelhante a adultos, enquanto os casos PIG  
10 podem possuir maiores complicações que comprometem a função hepática e interferem na  
11 distribuição da esteatose.

12 O grau de esteatose mostrou correlação positiva e significativa com a IL-6. A  
13 literatura mostra dados diferentes dos encontrados neste estudo. A IL-6 é considerada  
14 hepatoprotetora em fígados com esteatose, por reprimir o estresse oxidativo, e por prevenir  
15 a disfunção mitocondrial e o desequilíbrio lipídico (Sánchez-Garrido e cols. 2009;  
16 Tsochatzis, Papatheodoridis e Archimandritis 2009, Hijona e cols. 2010). No entanto, esse  
17 parece ser um efeito paradoxal, pois a IL-6 pode sensibilizar o fígado e expor à lesão e a  
18 morte celular por apoptose (Tsochatzis, Papatheodoridis e Archimandritis 2009). Desse  
19 modo, em nossos casos, é possível que o processo inflamatório tenha sido muito  
20 exacerbado, perdendo o efeito hepatoprotetor da IL-6. Logo, a IL-6 aumentada parece ser  
21 protetora para o hepatócito até determinado limite, que a partir do qual, pode ser a  
22 responsável pelo desenvolvimento de lesões dos hepatócitos e esteatose.

23 Houve correlação positiva e significativa entre o grau de esteatose e a PCR. Existe  
24 uma ampla associação entre os níveis elevados de PCR com a esteatose não alcoólica

1 (Oruc e cols. 2009; Yang e cols. 2010). Essa proteína de fase aguda foi relacionada com a  
2 síndrome metabólica e com o diabetes tipo 2, sendo encontrada em níveis muito altos em  
3 pacientes com esteatose e com esteatohepatite. Esse fato permite considerar a PCR como  
4 um marcador da esteatose não alcoólica (Oruc e cols. 2009). É possível que essa íntima  
5 relação também esteja associada com os níveis elevados de IL-6.

6 O grau de esteatose se correlacionou de maneira negativa e significativa com o  
7 TNF- $\alpha$ . Nossos resultados foram controversos para a correlação entre TNF-  $\alpha$  e esteatose.  
8 Foi demonstrado em estudos com animais que a neutralização do TNF- $\alpha$  provocou melhora  
9 na esteatose e na resistência à insulina (Tsochatzis e cols. 2009), e ainda que ele foi  
10 responsável pela aparecimento e progressão da esteatose até a necrose hepática (Sánchez-  
11 Garrido e cols. 2009). Uma possível explicação para a correlação negativa seria a de que,  
12 nesses quadros os níveis de IL-6 também estariam aumentados e atuariam na estimulação  
13 de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10, e de proteínas antagonicas para a resposta  
14 inflamatória, como a IL-1ra, antagonista do receptor da IL1, que diminuiriam a atuação do  
15 TNF- $\alpha$  (Petersen 2004). Além disso, a IL-6 atua favorecendo a oxidação do tecido adiposo  
16 e o aumento da lipólise. Um dos mecanismos seria o aumento de receptores solúveis de  
17 TNF- $\alpha$ , que se ligam a ele e inibem sua atuação, e o outro seria por diminuição dos  
18 adipócitos viáveis para síntese de TNF- $\alpha$ , por serem oxidados pela IL-6 (Petersen 2004).

19 Em nossos casos o acúmulo lipídico nos hepatócitos parecem se relacionar mais  
20 com o quadro inflamatório desencadeado por agentes estressantes, como a infecção e a  
21 anóxia intra-uterina, sendo dependente do maior tempo de exposição às alterações intra-  
22 uterinas e da IG. Esse depósito gorduroso favorece ao aumento do peso hepático e tem  
23 relação com o aumento do peso corporal. A condição inflamatória no organismo fetal é

- 1 mediada, pela IL-6 e pela PCR, contudo o TNF- $\alpha$  também atua nesse quadro inflamatório,
- 2 mas parece ser controlado pela atuação hepatoprotetora da IL-6.

3

## 1            **Conclusão**

2            Desse modo, conclui-se que as citocinas e a PCR possuem um papel fundamental  
3 no desencadeamento de alterações hepáticas, pois são uns dos responsáveis por induzir o  
4 desenvolvimento exacerbado de eritropoiese extramedular, esteatose e colágeno. A IL-6,  
5 principalmente, tem uma relação direta com todas as alterações hepáticas descritas,  
6 decorrente da sua participação desde o início da resposta inflamatória sistêmica frente a  
7 agentes agressores que proporcionaram situações de estresse ao feto. A PCR e o TNF- $\alpha$   
8 atuaram complementando a ação da IL-6, respectivamente, na esteatose e na síntese  
9 exacerbada de colágeno, potencializando a resposta inflamatória sistêmica.

10           Quanto ao tipo de estresse e as alterações morfológicas, a atuação da IL-6 não se  
11 diferenciou, pois esteve presente tanto no tipo agudo, quanto no crônico. A PCR, no  
12 entanto, se expressou mais nos casos de estresse crônico, o mesmo foi visto no TNF- $\alpha$  que  
13 atua mais em um processo inflamatório agressivo e prolongado com evolução para a  
14 cicatrização.

15

1            ***Objetivo específico 2:***

2            Comparar as porcentagens expressas de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR no fígado de crianças  
3            autopsiadas no período perinatal de acordo com os seguintes parâmetros: peso fetal,  
4            idade gestacional, causa de morte e tipo de estresse.

5

## 1 **Resultados**

2 A percentagem de IL-6 foi significativamente maior nos casos com MF (Tabela  
3 2A), classificados como estresse agudo (Tabela 2B). Os prematuros (Tabela 2C)  
4 apresentaram percentagem de IL-6 significativamente maior. Não houve diferença  
5 significativa entre a percentagem de IL-6 e a classificação do peso para a IG (Tabela 2D) e  
6 em relação ao baixo peso detectado ao nascimento (Tabela 2E). Houve correlação  
7 negativa e significativa entre a percentagem de IL-6 e a IG (rS: -0,114;  $p \leq 0,001$ ) e com o  
8 peso corporal (rS: -0,07;  $p \leq 0,001$ ).

9 Os casos com IA quando comparados aos MF (Tabela 2A), estresse crônico (Tabela  
10 2B) e a termo (Tabela 2C) apresentaram percentagem de PCR significativamente maior.  
11 Avaliando separadamente os casos a termo e prematuros, os prematuros com infecção  
12 apresentaram menor percentagem de PCR ( $H=777,655$ ;  $p \leq 0,001$ ). As crianças PIG e GIG  
13 apresentaram percentagem de PCR significativamente maior do que as crianças AIG  
14 (Tabela 2D). As crianças com baixo peso apresentaram percentagem de PCR  
15 significativamente menor (Tabela 2E). Houve correlação positiva e significativa entre a IG  
16 e a percentagem de PCR (rS: 0,222,  $p \leq 0,001$ ) e entre o peso corporal e a percentagem de  
17 PCR (rS: 0,290;  $p \leq 0,001$ ).

18 Os casos com AP apresentaram maior percentagem de TNF- $\alpha$  (Tabela 2A). Os  
19 casos com estresse agudo (Tabela 2B) apresentaram percentagem de TNF- $\alpha$   
20 significativamente maior. Não houve diferença significativa da expressão de TNF- $\alpha$  entre  
21 as crianças a termo e prematuras (Tabela 2C). As crianças PIG apresentaram percentagem  
22 de TNF- $\alpha$  significativamente maior (Tabela 2D). Não houve diferença significativa da  
23 expressão de TNF- $\alpha$  em relação ao baixo peso de nascimento (Tabela 2E). Foram

1 observadas as seguintes correlações em relação a porcentagem de TNF- $\alpha$ : positiva e  
2 significativa com a IG (rS:0,0379, p=0,0315) e com o peso corporal (rS:0,038; p=0,032).

3 O peso das crianças com AP, IA e MF foi significativamente maior do que o  
4 esperado para a população (Tabela 3).

Tabela 2. Análise da porcentagem de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR no fígado de crianças autopsiadas

Grupos	N (%)			%IL-6			%PCR			% TNF- $\alpha$		
	48 (100)	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
<b>A- Causa de morte</b>												
AP	21 (43,75)	26,86 <sup>1,3</sup>	88,18	2,41	3,07 <sup>5</sup>	58,06	0,03	10,46 <sup>10,11</sup>	54,89	0,01	54,89	54,89
IA	15 (31,25)	29,51 <sup>2,3</sup>	78,75	1,26	5,22 <sup>4,5</sup>	62,69	0,00	4,75 <sup>9,11</sup>	57,44	0,02	57,44	57,44
MF	12 (25,00)	32,91 <sup>1,2</sup>	79,64	2,00	2,61 <sup>4</sup>	46,83	0,02	9,30 <sup>9,10</sup>	82,39	0,05	82,39	82,39
		H = 42,911; p $\leq$ 0,001			H = 28,920, p $\leq$ 0,001			H = 101,374; p $\leq$ 0,001				
<b>B- Tipo de Estresse</b>												
Crônico	36 (75,00)	27,85	70,38	1,26	3,63	62,69	0,00	8,35	57,44	0,01	57,44	57,44
Agudo	12 (25,00)	32,91	79,64	2,00	2,61	46,83	0,02	9,30	82,39	0,05	82,39	82,39
		T = 1341457,000;p $\leq$ 0,001			T=1212794,000; p $\leq$ 0,001			T=1437612,000; p=0,003				
<b>C- IG</b>												
Termo	11 (22,92)	25,97	71,32	1,26	8,45	62,69	0,04	7,39	50,27	0,01	50,27	50,27
Prematuro	37 (77,08)	29,82	70,38	2,00	2,85	58,06	0,00	9,22	63,36	0,05	63,36	63,36
		T = 1052865,000;p $\leq$ 0,001			T=1449215,000; p $\leq$ 0,001			T = 1159934,500; p=0,249				
<b>D – Peso para IG</b>												
PIG	6 (12,50)	27,42	76,64	1,97	4,79 <sup>7,8</sup>	46,12	0,01	16,05 <sup>12,13</sup>	82,39	0,02	82,39	82,39
GIG	12 (25,00)	29,76	88,18	2,45	5,89 <sup>6</sup>	58,06	0,08	8,20 <sup>12</sup>	55,02	0,04	55,02	55,02
AIG	30 (62,50)	29,40	70,38	1,26	2,67 <sup>6,7,8</sup>	62,69	0,00	8,43 <sup>13</sup>	57,44	0,01	57,44	57,44
		H=0,0892; p=0,956			H = 109,947, p $\leq$ 0,001			H = 30,065; p $\leq$ 0,001				
<b>E- Baixo Peso</b>												
Sim	31 (64,58)	27,12	75,71	1,97	2,82	62,69	0,01	9,22	63,36	0,03	63,36	63,36
Não	17 (35,42)	29,45	88,18	1,26	6,26	58,56	0,04	7,73	57,44	0,01	57,44	57,44
		T = 1581396,500 ; p = 0,190			T= 1897139,500 ; p $\leq$ 0,001			T = 1581176,000; p= 0,147				

<sup>1 a 13</sup> Dunn, p: <0,05. AP: Anóxia Perinatal, IA: Infecção Ascendente , MF: Malformação, IG: Idade Gestacional, PIG: Pequeno para a Idade Gestacional, GIG: Grande para a Idade Gestacional, AIG: Adequado para a Idade Gestacional, Med: Mediana; Min: Mínimo; Max: Máximo.

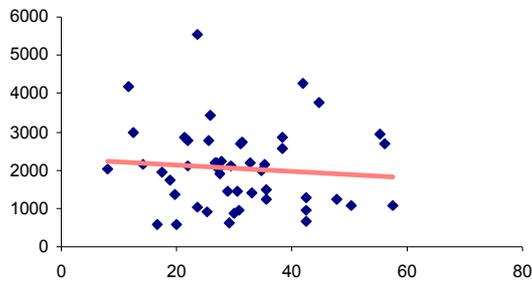
Tabela 3. Distribuição do peso perinatal esperado para a IG entre os grupos de causas de morte nas autopsias perinatais.

<b>Grupo</b>	<b>N (%)</b>	<b>Idade Gestacional</b> (semanas) <b>X ± DP</b>	<b>Peso Perinatal</b> (gramas) <b>X ± DP</b>	<b>PE</b> (gramas)	<b>♦ p</b>
AP	21 (43,75)	32,4 ± 5,4	2110,48 ± 966,01	1488	<0,05
IA	15 (31,25)	31,3 ± 5,9	1828,73 ± 1035,47	1359	<0,05
MF	12 (25,00)	33,5 ± 2,4	2225,00 ± 1149,84	1663	<0,05
Total	48 (100,00)				

♦ "t" de *Student* para uma média. PE: Peso Esperado para população. AP: Anóxia Perinatal, IA: Infecção Ascendente, MF: Malformação.

Gráfico 3 - Correlação entre o peso corporal e as citocinas e proteína pró-inflamatória e entre a IG e as citocinas e proteína pró-inflamatória nas crianças autopsiadas.

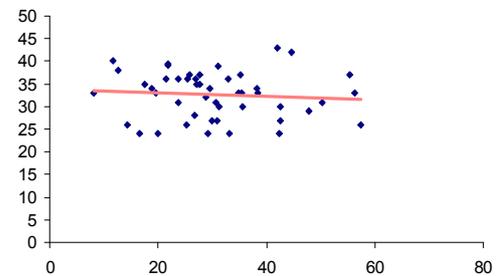
**Peso corporal**



rS: -0,07;  $p \leq 0,001$

**IL-6**

**Idade Gestacional**

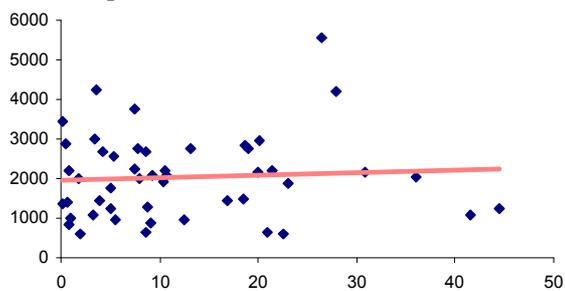


rS: -0,114;  $p \leq 0,001$

**IL-6**

1

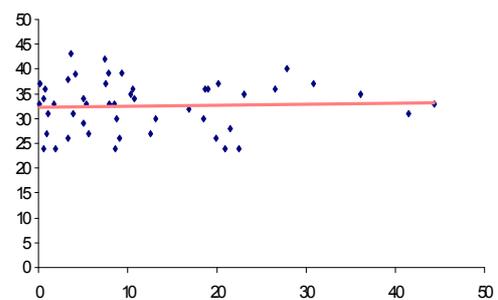
**Peso corporal**



rS: 0,290;  $p \leq 0,001$

**TNF-α**

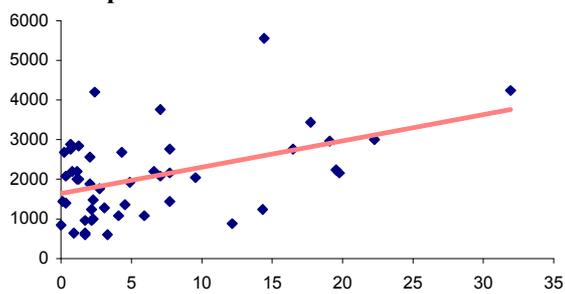
**Idade Gestacional**



rS: 0,0379;  $p = 0,0315$

**TNF-α**

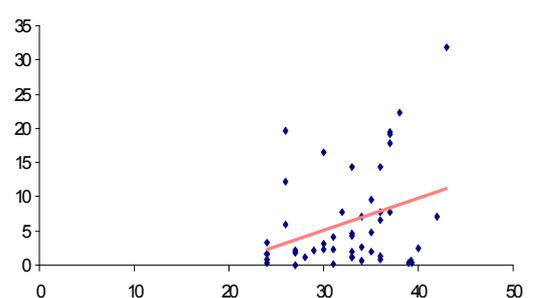
**Peso corporal**



rS: 0,038;  $p = 0,032$

**PCR**

**Idade Gestacional**



rS: 0,222;  $p \leq 0,001$

**PCR**

## 1 **Discussão**

2           A IL-6 esteve mais expressa nos casos com MF. Estudos em neonatos  
3 demonstram que a IL-6 chega a seu pico de produção em 2-3 horas após a exposição a  
4 um agente estressor, e diminui num período de 6-8 horas. Quando é realizada a  
5 mensuração sérica de IL-6, nos tempos 0, 12 e 24 horas após o diagnóstico de sepse,  
6 seus níveis são elevados apenas no momento do diagnóstico (Gonzalez e cols. 2003).  
7 Em nossos dados, os casos com MF ou estresse agudo sofreram a ação do agente  
8 estressor apenas no momento do parto. Dessa forma, os níveis de IL-6 encontrados  
9 podem ter relação com este curto intervalo de tempo entre o estímulo e o óbito. Nas  
10 demais causas de óbito, como a ação inicial do estímulo pode ter ocorrido num intervalo  
11 maior, os níveis de IL-6 detectados poderiam estar na fase de redução, justificando os  
12 valores de IL-6 nas causas de morte por IA e AP.

13           Em nossos resultados as crianças prematuras apresentaram níveis de IL-6  
14 maiores. Um estudo demonstrou que os níveis de IL-6 no sangue do cordão umbilical  
15 foram maiores nas placentas de prematuros, e que nesses casos, a frequência de sepse  
16 neonatal e outras intercorrências foi maior. Embora a inflamação placentária não seja  
17 equivalente a infecção intrauterina, existe uma estreita relação entre estas duas  
18 alterações (Kim e cols. 2001). O recente conceito de FIRS compartilha a idéia de  
19 associação entre aumento de citocinas fetais e resposta à infecção placentária (Gomez e  
20 cols. 1998). Nossos dados reforçam esta informação, demonstrando que a variação de  
21 IL-6 no fígado fetal sofre o mesmo padrão de alteração encontrado na placenta. Como  
22 todos os casos foram a óbito, todas as crianças apresentavam um quadro grave, no  
23 entanto, esta alteração pode ter sido mais acentuada entre os prematuros, culminando  
24 com o nascimento em IG precoce.

1            Houve correlação negativa e significativa entre a produção de IL-6 e a IG. Este  
2            dado esta de acordo com estudos de dosagem de IL-6 em culturas de células amnióticas  
3            em contato com LPS, onde os níveis de IL-6 foram inversamente proporcionais a IG  
4            (Kim e cols. 2001). É o marcador mais sensível para detecção de infecção do líquido  
5            amniótico em partos prematuros (Romero e cols. 1993/a; Romero e cols. 1993/b), e  
6            como consequência de sua produção, há um estímulo para produção de prostaglandinas  
7            pelas células amnióticas, principalmente a prostangladina E2, que possui grande  
8            importância no desenvolvimento do trabalho de parto (Okazaki e cols.1981; Skinner e  
9            Challis 1985, Marchini e cols. 2000; Bracci 2000; Yoon e cols. 2000; Romero e cols.  
10           2007), justificando os níveis aumentados de IL-6 nos prematuros, e sua variação de  
11           acordo com a IG.

12           A redução de IL-6 nos fetos a termo pode ainda ser associada a menor  
13           intensidade das intercorrências gestacionais, resultando em um maior tempo de  
14           sobrevivência intrauterina dos fetos. Os prematuros podem responder com mais vigor a  
15           alterações intra-uterinas que os fetos a termo, e sua resposta pode desencadear o parto  
16           prematuro, que funcionaria como um mecanismo de escape do ambiente hostil intra-  
17           uterino, sendo mais uma etapa da resposta fetal (Romero e cols. 1994). Em nossos  
18           dados isso pode ser observado, e embora possa ser considerado como parte do  
19           mecanismo de defesa, repercutiu com o óbito das crianças, devido à associação entre a  
20           resposta inflamatória já formada, sobreposta a alterações da prematuridade, que  
21           dificultam a sobrevida pós-natal.

22           Em nossos casos, houve uma correlação negativa e significativa entre a IL-6 e o  
23           peso ao nascimento, e não houve diferença significativa da porcentagem de IL-6 em  
24           relação ao baixo peso, e entre a classificação do peso fetal para a IG. Alguns autores

1 afirmam que uma das primeiras alterações intra-uterinas é a redução do crescimento, e  
2 conseqüentemente do peso fetal (Bracci 2000; Marchini e cols. 2000), e, assim como  
3 em nossos dados, demonstram uma relação inversa entre a quantidade de IL-6 e o  
4 aumento de peso ao nascimento. Em nossos casos, todas as crianças foram a óbito, e as  
5 intercorrências foram suficientes para comprometer de forma grave as crianças PIG,  
6 AIG e GIG. Dessa forma, é provável que o nosso estudo tenha avaliado estágios graves,  
7 que influenciaram em outros parâmetros além do peso fetal, justificando os níveis  
8 semelhantes de IL-6 nos grupos avaliados.

9       Em nossos casos a PCR foi mais expressa em casos com IA, com estresse  
10 crônico e em crianças a termo. A PCR é uma proteína de fase aguda secretada pelo  
11 fígado em resposta a inflamação e lesão tecidual (Trochez-Martinez, Smith e Lamont  
12 2007; Kim e cols. 2009). Existem vários estudos que demonstram uma relação positiva  
13 entre a PCR materna, sinais clínicos e histológicos de corioamnionite, e alta  
14 morbimortalidade neonatal (van de Laar e cols. 2009). Além disso, os autores avaliam  
15 frequentemente níveis plasmáticos de PCR no cordão umbilical, no plasma materno e  
16 fetal. Diferente destes estudos, este trabalho parece ser o primeiro a avaliar *in situ* a  
17 expressão de PCR no seu local de produção, mostrando seu aumento nos casos de  
18 infecção.

19       A PCR é considerada um bom marcador para IA, sendo menos sensível em  
20 estágios infecciosos iniciais (Dollner, Vatten e Austgulen 2001), e mais específica em  
21 estágios tardios. Estes dados estão de acordo com nossos resultados, que encontraram  
22 um aumento da expressão de PCR nos casos de estresse crônico, demonstrando que o  
23 tempo de exposição é importante para que a detecção de PCR seja suficiente para o  
24 diagnóstico de alterações intra-uterinas.

1           A literatura associa essa proteína de fase aguda à infecção intra-uterina e ao  
2 parto prematuro (Greksova e cols. 2009), entretanto, em nossos resultados sua maior  
3 expressão ocorreu nas gestações a termo. Além disso, houve correlação positiva e  
4 significativa entre o a PCR e a IG. Como a PCR é sintetizada pelo fígado é provável que  
5 esta variação de expressão possa ser devido a imaturidade funcional dos hepatócitos  
6 fetais (Loukovaara e cols. 2004), demonstrando a incapacidade de resposta a agressões  
7 dos prematuros. Desse modo, acredita-se que crianças a termo ficaram expostas um  
8 tempo maior aos agentes estressores e, conseqüentemente, apresentaram maior  
9 expressão de PCR, viabilizada pelo aumento da maturidade dos hepatócitos com a  
10 evolução da gestação.

11           As crianças PIG e GIG apresentaram porcentagem de PCR significativamente  
12 maior. Os trabalhos encontrados relacionam as alterações de peso de acordo com a IG  
13 com causas maternas. Níveis maiores de PCR nas crianças PIG são associados com  
14 aumento de PCR materna, provocada por alterações como a pré-eclâmpsia (Tjoa e cols.  
15 2003). Da mesma maneira, crianças GIG parecem sofrer estresse oxidativo,  
16 frequentemente ocasionado por pré-eclâmpsia, diabetes melitus gestacional,  
17 inflamações e hipóxia que podem ser responsáveis pela produção fetal de citocinas  
18 (Lottenberg, Glezer e Turatti 2007). Em longo prazo, estas alterações induziriam a uma  
19 maior produção fetal de PCR, dados de acordo com o observado neste estudo.

20           As crianças com baixo peso ao nascer apresentaram menor expressão de PCR.  
21 Frequentemente as crianças de baixo peso nascem prematuramente, e possuem uma  
22 imaturidade do fígado e do sistema imunológico. Desse modo, as citocinas e proteínas  
23 inflamatórias não são sintetizadas de maneira eficaz apresentando baixa expressão na

1 circulação fetal (Loukovaara e cols. 2004). Nosso estudo comprova estes achados,  
2 baseando-se em uma avaliação do local de produção da PCR.

3 Na AP o TNF- $\alpha$  foi mais expresso do que nas outras causas de morte. Em  
4 crianças com restrição de crescimento intra-uterino, um modelo de hipóxia fetal crônica,  
5 foram encontrados altos índices de TNF- $\alpha$  na circulação sanguínea (Amarilyo e cols.  
6 2010). Em estudos que avaliaram a elevação de TNF- $\alpha$  na circulação fetal em crianças  
7 com ruptura prematura da membrana e com parto prematuro, com ou sem infecção da  
8 cavidade amniótica, foram encontrados altos níveis de TNF- $\alpha$ , sendo que esse aumento  
9 não teve relação com a IA. Isso demonstra que a elevação de TNF- $\alpha$  se relaciona mais  
10 com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória fetal sistêmica, do que com  
11 quadros infecciosos (Romero e cols. 2000). Esses resultados demonstram similaridades  
12 com os nossos achados.

13 Nos casos com IA a expressão de TNF- $\alpha$  foi menor. Um estudo demonstrou que  
14 a quantidade de TNF- $\alpha$  diminui progressivamente de 3 a 7 dias após o tratamento da  
15 sepse, mas que seus valores sofrem progressivo aumento nos casos que evoluem para o  
16 óbito. Este estudo ainda considera o TNF- $\alpha$  um dos melhores marcadores para o  
17 diagnóstico de sepse neonatal, podendo ser usado para avaliação da efetividade do  
18 tratamento e do prognóstico da doença (Kocabas e cols. 2007). Nestes casos a IL-6 foi  
19 elevada, e segundo outro estudo, esta elevação pode ter atuado na síntese de citocinas  
20 anti-inflamatórias que inibem a atuação do TNF- $\alpha$  (Petersen 2004). Dessa forma, é  
21 provável que os níveis de TNF- $\alpha$  estejam sendo suprimidos pela alta expressão de IL-6.

22 Entre os casos classificados como estresse crônico, houve maior expressão de  
23 TNF- $\alpha$  nos com AP, dado de acordo com outros estudos que demonstram que a hipóxia  
24 é a principal causa de elevação de TNF- $\alpha$  (Kamiya e cols 2010). Quanto ao tempo de

1 estresse, um estudo demonstrou que a privação de oxigênio seguida de reperfusão  
2 provoca aumento importante do TNF- $\alpha$ . No entanto, quando o mesmo procedimento era  
3 repetido após um prévio episódio de isquemia e reperfusão, ocorreria uma proteção  
4 contra lesão hepática e um aumento não tão importante de TNF- $\alpha$  (Teoh e cols. 2003).  
5 Dessa forma, a hipóxia aguda dos casos com MF pode ter sido a responsável pelos  
6 valores de TNF- $\alpha$  elevados, e até maiores que os observados nos casos com AP, onde o  
7 tempo maior de exposição ao estímulo pode ter contribuído para a redução desta  
8 citocina.

9 Em nossos casos, as crianças PIG expressaram maiores taxas de TNF- $\alpha$ ,  
10 mostrando que nossos resultados estão de acordo com a literatura. Em crianças PIG e  
11 sem infecção intra-uterina, foram avaliados os níveis de marcadores inflamatórios e  
12 foram encontradas, no sangue umbilical, altas taxas de TNF- $\alpha$ , IL-6 e PCR, em  
13 comparação com as crianças AIG (Amarilyo e cols. 2010).

14 Houve correlação positiva e significativa entre a IG e a porcentagem de TNF- $\alpha$ .  
15 Alguns estudos demonstram que os níveis de TNF- $\alpha$  tendem a diminuir com o aumento  
16 da IG (Romero e cols. 2000), contudo outros trabalhos supõem que citocinas podem  
17 estar aumentadas por causa do aumento da exposição aos estímulos inflamatórios no  
18 útero (Matoba e cols. 2009). Os marcadores da inflamação podem apresentar uma  
19 variação de expressão de acordo com a IG. Alguns estudos mostram que é possível que  
20 níveis de interleucinas na veia umbilical mostrem padrões diferenciados, como o  
21 aumento da concentração destas em neonatos a termo, enquanto que em recém-nascidos  
22 prematuros, os níveis não aumentam enquanto não ocorre um agravamento da  
23 inflamação. O mesmo acontece em recém-nascidos com IG muito baixa, que podem  
24 apresentar níveis superiores de algumas citocinas em comparação com crianças a termo

1 (Matoba e cols. 2009). Nossos dados demonstram que existe influência da IG na  
2 produção de TNF- $\alpha$ , mas que as agressões podem ter maior impacto na sua produção  
3 entre termos e prematuros, já que não foram observadas diferentes expressões entre eles.

4 Houve correlação negativa e significativa entre o peso corporal e a IL-6, e  
5 positiva e significativa com a porcentagem de PCR e de TNF- $\alpha$ . Alguns estudos  
6 demonstram que em crianças que tiveram o peso menor para a IG, os níveis de IL-6  
7 foram maiores do que em crianças com pesos adequados (Amarilyo e cols. 2010).  
8 Acredita-se que, caso o estresse sofrido seja muito intenso, pode ocorrer a liberação de  
9 altas quantidades de IL-6, responsáveis por promover a perda de peso do feto por  
10 elevação do catabolismo (Madsen-Bouterse e cols. 2010).

11 A expressão de PCR está de acordo com dados encontrados em trabalhos que  
12 avaliaram os níveis de PCR em jovens obesas, nas quais foram encontradas  
13 concentrações maiores do que em jovens não obesas. A elevação da PCR está  
14 relacionada com alterações na sensibilidade à insulina, aumento da liberação de  
15 moléculas de adesão pelo endotélio, aumento da liberação hepática de fibrinogênio e de  
16 plaquetas com efeito pró-coagulante (Serrano e cols. 2010).

17 O TNF- $\alpha$  em situações inflamatórias pode estar envolvido com alterações no  
18 peso corporal por meio da associação do TNF- $\alpha$  e dos glicocorticóides, e ainda por  
19 promover a resistência à insulina. Pode ocorrer uma redução na leptina, nos níveis de  
20 glicose, nos depósitos de glicogênio hepático e promover o aumento da peroxidação  
21 lipídica (Peterson 2004; Rodríguez-Galán e cols. 2010). Desse modo, acredita-se que o  
22 TNF- $\alpha$  participa do aumento do peso corporal, pois em conjunto com o glicocorticóide e  
23 a resistência insulínica aumentam a disponibilidade de ácidos graxos na circulação fetal  
24 possibilitando o acúmulo de lipídeos e favorecendo o aumento do peso fetal. O peso

1 esperado para a IG foi maior em todos os tipos de causa de morte. Nossos casos  
2 demonstram que mesmo com um quadro inflamatório estabelecido há um aumento do  
3 peso corporal, e não uma redução, como era esperado. Alguns mecanismos são  
4 sugeridos para explicar a elevação do peso das crianças estudadas.

5 O primeiro envolve o desenvolvimento do processo inflamatório frente a agentes  
6 agressores que ocorrem de maneira semelhante na SIRS e na FIRS. No início da  
7 resposta pró-inflamatória, os mediadores provocam a dilatação dos vasos arteriais e  
8 aumentam a capacidade de fluxo sanguíneo, o que leva a diminuição do retorno venoso,  
9 do débito cardíaco e da perfusão tissular, enquanto as arteríolas periféricas sofrem  
10 constrição grave, numa tentativa de manter a pressão sanguínea. Após esse quadro, o  
11 fluxo é restabelecido e ocorre a vasodilatação com diminuição do retorno venoso  
12 (Raiser e cols. 2002). Associado a isso, os mediadores inflamatórios aumentam a  
13 permeabilidade capilar e há perda de fluidos para o interstício, levando ao edema  
14 (Marconato e cols. 2008) que, em nossos casos, pode ter sido o responsável pelo  
15 aumento do peso corporal das crianças autopsiadas.

16 O segundo mecanismo pode estar associado à subnutrição do tipo *kwashiorkor*.  
17 Em nossos casos, a resposta inflamatória utilizando aminoácidos para síntese de  
18 proteína de fase aguda, e por ação das citocinas inflamatórias que promovem lesão  
19 hepática, pode levar a redução da síntese de outras proteínas pelos hepatócitos, como a  
20 albumina. Esse distúrbio protéico desencadeia uma hipoalbuminemia que culmina com  
21 uma redução da pressão oncótica interna do vaso, permitindo que o líquido extravase  
22 para o meio extracelular e provoque o edema (Ahmed, Rahman e Cravioto 2009).

23 Supomos, ainda, que o peso aumentado seja decorrente do estresse sofrido no  
24 período intra-uterino, em que há o desencadeamento do processo inflamatório, com

1 ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal. As citocinas liberadas no processo  
2 inflamatório, principalmente IL-6 e TNF- $\alpha$ , que foram mais correlacionadas  
3 positivamente com a causa de morte por MF e AP, respectivamente, são responsáveis  
4 por favorecer a liberação do fator liberador de corticotrofina e da arginina vasopressina  
5 pelo hipotálamo. Esses dois últimos alcançam o sistema portal hipofisário e estimulam a  
6 produção de hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior, que ao alcançar a  
7 circulação sistêmica, ativa o córtex adrenal, a produção de glicocorticóides e de outros  
8 esteróides (Pizarro e Troster 2007). Em condições de estresse o feto tem uma tendência  
9 a controlar a acidose metabólica pelo consumo de ácido láctico e síntese de lipídeos  
10 (Sakamoto e cols. 1977). Vários estudos demonstram que a elevação de cortisol na  
11 circulação está associada com o aumento de ácido graxo livre e de glicerol (Djurhuus e  
12 cols. 2002). Além disso, é possível que o cortisol em excesso e a redução de insulina no  
13 sangue provoquem a inibição da lipólise, favorecendo o acúmulo de lipídeos (Samra e  
14 cols. 1998). Esses dados, também justificam o aumento do peso fetal nas crianças  
15 avaliadas. No entanto, a correlação negativa com a porcentagem de IL-6, e positiva do  
16 TNF- $\alpha$  com o peso corporal, nos leva a propor que o TNF- $\alpha$  tenha um papel mais  
17 importante relacionado às modificações do peso ao nascimento.

18 Alguns estudos têm mostrado que em crianças com ruptura prematura das  
19 membranas, mais propensas a ter FIRS, podem apresentar insuficiência cardíaca grave,  
20 pois possuem uma diminuição na contratilidade miocárdica (Letti e cols. 2010). Logo,  
21 acredita-se que nos casos avaliados também pode ter ocorrido essa insuficiência e  
22 desencadeado uma insuficiência cardíaca congestiva, que frequentemente se relaciona  
23 com edema sistêmico (Eronen 1997). Sendo, mais uma explicação para alteração no  
24 peso encontrado.

1           Como discutido anteriormente, o TNF- $\alpha$  tem relação com o aumento do peso e  
2 com a causa de morte por AP. Nessa causa de morte a insuficiência de oxigênio pode  
3 desencadear lesão hepática crônica caracterizada por esteatose e por processo  
4 inflamatório. Nos casos com anóxia pode ocorrer redução da função hepática, com  
5 supressão na beta-oxidação e na síntese de lipídios, aumento na capacidade de estoque  
6 lipídico e posterior esteatose e, ainda, redução na síntese de protéica (Rankin e cols.  
7 2009). Portanto, estes podem ser os mecanismos desencadeantes do aumento de peso  
8 corporal nos casos com anóxia.

9           A PCR também foi associada com o aumento de peso corporal, porém mais com  
10 a causa de morte por IA. Nessas crianças, durante o estresse, todo o corpo aumenta o  
11 turnover de proteínas. O processo é necessário para que haja uma resposta adequada  
12 para auxiliar o indivíduo a responder com sucesso à infecção. O aumento na taxa de  
13 degradação de proteínas é presumido para fornecer aminoácidos para a síntese de  
14 proteínas de fase aguda (Dülger e cols. 2002) em detrimento das outras proteínas, como  
15 a albumina. Assim, há um decréscimo dos níveis de albumina do sangue, que é a  
16 principal responsável pelo desenvolvimento de edema. Paralelo a esse processo, a  
17 lipoproteína-beta não é sintetizada em quantidades adequadas, o que provoca transporte  
18 deficiente de gordura no fígado, e conseqüentemente seu depósito nas células hepáticas,  
19 desencadeando a esteatose (Ahmed, Rahman e Cravioto 2009). Dessa forma, o aumento  
20 de peso observado nessa causa de morte poderia estar associado à redução da função  
21 hepática e ao edema.

22           A IL-6 foi maior nos casos com MF e apresentou correlação negativa com o  
23 peso, porém não foram encontradas informações na literatura que justificassem a  
24 redução do peso dessas crianças. A IL-6 é considerada um marcador para FIRS e está

1 relacionada principalmente a causa de morte infecciosa e anóxica (Romero e cols. 2007;  
2 Lee e cols. 2008), contudo essa informação não condiz com a principal causa de morte  
3 relacionada a ela em nosso trabalho. É provável que haja diferentes mecanismos  
4 desencadeadores do aumento do peso dessas crianças que estão relacionados aos  
5 diferentes tipos de malformação encontrados, e que estes se sobrepõem a ação da IL-6  
6 de diminuir o peso.

7       Diante disso, complementando a idéia de que a redução do peso corporal é o  
8 primeiro sinal de estresse intra-uterino (Viengsakhone e cols. 2010) entende-se que os  
9 estresses graves observados em nossos casos podem ter sido responsáveis pelo  
10 desenvolvimento de outras alterações, como a FIRS e, ainda, edema ou acúmulo de  
11 lipídeos com elevação do peso corporal por diferentes mecanismos. Portanto, o peso  
12 fetal como fator de prognóstico fetal deve ser avaliado com cautela, já que a intensidade  
13 do fator estressor pode interferir diretamente neste parâmetro.

14

## 1 **Conclusão**

2 As causas de morte interferem na expressão de marcadores para a FIRS e são  
3 influenciadas por outras variáveis como o tempo de estresse intra-uterino e a maturidade  
4 hepática.

5 Em relação ao peso, os marcadores que influenciaram seu aumento foram a TNF- $\alpha$  e  
6 a PCR, que estão mais relacionadas ao estresse crônico. A IL-6 conseguiu atuar na redução  
7 de peso dos casos de estresse agudo.

8 O desencadeamento da FIRS desenvolve-se a partir de um estresse crônico, com a  
9 progressão da inflamação ocorrendo a medida que há aumento da IG e amadurecimento  
10 hepático.

11

## 1            *Considerações Finais*

2            As alterações hepáticas tiveram relação com os marcadores da FIRS,  
3 demonstrando a influência dessa condição no diagnóstico de crianças autopsiadas, bem  
4 como no prognóstico das crianças que sobrevivem e que possuem comprometimento do  
5 fígado.

6            Embora os resultados encontrados sejam muito interessantes, entende-se que  
7 existem algumas limitações quanto aos nossos achados. Um deles é que nosso material  
8 de estudo é proveniente de autopsias, logo os mediadores inflamatórios poderiam ter  
9 sido degradados, subestimando nossos achados. Além disso, o contexto a que essas  
10 crianças foram submetidas é muito amplo, e não há como inferirmos qual mediador  
11 inflamatório foi ativado primeiro e quem ele induziu. Logo, não há como extrapolar os  
12 resultados encontrados para além do que foi discutido.

13

## 1 Referências Bibliográficas

- 2
- 3 1. Ahmed T, Rahman S e Cravioto A. Oedematous malnutrition. *Indian J Med Res*
- 4 2009 Nov; 130:651-4.
- 5 2. Alexander J, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal
- 6 growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin*
- 7 *Endocrinol Metab.* 2006 May; 91(5):1868-71.
- 8 3. Amarilyo G, Oren A, Mimouni FB, Ochshorn Y, Deutsch V, Mandel D.
- 9 Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age
- 10 neonates. *J Perinatol.* 2010 Apr 22. [Epub ahead of print]
- 11 4. Andrade ZA. Regression of hepatic fibrosis. *Revista da Sociedade Brasileira de*
- 12 *Medicina Tropical.* 2005 Nov-Dez;38(6):514-520.
- 13 5. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr*
- 14 *Res Anesth Analg.* 1953 Jul-Aug;32(4):260-7.
- 15 6. Arai H, Noguchi A, Goto R, Matsuda T, Nakajima H, Takahashi T. Liver fibrosis in
- 16 an extremely small infant for gestational age. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(3):181-5.
- 17 7. Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight
- 18 and gestational age. *J Pediatr.* 1967;71(2):159-63.
- 19 8. Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie B, Pileri A. C-reactive protein and
- 20 beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system.
- 21 *Blood.* 1992 Aug 1;80(3):733-7
- 22 9. Benassayag C, Mignot TM, Haourigui M, Civel C, Hassid J, Carbonne B, e cols.
- 23 High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A2, and alpha-fetoprotein
- 24 concentrations at the human feto-maternal interface. *Lipid Res.* 1997
- 25 Feb;38(2):276-86.
- 26 10. Bieghs V, Vlassaks E; Custers A; Gorp PJV, Gijbels MJ; Bast A, Bekers O,
- 27 Zimmermann LJI; Lütjohann D, Voncken JW, Gavilanes AWD, Kramer BW, Shiri-
- 28 Sverdlov R. Chorioamnionitis induced hepatic inflammation and disturbed lipid
- 29 metabolism in fetal sheep. 2010 Jul 17. [Epub ahead of print]
- 30 11. Bracci R. Acute phase reaction in the fetus and newborn. *Acta Paediatr.* 2000;
- 31 89:1027-28.
- 32 12. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR.
- 33 Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological
- 34 lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999 Sep;94(9):2467-74.
- 35 13. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma
- 36 consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood.* 2003 Apr
- 37 15;101(8):2973-82.
- 38 14. Chiavaroli V, Giannini C, D'Adamo E, de Giorgis T, Chiarelli F, Mohn A.
- 39 Insulin resistance and oxidative stress in children born small and large for
- 40 gestational age. *Pediatrics.* 2009 Aug;124(2):695-702.
- 41 15. Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese
- 42 Doutorado em Patologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG,
- 43 2007, 144p
- 44 16. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu Rev*
- 45 *Immunol.* 2007 Jan 2. [Epub ahead of print]
- 46 17. Daimon T, David H, von Zglinicki T, Marx I. Correlated ultrastructural and
- 47 morphometric studies on the liver during prenatal development of rats. *Exp Pathol.*
- 48 1982;21(4):237-50.
- 49 18. Dammann O, Allred EN, Genest DR, Kundsinn RB, Leviton A. Antenatal

- 1 mycoplasma infection, the fetal inflammatory response and cerebral white  
 2 matter damage in very-low-birthweight infants. *Paediatr Perinat Epidemiol.*  
 3 2003;17(1):49-57.
- 4 19. Dando JS, Tavian M, Catelain C, Poirault S, Bennaceur-Griscelli A, Sainteny F,  
 5 e cols. Notch/Delta4 interaction in human embryonic liver CD34+ CD38- cells:  
 6 positive influence on BFU-E production and LTC-IC potential maintenance.  
 7 *Stem Cells.* 2005 Apr;23(4):550-60.
- 8 20. David H. The hepatocyte. Development, differentiation, and ageing. *Exp Pathol*  
 9 *Suppl.* 1985;11:1-148.
- 10 21. De Jongh RF, Puylaert M, Bosmans E, Ombelet W, Maes M, Heylen R. The  
 11 fetomaternal dependency of cord blood interleukin-6. *Am J Perinatol.*  
 12 1999;16(3):121-8.
- 13 22. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Mengel A, Christiansen JS, Schmitz OE,  
 14 Møller N. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels  
 15 in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E172-7.
- 16 23. Delprado WJ, Baird PJ. The fetal adrenal gland: definitive cortex cystic change,  
 17 lipid patterns, and their relationship to fetal disease and maturity. *Pathology*  
 18 1984 Jul;16(3):312-7.(b)
- 19 24. Döllner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis:  
 20 comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors  
 21 and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol.* 2001 Dec;54(12):1251-7.
- 22 25. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipoor S, Austgulen R. Histologic  
 23 chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and  
 24 cytokine inhibitors. *BJOG.* 2002 May;109(5):534-9.
- 25 26. Dolznig H, Kolbus A, Leberbauer C, Schmidt U, Deiner EM, Mullner EW e  
 26 cols. Expansion and differentiation of immature mouse and human  
 27 hematopoietic progenitors. *Methods Mol Med.* 2005;105:323-44.
- 28 27. Dülger H, Arik M, Sekeroğlu MR, Tarakçıoğlu M, Noyan T, Cesur Y, Balahoroğlu  
 29 R. Pro-inflammatory cytokines in Turkish children with protein-energy  
 30 malnutrition. *Mediators Inflamm.* 2002 Dec;11(6):363-5.
- 31 28. Erdei G, Tóth P, Vásárhelyi B. New clinical entity in perinatology: fetal  
 32 inflammatory response syndrome. *Orv Hetil.* 2003;144(31):1515-9.
- 33 29. Eronen M. Outcome of fetuses with heart disease diagnosed in utero. *Arch Dis*  
 34 *Child Fetal Neonatal Ed.* 1997 Jul;77(1):41-6.
- 35 30. Faye-Petersen OM, Guinn DA, Wenstrom KD. Value of perinatal autopsy.  
 36 *Obstet Gynecol.* 1999 Dec;94(6):915-20.
- 37 31. Fahnenstich H and Dame C. Erythropoietin concentrations and erythropoiesis in  
 38 newborns suffering from renal agenesis and congenital kidney diseases *European*  
 39 *Journal of Pediatrics* . 2006; 155(3):185-8.
- 40 32. Fonseca SC, Coutinho ESF. Características biológicas e evitabilidade de óbitos  
 41 perinatais em uma localidade na cidade do Rio de Janeiro, 1999 a 2003. *Rev.*  
 42 *Bras. Saude Mater. Infant.* 2008 Mar;8(2):171-8.
- 43 33. Goepfert AR, Andrews WW, Carlo W, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, e  
 44 cols. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk  
 45 of neonatal morbidity. *J Obstet Gynecol.* 2004;191(4):1375-81.
- 46 34. Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, Faye-Petersen O, Cliver SP, Carlo  
 47 WA, Hauth JC The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood  
 48 *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm  
 49 newborn infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):1-3

- 1 35. Gonzalez BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. Early markers of  
2 late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J*  
3 *Perinat Med.* 2003;31(1):60-8.
- 4 36. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles B, Erez O e cols.  
5 The fetal Inflammatory Response Syndrome. *Clinical Obstetrics and*  
6 *Gynecology.* 2007;50(3): 652-83.
- 7 37. Greksova K, Parrak V, Chovancova D, Stencil P, Oravec J, Marsik L, e cols. Procalcitonin,  
8 neopterin and C-reactive protein in diagnostics of intrauterine infection and preterm delivery.  
9 *Bratisl Lek Listy.* 2009;110(10):623-6.
- 10 38. Gruenwald P, Minh HN. Evaluation of body and organ weights in perinatal  
11 pathology. II. Weight of body and pl APGAR, V. A proposal for a new method  
12 of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg.* 1953;32(4):260-26.
- 13 39. Gveric-Ahmetasevic S, Sunjic SB, Skala H, Andrisic L, Stroser M, Zarkovic K,  
14 e cols. Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and  
15 their mothers. *Free Radic Res.* 2009;43(4):376-84.
- 16 40. Hay WW Jr. Strategies for feeding the preterm infant. *Neonatology.*  
17 2008;94(4):245-54.
- 18 41. Hey EN, Lloyd DJ, Wigglesworth JS. Classifying perinatal death: fetal and  
19 neonatal factors. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986 Dec;93(12):1213-23.
- 20 42. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory mediators of hepatic  
21 steatosis. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:837419.
- 22 43. Janeway C, Travers P, Walport M, Schlomchik M. Innate immunity. In:  
23 *Immunobiology.* 6th ed. New York: Garland Science; 2005:37-102.
- 24 44. Junge K, Binnebösel M, Rosch R, Otto J, Kämmer D, Schumpelick V, Klinge U.  
25 Impact of proinflammatory cytokine knockout on mesh integration. *J Invest*  
26 *Surg.* 2009 Jul-Aug;22(4):256-62
- 27 45. Kakkar N, Menon S, Radotra BD. Histomorphology of renal dysplasia--an  
28 autopsy study. *Fetal Pediatr Pathol.* 2006 Mar-Apr;25(2):73-86.
- 29 46. Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of  
30 hepatic stem cells during liver development *Front Biosci.* 2006 May;11:1302-10.
- 31 47. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-  
32 John S, zum Büschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an  
33 inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol.*  
34 1999 Apr;276(4 Pt 1):G1059-68
- 35 48. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming  
36 of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J*  
37 *Physiol.* 2006 Apr 1;572(Pt 1):31-44.
- 38 49. Karaduman D, Ergin H, Kiliç I. Serum ferritin, iron levels and iron binding  
39 capacity in asymmetric SGA babies. *Turk J Pediatr.* 2001;43(2):121-4.
- 40 50. Kim SK, Romero R, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Mittal P  
41 e cols. Evidence of changes in the immunophenotype and metabolic  
42 characteristics (intracellular reactive oxygen radicals) of fetal, but not maternal,  
43 monocytes and granulocytes in the fetal inflammatory response syndrome. *J*  
44 *Perinat Med.* 2009;37(5):543-52.
- 45 51. Kim CJ, Yoon BH, Park SS, Kim MH, Chi JG. Acute funisitis of preterm but  
46 not term placentas is associated with severe fetal inflammatory response. *Hum*  
47 *Pathol.* 2001 Jun;32(6):623-9.
- 48 52. Kocabaş E, Sarikçioğlu A, Aksaray N, Seydaoğlu G, Seyhun Y, Yaman A. Role  
49 of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor  
50 necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr.* 2007

- 1 Jan-Mar;49(1):7-20.
- 2 53. Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and  
3 meta-analysis. *Bull World Health Organ* 1987;65(5):663-737.
- 4 54. Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, e cols. Enhancement of  
5 intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in  
6 response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood*. 2002 Jun  
7 15;99(12):4307-17.
- 8 55. Lee SE, Romero R, Jung H, Park CW, Park JS, Yoon BH. The intensity of the  
9 fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without  
10 microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*.  
11 2007;197:294.e1-294.e6.
- 12 56. Lee SE, Romero R, Park CW, Jun JK, Yoon BH. The frequency and  
13 significance of intraamniotic inflammation in patients with cervical  
14 insufficiency. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Jun;198(6):633.e1-8.
- 15 57. Letti Müller AL, Barrios Pde M, Kliemann LM, Valério EG, Gasnier R,  
16 Magalhães JA. Tei index to assess fetal cardiac performance in fetuses at risk for  
17 fetal inflammatory response syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010  
18 Jul;36(1):26-31.
- 19 58. Lim FT, Scherjon SA, van Beckhoven JM, Brand A, Kanhai HH, Hermans JM e  
20 cols. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated  
21 cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am J Obstet  
22 Gynecol*. 2000 Nov;183(5):1144-52.
- 23 59. Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. Síndrome metabólica: identificando fatores de  
24 risco. *J Pediatr*. 2007; 83(5):S204-208.
- 25 60. Loukovaara M, Leinonen P, Teramo K, Alfthan H, Stenman UH, Andersson S. Fetal  
26 hypoxia is associated with elevated cord serum C-reactive protein levels in diabetic  
27 pregnancies. *Biol Neonate*. 2004;85(4):237-42.
- 28 61. Madsen-Bouterse SA, Romero R, Tarca AL, Kusanovic JP, Espinoza J, Kim CJ,  
29 Kim JS, Edwin SS, Gomez R, Draghici S. The transcriptome of the fetal  
30 inflammatory response syndrome. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Jan;63(1):73-  
31 92.
- 32 62. Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, e cols. Differential  
33 patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*.  
34 2009 May;123(5):1320-8.
- 35 63. Marchini G, Berggren V, Djilali-Merzoug R, Hansson L-O. The birth process  
36 initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatr* 2000;  
37 89:1082-6.
- 38 64. Marconato F, Pulz RS, Bueno PL, Santos LP, Ghiorzi VR, Fisch J e cols.  
39 Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) – Revisão Bibliográfica.  
40 Resumo de anais. Disponível em  
41 <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1071-1.pdf>  
42
- 43 65. Farquhar JW. The child of the diabetic woman. *Arch Dis Child*. 1959;34:76–96.  
44 doi: 10.1136/adc.34.173.76.
- 45 66. Mattos TC, Giugliani R, Haase HB. Congenital malformations detected in 731  
46 67. autopsies of children aged 0 to 14 years. *Teratology*. 1987 Jun;35(3):305-7.
- 47 68. Mazor M, Smolin A, Burshtein E. Ultrasound in fetal inflammatory response  
48 syndrome. 2006; 34(1):40.
- 49 69. Meberg A, Jakobsen E, Halvorsen K. Humoral regulation of erythropoiesis and  
50 thrombopoiesis in appropriate and small for gestational age infants. *Acta  
Paediatr Scand*. 1982;71(5):769-73.

- 1 70. McWilliam S, Riordan A. How to use: C-reactive protein. *Arch Dis Child Educ*  
 2 *Pract Ed.* 2010 Apr;95(2):55-8.
- 3 71. Miranda RN, Omurtag K, Castellani WJ, De las Casas LE, Quintanilla NM,  
 4 Kaabipour E. Myelopoiesis in the liver of stillborns with evidence of intrauterine  
 5 infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 Dec;130(12):1786-91.
- 6 72. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin  
 7 and erythropoiesis. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 2):1829-44.
- 8 73. Moshage HJ, Roelofs HMJ, Van Pelt JF, Hazenberg BPC, Van Leeuwen MA,  
 9 Limburg PC, e cols. The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its  
 10 interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in  
 11 primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*  
 12 1988;155:112-7.
- 13 74. Murckart DJ, Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of  
 14 Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic  
 15 inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically  
 16 injured patients. *Crit. Care Med.* 1997;25:1789-1795.
- 17 75. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science  
 18 to medicine. *Arthritis Res.* 2002;4(Suppl 3):S233-42.
- 19 76. Naughton BA, Kolks GA, Arce JM, Liu P, Gamba-Vitalo C, Piliero SJ, Gordon  
 20 AS. The regenerating liver: a site of erythropoiesis in the adult Long-Evans rat.  
 21 *Am J Anat.* 1979 Sep;156(1):159-67.
- 22 77. Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Carroli G, Purwar M, Zavaleta N, e  
 23 cols. Causes of stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993 pregnancies  
 24 in six developing countries. *Bull World Health Organ.* 2006 Sep;84(9):699-705.
- 25 78. Okazaki T, Sagawa N, Bleasdale JE, Okita JR, MacDonald PC, Johnston JM.  
 26 Initiation of human parturition: XIII. Phospholipase C, phospholipase A2, and  
 27 diacylglycerol lipase activities in fetal membranes and decidua vera tissues from  
 28 early and late gestation. *Biol Reprod.* 1981 Aug;25(1):103-9.
- 29 79. OMS – Organização Mundial da Saúde; FIGO – Federação Internacional de  
 30 Ginecologia e Obstetrícia. 1976. In: Rezende J, Montenegro CAB.
- 31 80. Oruc N, Ozutemiz O, Yuce G, Akarca US, Ersoz G, Gunsar F, Batur Y. Serum  
 32 procalcitonin and CRP levels in non-alcoholic fatty liver disease: a case control  
 33 study. *BMC Gastroenterol.* 2009 Feb 17;9:16.
- 34 81. Pereira FEL. Degenerações, morte celular e alterações do interstício. In:  
 35 Brasileiro Filho B. *Patologia Geral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.  
 36 79-80.
- 37 82. Persico M, Iolascon A. Steatosis as a co-factor in chronic liver diseases *World J*  
 38 *Gastroenterol* 2010 March 14;16(10):1171-6.
- 39 83. Pfisterer C, Faber R, Horn LC. Chorioamnionitis-induced changes of fetal  
 40 extramedullar hematopoiesis in the second trimester of gestation. Is diagnosis  
 41 from fetal autopsy possible? *Virchows Arch.* 2005 Feb;446(2):150-6.
- 42 84. Pizarro CF, Troster EJ. Adrenal function in sepsis and septic shock *Jornal de*  
 43 *Pediatria* 2007. 83(5) (Supl);155-62.
- 44 85. Ragonesi SMA, Bertini AM, Camano L. Crescimento intra-uterino retardado:  
 45 aspectos atuais. *RAMB.* 1997;43(2):143-178.
- 46 86. Rankin EB, Rha J, Selak MA, Unger TL, Keith B. Hypoxia-Inducible Factor 2  
 47 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Mol Cell Biol.* 2009; 29 (16): 4527–38.
- 48 87. Redline RW. Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord.  
 49 *Seminars in Fetal e Neonatal Medicine* 2006;11:296-301.
- 50 88. Reif S, Lu RB, Tano M, Terranova V, Young C, Fisher J, e cols. Perinatal food

- 1 restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular  
2 matrix proteins. *J Nutr.* 1993 May;123(5):811-6.
- 3 89. Reif S, Lu RB, Tano M, Terranova V, Young C, Fisher J, Petell J, Lebenthal E.  
4 Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of  
5 liver extracellular matrix proteins. *J Nutr.* 1993 May;123(5):811-6.
- 6 90. Reif S, Terranova VP, el-Bendary M, Lebenthal E, Petell JK. Modulation of  
7 extracellular matrix proteins in rat liver during development. *Hepatology.* 1990  
8 Sep;12(3 Pt 1):519-25.
- 9 91. Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *Curr Gastroenterol Rep.*  
10 2003 Jun;5(3):253-9.
- 11 92. Rodríguez-Galán MC, Porporatto C, Sotomayor CE, Cano R, Cejas H, Correa  
12 SG. Immune-metabolic balance in stressed rats during *Candida albicans*  
13 infection *Stress.* 2010 Sep;13(5):373-83.
- 14 93. Rogers BB, Alexander JM, Head J, McIntire D, Leveno KJ. Umbilical vein  
15 interleukin-6 levels correlate with the severity of placental inflammation and  
16 gestational age. *Hum Pathol.* 2002 Mar;33(3):335-40.
- 17 94. Romanque P, Díaz A, Tapia G, Uribe-Echevarría S, Videla LA, Fernandez V.  
18 Delayed ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion  
19 injury in vivo. *Transplant Proc.* 2010 Jun;42(5):1569-75.
- 20 95. Romero R, Espinoza J, Gonçalves L, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role  
21 of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.*  
22 2007;25(1):21-39.
- 23 96. Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS, et al. A fetal  
24 systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm  
25 parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(1):186-93.
- 26 97. Romero R, Maymon E, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Yoon BH, e cols. Further  
27 observations on the fetal inflammatory response syndrome: A potencial  
28 homeostatic role for the soluble receptors of tumor necrosis factor  $\alpha$ .. *Am J*  
29 *Obstetr Gynecol* 2000; 183:1070-7.
- 30 98. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, Kenney JS, e cols.  
31 The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count,  
32 glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact  
33 membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Oct;169(4):805-16. a
- 34 99. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Gonzalez R, Diamond MP, e cols. A  
35 comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose,  
36 white blood cell count, interleukin-6, and gram stain in the detection of  
37 microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes *Am*  
38 *J Obstet Gynecol.* 1993 Oct;169(4):839-51. b
- 39 100. Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, Ejima Y, Hoshi K, Shibusawa M, e  
40 cols. Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating  
41 CD4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J*  
42 *Exp Med.* 2008;216(1):61-8.
- 43 101. Sakamoto S, Kigawa T, Mizuno M, Minaguchi H, Satoh K, Jimbo T,  
44 Nakai T, Kuwabara Y. Adaptation mechanism in the fetus, with special  
45 reference to fetal endocrinology. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977;63:1-19.
- 46 102. Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto SL,  
47 Azevedo PRC, Silva TM, Golin V. Síndrome da resposta inflamatória  
48 sistêmica/sepsis – revisão estudo da terminologia e fisiopatologia *Rev Ass Med*  
49 *Brasil*1999; 45(1): 86-92

- 1 103. Salvesen B, Fung M, Saugstad OD, Mollnes TE. Role of Complement  
2 and CD14 in Meconium-Induced Cytokine Formation. *Pediatrics*  
3 2008;121:e496-e505.
- 4 104. Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, and  
5 Frayn KN. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of  
6 lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 626–631,  
7 1998
- 8 105. Sánchez-Garrido MA, Chico Y, González R, Ranchal I, González-Rubio  
9 S, Hidalgo AB, Díaz-López C, Costán G, Padillo FJ, De la Mata M, Ochoa B,  
10 Muntané J. Interleukin-6 is associated with liver lipid homeostasis but not with  
11 cell death in experimental hepatic steatosis. *Innate Immun.* 2009 Dec;15(6):337-  
12 49.
- 13 106. Sauerwein RW, Mulder JA, Mulder L, et al. Inflammatory mediators in  
14 children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1534–1539.
- 15 107. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, e  
16 cols. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-  
17 induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007  
18 Oct;293(4):G871-7.
- 19 108. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, e cols.  
20 Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology.* 2007  
21 Apr;45(4):1007-13.
- 22 109. Scrimshaw NS, Viteri FE. INCAP studies of kwashiorkor and marasmus.  
23 *Food Nutr Bull.* 2010 Mar;31(1):34-41.
- 24 110. Seghaye MC, Heyl W, Grabitz RG, Schumacher K, von Bernuth G, Rath  
25 W, e cols. The production of pro- and anti-inflammatory cytokines in neonates  
26 assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth.  
27 *Biol Neonate.* 1998;73(4):220-7.
- 28 111. Serrano HM, Carvalho GQ, Pereira PF, Peluzio MD, Franceschini SD,  
29 Priore SE. Body composition, biochemical and clinical changes of adolescents  
30 with excessive adiposity. *Arq Bras Cardiol.* 2010
- 31 112. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Martinez de Tejada B, Landers  
32 DV, Hillier SL. Decreased cervical proinflammatory cytokines permit  
33 subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet*  
34 *Gynecol.* 2003;189:560-7.
- 35 113. Sims MA, Collins KA. Fetal death. A 10-year retrospective study. *Am J*  
36 *Forensic Med Pathol.* 2001 Sep;22(3):261-5.
- 37 114. Shouman B, Badr R. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted  
38 and tumor necrosis factor-alpha in septic neonates. *J Perinatol.* 2010 Mar;30(3):192-6.
- 39 115. Skinner KA, Challis JR. Changes in the synthesis and metabolism of  
40 prostaglandins by human fetal membranes and decidua at labor. *Am J Obstet*  
41 *Gynecol.* 1985 Feb 15;151(4):519-23.
- 42 116. Streeter GL. Weight sitting height head size, foot length and menstrual  
43 age of human embryo. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1920;11:143 – 70.
- 44 117. Surbek D, Johann S, Berger M, Cromi A, Ghezzi F, Raio L. Funisitis and  
45 fetal inflammatory response syndrome (FIRS). *Am J Obstet Gynecol* 2007;  
46 197(1):S206.
- 47 118. Tamiolakis D, Venizelos I, Lambropoulou M, Efthymiadou A,  
48 Arvanitidou V, Tsikouras P, e cols. Altered intrahepatic hematopoiesis in  
49 neonates from women with pregnancy induced hypertension/pre-eclampsia. *Acta*  
50 *Medica (Hradec Kralove).* 2004;47(2):119-23.

- 1 119. Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects  
2 against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for  
3 preconditioning. *Hepatology*. 2003 Jan;37(1):118-28
- 4 120. Tian JL, Zhang Y, Chen BY. Sleep apnea hypopnea syndrome and liver  
5 injury. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Jan 5;123(1):89-94.
- 6 121. Tilg H, Moschen A. Weight loss: cornerstone in the treatment of non-  
7 alcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2010 Jun;56(2):159-  
8 68.
- 9 122. Tjoa ML, van Vugt JM, Go AT, Blankenstein MA, Oudejans CB, van  
10 Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy  
11 are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod*  
12 *Immunol*. 2003 Jun;59(1):29-37.
- 13 123. Trochez-Martinez RD, Smith P, Lamont RF. Use of C-reactive protein as  
14 a predictor of chorioamnionitis in preterm prelabour rupture of membranes: a  
15 systematic review. *BJOG*. 2007 Jul;114(7):796-801.
- 16 124. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in  
17 Nonalcoholic Steatohepatitis: From Pathogenesis to Implications in Diagnosis  
18 and Therapy. *Mediators Inflamm*. 2009.
- 19 125. van de Laar R, van der Ham DP, Oei SG, Willekes C, Weiner CP, Mol  
20 BW. Accuracy of C-reactive protein determination in predicting  
21 chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature  
22 rupture of membranes: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.  
23 2009 Dec;147(2):124-9.
- 24 126. Viengsakhone L, Yoshida Y, Harun-Or-Rashid M, Sakamoto J. Factors  
25 affecting low birth weight at four central hospitals in vientiane, Lao PDR  
26 Nagoya J Med Sci. 2010 Feb;72(1-2):51-8.
- 27 127. Yang Z, Wen J, Tao X, Lu B, Du Y, Wang M, Wang X, Zhang W, Gong  
28 W, Ling C, Wu S, Hu R. Genetic variation in the GCKR gene is associated with  
29 non-alcoholic fatty liver disease in Chinese people. *Mol Biol Rep*. 2010 Jul 13.  
30 [Epub ahead of print]
- 31 128. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh S-Y, KIM CJ, e cols. The  
32 relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis),  
33 umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and  
34 neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(5):1124-29.
- 35 129. Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids, stress, and fertility.  
36 *Minerva Endocrinol*. 2010 Jun;35(2):109-25.
- 37 130. Wigglesworth JS. Classification of perinatal deaths. *Soz Praventivmed*.  
38 1994;39(1):11-4.
- 39 131. Wigglesworth JS. Hemopoietic and lymphoreticular systems. In:  
40 *Perinatal Patology*. Philadelphia. Saunders Company; 1996. p. 366-80.a
- 41 132. Wigglesworth JS. The liver and biliary system. In: *Perinatal Patology*.  
42 Philadelphia. Saunders Company; 1996. p. 275-91.b
- 43 133. Williams MA. Quantitative methods in biology. Amsterdam:  
44 Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1977. p.233.
- 45 134. Zago AFR, Paravidine LM, Siqueira LMS, Balbão LM, Reis MA, e cols.  
46 Comparative study between foot length and other methods of gestational age  
47 determination in the newborn. *Pediatr Mod* 2000;36:388– 92.
- 48 135. Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P,  
49 e cols. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a

1 correlation with histological fibrosis and activity. J Hepatol. 1999  
2 Feb;30(2):185-91.

# 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](#)