

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO LEUCOCITÁRIA
EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS DE MÃES
COM PRÉ-ECLAMPSIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FABRÍZIA RENNÓ SODERO FAULHABER

PORTO ALEGRE, BRASIL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO LEUCOCITÁRIA
EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS DE MÃES
COM PRÉ-ECLAMPSIA

FABRÍZIA RENNÓ SODERO FAULHABER

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de mestre.

PORTO ALEGRE, BRASIL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM

09/05/2011

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA
POR:

DRA.: Andrea Lucia Corso

INSTITUIÇÃO: Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de
Clínicas de Porto Alegre.

PROF. DRA.: Liane Esteves Daudt

INSTITUIÇÃO: PPG Saúde da Criança e do Adolescente –
Faculdade de Medicina – UFRGS.

PROF. DRA.: Patricia Pelufo Silveira

INSTITUIÇÃO: PPG Saúde da Criança e do Adolescente –
Faculdade de Medicina – UFRGS.

DEDICATÓRIA

À minha filha Julia e ao meu marido Gustavo por darem sentido e felicidade à minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Professora Dra. Rita de Cássia Silveira, exemplo de médica, professora, pesquisadora, orientadora, mãe e mulher. Obrigada pela paciência, disponibilidade, dedicação, incentivo, apoio e ensinamentos proporcionados a mim deste os tempos de residência. Minha eterna gratidão e admiração.

Ao meu marido, Gustavo, pelo seu amor, apoio, incentivo e exemplo. Obrigada pela incansável ajuda na análise estatística e nos cuidados com a Julia enquanto escrevia esta tese. Meu eterno amor.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Aida, exemplos de responsabilidade, caráter, honestidade e integridade, pela dedicação, incentivo e amor proporcionados a mim desde a infância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Renato Soibermann Procianoy, pela co-orientação da tese, pela disponibilidade, exemplo e pela confiança que depositou no meu trabalho.

À Denize Faulhaber que me acolheu tão bem em sua família, me tratamento como filha, pelo incentivo e carinho constantes.

Ao Marcelo Faulhaber pelo apoio e incentivo.

Às minhas irmãs Ana Carolina e Daniela, pelo amor, apoio e incentivo.

Aos meus amigos Ana Maria, Gustavo, Valentina e Rafael, pela constante amizade e apoio.

Ao funcionário Jeferson do laboratório de Pesquisa do HCPA, pela fundamental e competente ajuda no processamento e armazenamento das amostras.

Ao Dr. Diogo Demartini, do Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica - Centro de Biotecnologia da UFRGS, pelo incansável e eficiente auxílio na dosagem laboratorial das quimiocinas.

À Professora Célia Carlini, chefe do Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica - Centro de Biotecnologia da UFRGS, por ceder gentilmente seu laboratório para realização da dosagem laboratorial das quimiocinas.

À acadêmica Ana Paula Vargas, pela fundamental, incansável e eficiente ajuda na coleta, processamento das amostras e busca dos dados dos pacientes.

Aos médicos contratados e residentes do Serviço de Neonatologia do HCPA, pela ajuda na captação dos pacientes.

A todos os funcionários do Serviço de Neonatologia do HCPA, pela amizade e incentivo nos tempos de coleta das amostras e dados dos pacientes.

À Equipe de coleta do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela atenção e disponibilidade na coleta das amostras.

À Vania Naomi Hirakata e ao Gustavo Faulhaber pela ajuda e orientação na análise estatística.

Ao meu chefe no Serviço de Oncologia-Hematologia do Hospital da Criança Conceição, Dr. Carlo Conchin, e aos meus colegas Pedro Paulo A. Santos, Ronaldo Piva, Luciane Ramos e Sheila, pelo carinho e apoio na realização deste trabalho.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela imprescindível participação neste estudo.

A todos aqueles que embora não tenham sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

RESUMO

A neutropenia é um achado freqüente em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia. Estudos avaliando a ativação leucocitária nestes recém-nascidos são escassos. No entanto, as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas são a IL-8 e o GRO- α . O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α em recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia.

Metodologia: Foram incluídos recém-nascidos com idade gestacional menor de 36 semanas e peso de nascimento inferior a 2000 gramas, sendo divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de pré-eclampsia materna. Os critérios de exclusão foram: malformações congênitas, erro inato de metabolismo ou anormalidades cromossômicas, infecções do grupo STORCH, óbito na sala de parto e recém-nascidos nos quais as mães possuíam hipertensão crônica sem a presença de pré-eclampsia. Nas primeiras 48 horas de vida, no momento de coleta assistencial, uma pequena amostra adicional de sangue foi obtida para dosagem de IL-8 e GRO- α pelo método de enzimoimunoensaio. Foram usados os testes qui-quadrado, T student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e regressão logística múltipla.

Resultados: 119 recém-nascidos (64 sem pré-eclampsia e 55 com pré-eclampsia). Os grupos foram similares quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, escore de Apgar no 5º minuto, sepse, doença de membrana hialina, ventilação mecânica, nutrição parenteral total, enterocolite necrosante, hemorragia periventricular. O grupo com pré-eclampsia apresentou mais neutropenia, foi mais PIG, parto cesariano e menos bolsa rota superior a 18 horas. Os níveis de IL-8 foram maiores no grupo sem pré-eclampsia materna [157.1 pg/ml (86.4-261.3) e 26.54 pg/ml (3.6-87.2) $p < 0.001$ para não pré-eclampticos e pré-eclampticos, respectivamente]. Os níveis de GRO- α foram similares [229.5 pg/ml (116.6-321.3) and 185.5 pg/ml (63.9-306.7) $p = 0.236$ para não pré-eclampticos e preeclampticos, respectivamente]. Após análise por regressão múltipla apenas a ausência de pré-eclampsia foi associada com níveis elevados de IL-8.

Conclusão: O prematuro de mãe com pré-eclampsia apresenta níveis reduzidos de IL-8, sugerindo que a ativação leucocitária possa estar prejudicada nestes recém-nascidos.

Resumo: 312 palavras.

Descritores: Quimiocinas; neutropenia; recém-nascido; pré-eclampsia; recém-nascidos prematuros.

ABSTRACT

Neutropenia is frequent in newborn infants of preeclamptic mothers. Information on leukocyte activation in those newborns is scarce, but IL-8 and GRO- α are the main pro-inflammatory cytokines involved. The aim was to study IL-8 and GRO- α plasma levels in preterm newborn infants of preeclamptic mothers.

Methods: Newborn infants with gestational age < 36 weeks and birth weight < 2000 grams were included and divided: non-preeclamptic and preeclamptic groups. Exclusion criteria: major congenital malformations, inborn errors of metabolism or chromosomal anomalies, TORCH infections, inborn preterm that died in the delivery room, and those whose mothers had chronic hypertension without preeclampsia. During the regular blood sample collection in the first 48 hours, a small amount was used for IL-8 and

GRO- α measurement by enzyme immunoassay. Chi-square, Student's t test, Mann Whitney test, Kruskal-Wallis and multiple logistic regression model were employed.

Results: 119 preterm infants (64 non-preeclamptic and 55 preeclamptic). They were similar in birth weight, gestational age, Apgar scores at 5 minutes, sepsis, SDR, mechanical ventilation, TPN, NEC, intraventricular hemorrhage and death. The preeclamptic group had more neutropenia, SGA, C Section, and less rupture of membranes for > 18 hours. IL-8 was higher in the non-preeclamptic [157.1 pg/ml (86.4-261.3) e 26.54 pg/ml (3.6-87.2) p<0.001 non-preeclamptic and preeclamptic groups, respectively]. GRO- α was similar [229.5 pg/ml (116.6-321.3) and 185.5 pg/ml (63.9-306.7) p=0.236 in non-preeclamptic and preeclamptic groups, respectively]. After multiple regression analysis only absence of preeclampsia was associated with high IL-8 levels.

Conclusions: Preterm newborn infants of preeclamptic mothers have a decreased plasma level of IL-8, suggesting that the leukocyte activation may be impaired in infants of preeclamptic mothers.

Abstract: 263 words

Keywords: Chemokine, neutropenia, newborn, preeclampsia, preterm infants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1:

Curva Padrão IL-8 - Placa 1 (duplicata).....62

GRÁFICO 2:

Curva Padrão IL-8 - Placa 2 (duplicata).....63

GRÁFICO 3

Curva padrão GRO- α , placa 1 (duplicata).....63

GRÁFICO 4

Curva padrão GRO- α , placa 2 (duplicata).....64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:

Critérios diagnósticos para Pré-Eclampsia21

Quadro 2:

Critérios diagnósticos para Pré-Eclampsia Severa21

Quadro 3: Propriedades das Quimiocinas47

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Tabela 1:

Fatores maternos e neonatais associados com pré-eclampsia99

Tabela 2:

Fatores independentemente associados à pré-eclâmpsia materna.101

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Table 1:

Maternal and Neonatal factors associated with preeclampsia117

Table 2:

Factors independently associated with maternal preeclampsia119

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AIG	Adequado para idade gestacional
AT1	<i>Angiotensina II receptor type 1</i>
AT1-AA	<i>Agonistic autoimmune angiotensina II receptor type 1</i>
ELR +	Presença dos resíduos de aminoácidos Glu-Leu-Arg
ELR -	Presença ou ausência dos resíduos de aminoácidos Glu-Leu-Arg
ENA-78	<i>Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78</i>
sFlt-1	<i>Fms-like tyrosina kinase-1</i>
Glu-Leu-Arg	Glutamina-Leucina-Arginina
GRO- α	<i>Growth-related Oncogene α</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HELLP	<i>Hemolysis, elevated liver enzyme levels and low platelet count</i>
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Intereucina-6
IL-8	Interleucina-8
NAP-2	<i>Neutrophil-activatin peptide 2</i>

PE	Pré-eclampsia
PIG	Pequeno para idade gestacional
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
RCIU	Restrição do crescimento Intra-Uterino
rhG-CSF	<i>Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor</i>
RN	Recém-nascido
sEng	<i>Soluble form of endoglin</i>
SNAPPE-II	<i>Score dor Neonatal Acute Physiology ans Perinatal Extension II</i>
SPSS 18.0	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SRA	Sistema renina-angiotensina
sVEGFR-1	<i>Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-- α</i>
TGF- β1	<i>Transforming growth factor β1</i>
TGF-β3	<i>Transforming growth factor β1 e β3</i>
UTIN	Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

***Algumas siglas foram mantidas na sua versão original em inglês, por serem assim internacionalmente referidas.**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Pré-Eclampsia	20
2.1.1 Definição e Critérios Diagnósticos	20
2.1.2 Incidência	23
2.1.3 Fisiopatologia	24
2.1.4 Fatores de Risco	29
2.1.5 Manifestações Clínicas	30
2.1.6 Tratamento	33
2.1.7 Efeitos da Pré-Eclampsia no Feto e no Recém-Nascido	34

2.1.7.1Pré-Eclampsia e Restrição do Crescimento Intra-Uterino	35
2.1.7.2 Pré-Eclampsia e Neutropenia Neonatal	36
2.1.7.3 Pré-Eclampsia e Sepsis Neonatal	39
2.2 Fisiologia do Processo Inflamatório	42
2.3 Quimiotaxia e Ativação Leucocitária: As Quimiocinas	43
2.3.1 Quimiocinas CXC: IL-8/CXCL8 e GRO-alpha/CXCL1	49
2.3.2 Quimiocinas, Recém-Nascidos e Prematuridade	50
2.3.3 Quimiocinas e Sepsis Neonatal	51
2.3.4 Quimiocinas, Prematuridade e Restrição do crescimento intra-uterino.....	52
2.3.5 Quimiocinas e Ruptura Prematura de Membranas	53
2.4 Quimiocinas e Pré-Eclampsia	54
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	56
4 OBJETIVOS.....	57
5 METODOLOGIA.....	58
5.1 População em Estudo.....	58
5.2 População da Pesquisa.....	58
5.3 Critérios de Inclusão	59
5.4 Critérios de Exclusão.....	59
5.5 Delineamento.....	59
5.6 Logística	60
5.7 Análise Laboratorial das Quimiocinas	60
5.8 Considerações Éticas	64
5.9 Variáveis Estudadas	65
5.10 Variáveis Controladas	65

5.11 Cálculo do Tamanho da Amostra	67
5.12 Análise Estatística	67
6 REFERÊNCIAS	68
7 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	82
8 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	102
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
Anexos	121

1 INTRODUÇÃO:

As doenças hipertensivas são causas prevalentes de morbimortalidade materna e fetal, incluindo nascimentos prematuros. A pré-eclampsia (hipertensão com proteinúria iniciada após 20 semanas de gestação) é a doença hipertensiva mais prevalente, correspondendo de 3 a 14% das gestações (LINDHEIMER *et al*, 2008; SAFTLAS *et al*, 1990; SIBAI *et al*, 1995; ACOG, 2002; LAIN *et al*, 2002).

Os recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia apresentam risco aumentado de complicações neonatais, dentre elas alterações hematológicas e sepse neonatal. A neutropenia é um achado freqüente em RN de mães com pré-eclampsia (DORON *et al*, 1994). Aproximadamente 50% dos RN de mães com hipertensão apresentam neutropenia ao nascimento (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; MOUZINHO *et al*, 1992). Cerca de 17% dos RN de mães com pré-eclampsia apresentam neutropenia nas primeiras 72 horas de vida (PROCIANOY *et al*, 2010). A pré-eclampsia materna é um fator de risco independente para neutropenia em RN prematuros (GRECO *et al*, 1997).

Diversos estudos prévios tentaram esclarecer a patogênese da pré-eclâmpsia. A disfunção endotelial parece ter papel central na patogênese da pré-eclâmpsia, tanto na doença materna quanto fetal. O efeito da hipóxia placentária decorrente da hipertensão, induz alterações inflamatórias na placenta com liberação de quimiocinas inflamatórias, levando a ativação de neutrófilos e monócitos fetais, produzindo um estado de inflamação e disfunção endotelial no recém-nascido (GILBERT *et al*, 2007; MELLEMLAKKEN *et al*, 2001; MELLEMLAKKEN *et al*, 2002; ; REDMAN *et al*, 1999; TURNER, 2010).

MELLEMLAKKEN *et al* (2001) demonstraram o aumento da expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e monócitos e elevação de CXC quimiocinas interleucina-8 e GRO- α no cordão umbilical de recém-nascidos com pré-eclâmpsia materna. Com isso, demonstraram o estado de inflamação e disfunção endotelial nestes recém-nascidos (MELLEMLAKKEN *et al*, 2001).

O mecanismo geral de inflamação é composto por quatro etapas principais: Marginação, rolamento, ativação, adesão leucocitária e migração transendotelial. No rolamento leucocitário as principais moléculas envolvidas são as selectinas (plaquetárias, endoteliais e leucocitárias). Na ativação leucocitária, as quimiocinas inflamatórias CXC, objeto de interesse desta pesquisa. Na adesão leucocitária e migração transendotelial, as integrinas, as selectinas e a superfamília de imunoglobulinas (ICAM, VCAM, PECAM).

As principais quimiocinas inflamatórias responsáveis pela ativação dos neutrófilos são: interleucina-8 (IL-8), Growth-related Oncogene (GRO- α), Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78), Neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2). O GRO- α é considerado um poderoso ativador de neutrófilos induzindo

quimiotaxia, exocitose e aumento do metabolismo celular de oxigênio (GEISER *et al*, 2003; MELLEMBACKEN *et al*, 2002; TANG *et al*, 2007). Assim como o GRO- α , a IL-8 também é um importante e potente ativador de neutrófilos, sendo suas principais funções a quimiotaxia e a ativação de neutrófilos (ROLLINS, 1997).

A proposta deste estudo foi avaliar a ativação de neutrófilos em recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclâmpsia, através da dosagem plasmática das principais quimiocinas relacionadas com a ativação e quimiotaxia de neutrófilos, e correlacionar estes níveis e a presença de pré-eclâmpsia materna com os eventos ocorridos no período neonatal.

2 REVISÃO DA LITERATURA:

.1 Pré-Eclâmpsia:

2.1.1 Definição e critérios diagnósticos:

A pré-eclâmpsia é uma síndrome caracterizada por hipertensão e proteinúria iniciada após a vigésima semana de gestação em mulheres previamente normotensas (QUADRO 1). Pode ser classificada como leve ou severa. Pacientes com doença severa possuem um ou mais achados descritos no QUADRO 2. A eclâmpsia refere-se ao desenvolvimento de convulsão de grande mal em mulheres com hipertensão gestacional ou pré-eclâmpsia e neste caso, a convulsão não pode estar associada a outra causa que a

justifique (LINDHEIMER *et al*, 2008; SIBAI *et al*, 2003; ACOG *practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002).

A gravidade da hipertensão arterial materna, a quantidade de proteinúria e a presença ou ausência de alterações laboratoriais são variáveis, assim como a idade gestacional de início dos sintomas (SIBAI, 2008). As manifestações podem ter início precoce (<34 semanas), tardio (> 34 semanas), durante o parto ou no pós parto, apresentando diferentes fisiopatologias. A pré-eclampsia de início precoce parece estar associada a restrição de crescimento fetal e lesões isquêmicas placentárias, enquanto a de início tardio não parece estar associadas a estes eventos (MOLDENHAUER *et al*, 2003).

QUADRO 1: Critérios diagnósticos para Pré-Eclampsia

Pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg
OU
Pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg
E
Proteinúria ≥ 0.3 g em urina de 24 horas ou $\geq 1+$ em fita teste de urina

A elevação da pressão arterial deve ser sustentada, isto é presenciada em duas medidas com intervalo mínimo de 6 horas, mas em menos de 7 dias.

QUADRO 2: Critérios diagnósticos para Pré-Eclampsia severa

Sintomas Neurológicos:

Borramento visual, escotoma, alteração do status mental, cefaléia severa (incapacitante), persistente ou que progride mesmo com terapia analgésica.
Sintomas decorrentes de distensão de cápsula hepática:
Dor abdominal no quadrante superior ou epigástrica.
Náuseas, Vômitos
Injúria hepática:
Elevação 2x normal de transaminases.
Elevação severa da pressão arterial:
Pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg ou diastólica ≥ 110 mmHg, medidas em 2 ocasiões com mais de 6 horas de diferença.
Trombocitopenia:
< 100000 plaquetas/mm ³
Proteinúria:
≥ 3 gramas em 24 horas ou $\geq 3+$ em fita teste de urina.
Oligúria < 500 ml em 24 horas.
Severa restrição do crescimento intra-uterino.
Edema pulmonar ou cianose
Acidente vascular cerebral.

Existem outras doenças hipertensivas na gestação que devem ser diferenciadas da pré-eclampsia (LINDHEIMER *et al*, 2008; *Working group report on high blood pressure in pregnancy*, 2000):

- Hipertensão crônica: Pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg preexistente a gestação ou de início antes da vigésima semana de gestação ou que persiste após 12 semanas do pós parto. Pode ser primária (hipertensão essencial) ou secundária a uma variedade de doenças.

- Hipertensão crônica com superposição de pré-eclampsia: Diagnóstico de hipertensão antes da gestação e início de proteinúria após vigésima semana de gestação. Em mulheres que já tinham hipertensão e proteinúria são consideradas pré-eclampticas aquelas que possuem piora súbita da hipertensão (PAS ≥ 160 mmHg ou PAD ≥ 110

mmHg), principalmente se acompanhado aumento de transaminases ou trombocitopenia.

- Hipertensão induzida pela gestação: Hipertensão sem proteinúria desenvolvida após a vigésima semana de gestação em mulheres previamente normotensas.

A síndrome HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme levels and a low plaquet count*) tem sido considerada uma variante da pré-eclampsia, mas pode ocorrer sem estar associada a pré-eclampsia. É uma síndrome caracterizada por hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia devido alteração endotelial microvascular. Quando a pré-eclampsia não está associada, o diagnóstico de HELLP frequentemente é retardado (GLESSON *et al*, 1996).

2.1.2 Incidência:

As doenças hipertensivas complicam 5 a 10% de todas as gestações. A pré-eclampsia ocorre em 3 a 14% das gestações. A hipertensão crônica ocorre em 3% das gestações e a hipertensão gestacional ocorre em 6% das gestações (LINDHEIMER *et al*, 2008; SAFTLAS *et al*, 1990; SIBAI *et al*, 1995; ACOG, 2002; LAIN *et al*, 2002).

Globalmente, a pré-eclâmpsia e a eclâmpsia são responsáveis por 10-15% das mortes maternas (DULEY, 2009). Também são responsáveis por significativa morbimortalidade perinatal devido desencadearem a restrição do crescimento intra-uterino e serem uma das principais causas de nascimentos prematuros (TURNER, 2010).

No Brasil, a hipertensão arterial na gravidez constitui a primeira causa de morte materna (SOARES *et al*, 2009). LAURENTI *et al* (2004) demonstraram em seu estudo que nas capitais brasileiras os transtornos hipertensivos lideram as causas de morte

materna, representando 25% dos óbitos maternos investigados. SOARES *et al* (2009), em levantamento epidemiológico realizado no estado do Paraná, encontraram 190 mortes por pré-eclâmpsia/eclâmpsia entre 1997 e 2005, representando 18% dos óbitos maternos, constituindo a primeira causa de mortalidade materna no estado do Paraná. Já Vega *et al* (2007) demonstraram que dentre os 609 óbitos maternos ocorridos em São Paulo no período de 1995 a 1999, 142 deles (23%) foram devido a hipertensão na gestação, sendo 99 (16%) por pré-eclâmpsia/eclâmpsia e 43 (7%) secundários a hipertensão crônica na gestação.

A superposição de síndrome HELLP ocorre em 4-12% das mulheres com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia (WOLF, 1996).

2.1.3 Fisiopatologia:

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia envolve tanto fatores maternos quanto fatores fetais/placentários. Sendo a PE uma doença complexa e multissistêmica, numerosos modelos têm sido propostos para explicar a sua fisiopatogênese.

Anormalidades no desenvolvimento da vasculatura placentária no início da gestação podem resultar em baixa perfusão, hipóxia e isquemia placentária que levariam a liberação de fatores anti-angiogênicos, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, dentre outros fatores inflamatórios na circulação materna que alterariam a função endotelial sistêmica e causariam a hipertensão e as outras manifestações da pré-eclâmpsia, além das manifestações no feto como a restrição do crescimento uterino e o oligodrâmnio (GILBERT *et al* 2007; TURNER, 2010; REDMAN *et al*, 1999). A

disfunção endotelial parece ter papel central na patogênese da PE. Esta doença também parece ser caracterizada por uma produção alterada de citocinas e ativação leucocitária, sugerindo que a pré-eclampsia possa representar uma resposta inflamatória materna excessiva à gestação (MELLEMBAKKEN *et al*, 2002). As bases moleculares para a desregulação placentária continuam incertos e o papel dos mediadores endoteliais/angiogênicos/antiangiogênicos no desenvolvimento vascular placentário precoce estão em intensa investigação (GILBERT *et al* 2007; TURNER, 2010; REDMAN *et al*, 1999).

O desenvolvimento anormal da placenta pode ser explicado pela falha de invasão do trofoblasto nas artérias espiraladas e pelo defeito de diferenciação do trofoblasto, levando ao incompleto remodelamento destas artérias, sendo este mecanismo considerado a causa primária da isquemia placentária (ZHOU *et al*, 1997). Nas gestações normais, as células citotrofoblásticas migram através da decídua e parte do miométrio para invadir o endométrio e a túnica muscular média das artérias espiraladas. Como resultado estes vasos transformam-se de pequenas arteríolas musculares em largos vasos de baixa resistência, o que facilita o fluxo sanguíneo para placenta. Na pré-eclampsia há uma falha de penetração do trofoblasto na porção muscular das artérias espiraladas, havendo por consequência falha no desenvolvimento destas artérias, ao invés de canais vasculares largos e tortuosos característicos das gestações normais, estes permanecem finos, resultando em hipoperfusão e isquemia placentária (ZHOU *et al*, 1997). Um defeito na diferenciação do trofoblasto também seria uma possível explicação para a falha de sua invasão nas artérias espiraladas. A sua diferenciação depende de alteração de expressão de inúmeras moléculas, como as citocinas, as moléculas de adesão, os fatores de crescimento e as metaloproteinases,

sendo esse processo denominado de pseudo-vasculogênese. Na pré-eclampsia o trofoblasto possui um defeito neste mecanismo de pseudo-vasculogênese (ZHOU *et al*, 1997; HUPPERTZ, 2008; FURUYA *et al*, 2011).

A hipoperfusão, a hipóxia e a isquemia placentária resultantes deste desenvolvimento anormal da placenta na pré-eclampsia, promovem a liberação pela mesma de uma série de mediadores inflamatórios e fatores antiangiogênicos que irão desencadear a disfunção endotelial sistêmica e os seus efeitos na gestante e no feto. A seguir serão apresentados os principais mediadores descritos na literatura.

Estudos demonstram que na circulação de pacientes preeclâmpicas os níveis dos fatores antiangiogênicos, *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1) e *soluble endoglin* (sEng), estão significativamente aumentados, havendo um desbalanço entre estes fatores antiangiogênicos e os fatores angiogênicos, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *placental growth factor* (PlGF) (FURUYA *et al*, 2011; GILBERT *et al*, 2007; LEVINE *et al*, 2006; ROMERO *et al*, 2008; REDDY *et al*, 2009).

O sFlt-1 tem sido postulado como o principal fator na patogênese da pré-eclampsia (GILBERT *et al*, 2007; SHIBATA *et al*, 2005). Também é nomeado como *Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1* (sVEGFR-1). É um antagonista do VEGF e do PlGF. O sFlt-1 antagoniza a atividade biológica pró-angiogênica do VEGF e PlGF por sua ligação a eles, prevenindo a interação deles com outros receptores. Em gestações normais, há um aumento de VEGF e PlGF na metade da gestação. Em mulheres com pré-eclampsia há um aumento de sFlt-1 em comparação com gestações normais, o que promove a disfunção vascular sistêmica pela interferência nas atividades do VEGF e PlGF (FURUYA *et al*, 2011).

A engolina é um co-receptor do transforming growth factor $\beta 1$ e $\beta 3$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 3$) e está altamente expressa nas membranas celulares do endotélio vascular e do sinciciotrofoblasto. A sua forma solúvel – sEng - é uma proteína antiangiogênica que inibe o sinal do TGF- $\beta 1$ na vasculatura. Juntamente com o sFlt1 produz a disfunção endotelial da pré-eclampsia, mas operando por mecanismos distintos (LEVINE *et al*, 2006; ROMERO *et al*, 2008).

O sistema renina-angiotensina (SRA) também possui importante função na fisiopatologia da PE. O angiotensin II receptor type 1 (AT1) é o principal receptor para a angiotensina II e a sua sinalização desencadeia uma intensa contração vascular e em consequência hipertensão, edema e proteinúria. A angiotensina II não está elevada na pré-eclampsia, mas há uma ativação aberrante da sinalização da AT1, que ocorre em decorrência da formação de anticorpos autoimunes agonistas contra AT1 (AT1-AA). Mais recentemente tem sido demonstrado associação entre a aceleração da sinalização da AT-1 e a produção de sFlt-1. Em modelos experimentais com ratas preeclámpicas com elevação do SRA foi demonstrado aumento dos níveis plasmáticos de sFlt-1 (FURUYA *et al*, 2011).

A produção de óxido nítrico está elevada na gestação normal, tendo papel importante na vasodilatação renal das gestantes (GILBERT *et al*, 2008). Nas gestantes com PE há diminuição da produção de vasodilatadores derivados do endotélio, tais como o óxido nítrico e a prostaciclina e aumento de produção de vasoconstritores como as endotelinas e tromboxanos. Há também um aumento das concentrações de fibronectina, fator VIII, fator de Von Willebrand e trombomodulina (REDMAN *et al*, 1999; ROBERTS *et al*, 1991; WALSH, 2006). Na PE há um estresse oxidativo resultante do aumento da atividade de fatores pró-oxidantes e diminuição da proteção

antioxidante, isto podendo ser resultado da interação entre fatores maternos como obesidade, diabetes, hiperlipidemia e fatores placentários que envolvem a secreção de peróxidos de lipídeos (ROBERTS *et al*, 1991; WALSH, 2006).

A ativação dos neutrófilos também está associada a fisiopatologia da pré-eclampsia. (CLARK *et al*, 1998). WALSH, 2009 demonstrou em seu estudo que fatores presentes no plasma de gestantes com PE estimulam a migração transendotelial dos neutrófilos e isto aconteceria devido a indução do estresse oxidativo e da produção de interleucina-8. Partículas da membrana de leucócitos e plaquetas, assim como fragmentos da membrana do sinciciotrofoblasto estão elevadas no plasma de gestantes com PE, induzindo inflamação vascular e ativação endotelial (WALSH, 2006; WALSH, 2009).

As citocinas, as quimiocinas e as moléculas de adesão são potenciais mediadores da disfunção endotelial presentes na pré-eclampsia. SZARKA *et al* (2010) demonstraram aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , bem como das quimiocinas IL-8, IP-10 e MCP-1 e das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 nas pacientes com pré-eclampsia quando comparadas com gestantes normais. TOSUN *et al* (2010) também demonstraram aumento significativo de IL-6, IL-8 e TNF-alpha em gestantes com PE. KAUMA *et al* (2002) encontraram dados que suportam a hipótese de que fatores circulantes no plasma de mulheres com PE ativam a produção de *endothelial monocyte chemoattractant protein-1* e interleucina-8, podendo aumentar a aderência dos monócitos no endotélio vascular. MELLEBAKKEN *et al* (2002) demonstraram ativação dos leucócitos nas gestantes com pré-eclampsia, uma vez que obtiveram aumento da expressão de marcadores de ativação leucocitária na circulação uteroplacentária. Embora não necessariamente a ativação leucocitária seja o evento

primário, ou mesmo a causa da pré-eclampsia, ela pode contribuir para a sua progressão. A ativação endotelial pode estar presente antes da ativação leucocitária e até mesmo induzi-la, no entanto a ativação leucocitária pode posteriormente promover a ativação endotelial, representando um círculo vicioso na fisiopatogênese da pré-eclampsia (MELLEMBAKKEN *et al*, 2002).

Outros fatores também contribuem na patogênese da pré-eclampsia como fatores genéticos, imunológicos, comportamentais e ambientais.

2.1.4 Fatores de Risco:

Vários são os fatores de risco descritos para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. O conhecimento destes fatores é muito importante para a identificação precoce das gestantes com alto risco para desenvolver pré-eclâmpsia e suas complicações. Abaixo serão apresentados os principais fatores de risco para o desenvolvimento da pré-eclampsia (TURNER, 2010).

- Fatores obstétricos maternos: Nuliparidade, história prévia de pré-eclâmpsia, gestação múltipla, hipertensão gestacional, gestação molar (SIBAI *et al*, 2003; DUCKITT *et al*, 2005).

- Co-morbidades maternas: Hipertensão crônica, diagnóstico prévio de doença renal/vascular/endotelial e diabetes (DUCKITT *et al*, 2005).
- Fatores maternos genéticos: Síndrome do anticorpo antifosfolípideo, Mutação do Fator V de Leiden (resistência proteína C) e outras trombofilias, história familiar de pr -eclampsia (parente de primeiro grau) (SKJAERVEN *et al*, 2005).
- Obesidade, tabagismo (DUCKITT *et al*, 2005; TURNER, 2010). O tabagismo parece diminuir o risco de pr -eclâmpsia.
- Idade superior a 40 anos ou inferior a 18 anos (DUCKITT *et al*, 2005) .
- Fatores obstétricos paternos: Homem nascido de gesta o pr -eclamptica, história de outra mulher com gesta o pr -eclamptica (SKJAERVEN *et al*, 2005).

2.1.5 Manifesta es Clínicas:

  necessário pensar em PE e diagnostic -la o mais precocemente possível. O grande problema   que na maior parte das gesta es complicadas com PE as manifesta es clínicas da mesma são tardias.

As altera es patológicas na placenta associadas   pr -eclâmpsia ocorrem semanas a meses antes da percep o das manifesta es clínicas. Usualmente há um desenvolvimento gradual de hipertensão e proteinúria, achados estes que se tornam aparentes a partir do terceiro trimestre de gravidez e progridem até o momento do parto.

Entretanto, algumas mulheres podem desenvolver os sintomas no segundo trimestre de gestação enquanto outras podem apresentar os sintomas apenas no parto ou no período pós parto (LINDHEIMER *et al*, 2008; SIBAI, 1988). A ocorrência de sinais e sintomas de pré-eclampsia antes de 20 semanas de gestação é muito raro. Quando presente, é sugestivo de gestação molar ou síndrome do anticorpo antifosfolípideo, podendo ser também causado por uso de drogas ou aneuploidias cromossômicas fetais (TOWERS *et al*, 1993; BROEKHUIZEN *et al*, 1983).

As principais manifestações clínicas na pré-eclampsia serão descritas abaixo :

Hipertensão arterial sistêmica: É definida como pressão arterial sistólica maior ou igual 140 mmHg ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg em mulheres que eram normotensas antes da vigésima semana de gestação. A elevação da pressão arterial deve ser sustentada, isto é, presenciada em duas medidas com intervalo mínimo de 6 horas, mas em menos de 7 dias (QUADRO 1). Se a pressão arterial sistólica for maior ou igual a 160 mmHg ou a pressão arterial diastólica for maior que 110 mmHg em duas medidas com intervalo de 6 horas, a pré-eclampsia é considerada severa (Quadro 2) (*Working group report on high blood pressure in pregnancy*, 2000; SIBAI *et al*, 2003; LINDHEIMER *et al*, 2008; *ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002).

Proteinúria: É indispensável haver proteinúria presente no momento do diagnóstico de pré-eclâmpsia. Considera-se proteinúria uma quantidade maior ou igual a 0.3 gramas de proteína na urina de 24 horas ou maior ou igual a 1+ de proteína na fita teste de urina. Na presença de mais de 5 gramas de proteína na urina de 24 horas considera-se a pré-eclampsia como severa. A diminuição da taxa de filtração

glomerular, a elevação do ácido úrico, a oligúria e o aumento da relação proteína/creatinina são outros achados da pré-eclampsia (*Working group report on high blood pressure in pregnancy*, 2000; SIBAI *et al*, 2003; LINDHEIMER *et al*, 2008; *ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002).

Alterações hematológicas: A alteração hematológica mais comum na pré-eclampsia é a plaquetopenia. Uma contagem de plaquetas menor que 100000/ microL/mm³ caracteriza a pré-eclampsia como severa. A hemólise por microangiopatia pode ocorrer, levando aumento da enzima lactado desidrogenase, reticulocitose e anemia. Hipercoagulabilidade, ativação de plaquetas com consumo microvascular e ativação do sistema fibrinolítico são alterações que podem ocorrer na pré-eclampsia (*ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002).

Alterações hepáticas: Dor epigástrica e no quadrante superior do abdômen, elevação das transaminases e mais raramente hemorragia subcapsular e ruptura da cápsula de Glisson com hemorragia hepática podem ocorrer em mulheres com pré-eclampsia. Náuseas e vômitos também podem ocorrer. Quando as alterações hepáticas estão presentes, a pré-eclampsia é classificada como severa (*ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002; LINDHEIMER *et al*, 2008).

Alterações no Sistema Nervoso central e oftalmológicas: Cefaléia, acidente vascular cerebral, alterações visuais como borramento da visão e escotomas e mais raramente cegueira cortical. A presença destas alterações classifica a pré-eclampsia

como severa. Pode também ocorrer hiperreflexia e convulsão, esta última levando ao diagnóstico de eclampsia. (*ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002; LINDHEIMER *et al*, 2008).

Alterações cardiovasculares: Aumento da resistência vascular, redução do débito cardíaco, depleção do volume intravascular, aumento do risco de eventos coronarianos (TURNER, 2010).

Alterações no sistema respiratório: Edema faringo-amigdaliano, edema pulmonar e cianose são as principais alterações no sistema respiratório desencadeadas pela pré-eclampsia e classificam-na como severa (*ACOG practice bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*, 2002; LINDHEIMER *et al*, 2008, TURNER, 2010).

2.1.6 Tratamento:

O tratamento da pré-eclampsia leve é de suporte até o parto e inclui repouso parcial da gestante e monitorização freqüente do feto (TURNER, 2010). Conforme *ACOG practice bulletin on hypertensive disorders*, 2002, sugere-se avaliação da movimentação fetal diariamente, perfil biofísico fetal semanal, ecografia para avaliação de crescimento fetal e monitorar o líquido amniótico a cada 3-4 semanas, além de exames maternos semanais (pressão arterial, hematócrito, plaquetas, funções hepática e renal, proteinúria de 24 horas). O risco de convulsão por eclampsia na pré-eclampsia

leve é de menos de 1%, sendo o uso de sulfato de magnésio profilático controverso (TURNER, 2010).

Nos casos de pré-eclampsia severa, o alvo da terapia é o controle da hipertensão arterial e a prevenção da eclampsia, indicando-se parto vaginal quando possível e cesariana para casos de urgência ou falha de indução do parto. O momento da interrupção da gestação é avaliado considerando o balanço entre a segurança da mãe e o risco das conseqüências do parto prematuro para o feto (TURNER, 2010). O manejo expectante é reservado apenas para algumas pacientes que estão próximas da gestação à termo, com quadro cínico estável com uso de anti-hipertensivos e com estabilidade dos exames laboratoriais e do perfil biofísico fetal. (*ACOG practice bulletin on hypertensive disorders*, 2002; TURNER, 2010). A profilaxia de convulsões é realizada com sulfato de magnésio (SIBAI, 2004). As principais medicações utilizadas no tratamento da hipertensão associada a pré-eclampsia severa são a hidralazina, o labetalol e a nifedipina (VON DADELSZEN *et al*, 2005). A Nitroglicerina e o nitroprussiato são utilizadas nas emergências hipertensivas (TURNER, 2010).

As principais indicações de interrupção da gestação de urgência na pré-eclampsia são (TURNER, 2010):

- Tempo superior a 24 horas de hipertensão severa e refratária ao tratamento
- Insuficiência renal refratária
- Edema pulmonar
- Piora da trombocitopenia, coagulopatia, coagulação intravascular disseminada
- Disfunção hepática progressiva, hematoma ou ruptura hepática
- Ruptura da placenta
- Restrição do crescimento fetal severa ou oligodramnios

- Sofrimento fetal

2.1.7 Efeitos da Pré-Eclampsia no Feto e no Recém-Nascido:

A principal consequência de uma gestação pré-eclamptica para feto é a restrição do crescimento fetal e é o resultado da hipoperfusão, hipoxemia e isquemia crônica placentária. A prematuridade, o baixo peso ao nascer e a neutropenia são outros efeitos comuns ao recém-nascido de mães com pré-eclampsia. É controverso na literatura se a pré-eclampsia materna aumenta o risco de sepse neonatal. A seguir serão abordadas as principais alterações provocados no feto/recém-nascido em decorrência da pré-eclampsia materna.

2.1.7.1 Pré-eclampsia e Restrição do Crescimento Intra-Uterino:

A restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) pode ser definida como o peso fetal inferior ao percentil 10 para a idade gestacional. A RCIU resulta em um recém-nascido pequeno para idade gestacional (PIG) (ALEXANDER *et al*, 1996).

A restrição do crescimento fetal pode ocorrer devido a fatores maternos (Desnutrição severa; hipoxemia; desordens imunológicas e hematológicas que causam trombose; nefropatia; doença do colágeno; **pré-eclampsia**; infecções virais e

parasitárias; tabagismo; alcoolismo; uso de drogas ilícitas; medicações) ou devido a fatores neonatais (anormalidades cromossômicas; síndromes genéticas; gestação múltipla) ou devido a fatores placentários (vasculatura útero-placentária anormal; inflamação crônica; anormalidades estruturais da placenta; hemangioma placentário) (WOLLMANN, 1998).

A incidência de RCIU varia entre as populações. Aproximadamente 10% dos RN à termo são PIG nos países desenvolvidos, em comparação a 23% em países em desenvolvimento. JELIN *et al* (2010) demonstraram uma incidência de 17.8% de RN PIG em consequência da pré-eclampsia materna.

A diminuição do fluxo sanguíneo útero-placentário, resultando em hipoperfusão, hipóxia e isquemia crônica placentária, é o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento da restrição do crescimento fetal. Como resultado, as gestantes com pré-eclampsia possuem maior risco de apresentarem recém-nascidos com baixo peso de nascimento e pequenos para idade gestacional (FRIEDMAN *et al*, 1995; XIONG *et al* 2000).

Fatores maternos angiogênicos e antiangiogênicos (PIGF, Flt-1, sEnd) podem estar associados a restrição do crescimento fetal tanto nas gestações normais quanto nas gestações complicadas com pré-eclampsia (OLAV *et al*, 2011; ROMERO *et al*, 2008).

OLAV *et al* (2011) demonstrou que o PIGF diminuído está associado com um alto risco de RCIU. Também demonstrou que uma baixa dosagem de Flt-1 no início da gestação seguido de um grande aumento de Flt-1 e s-Eng está associado com alto risco de RCIU severa (OLAV *et al*, 2011).

Segundo XIONG *et al* (2002) a PE é uma desordem heterogênea que pode manifestar-se com restrição do crescimento fetal ou com um crescimento fetal normal.

Pacientes com pré-eclampsia associada a RCIU geralmente desenvolvem parto prematuro e o modelo fisiopatológico de sua doença segue da hipótese isquêmica clássica. Já as pacientes que desenvolvem pré-eclampsia com crescimento fetal normal geralmente evoluem para parto à termo e sugere-se poder haver outro mecanismo de doença ou menor severidade da doença ou início das anormalidades mais tardios durante a gestação (XIONG *et al*, 2002).

ODEGARD *et al* (2000) demonstraram que tanto a pré-eclampsia severa quanto a de início precoce estão associadas a significativa restrição do crescimento intra-uterino. Também demonstraram que o risco de ter um RN PIG foi dramaticamente aumentado em mulheres com pré-eclampsia recorrente (ODEGARD *et al*, 2000).

2.1.7.2 Pré-Eclampsia e Neutropenia Neonatal:

A neutropenia neonatal é definida como contagem de neutrófilos absolutos menor que 1500/microL. A contagem de neutrófilos absolutos é igual ao produto dos leucócitos totais e as frações de neutrófilos e bastões. Os neutrófilos metamielócitos e outras formas jovens não estão incluídos no cálculo (SCHWARTZBERG, 2006).

Neutrófilos absolutos = leucócitos totais x porcentagem de neutrófilos + bastões / 100.

A neutropenia pode ser caracterizada como leve, moderada ou severa, baseada na contagem de neutrófilos. Neutropenia leve corresponde ao número de leucócitos entre 1000-1500/microL, moderada entre 500-1000/microL e severa menos que 500/microL.

O risco de infecção aumenta quando a contagem de neutrófilos $< 1000/\text{microL}$ (SCHWARTZBERG, 2006).

É importante diferenciar alguns termos que podem ser confundidos com neutropenia, como leucopenia, granulocitopenia e agranulocitose.

Leucopenia é definida como contagem de leucócitos $< 5000/\text{microL}$, e pode ser devido a linfopenia e/ou neutropenia. Quase todos os pacientes leucopênicos são neutropênicos, devido ao número de neutrófilos ser maior que de linfócitos.

Granulocitopenia se refere a redução do número absoluto de todas as células da série de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Quase todos os pacientes granulocitopênicos são neutropênicos, devido ao número de neutrófilos ser maior que de eosinófilos e basófilos.

Agranulocitose se refere a ausência de granulócitos e este termo é frequentemente utilizado incorretamente para indicar neutropenia severa (neutrófilos $< 500/\text{microL}$).

A neutropenia pode resultar de quatro mecanismos básicos: 1) Diminuição da produção de neutrófilos; 2) Granulopoiese inefetiva; 3) Consumo dos neutrófilos pelo endotélio vascular e tecidos; 4) Destruição periférica dos neutrófilos (AL-MULLA & CHRISTENSEN, 1995; SCHWARTZBERG, 2006).

Com base na sua etiologia, a neutropenia pode ser classificada como adquirida ou congênita (SCHWARTZBERG, 2006).

As principais causas de neutropenia adquirida são: 1) Neutropenia pós infecção; 2) Neutropenia induzida por drogas; 3) Neutropenia devido a desordens auto-imunes; 4) Hiperesplenismo; 5) Doenças da medula óssea; 6) Neutropenia neonatal isoimune. As principais causas de neutropenia congênita seriam: 1) Síndromes como Chediak-

Higashi, Shwachman-Diamond; 2) Agranulocitose infantil severa; 3) Disgenesia reticular; 4) Neutropenia cíclica; 5) Disceratose congênita; 6) Deficiência de mieloperoxidase. (BOXER & NEWBURGER, 2007).

A neutropenia é um achado freqüente em RN de mães com pré-eclampsia (DORON *et al*, 1994). Aproximadamente 50% dos RN de mães com hipertensão apresentam neutropenia ao nascimento (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; MOUZINHO *et al*, 1992). Cerca de 17% dos RN de mães com pré-eclampsia apresentam neutropenia nas primeiras 72 horas de vida (PROCIANOY *et al*, 2010). A pré-eclampsia materna é um fator de risco independente para neutropenia em RN prematuros (GRECO *et al*, 1997).

O mecanismo fisiopatológico que desencadeia a neutropenia nos RN de mães com pré-eclampsia tem sido intensamente investigado, mas ainda continua incerto o que o determina.

KOENING & CHRISTENSEN (1989) estudaram a circulação, marginação, estocagem e proliferação dos neutrófilos e seus progenitores sugerindo que a neutropenia seja um resultado da diminuição da produção dos neutrófilos nos RN de mães com hipertensão. Em outro estudo, KOENING & CHRISTENSEN (1991) demonstraram uma diminuição da produção de neutrófilos em recém-nascidos de mães com hipertensão induzida pela gestação, sugerindo poder existir um inibidor da produção de neutrófilos elaborado pela placenta presente no cordão umbilical, que causaria a neutropenia neonatal.

ZOOK *et al* (2009) tentou correlacionar o efeito da patologia placentária, como infarto e vasculopatia, com a presença da neutropenia em recém-nascidos de muito baixo peso nascidos de mães com pré-eclampsia, mas não houve correlação desta

citopenia com a vasculopatia ou infarto placentário. Por outro lado houve correlação entre a citopenia e o fato destes recém-nascidos serem mais PIG e mais prematuros quando comparados com recém-nascidos de mães sem pré-eclampsia (ZOOK *et al*, 2009).

O uso de fatores estimulantes de colônia de granulócitos (rhG-CSF - *recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*) em RN com neutropenia decorrente da pré-eclampsia materna aumenta a contagem de neutrófilos (LA GAMMA *et al*, 1995; MAKHLOUF *et al*, 1995). O uso destes fatores deve ser cauteloso, já que a neutropenia nestes RN é transitória e estudos demonstram que não há aumento do risco de sepse neonatal.

2.1.7.3 Pré-Eclampsia e Sepse Neonatal:

A sepse neonatal é uma síndrome clínica caracterizada por sinais sistêmicos de infecção acompanhada do isolamento de uma bactéria em hemocultura ou outro cultural do recém-nascido. É classificada de acordo com a idade do recém-nascido no momento do início dos sintomas:

Sepse precoce: É definida como início de sintomas de infecção nos primeiros dias de vida. BIZZARRO *et col*, 2008, classifica sepse precoce como hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida. Já PICKERING *et al*, 2009, define no comitê de doenças infecciosas da Academia Americana de Pediatria sepse precoce como infecção pelo estreptococcus grupo B com início dos sintomas nos primeiros 6 dias de vida. É causada pela transmissão vertical pela contaminação do líquido amniótico ou durante parto vaginal pelas bactérias colonizantes ou infectantes do trato genito-

urinário materno. O risco de sepse aumenta 1 a 4% em neonatos de mães com corioamnionite. A colonização do trato genito-urinário ou infecção urinária por estreptococos do grupo B são fatores de risco para sepse precoce (PICKERING *et al*, 2009).

Sepse tardia: É definida como início dos sintomas após os primeiros dias de vida. Da mesma forma que na sepse precoce, há uma variabilidade de definição quanto ao início da sepse tardia (mais de 72 horas de vida ou mais de 7 dias de vida). Conceitualmente, tem sido aceito como sepse tardia a presença de microorganismo sabidamente patogênico em cultura de recém-nascido com mais de 72 horas de vida. Pode ser adquirida por transmissão vertical materna, que resulta em colonização neonato e posterior infecção ou transmissão horizontal pelo contato com equipe da unidade neonatal, procedimentos invasivos, perda integridade de pele e mucosa (BIZZARRO *et col*, 2008; PICKERING *et col*, 2009).

A incidência de sepse neonatal é baixa (1-10/1000 nascimentos vivos), podendo afetar mais de 16% dos RN nas UTI neonatais com peso entre 501-1500 g. A mortalidade é alta: 15 a 50% dos RN sépticos evoluem à óbito (KURT *et col*, 2007).

Ainda há controvérsias na literatura a respeito da pré-eclâmpsia aumentar o risco de sepse para o recém-nascido.

PROCIANOY *et al* (2010) demonstraram que RN prematuros de muito baixo peso nascidos de mães com pré-eclâmpsia não possuem risco aumentado de sepse precoce ou tardia, independente da presença de neutropenia. PAUL *et al* (1999) e FRIEDMAN *et al* (1995) também não encontraram aumento do risco de sepse em RN de mães com PE.

Alguns estudos relatam o aumento da ocorrência de infecção neonatal nos RN de mães pré-eclâmpicas, especialmente nos que possuem neutropenia (BHAUMIK *et al* , 2000; CADNAPAPHORNCHAI & FAIX, 1992; DORON *et al*, 1994; KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; SHARMA *et al*, 2009). GRECO *et al* (1997) demonstrou que a pré-eclampsia é um fator de risco independente para infecção e neutropenia em RN prematuros. O risco de sepse associado à neutropenia nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia ainda é controverso.

O uso de fatores estimulantes de colônia de granulócitos (rhG-CSF - *recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*) em RN com neutropenia decorrente da pré-eclampsia materna aumenta a contagem de neutrófilos (LA GAMMA *et al*, 1995; MAKHLOUF *et al*, 1995).

KOCHERLAKOTA & LA GAMMA (1998) sugerem que o uso de rhG-CSF diminuiria a incidência de infecção neonatal nos RN em ventilação mecânica e com neutropenia prolongada associada a PE, quando comparado à terapia convencional.

O uso destes fatores estimuladores, entretanto, deve ser cauteloso, já que a neutropenia nestes RN é transitória e alguns estudos demonstram que não há aumento do risco de sepse nestes RN (PROCIANOY *et al*, 2010).

2.2 Fisiologia do Processo Inflamatório:

Os neutrófilos agem na primeira linha da defesa contra infecções bacterianas e são fundamentais no processo de inflamação aguda, independente da etiologia da

inflamação. Infecções e injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria (BILATE, 2007).

O mecanismo de inflamação é caracterizado histologicamente pelo acúmulo de leucócitos no sítio inflamado. A migração acontece através do contato entre os leucócitos e o endotélio vascular inflamado. As bases moleculares e fatores determinantes do movimento leucocitário para o sítio de inflamação tem sido amplamente estudadas nas últimas décadas (LIU & KUBES, 2003; BILATE, 2007).

Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo e em fases mais tardias os monócitos e linfócitos também migram para o local amplificando o processo inflamatório. Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória: 1) Quimiocinas realizam a quimiotaxia de leucócitos, 2) Enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; 3) Plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilotoxinas que induzem degranulação de mastócitos e conseqüentemente liberação de histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microorganismos, facilitando a fagocitose; 4) Mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; 5) Citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda (BILATE, 2007).

O mecanismo de inflamação é composto por quatro etapas principais:

- Marginação leucocitária

- Rolamento leucocitário
- Ativação e adesão leucocitária
- Migração transendotelial celular.

No rolamento leucocitário as principais moléculas envolvidas são as selectinas (plaquetárias, endoteliais e leucocitárias).

Na ativação leucocitária, as quimiocinas inflamatórias CXC.

Na adesão leucocitária e na migração transendotelial celular, as integrinas, as selectinas e a superfamília de imunoglobulinas (ICAM, VCAM, PECAM).

As principais quimiocinas inflamatórias responsáveis pela ativação dos neutrófilos são: interleucina-8 (IL-8), Growth-related Oncogene (GRO- α), Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78), Neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2) (GEISER *et al*, 2003; MELLEMBACKEN *et al*, 2002; TANG *et al*, 2007).

As quimiocinas possuem papel fundamental no processo inflamatório, sendo responsáveis pela quimiotaxia e ativação leucocitária. Têm sido alvo de inúmeros estudos em diversas patologias humanas. A seguir será abordado de forma detalhada as funções das quimiocinas no processo inflamatório.

2.3 Quimiotaxia e Ativação Leucocitária: As quimiocinas

As quimiocinas (ou citocinas quimiotáticas) são pequenas moléculas protéicas (8-12 kDa), compostas de 92 a 125 aminoácidos, constituem uma família especializada de citocinas que funcionam como potentes mediadores e reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos (BAGGLIONI *et al*, 1997). Além disso, são responsáveis por controlar a adesão, a

quimiotaxia e a ativação de vários tipos de leucócitos. Desempenham papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. As quimiocinas também controlam e atuam na hematopoiese, angiogênese e metástase de tumores (ROLLINGS, 1997). As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos ou células residentes do local da inflamação, em resposta a estímulos externos, regulam o tráfego celular através dos tecidos e são produzidas constitutivamente por várias células nesses tecidos. Mais de 50 quimiocinas e 18 receptores já foram descritos (BILATE, 2007).

A nomenclatura das quimiocinas é confusa devido ao fato de que inicialmente foram identificadas de acordo com a nomenclatura das citocinas (exemplo: Interleucina-8) ou de acordo com a sua função biológica (exemplo: MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*) ou de acordo com a sua localização (exemplo: *lungkine*). Atualmente, para tentar unificar a nomenclatura, as quimiocinas foram classificadas de acordo com a posição de seus resíduos de cisteína (IUIS/WHO, 2003).

As quimiocinas possuem quatro resíduos conservados de cisteína e são classificadas em quatro subfamílias dependendo da posição de dois desses resíduos de cisteína: CC, CXC, CX3C e XC (X= aminoácido e C= cisteína). Na subfamília CXC um aminoácido separa as primeiras 2 cisteínas, enquanto na subfamília CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. A subfamília XC apresenta apenas uma cisteína, enquanto que as quimiocinas da subfamília CX3C apresentam 3 aminoácidos entre as duas cisteínas (BAGGLIONI *et al*, 1997).

As quimiocinas podem também ser separadas em duas categorias dependendo da forma como são expressas: Constitutivas ou inflamatórias/induzidas. As quimiocinas

constitutivas são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos, principalmente linfócitos, para estes tecidos na ausência de inflamação. As quimiocinas inflamatórias são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e recrutam leucócitos para locais de inflamação (MOSER & LOETSCHER, 2001).

A ação das quimiocinas é mediada por receptores transmembranas de alta afinidade acoplados a proteína G. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. A identificação dos receptores segue a mesma nomenclatura proposta para as quimiocinas seguida do R (exemplo: quimiocina CXC, receptor CXCR). A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor. Após a ligação da quimiocina em seu receptor, ocorre a ativação de proteínas G, iniciando uma cascata de transdução de sinais que gera segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) e cálcio. As vias de transdução de sinais ativadas pelas quimiocinas promovem a ativação de integrinas nos leucócitos, e com isso a adesão à parede do endotélio, com geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos e ativação de proteases nos neutrófilos (BILATE, 2007; MURPHY *et al*, 2000, MURPHY, 2002).

Existem 11 receptores diferentes identificados para as quimiocinas CC (CCR1 a CCR11) e seis para as quimiocinas CXC (CXCR1 a CXCR6), (MURPHY *et al*, 2000; MURPHY, 2002).

As subfamílias de quimiocinas possuem propriedades distintas. São produzidas por uma variedade de células e possuem efeitos alvo diferentes (QUADRO 3). As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos e promovem sua ativação. São

produzidas por uma variedade de células (monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, plaquetas, células estromais). As CC quimiocinas atraem monócitos, basófilos e linfócitos. São produzidas por várias células (QUADRO 3). As quimiocinas também estão envolvidas na diferenciação de linfócitos Th1 e Th2. Algumas quimiocinas estão envolvidas na angiogênese por exercerem efeito quimiotático em células endoteliais (CXCL8/IL-8, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL1/GRO-a, CXCL2/GRO-b, CXCL3/GRO-g), enquanto outras podem exercer um efeito anti-angiogênico (CXCL4/PF-4, CXCL10/IP-10 e CXCL9/MIG). Outro efeito atribuído às quimiocinas é a sua interferência, tanto estimulando quanto inibindo, a hematopoiese, ação esta que vai depender da maturidade das células progenitoras envolvidas (ROLLINS, 1997).

Diversos estudos publicados nas várias áreas da medicina correlacionam as quimiocinas e seus receptores com uma ampla variedade de patologias (DAMAS *et al*, 2000; GONÇALVES *et al*, 2007; KUNKEL *et al*, 1995; LUSTER, 1998; VERMONT *et al*, 2006).

Na pré-eclampsia, patologia que é objeto de nosso estudo, existem alguns estudos demonstrando maior ativação leucocitária através da dosagem das quimiocinas (LASKOWSKA *et al*, 2007; MELLEMBAKKEN *et al*, 2001; SZARKA *et al*, 2010).

Na sepse, restrição do crescimento uterino e ruptura prematura de membrana também têm sido demonstrado níveis elevados de quimiocinas inflamatórias (FOX *et al*, 2005; LASKOWSKA *et al*, 2007; SATAR *et al*, 2008).

QUADRO 3 – Propriedades das quimiocinas

Peter Parham - O sistema Imune - Ed. Artmed - Pag 216.

Família	Quimiocina	Produção	Receptores	Células Atraídas	Maiores Efeitos
CXC	CXCL8 (IL-8)	Monócitos Macrófagos Fibroblastos Queratinócitos Células endoteliais	CXCR1 CXCR2	Neutrófilos Células T virgens	Mobiliza, ativa e degranula os neutrófilos. Angiogênese
CXC	CXCL7 (PBP, b-TG, NAP-2)	Plaquetas	CXCR2	Neutrófilos	Ativa os neutrófilos Reabsorção coágulo. Angiogênese
CXC	CXCL1 (GRO-a) CXCL2 (GRO-b) CXCL3 (GRO-gama)	Monócitos Fibroblastos Endotélio	CXCR2	Neutrófilos Células T virgens Fibroblastos	Ativa os neutrófilos Fibroplasia Angiogênese
CXC	CXCL10 (IP-10)	Queratinócitos Monócitos Células T Fibroblastos Endotélio	CXCR3	Células T em repouso Células NK Monócitos	Imunoestimulante Antiangiogênico Promove a imunidade por TH1
CXC	CXCL12 (SDF-1)	Células estromais	CXCR4	Células T virgens Células B progenitoras (CD34+)	Desenvolvimento das células B Direcionamento dos linfócitos Compete com o HIV-1
CXC	CXCL13 (BCL)	Células estromais	CXCR5	Células B	Direcionamento dos linfócitos

CC	CCL3 (MIP-1alpha)	3 Monócitos Células estromais Mastócitos Fibroblastos	CCR1, 3, 5	Monócitos Células NK e T Basófilos Células dendríticas	Compete com o HIV-1 Defesa antiviral Promove a imunidade por TH1
CC	CCL4 (MIP-1beta)	4 Monócitos Macrófagos Neutrófilos Endotélio	CCR1,3,5	Monócitos Células NK e T Células dendríticas	Compete com o HIV-1
CC	CCL2 (MCP-1)	Monócitos Macrófagos Fibroblastos Queratinócitos	CCR2B	Monócitos Células NK e T Basófilos Células dendríticas	Ativa os macrófagos Liberação de histamina pelos basófilos Promove a imunidade por TH2
CC	CCL5 (RANTES)	Células T Endotélio Plaquetas	CCR1, 3, 5	Monócitos Células NK e T Basófilos Eosinófilos Células dendríticas	Degranula os basófilos Ativa as células T Inflamação crônica
CC	CCL11 (Eotaxin)	Endotélio Monócitos Epitélio Células T	CCR3	Eosinófilos Monócitos Células T	Papel na alergia
CC	CCL18 (DC-CK)	Células dendríticas		Células T virgens	Papel na ativação de células T virgens
C	Linfotactina	CD8 ⁺ CD4 ⁺ Células T	CXCR1	Timócitos Células dendríticas Células NK	Circulação e desenvolvimento dos linfócitos

C X X C (CX3C)	C X 3 C C L 1 (Fractalquina)	Monócitos Endotélio C é l u l a s microgliais	CX3CR1	Monócitos Células T	Adesão leucócito-endotélio Infamação cerebral
-------------------	---------------------------------	--	--------	------------------------	--

2.3.1 Quimiocinas CXC: IL-8/CXCL8 e GRO-alpha/CXCL1:

As quimiocinas CXC pertencem a família de proteínas com atividade quimiotática para leucócitos específica, podendo ser divididas em dois grupos baseados na presença ou ausência dos resíduos de aminoácidos Glu-Leu-Arg (ELR), (BAGGLIOLINI *et al*, 1997; ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). As quimiocinas CXC ELR+ são quimiotáticas para neutrófilos e as quimiocinas ELR- são quimiotáticas para linfócitos T e células NK (FUJIWARA *et al*, 2002).

A IL-8 (CXCL8) e o GRO- α (CXCL1) são membros das quimiocinas CXC ELR+. Estas quimiocinas tem sido detectadas em uma variedade de doenças caracterizadas por infiltração maciça de neutrófilos, incluindo síndrome da angústia respiratória, pneumonia bacteriana, meningite bacteriana, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, uveítes (DAMAS *et al*, 2000; GONÇALVES *et al*, 2007; KUNKEL *et al*, 1995; LUSTER, 1998; VERMONT *et al*, 2006).

MELLEMBAKKEN *et al* (2002) demonstraram aumento destas quimiocinas em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de mães com pré-eclampsia (MELLEMBAKKEN *et al*, 2002).

O GRO- α é uma proteína estruturalmente relacionada a IL-8 e originalmente foi descrita como fator de estimulação de crescimento de melanoma. Seu gene foi identificado em hamsters chineses e fibroblastos humanos. A expressão de GRO- α foi relacionada a regulação de crescimento e foi subsequentemente observado que é expresso por células de melanoma, glioblastoma e células carcinomatosas de rim, próstata e bexiga. O GRO-alpha é produzido por uma variedade de células normais como monócitos, células endoteliais, fibroblastos, células sinoviais após estimulação por lipopolissacarídeo, IL-1, ou TNF-alpha. É um potente ativador de neutrófilos e induz a quimiotaxia, exocitose e liberação de radicais livres de oxigênio *in vitro* e acúmulo de neutrófilos *in vivo* (GEISER *et al*, 1993).

A interleucina-8 (IL-8) foi a primeira quimiocina a ser descrita, há mais de 20 anos. É produzida por monócitos, linfócitos T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. Sua função é atrair e ativar neutrófilos. Outras propriedades da IL-8 seriam a quimioatração de linfócitos T, atividade angiogênica e estimulação de liberação de histamina pelos basófilos (ROLLINS, 1997).

2.3.2 Quimiocinas, Recém-Nascidos e Prematuridade:

As quimiocinas são críticas para a movimentação dos leucócitos. Sabe-se que a quimiotaxia é deficiente em neonatos, particularmente nos prematuros, o que explica em

parte a maior vulnerabilidade a sepse destes recém-nascidos. SULLIVAN *et al* (2002) mensurou algumas quimiocinas em RN prematuros, em RN a termo e em adultos, com a hipótese de encontrar baixas concentrações destas quimiocinas nos RN prematuros devido estarem relacionadas ao defeito de quimiotaxia. Foram medidas as concentrações de ENA-78, GRO- α , RANTES, sendo as concentrações de prematuros semelhantes a recém-nascidos a termo e adultos, concluindo que o defeito de quimiotaxia não resulta da diminuição de quimiocinas circulantes.

FOX *et al* (2005) determinaram a potencia relativa das quimiocinas (IL-8, GRO- α , NAP-2, GCP-2, ENA-78, GRO- γ e GRO- β) na quimiotaxia de neutrófilos neonatais comparando aos adultos, concluindo que possuem a mesma potencia dos adultos, mas a migração dos neutrófilos neonatais é significamente menor.

KROLAK-OLEJNIK *et al* (2006) mostrou que RN prematuros possuem constitutivamente baixas concentrações de RANTES e altas concentrações de GRO- α em comparação com RN à termo e que a sepse aumenta os níveis de GRO- α mas não de RANTES.

A IL-8 é a quimiocina mais estudada, existindo diversos estudos sobre os efeitos da IL-8 na quimiotaxia dos neutrófilos do neonato. Sabe-se que a sua concentração aumenta durante condições de inflamação no RN como sepse e doença pulmonar crônica, mas pouco se sabe a respeito das outras quimiocinas no RN (FOX *et al*, 2005).

2.3.3 Quimiocinas e Sepse Neonatal:

Apesar dos avanços nos cuidados intensivos neonatais, a sepse continua sendo um fator importante para a morbimortalidade dos recém-nascidos, principalmente nos prematuros, devido a imaturidade imunológica. Uma deficiência na quimiotaxia pode contribuir para o aumento desta vulnerabilidade do RN.

Com base na função da IL-8, agindo na liberação, ativação e quimiotaxia de neutrófilos, esta quimiocina tem sido alvo de diversos estudos sobre sepse neonatal, principalmente para o auxílio no diagnóstico da sepse e no tempo de antibioticoterapia (KURT *et al*, 2007; FRANZ *et al*, 1999).

No diagnóstico de sepse neonatal, FRANZ *et al* (1999) demonstrou que o aumento plasmático de IL-8 possui sensibilidade de 80-90% e especificidade de 76-100% (FRANZ *et al*, 1999).

KURT *et al* (2007) mensurou níveis de IL-8 (e também IL-1 β , IL-6 e TNF- α) no momento do diagnóstico da sepse neonatal e depois do tratamento, encontrando níveis maiores desta quimiocina em RN com sepse em comparação aos controles e maiores no momento do diagnóstico em comparação ao sétimo dia de tratamento antibioticoterápico.

O GRO- α é um poderoso ativador e indutor de quimiotaxia dos neutrófilos. Estudos têm demonstrado seu aumento associado a sepse neonatal. MANOURA *et al* (2010) investigaram a quimiotaxia, comparando RN prematuros e RN à termo sépticos. Estes autores dosaram GRO- α , ENA-78, RANTES e MIP- α , encontrando níveis elevados de GRO- α e diminuídos de RANTES no início do quadro de sepse, similar a resposta observada em adultos.

2.3.4 Quimiocinas, Prematuridade e Restrição do Crescimento Intra-Uterino:

Muitos estudos têm investigado o papel da inflamação e da imunorregulação materna e fetal na etiologia da restrição do crescimento fetal e da prematuridade. Numerosos estudos têm tentado determinar a relação entre citocinas e crescimento fetal (NETA *et al*, 2010). Associações entre níveis elevados da IL-8 e prematuridade tem sido reportada em alguns estudos, mas a evidência da relação entre citocinas e quimiocinas com ocorrência de restrição do crescimento intra-uterino ainda é inconclusiva (NETA *et al*, 2010). LASKOWSKA *et al* (2007) demonstrou aumento dos níveis de IL-8 no cordão umbilical e no sangue de gestantes com PE (tanto com RCIU quanto com crescimento fetal normal) quando comparadas a gestantes sem PE, sugerindo um possível papel desta quimiocina na patogênese e sequela da pré-eclampsia, principalmente nas complicadas com RCIU.

2.3.5 Quimiocinas e Ruptura Prematura de Membranas:

O termo ruptura prematura de membranas é utilizado quando ocorre ruptura da membrana antes da 37ª semana de gestação. Ocorre em 3% das gestações e é a causa de aproximadamente um terço dos partos prematuros. A ruptura prematura de membranas aumenta o risco de morbidades perinatais como prematuridade, sepse, síndrome da angústia respiratória, prolapso de cordão, corioamnionite e morte fetal (MERCER, 2003). Diversos estudos correlacionam aumento dos níveis de IL-8 com a ruptura

prematura prolongada de membranas e com corioamnionite (ANDRYS *et al*, 2010; NAJATI *et al*, 2009; SATAR *et al*, 2008).

SATAR *et al* (2008) avaliaram os níveis de IL-8 em cordão umbilical e sangue de mães com BR> 24 horas e compararam com controles. Os níveis foram significativamente maiores no grupo com bolsa rota. Também foram encontrados, no mesmo estudo, maiores níveis de IL-8 no cordão umbilical de RN que desenvolveram enterocolite necrosante.

ANDRYS *et al* (2010) obtiveram níveis elevados de IL-8 em sangue de cordão de pacientes com corioamnionite e funisite.

NAJATI *et al* (2009) também demonstraram forte correlação entre o aumento dos níveis de IL-8 no sangue de cordão umbilical de RN com ruptura prematura de membranas quando comparado com controle, com bolsa íntegra.

2.4 Quimiocinas e Pré-Eclampsia:

Como foi discutido anteriormente, a disfunção endotelial possui papel central na fisiopatologia da pré-eclampsia. Existem diversos estudos que tentam correlacionar a atividade da IL-8 com a pré-eclampsia, mas alguns divergem se há um aumento ou diminuição na produção desta quimiocina em associação com a PE (CHEDRAU *et al*,

2009; LASKOWSKA *et al*, 2007; MELLEBAKKEN *et al*, 2001; SZARKA *et al*, 2010; WANG *et al*, 1999).

MELLEBAKKEN *et al* (2001) demonstraram o aumento da expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e monócitos e elevação de CXC quimiocinas, IL-8 e GRO-alpha, através da dosagens plasmáticas destes fatores no cordão umbilical, demonstrando o estado de inflamação e disfunção endotelial nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia.

LASKOWSKA *et al* (2007) também demonstraram aumento dos níveis de IL-8 no sangue de cordão umbilical e no sangue de gestantes com PE (tanto com RCUI quanto com crescimento fetal normal) quando comparadas a gestantes sem PE, sugerindo que o aumento de concentrações de IL-8 possa estar associado com apoptose, inflamação, ativação de neutrófilos, dano endotelial, disfunção celular e aumento da permeabilidade endotelial, tendo esta quimiocina um significativo papel na patogênese e seqüela da pré-eclampsia, principalmente nas complicadas com RCIU.

SZARKA *et al* (2010) também demonstrou níveis aumentados de IL-8 em sangue de gestantes com PE quando comparadas com grupo controle.

WALSH (2009) avaliou os fatores presentes no plasma de mulheres com PE e concluiu que estes estimulam a migração transendotelial de neutrófilos por meio de indução do estresse oxidativo e da produção de IL-8.

CHEDRAU *et al* (2009) encontraram níveis significativamente menores de IL-8 e maiores de sFlt-1 e sEng no plasma de gestantes com pré-eclampsia em comparação com controles. Da mesma forma, OLUSI *et al* (2000) também encontraram níveis de IL-8 significativamente menores em gestantes com PE.

WANG *et al* (1999) avaliaram a produção placentária de IL-8 e sua correlação com a produção de prostaciclina em gestações normais e com PE, encontrando níveis significativamente menores na PE, concluindo-se que o tecido placentário de gestações com PE produzem significativamente menos IL-8 que tecidos placentários de gestações normais e isto possivelmente está correlacionado com a diminuição da produção de prostaciclina. A IL-8 promoveria a produção placentária de prostaciclina na PE.

Estudos demonstram a existência de hipoxemia e estresse oxidativo na pré-eclampsia, tanto na circulação feto-placentária (SALAFIA *et al*, 1995) quanto na placenta (WALSH *et al*, 2009), acarretando no aumento da liberação de quimiocinas por vários subtipos de leucócitos e desencadeando a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos (METINKO *et al*, 1992). MELLEMBAKKEN *et al* (2001) sugeriram que a ativação dos neutrófilos e monócitos nos fetos de mães com pré-eclampsia envolveriam uma maior atividade das quimiocinas. A adesão dos leucócitos ativados ao endotélio poderia liberar agentes citotóxicos, tais como radicais livres de oxigênio e proteases e posteriormente contribuir para ativação do endotélio e outros leucócitos, representando um ciclo vicioso para o feto na pré-eclampsia, possivelmente contribuindo para o aumento da resistência vascular fetal, retardo do crescimento intra-uterino e mortalidade vistos na pré-eclampsia (MELLEMBAKKEN *et al*, 2001).

TORRANCE *et al* (2008) demonstraram que o estresse oxidativo e os níveis das citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) estão aumentados em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia com síndrome HELLP e que isto poderia causar a inativação do surfactante explicando o aumento da incidência de síndrome da angústia respiratória nestes recém-nascidos (TORRANCE *et al*, 2008).

ERBAĀCI *et al* (2005) questionaram o quanto a resposta inflamatória materna excessiva encontrada na patogênese da pré-eclampsia poderia ser transferida para o leite materno. Os resultados do estudo demonstraram que as citocinas inflamatórias (IL-8 e TNF- α) no leite materno exibem variações biológicas nos diferentes períodos da lactação e que na pré-eclampsia, altos níveis destas citocinas persistem por 30 dias. Estes resultados sugerem que a pré-eclampsia possa afetar o balanço das citocinas do leite materno e oferecer um sinal imunológico para a defesa de recém-nascidos de alto risco (ERBAĀCI *et al*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO:

A pré-eclampsia corresponde à 10% dos partos prematuros, sendo uma patologia prevalente e associada a morbimortalidade no recém-nascido. Dados da literatura demonstram que os recém-nascidos de mães com pré-eclampsia possuem maior risco de complicações neonatais como prematuridade, restrição do crescimento intra-uterino, neutropenia e sepse neonatal (ACOG, 2002; DORON *et al*, 1994; LINDHEIMER *et al*, 2008; SAFTLAS *et al*, 1990; SIBAI *et al*, 1995).

A fisiopatologia da pré-eclampsia é objeto de interesse recente, pois não está completamente elucidada. Estudos demonstram que existe uma disfunção endotelial ocasionada pela hipoxemia placentária responsável pela indução da ativação leucocitária e estado de inflamação no feto (GILBERT *et al*, 2007; MELLEBAKKEN *et al*, 2001; MELLEBAKKEN *et al*, 2002; ; REDMAN *et al*, 1999; TURNER, 2010). No entanto, o papel exato dos mediadores da resposta

inflamatória aguda, responsáveis pelos mecanismos de ativação leucocitária, no desenvolvimento das alterações encontradas nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia necessita ser melhor estudado.

Não há relatos na literatura de estudos avaliando o perfil das quimiocinas inflamatórias GRO- α e IL-8 responsáveis pela função leucocitária nos recém-nascidos. Além disso, estudos correlacionando esses marcadores com as patologias encontradas nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia são restritos à dosagens na mãe ou no cordão umbilical, mas não no RN.

O melhor conhecimento dos mecanismos responsáveis pelas complicações fetais associadas a pré-eclampsia é importante e fundamental para o melhor manejo e tratamento da pré-eclampsia materna, minimizando assim as conseqüências fetais e no recém-nascido.

4 OBJETIVOS:

4.1 Geral:

Avaliar a ativação dos neutrófilos, através da dosagem plasmática das quimiocinas CXC: IL-8 e GRO- α , nos recém-nascidos prematuros filhos de mães com pré-eclampsia.

4.2 Específicos:

4.1.1 Associar os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α com a presença de neutropenia e PE.

4.2.2 Avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α com a presença de PE e sepse.

4.2.3 Estabelecer se existe associação entre os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α com PE e menor idade gestacional.

4.2.4 Associar os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α com PE e ocorrência de RN com restrição do crescimento intra-uterino.

5 METODOLOGIA:

5.1 População em Estudo:

Recém-nascidos prematuros internados no Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de março de 2008 a dezembro de 2009.

5.2 População da Pesquisa:

A população efetivamente pesquisada foram os recém-nascidos prematuros nascidos no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cujo

peso de nascimento era inferior a 2000 gramas, e com necessidade de internação no Serviço de Neonatologia.

5.3 Critérios de Inclusão:

Recém-nascidos prematuros com peso inferior a 2000g e idade gestacional inferior a 36 semanas, nascidos e internados no Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que necessitaram de coleta de exames laboratoriais nas primeiras 48 horas de vida, durante o período de março de 2008 a dezembro de 2009.

5.4 Critérios de Exclusão:

Recém-nascidos que apresentavam malformações congênitas, erro inato do metabolismo ou síndromes com alterações cromossômicas, infecção congênita do grupo STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegavírus ou herpes) ou mãe HIV +, óbito na sala de parto e os recém-nascidos e nos quais as mães possuíam hipertensão crônica sem a presença de pré-eclampsia.

5.5 Delineamento:

A pesquisa foi desenvolvida sob a forma de um estudo de coorte prospectivo, onde a população foi dividida em dois grupos: recém-nascidos prematuros de mães sem pré-eclampsia e o recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia.

5.6 Logística:

Todo recém-nascido prematuro, com idade gestacional inferior a 36 semanas e peso de nascimento inferior a 2000 gramas era seguido desde seu nascimento. No momento em que a equipe assistente requisitava exames laboratoriais, os pais (ou responsável legal pelo paciente) eram convidados a participar do estudo. Após assinatura do consentimento informado (ANEXO 1) e a partir da amostra solicitada pela equipe assistente (só foram coletados amostras nos pacientes que necessitaram de coleta de exames laboratoriais de rotina nas primeiras 48 horas de vida, não implicando em coleta exclusivamente para a pesquisa), foi obtido um volume adicional de sangue (200 μ L) em tubo com EDTA, sendo este sangue centrifugado e o plasma armazenado e congelado em temperatura -80°C em até uma hora após a coleta.

Todo recém-nascido do estudo tinha sua ficha-protocolo (ANEXO 2) preenchida com os dados perinatais e eram seguidos quanto as principais morbidades que apresentassem durante sua internação na UTI neonatal, bem como o desfecho alta ou óbito.

No descongelamento das amostras, aquelas com hemólise foram consideradas perdas e não foram processadas.

5.7 Análise Laboratorial das Quimiocinas:

As amostras e a curva padrão foram processadas em duplicata.

5.7.1 Interleucina-8:

A técnica empregada para a dosagem de IL-8 foi o ensaio imunoenzimático quantitativo sanduíche, com o Kit comercialmente disponível (Quantikine Human IL-8, R&D Systems, Inc. MN, USA).

Um anticorpo monoclonal específico para a IL-8 já vem pré-colocado nas paredes da microplaca. Cada amostra é pipetada num poço da microplaca de IL-8 e qualquer IL-8 presente na amostra é ligado ao anticorpo pré-fixado. Após a lavagem dos poços com o objetivo de retirar qualquer substância que não esteja ligada ao anticorpo, uma enzima ligada a um anticorpo policlonal específico para IL-8 é adicionada nos poços. Em seguida, lava-se novamente os poços com o mesmo objetivo de remover qualquer substância que não seja a reação enzima-anticorpo. Uma solução de substrato é adicionada nos poços com finalidade de desenvolver uma cor na exata proporção de IL-8 ligada no passo inicial. A intensidade da cor é mensurada através da leitura no leitor óptico automático Spectramax no comprimento de onda de 450 nm.

O limite para detecção de IL-8 foi 0.35 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%.

A curva padrão da IL-8 para as placas constam nos gráficos 1 e 2.

5.7.2 GRO- α :

A mesma técnica e ensaio descritos para a dosagem de IL-8 foram empregados para a dosagem de GRO- α (Kit comercialmente disponível: Quantikine Human GRO α , R&D Systems, Inc. MN, USA).

O limite para detecção de GRO- α foi 0.6 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%.

A curva padrão do GRO- α para as placas constam nos gráficos 3 e 4.

Abaixo estão representadas em forma de gráfico as curvas padrões de cada placa de IL-8 e GRO-alpha:

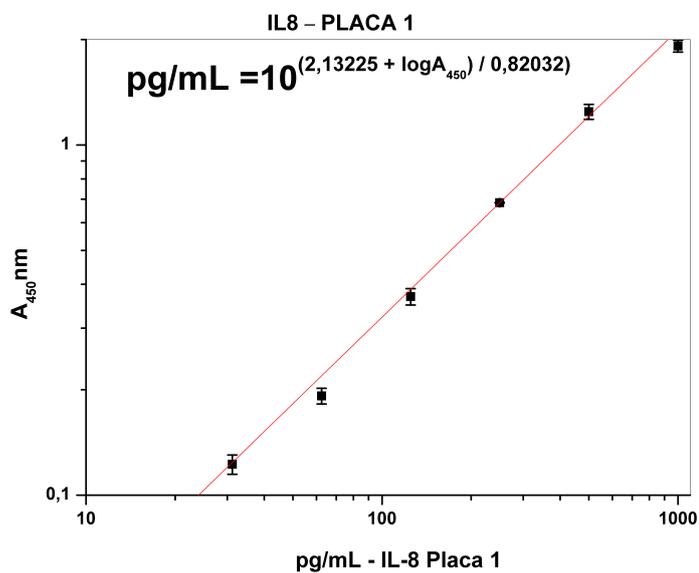


GRÁFICO 1: Curva Padrão IL-8 - Placa 1 (duplicata)

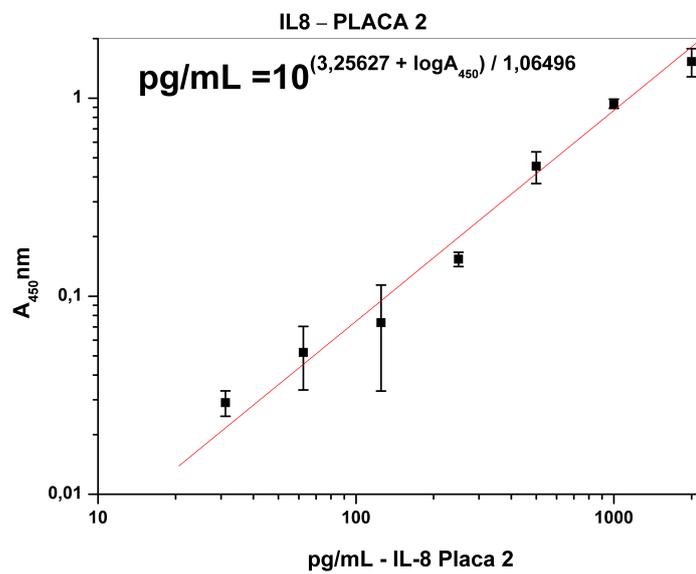


GRÁFICO 2: Curva Padrão IL-8 – Placa 2 (duplicata)

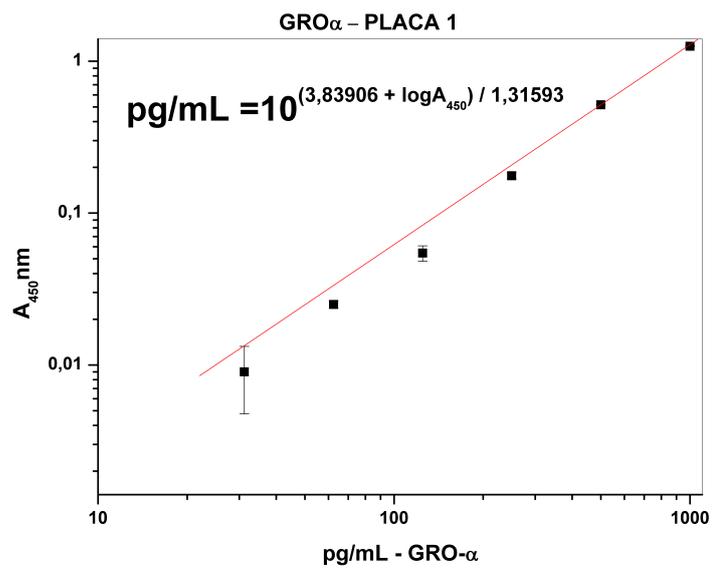
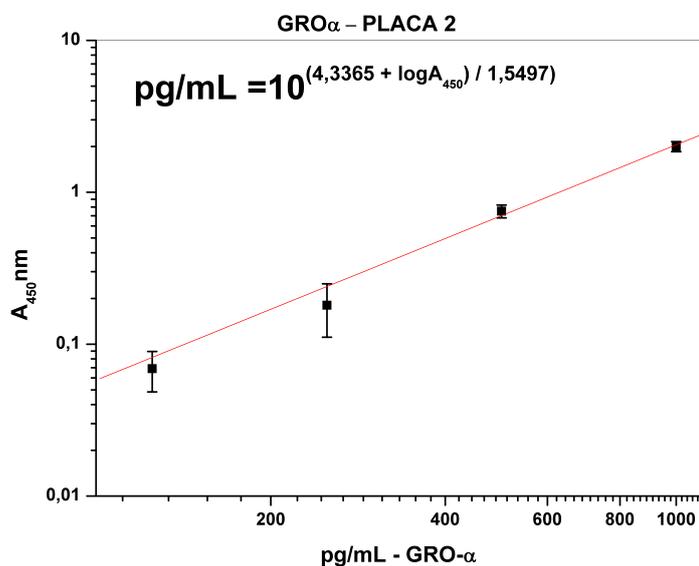


GRÁFICO 3: Curva Padrão GRO- α – Placa 1 (duplicata)GRÁFICO 4: Curva Padrão GRO- α – Placa 2 (duplicata)

5.8 Considerações Éticas:

A assinatura do consentimento informado foi obtida após a apresentação e a leitura do mesmo para o pai, a mãe ou responsável legal pelo recém-nascido (ANEXO 1).

Trata-se de pesquisa com risco mínimo. Foram obtidos volumes adicionais de sangue que representam menos de 2% da volemia dos pacientes. Nenhum procedimento

invasivo, como punção venosa para coleta de sangue para realizar a pesquisa, foi realizado.

5.9 Variáveis Estudadas:

Pré-eclampsia: pressão arterial maior que 140 x 90 mmhg, desenvolvida após a vigésima semana de gestação, acompanhada por edema e proteinúria.

Neutropenia: contagem de neutrófilos totais inferior a 1500 células/mm³.

Sepse neonatal comprovada: presença de uma bactéria patogênica em cultura (hemocultura ou urocultura ou líquido).

Prematuridade: recém-nascido com idade gestacional inferior a 36 semanas.

Restrição do crescimento intra-uterino (RCIU): Peso abaixo do percentil 10 para a idade gestacional (ALEXANDER *et al*, 1996).

Interleucina-8 (pg/ml)

GRO-alpha (pg/ml)

5.10 Variáveis Controladas:

Idade gestacional : avaliada pela melhor estimativa obstétrica; ou seja, a data da última menstruação da mãe ou ultrassonografia obstétrica realizada nas primeiras 12 semanas de gestação, confirmado pelo exame físico pediátrico.

Peso de nascimento (gramas): avaliado em balança digital no momento do nascimento, como parte da assistência pediátrica em sala de parto. Todos os pacientes usaram a mesma balança.

Classificação da idade gestacional conforme a curva de Alexander (ALEXANDER et al, 1996). No primeiro exame físico após nascimento, realizado pelo neonatologista plantonista responsável pela admissão, os pacientes foram classificados em adequados (AIG) ou pequenos para a idade gestacional (PIG) de acordo com a curva de Alexander e colaboradores, empregada na rotina assistencial do nosso Serviço de Neonatologia (ALEXANDER et al., 1996).

Adequado para a idade gestacional (AIG): Peso de nascimento entre o 10° e 90° percentil para a idade gestacional (ALEXANDER et al,1996)

Pequeno para a idade gestacional (PIG): Peso de nascimento inferior ao 10° percentil para a idade gestacional (ALEXANDER et al, 1996).

Dados obstétricos e intercorrências maternas: Uso de ocitocina, corticóide, infecção ovular, característica do líquido amniótico, tempo de bolsa rota, hipertensão arterial prévia.

Morbidades e intercorrências do recém-nascido como doença da membrana hialina, enterocolite necrosante, convulsões, asfixia neonatal, hemorragia periventricular grave (III e IV), necessidade de ventilação mecânica, CPAP nasal, nutrição parenteral total, transfusão sanguínea, filgrastima, data da alta ou óbito.

Score SNAPPE II: Escore utilizado para medir a gravidade de doença e o risco de mortalidade em recém-nascidos com qualquer peso de nascimento. É composto por nove itens, pontuando-se os piores resultados encontrados para os sinais vitais (pressão arterial média e temperatura axilar), diurese e análises laboratoriais (pH do sangue,

razão PaO₂/FiO₂) durante as primeiras 12 horas da internação na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal, além de presença ou não de convulsões múltiplas, baixo peso de nascimento, escore de apgar no 5º minuto e peso de nascimento inferior ao 3º percentil para a idade gestacional. (RICHARDSON et al., 2001).

5.11 Cálculo do Tamanho da Amostra:

O tamanho da amostra foi calculado a partir de estudos prévios com dosagens de IL-8 e GRO- α em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia (MELLEMLAKKEN *et al*, 2001).

Foram empregadas proporções para o cálculo do tamanho da amostra e estimado significância com um intervalo de confiança de 95%, e 10% de erro máximo. O número necessário calculado foi de 98 pacientes, 1:1: 49 pacientes no grupo em estudo e 49 pacientes no grupo controle.

5.12 Análise Estatística:

A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences software version 18.0* (SPSS 18.0).

As variáveis com distribuição paramétrica foram expressas como média \pm desvio padrão. As variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas como mediana e intervalo interquartil (p25-p75).

Foram empregados o teste de qui-quadrado na análise das variáveis categóricas, teste t de Student na comparação de dados paramétricos e Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, na comparação de três grupos, para dados não paramétricos. Na análise multivariada empregou-se o método de regressão logística, sendo incluídas variáveis com $p < 0,057$. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, et al. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-168.
2. Al-Mulla ZD, Christensen RD. Neutropenia in the neonate. *Clin Perinatol.* 1995;22:711-39.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2002;99:159-167.
4. Andrys C, Drahosova M, Hornychova H, Tambor V, Musilova I, Tosner J, Flidrova E, Kacerovsky M. Umbilical cord blood concentrations of IL-6, IL-8, and MMP-8 in pregnancy complicated by preterm premature

- rupture of the membranes and histological chorioamnionitis. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31:857-63.
5. Bagglioni M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.
 6. Ballard JL, Khouri JC, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman L, Lipp R. New ballard score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119: 417-423.
 7. Bilate AMB. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. *Temas de Reumatologia Clínica.* 2007;8:86-90.
 8. Bizzarro MJ, Dembry LM, Baltimore RS, Gallagher PG. Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2008;121:689-696.
 9. Boxer LA, Newburger PE. A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49:609-614.
 10. Broekhuizen FF, Elejalde R, Hamilton PR. Early-onset preeclampsia, triploidy and fetal hydrops. *J Repro Med* 1983; 28:223-6.
 11. Bhaumik S, Ghosh S, Haldar KK, Mitra PK, Manna B. Risk of early onset neonatal septicemia in babies born to mothers with pre-eclampsia. *Indian Pediatr.* 2000; 37:775-779.
 12. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in newborn infant. *J Pediatr* 1978;93:120-122.

13. Cadnapaphornchai M, Faix RG. Increased nosocomial infection in neutropenic low birth weight (2000g or less) infants of hypertensive mothers. *J Pediatr* 1992;121:956-961.
14. Chang EY, Menard MK, Vermillion ST, Hulsey T, Ebeling M. The association between hyaline membrane disease and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1414-7.
15. Chedraui P, Lockwood CJ, Schatz F, Buchwalder LF, Schwager G, Guerrero C, Escobar GS, Hidalgo L. Increased plasma soluble fms-like tyrosine kinase 1 and endoglin levels in pregnancies complicated with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22:565-70.
16. Cherif A, Ben jema W, Kacem S, Guellouze N, Jebnoun S, Khrouf N. Preeclampsia increases the risk of hyaline membrane disease in premature infant: a retrospective controlled study. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2008;37:597-601.
17. Clark P, Boswell F, Greer IA. The neutrophil and preeclampsia. *Sem Reprod Endocrinol*. 1988; 16:57-64.
18. Damas JK, Gullestad L, Ueland T, Solum NO, Simonsen S, Froland SS, Aukrust P. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure – possible role of platelets and monocytes, *Cardiov Res*. 2000;45:428-436.
19. Davidge ST, Signorella AP, Lykins DL, Gilmour CH, Roberts JM. Evidence of endothelial activation and endothelial activators in cord blood of infants of preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 175:1301–1306.

20. Doron MW, Makhoul RA, Katz VL, Lawson EE, Stiles AD. Increased incidence of sepsis at birth in neutropenic infants of mothers with preeclampsia. *J Pediatr.* 1994; 125:452-8.
21. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330:565-7.
22. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33:130-137.
23. Erbagci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakcioglu M. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrums to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem.* 2005;38:712-6.
24. Figueras-Aloy J, Gómez-López L, Rodríguez-Miguélez JM, Salvia-Roiges MD, Jordán-García I, Ferrer-Codina I, Carbonell-Estrany X, Jiménez-González R. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2007; 24:331-8.
25. Fox SE, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine.* 2005;29:135-40.
26. Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics.* 1999;104:447-453.
27. Friedman SA, Schiff E, Kao L, Sibai BM. Neonatal outcome after preterm delivery for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:1785-92.

28. Fujiwara K, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M. Functional Distinction between CXC chemokines, Interleukin-8 (IL-8), and Growth Related Oncogene (GRO) alpha in Neutrophil Infiltration. *Lab Invest.* 2002;82:15-23.
29. Funke A, Berner R, Traichel B, Schmeisser D, Leititis JU, Neimeyer CM. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000;106:45-51.
30. Furuya M, Kurasawa K, Nagahama K, Kawachi K, Nozawa A, Takahashi T, Aoki I. Disrupted Balance of Angiogenic and Antiangiogenic Signalings in Preeclampsia. *Journal of Pregnancy.* 2011;1-10.
31. Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I. The Interleukin-8-related Chemotactic Cytocines GRO-alpha, GRO-beta and GRO-gama activate Human Neutrophil and Basophil Leukocytes. *J Biol Chem.* 1993;268:15419-15424.
32. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294:541-550.
33. Gleeson R, Farrel J, Doyle M, Walshe JJ. HELLP syndrome: a condition of varied presentation. *Ir J Med Sci.* 1996. 165:265-267.
34. Gonçalves RM, Teixeira AL, Campos WR, Orefice F. The role of chemokines in uveitis. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70:1-10.

35. Greco P, Manzionna M, Vimercati A, Loverro G, Mautone A, Selvaggi L. Neutropenia in neonatos delivered of women with pre-eclampsia. *Acta Biomed Ateneo parmense*. 1997; 68:91-4.
36. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008. 51:970-975.
37. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine*. 2003;21:48-9.
38. Jelin AC, Cheng YW, Shaffer BL, Kaimal AJ, Little SE, Caughey AB. Early-onset preeclampsia and neonatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010; 23:389-92.
39. Kauma S, Takacs P, Scordalackes C, Walsh S, Green K, Peng T. Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 100:706-714.
40. Kocherlakota P, La Gamma EF. Preliminary report: rhG-CSF may reduce the incidence of neonatal sepsis in prolonged preeclampsia associated neutropenia. *Pediatrics*. 1998;102:1107-11.
41. Koenig JM, Christensen RD. Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. *N Engl J Med*. 1989;321:557-62.
42. Koenig JM, Christensen RD. The mechanism responsible for diminished neutrophil production in neonates delivered of women with pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:467-73.
43. Kourtis AP, Lee FK, Stoll BJ. Soluble L-selectin, a marker of immune activation, in neonatal infection. *Clin Immunol*. 2003; 109: 224-8.

44. Królak-Olejniak B, Beck B, Olejniak I. Umbilical serum concentrations of chemokines (RANTES and MIP-1α) in preterm and term neonates. *Pediatr Int.* 2006;48:586-90.
45. Kurt ANC, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. *Mediators Of Inflammation.* 2007. 31397:1-5.
46. Kunkel SL, Lukacs N, Strieter RM. Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions Suppl.* 1995. 46:11-22.
47. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002;287:3183-86.
48. La Gamma EF, Alpan O, Kocherlakota P. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on preeclampsia-associated neonatal neutropenia. *J Pediatr* 1995;126:457-9.
49. Laskowska M, Laskowska K, Leszczynska-Gorzela B, Oleszcuk J. Comparative analysis of maternal and umbilical interleukin-8 levels in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia with intrauterine normal growth and intrauterine growth retardation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007;20:527-32.
50. Laurenti R, Jorge MHPM, Gotlieb SLD. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:449-60.
51. Levini RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi A. Soluble Endoglin

- and Other Circulating Antiangiogenic Factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355:922-1005.
52. Lindheimer MD, Cunningham FG,. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens*.2008; 2:484-494.
53. Liu L, Kubes P. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. *Thromb Haemost* 2003;89:213-220.
54. Luster AD. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediated inflammation. *NEJM*, 1998; 338:436-445.
55. Maheshwari A, Voitenok NN, Akalovich S, Shaik SS et al. Developmental Changes in circulating IL-8/CXCL8 isoforms in neonates. *Cytokine*. 2009;46:12-16.
56. Makhlof RA, Simhan HN. Effect of tocolytics on interleukin-8 production by human amniotic and decidual cells. *J Reprod Immunol*. 2006;69:1-7.
57. Makhlof RA, Doron MW, Bose CL, Price WA, Stiles AD. Administration of granulocyte colony-stimulating factor to neutropenic low birth weight infants of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 1995;126:454-6.
58. Manoura A, Gourgiotis D, Galanakis E, Matalliotakis E, Hatzidaki K et al. Circulating concentrations of alpha e beta-chemokines in neonatal sepsis. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e806-9.
59. Mellebacken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension*. 2002;39:155-60.

60. Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and Leukocyte activation in the Fetal Circulation During Preeclampsia. *Hypertension*. 2001;38:394-398.
61. Mellembakken JR, Solum NO, Ueland T, Videm V, Aukrust P. Increased concentrations of soluble CD40 ligand, RANTES and GRO-alpha in preeclampsia--possible role of platelet activation. *Thromb Haemost* 2001;86:1272-6.
62. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101:178-93.
63. Metino AP, Kunkel SL, Standiford TJ, Strieter RM. Anoxia-hyperoxia induces monocyte-derived interleukin-8. *J Clin Invest*. 1992;90:791-198.
64. Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, et al. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1173-77.
65. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2:123-8.
66. Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sanchez PJ, Risser R. Effect of maternal hypertension on neonatal neutropenia and risk of nosocomial infection. *Pediatrics*. 1992;90:430-5.
67. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:145-76.

68. Murphy PM. International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54:227-9.
69. Najati N, Rafeey M, Melekian T. Comparison of umbilical cord IL-8 in low weight infants with premature rupture of membranes and intact membranes. *Pak J Biol Sci.* 2009; 12:1094-4.
70. Neta GI, Von Ehrestein OS, Golgman LR, Lum K, Sundaram R, Andrews W, Zhang J. Umbilical Cord Serum cytokine Levels and Risks of Small-for-Gestational-Age and Preterm Birth. *Am J Epidemiol.* 2010;171:859-867.
71. Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Preeclampsia and fetal growth. *Obstet Gynecol.* 2000;96:950-5.
72. Olav Asvold B, Vatten LJ, Romundstad PR, Jenum PA, Karumanchi SA, Eskild A. Angiogenic factors in maternal circulation and the risk of severe fetal growth restriction. *Am J Epidemiol.* 2011;173:630-9.
73. Olusi SO, Diejomaoh M, Omu A, Abdulaziz A, Prabha K, George S. Interleukins in preeclampsia. *Ann Saudi Med.* 2000;20:4-7.
74. Paul DA, Kepler J, Leef KH, Sciscione A, Palmer C, Stefano JL. Effect of preeclampsia on mortality, intraventricular hemorrhage and need for mechanical ventilation in very low-birth-weight infants. *AMJ Perinatol* 1998, 15:381-6.
75. Paul DA, Leef KH, Sciscione A, Tuttle DJ, Stefano JL. Preeclampsia does not increase the risk for culture proven sepsis in very low birth weight infants. *AMJ Perinatol* 1999, 16:367-22.

76. Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village 2009;628.
77. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Rugolo LMSS, Leone CR, Lopes JMA, Almeida MF; Brazilian Network of Neonatal Research. Sepsis and neutropenia in very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 2010;157:434-8.
78. Rasmussen S, Irgens LM. Fetal growth and body proportion in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003;101:575-83.
79. Reddy A, Suri S, Sargent IL, Redman CWG, Muttukrishna. Maternal Circulating Levels of Activin A, Inhibin A, sFlt-1 and Endoglin at Parturition in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia. *PLoS ONE* 2009;4(2):e4453:1-9.
80. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response a pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999.180:499-506.
81. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK, The Canadian NICU Network, The Kaises Permanente Neonatal Minimum Data Set Wide area Network, and The SNAP-II Study Group. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001;138:92-100.
82. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1991;4: 700-708.

83. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NfkappaB pathway. *J Reprod Immunol.* 2007;73:101-7.
84. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90:909-928.
85. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine R, Karumanchi A. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble VEGF receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a samml-for-gestational-age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008; 21:9-23.
86. Salafia CM, Minior VK, Lopez-Zeno JA, Whittington SS, Pezzullo JC, Vintzileos AM. Relationship between placental histologic features and umbilical cord gases in preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1058-1064.
87. Satar M, Turhan E, Yapicioglu H, Narli N, Ozgunen FT, Cetiner S. Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture of membranes and its relationship with morbidity and mortality. *Eur Cytokine Netw.* 2008;19:37-41.
88. Schwartzberg LS. Neutropenia: etiology and pathogenesis. *Clin Cornerstone.* 2006; 5:s5-11.

89. Scharma G, Nesin M, Feuerstein M, Bussel JB. Maternal and neonatal characteristics associated with neonatal neutropenia in hypertensive pregnancies. *Am J Perinatol*. 2009;26:683-9.
90. Shibata E, Rajakumur A, Powers RW, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM, Hubel CA. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2005. 90: 4895-4903.
91. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. What we have learned about preeclampsia. *Sem Perinatol*. 2003;27:239-246.
92. Sibai BM. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190:1520-1526.
93. Sibai BM. Maternal and uteroplacental hemodynamics for the classification and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2008;52:805-6.
94. Sibai BM. Pitfalls in diagnosis and management of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:1-5.
95. Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, et al. Recurrence of preeclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ*. 2005;331:877-9.
96. Soares VMN, Souza KV, Freygang TC, Correa V, Saito MR. Mortalidade maternal por pré-eclampsia/eclampsia em um estado do Sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31:566-73.

97. Sullivan SE, Staba SL, Gersting JA, Hutson AD, Theriaque D, Christensen RD, Calhoun DA. Circulating concentrations of chemokines in cord blood, neonates, and adults. *Pediatr Res.* 2002;51:653-7.
98. Szarka A, Rigó JJ, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010, 11:59.
99. Tang J, Ley KF, Hunt CA. Dynamics of silico leucocyte rolling, activation and adhesion. *BMC Systems Biol* 2007, 1:14
100. Torrance HL, Krediet TG, Vreman HJ, Visser GH, Van Bel F. Oxydative stress and proinflammatory cytokine levels are increased in premature neonates of preeclamptic mothers with HELLP syndrome. *Neonatology.* 2008;94:138-42.
101. Tosun M, Velik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010; 23:880-886.
102. Towers CV, Pircon RA, Nageotte MP, et al. Cocaina intoxication presenting as preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 1993; 81:545-7.
103. Turner JA. Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. *International Journal of Womens Health* 2010;2 327-337.

104. Vega CE, Kanhale S, Zugaib M. Maternal mortality due to arterial hypertension in São Paulo City (1995-1999). *Clinics (São Paulo)*. 2007;62:679-84.
105. Vermont CL, Hazelzet JA, Kleijn ED, Van den Dobbelsteen GPJM, Groot R. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Critical care*. 2006;10:1-8.
106. Von Dadelszen P, Magee LA. Antihypertensive medications in management of gestational hypertension-preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;8:441-459.
107. Xiong X, Demianczuk NN, Buekens P, Saunders LD. Association of preeclampsia with high birth weight for age. *Am J Obstet Gynecol* 2000. 183;148-55.
108. Zook KJ, Mackley AB, Kern J, Paul DA. Hematologic effects of placental pathology on very low birthweight infants born to mothers with preeclampsia. *J perinatol* 2009;29:8-12.
109. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, et al. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*. 1997; 99:2152-64.
110. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000. 12:121-127.
111. Walsh SW. What Causes Endothelial Cell Activation in Preeclamptic Women? *AJP*. 2006;169:1104-1006.

112. Walsh SW. Plasma from Preeclamptic Women Stimulates Transendothelial Migration of Neutrophils. *Reprod Sci.* 2009; 16: 320-25.
113. Wang Y, Baier J, Adair CD, Lewis DF, Krueger S, Kruger T, Gurski M, Brown E. Interleukin-8 stimulates placental prostacyclin production in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1999;42:375-80.
114. Wolf JL. Liver disease in pregnancy. *Med Clin North Am.* 1996. 80:1167-1187.
115. Wollmann HA. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res.* 1998;49:1-6.
116. Working group report on high blood pressure in pregnancy. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2001;3:75-88.

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO LEUCOCITÁRIA EM RECÉM-NASCIDOS
PREMATUROS DE MÃES COM PRÉ-ECLAMPSIA

Fabrizia R. S. Faulhaber, MD

Renato S. Procianoy, MD, PhD

Ana Paula Vargas

Rita de Cássia Silveira, MD, PhD

Instituições às quais o trabalho está vinculado:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-Graduação em Saúde da
Criança e do Adolescente

Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Financiamento: FIPE/HCPA

Autor responsável pela correspondência:

Fabrizia R. S. Faulhaber

Rua Tito Livio Zambecari, 359/201

Porto Alegre, RS – CEP: 90450231.

Fone (51) 8408-8737

e-mail: rennosodero@ig.com.br

RESUMO

A neutropenia é um achado freqüente em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia. Estudos avaliando a ativação leucocitária nestes recém-nascidos são escassos. No entanto, as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas são a IL-8 e o GRO- α . O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α em recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia.

Metodologia: Foram incluídos recém-nascidos com idade gestacional menor de 36 semanas e peso de nascimento inferior a 2000 gramas, sendo divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de pré-eclampsia materna. Os critérios de exclusão foram: malformações congênitas, erro inato de metabolismo ou anormalidades cromossômicas, infecções do grupo STORCH, óbito na sala de parto e recém-nascidos nos quais as mães possuíam hipertensão crônica sem a presença de pré-eclampsia. Nas primeiras 48 horas de vida, no momento de coleta assistencial, uma pequena amostra adicional de sangue foi obtida para dosagem de IL-8 e GRO- α pelo método de enzimoimunoensaio. Foram usados os testes qui-quadrado, T student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e regressão logística múltipla.

Resultados: 119 recém-prematuros (64 sem pré-eclampsia e 55 com pré-eclampsia). Os grupos foram similares quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, escore de Apgar no 5º minuto, sepse, doença de membrana hialina, ventilação mecânica, nutrição parenteral total, enterocolite necrosante, hemorragia periventricular. O grupo com pré-eclampsia apresentou mais neutropenia, foi mais PIG, parto cesariano e menos bolsa rota superior a 18 horas. Os níveis de IL-8 foram maiores no grupo sem pré-eclampsia materna [157.1 pg/ml (86.4-261.3) e 26.54 pg/ml (3.6-87.2) $p < 0.001$ para não pré-eclampticos e pré-eclampticos, respectivamente]. Os níveis de GRO- α foram similares [229.5 pg/ml (116.6-321.3) and 185.5 pg/ml (63.9-306.7) $p = 0.236$ para não pré-

clampticos e preeclampticos, respectivamente]. Após análise por regressão múltipla apenas a ausência de pré-eclampsia foi associada com níveis elevados de IL-8.

Conclusão: O prematuro de mãe com pré-eclampsia apresenta níveis reduzidos de IL-8, sugerindo que a ativação leucocitária possa estar prejudicada nestes recém-nascidos.

Resumo: 312 palavras.

Descritores: Quimiocinas; neutropenia; recém-nascido; pré-eclampsia; recém-nascidos prematuros.

Introdução

A pré-eclampsia é a principal causa de morbimortalidade materna e fetal, considerada a doença hipertensiva da gestação mais prevalente e correspondendo de 3 a 14% de todas as gestações (1-5). A neutropenia é um achado freqüente nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia. A associação entre sepse e neutropenia nestes recém-nascidos tem demonstrado resultados conflitantes (6-10). Recentemente, em uma grande população de recém-nascidos de muito baixo peso, nascidos de mães com pré-eclampsia, nosso grupo achou associação entre neutropenia e óbito, independentemente da ocorrência de sepse neonatal (10).

A quimiotaxia é deficiente nos recém-nascidos, particularmente nos prematuros. Isto pode contribuir para a alta vulnerabilidade dos mesmos à sepse neonatal. Duas quimiocinas são críticas para a função de movimento dos leucócitos: a Interleucina-8 (IL-8) e Growth-related Oncogene alfa (GRO- α) (11,12). As informações a respeito da ativação leucocitária nos recém-nascidos de mães com pré-eclampsia ainda são escassas. A ativação de neutrófilos e monócitos na circulação fetal durante a pré-eclampsia tem sido sugerida, resultando em níveis elevados de quimiocinas e moléculas de adesão na circulação materna (13-15).

Nós hipotetizamos que a IL-8 e o GRO- α estão envolvidos na patogênese da pré-eclampsia e afetariam a ativação leucocitária neonatal. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi comparar os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α de recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia e sem pré-eclampsia.

Metodologia

População em Estudo

Estudo de coorte prospectivo de recém-nascidos prematuros com idade gestacional inferior a 36 semanas e peso de nascimento inferior a 2000 gramas, nascidos no centro obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e internados no Serviço de Neonatologia, durante o período de março de 2008 a dezembro de 2009. Os critérios de exclusão foram: presença de malformações congênitas, erro inato do metabolismo ou síndromes com alterações cromossômicas, infecção congênita do grupo STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegavírus ou herpes) ou mãe HIV +, óbito na sala de parto e nas primeiras 48 horas de vida, e os recém-nascidos nos quais as mães apresentavam Doença Hipertensiva prévia a gestação que não desenvolveram preeclampsia nesta gestação.

A população efetivamente estudada foi dividida em dois grupos de recém-nascidos prematuros: sem pré-eclampsia materna e com pré-eclampsia materna.

O diagnóstico de pré-eclampsia materna foi definido como a presença de hipertensão arterial (pressão arterial sistólica \geq 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica \geq 90 mmHg) desenvolvida após a vigésima semana de gestação, acompanhada de proteinúria ($>$ 300 mg em urina de 24 horas) e edema, em gestantes sem outras causas para estes sintomas (16).

Considerações éticas

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, e para todos os pacientes incluídos foi obtido consentimento informado do pai, mãe ou responsável legal. Quando uma amostra de sangue era requisitada pela

equipe médica assistencial, uma quantidade adicional mínima (200µL) era coletada em frasco específico com EDTA para posterior análise das quimiocinas. Nenhuma amostra de sangue, punção venosa ou arterial foi realizada exclusivamente para fins da pesquisa.

Variáveis e definições

As seguintes variáveis foram coletados prospectivamente e posteriormente comparadas entre os dois grupos: Peso de nascimento, idade gestacional, tipo de parto, escore de Apgar, *Score for Neonatal Acute Physiology and Perinatal Extension II* (SNAPPE-II), dados maternos (idade da mãe, realização do pré-natal, uso de corticoesteróide pré-natal, presença de ruptura precoce de membranas, infecção do trato urinário), ocorrência de pequeno para idade gestacional (PIG), uso de nutrição parenteral total, uso de filgrastima (Rh-GCSF), transfusão de concentrado de hemácias, necessidade de ventilação mecânica, CPAP nasal, presença de neutropenia, hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida (sepse precoce) e hemocultura positiva após 72 horas de vida (sepse tardia); presenças de Doença de Membrana Hialina, hemorragia intraventricular graus III e IV, enterocolite necrosante, convulsões e óbito.

A idade gestacional foi avaliada pela melhor estimativa obstétrica, ou seja, a data da última menstruação da mãe ou ultrassonografia obstétrica realizada nas primeiras 12 semanas de gestação, confirmado pelo exame físico pediátrico pós-natal. Recém-nascidos pequeno para a idade gestacional (PIG) foi definido quando o peso de nascimento encontrava-se inferior ao 10º percentil para a idade gestacional das curvas de Alexander e colaboradores, empregadas na rotina do Serviço (17). Ruptura prolongada de membranas foi considerado bolsa rota por tempo superior a 18 horas antes do parto.

Foram coletados amostras de sangue apenas nos pacientes que necessitaram de coleta de exames laboratoriais de rotina nas primeiras 48 horas de vida, não implicando em coleta exclusivamente para a pesquisa. A contagem de neutrófilos absolutos foi realizada através do aparelho Sysmex 2100 (TOA Medical Electronic, Kobe, Japan). Os recém-nascidos foram considerados neutropênicos quando apresentavam um número de neutrófilos absolutos inferior a $1500/\text{mm}^3$ nas primeiras 72 horas de vida (18).

As principais variáveis foram os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α . As amostras sanguíneas (200 μL) foram coletadas em tubos com EDTA, o plasma foi separado por centrifugação e após congelado em freezer a -80°C , no centro de pesquisa de nossa instituição, até as análises serem realizadas em conjunto.

Todas as análises laboratoriais foram cegas e realizadas por pesquisadores (FRS, RCS) não diretamente envolvido clinicamente com o cuidado dos pacientes.

Análise plasmática das quimiocinas

A análise das quimiocinas IL-8 e GRO- α foi realizada pelo método enzimoimunoensaio com kits comercialmente disponíveis (Quantikine Human IL-8 e GRO- α , R&D Systems, Inc. MN, USA). O limite para detecção de IL-8 foi 0.35 pg/ml e de GRO- α foi 0.6 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%. A leitura foi realizada através do leitor óptico automático Spectramax no comprimento de onda de 450 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado a partir de estudos prévios com dosagens de IL-8 e GRO- α em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de mães com pré-

eclampsia (19). Para um nível de significância de 5% e 90% de poder, o tamanho da amostra foi de 49 pacientes em cada grupo. Os recém-nascidos prematuros foram admitidos sequencialmente até completar o tamanho da amostra e um adicional de 25% de amostra ser obtido.

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (p25-p75) e as variáveis categóricas como número e porcentagem. Na comparação entre os grupos foi empregado o teste bi-caudal qui-quadrado para a análise das variáveis categóricas e o teste t de Student ou Mann-Whitney para variáveis contínuas. As diferenças nas medianas dos níveis plasmáticos de IL-8 entre os grupos de RN de mães com pré-eclampsia com neutropenia, RN de mães com pré-eclampsia sem neutropenia e controle foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise univariada foi realizada e as variáveis foram incluídas no modelo de regressão logística múltipla quando exibiram significância estatística ($p < 0.005$). O nível de significância para todas as diferenças foi estabelecido em $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences software version 18.0* (SPSS 18.0).

Resultados

Durante o período do estudo, 119 recém-nascidos prematuros preencheram o critério de inclusão, sendo 55 de mães com pré-eclampsia e 64 sem pré-eclampsia materna. A média da idade gestacional e peso de nascimento foi 29 ± 5 semanas e 1460 ± 419 gramas, respectivamente. A média do SNAPPE foi 5 (0-22). A média do escore de Apgar no 1º e 5º minuto foi 7 (5-8) e 8 (7-9), respectivamente. A média da contagem neutrófilos absolutos totais foi 3590 células/mm³ (2030-5570 células/mm³).

A mediana do momento da coleta da amostra foi 28 (6-42) horas após o nascimento, em ambos grupos de recém-nascidos de mães com pré-eclampsia e sem pré-eclampsia. Todos os recém-nascidos prematuros tiveram os níveis plasmáticos de IL-8 e GRO- α obtidos nas primeiras 48 horas de vida. Foi administrado tratamento com sulfato de magnésio anteparto em 100% das mães com pré-eclampsia, de acordo com rotina da obstetrícia.

Na análise univariada, as características significativamente associadas com pré-eclampsia foram as variáveis: tipo de parto, bolsa rota > 18 horas, recém-nascido pequeno para idade gestacional (PIG), neutropenia e os níveis plasmáticos de IL-8, como mostrado na tabela 1. Apesar do grupo com pré-eclampsia materna apresentar menos nascimento prematuro, somente a ocorrência de recém-nascido PIG foi significativamente estatístico. Peso de nascimento, presença de infecção do trato urinário materno ou corioamnionite, Doença de Membrana Hialina, hemorragia intraventricular (graus III e IV) e enterocolite necrosante foram similares nos dois grupos. Não houve diferença estatística nos níveis de GRO- α . Os níveis plasmáticos de IL-8 foram maiores no grupo de recém-nascidos sem pré-eclampsia materna (Tabela 1). Os níveis plasmáticos de IL-8 foram similares nos recém-nascidos de mães pré-eclampticas com neutropenia e sem neutropenia [31.88 88 pg/ml (5.36-74.15); 50.92 pg/ml (16.9-100.8), respectivamente], e foram significativamente menores que nos recém-nascidos de mães sem pré-eclampsia [157.1 pg/ml (86.4-261.3); $p < 0.001$].

Não houve associação significativa entre pré-eclampsia materna e idade gestacional. A análise por regressão múltipla mostrou que a ausência de pré-eclampsia foi independentemente associado a níveis plasmáticos elevados de IL-8 e a bolsa rota >

18 horas; e a presença de pré-eclampsia foi independentemente associado a parto cesariano, recém-nascido PIG e presença de neutropenia (Tabela 2).

Discussão

Os recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia apresentaram níveis plasmáticos de IL-8 significativamente menores nas primeiras 48 horas de vida quando comparados com os controles, independentemente da presença de neutropenia, da idade gestacional ou do peso do nascimento, sugerindo que a ativação leucocitária está prejudicada nestes recém-nascidos.

De acordo com os nossos achados, vários estudos demonstraram que a pré-eclampsia materna está associada a neutropenia (6,8,10,18,20) e além disso, não aumenta a ocorrência de sepse neonatal (10,21). Nós utilizamos o mesmo critério clássico de neutropenia descrito para recém-nascidos de muito baixo peso por Mouzinho e colaboradores (18). Em estudo multicêntrico que publicamos previamente, demonstramos que recém-nascidos de muito baixo peso de mães com pré-eclampsia não apresentaram risco aumentado de sepse neonatal, mesmo naqueles que apresentavam neutropenia. A neutropenia nestes recém-nascidos é transitória e não demonstra nenhuma associação com maior mortalidade (10).

Alguns pontos positivos e relevantes do nosso estudo foram um critério de inclusão bem estabelecido, o momento da coleta das amostras sanguíneas para a análise das quimiocinas e principalmente devido as amostras serem do sangue periférico dos recém-nascidos ao invés de sangue de cordão umbilical ou materno. Estudos prévios com recém-nascidos de mães com pré-eclampsia mensuraram as quimiocinas in vitro ou em sangue de cordão umbilical e foram limitados, devido um tamanho reduzido da

amostra (14,19,22,23). Mellembakken et al demonstraram um significativo aumento dos níveis de IL-8 e GRO- α em sangue de cordão umbilical em um grupo de gestantes com pré-eclampsia. Eles estudaram 20 gestações com pré-eclampsia e 19 gestações normais, incluindo partos prematuros e à termo e tiveram valores elevados de IL-8 e GRO- α (19). Uma questão adicional importante é saber se os pacientes são comparáveis em termos de idade gestacional e morbidades, estudos com diferentes idades gestacionais são muito falhos quando o desfecho é o nível plasmático de quimiocina. Isto porque a quimiotaxia dos neutrófilos no período neonatal é reduzida quando comparada com a quimiotaxia de neutrófilos de adultos. Além disso, devemos lembrar que a IL-8 é um potente estimulador da quimiotaxia dos polimorfonucleares (24). Por esta razão, nós estudamos apenas recém-nascidos prematuros. Outros estudos com quimiocinas mostraram diferenças importantes entre os prematuros e recém-nascidos a termo (25,26).

Os recém-nascidos prematuros estão mais expostos à estímulos inflamatórios do que os recém-nascidos a termo (9,27,28). Em um estudo prospectivo realizado em recém-nascidos de muito baixo peso com sepse precoce, nosso grupo demonstrou relação entre os níveis plasmáticos elevados de IL-8 nos primeiros dias de vida com o posterior desenvolvimento de retinopatia da prematuridade (ROP) severa (27). Também demonstrou que na presença de pré-eclampsia materna o risco de ocorrência de ROP severa é reduzido em 80% nestes prematuros (29). Portanto, no presente estudo, não foi um achado inesperado a obtenção de níveis plasmáticos de IL-8 menores nos recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclampsia.

Em nosso estudo, o tratamento com sulfato de magnésio (MgSO₄) foi administrado em 100% das mães com pré-eclampsia. O sulfato de magnésio parece ter

efeito antiinflamatório durante o trabalho de parto prematuro, causando níveis plasmáticos de IL-8 menores nos prematuros nascidos de mães com pré-eclampsia quando comparados àqueles nascidos de mães sem pré-eclampsia, como já demonstrado em estudo prévio (30). O sulfato de magnésio inibe a endotoxina que estimula in vitro a produção de IL-8 em células decíduais e amnióticas (31). A administração de sulfato de magnésio antes do parto reduz significativamente a ativação endotelial celular, este achado foi avaliado pela promoção de resposta inflamatória in vitro e medido através dos níveis de IL-8 e de ICAM-1 em células endoteliais da veia umbilical humana (HuVEC) (30).

Estudos apontam para um papel central do desbalanço angiogênico na patogênese da pré-eclampsia. Mais recentemente tem sido proposto um mecanismo envolvendo a placentação anormal que levaria a liberação de fatores anti-angiogênicos responsáveis pelo dano endotelial vascular (33,34). Gotsch et al reportaram a ocorrência de um estado anti-angiogênico em gestantes com pré-eclampsia, detectando alterações nas concentrações de fatores angiogênicos circulantes (35). A IL-8 e o GRO- α são secretados pelas células endoteliais. No nosso estudo encontramos níveis de IL-8 diminuídos em RN de mães com pré-eclampsia e o GRO- α foi similar nos dois grupos. Parece haver alteração nos fatores angiogênicos em gestantes com pré-eclampsia. O fator anti-angiogênico reduz o número de células endoteliais, causando uma redução da expressão de IL-8, mas não de GRO- α (36,37).

Como a causa da pré-eclampsia é incerta, o desenvolvimento de estratégias racionais para sua prevenção e tratamento é difícil. Os dados de ensaios clínicos são insuficientes para conclusões confiáveis sobre estratégias alternativas de prevenção e tratamento (38). A disfunção endotelial como causa das alterações clínicas da

preeclampsia é uma hipótese que pode abrir uma janela terapêutica. Portanto, as respostas adaptativas do recém-nascido de mães com pré-eclâmpsia necessitam de mais investigação.

Referências Bibliográficas.

1. Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, Wilcox AJ, Irgens L, Skjaerven R. Trends in Fetal and Infant Survival Following Preeclampsia. *JAMA*, 2006; 296: 1357-62
2. Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Carroli G, Purwar M, Zavaleta N, Campódonico L, Ali MM, Hofmeyr GJ, Mathai M, Lincetto O, Villar J. Causes of stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993 pregnancies in six developing countries. *Bull World health organ* 2006; 84:599-705.
3. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M; NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 2003 ;41: 437-45.
4. ACOG Committee on Practice Bulletins Obstetrics. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002;99:159-67.
5. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002; 287: 3183.
6. Doron MW, Makhoulouf RA, Katz VL, Lawson EE, Stiles AD. Increased incidence of sepsis at birth in neutropenic infants of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 1994;125:452-8.

7. Cetinkaya M, Ozkan H, Köksal N, Karali Z, Ozgür T. Neonatal outcomes of premature infants born to preeclamptic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23:425-30.
8. Koenig JM, Christensen RD. The mechanism responsible for diminished neutrophil production in neonates delivered of women with pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:467-73.
9. Zook KJ, Mackley AB, Kern J, Paul DA. Hematologic effects of placental pathology on very low birthweight infants born to mothers with preeclampsia. *J Perinatol* 2009;29:8-12.
10. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Rugolo LMSS, Leone CR, Lopes JMA, Almeida MF, Brazilian Network of Neonatal Research. Sepsis and neutropenia in very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 2010; 157:434-8.
11. Sullivan SE, Staba SL, Gersting JA, Hutson AD, Theriaque D, Christensen RD, Calhoun DA . Circulating concentrations of chemokines in cord blood, neonates, and adults. *Pediatr Res.* 2002; 51:653-7.
12. Greer IA, Haddad NG, Dawes J, Johnstone FD, Calder AA. Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989;96:978 –982.
13. Mellebacken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension.* 2002 ;39:155-60.
14. Laskowska M, Laskowska K, Leszczyńska-Gorzela B, Oleszczuk J. Comparative analysis of the maternal and umbilical interleukin-8 levels in normal pregnancies and in

pregnancies complicated by preeclampsia with intrauterine normal growth and intrauterine growth retardation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007;20:527-32.

15. Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010;11:59.

16. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: s1–22.

17. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 163–168.

18. Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sánchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics.* 1994;94:76-82.

19. Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and Leukocyte activation in the Fetal Circulation During Preeclampsia. *Hypertension* 2001;38: 394-398.

20. Funke A, Berner R, Traichel B, Schmeisser D, Leititis JU, Neimeyer CM. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000;106:45-51.

21. Paul DA, Leef KH, Sciscione A, Tutte DJ, Stefano JL. Preeclampsia does not increase the risk for culture proven sepsis in very low birth weight infants. *Am J Perinatol* 1999, 16:367-22.

22. Gu Y, Lewis DF, Zhang Y, Groome LJ, Wang Y. Increased superoxide generation and decreased stress protein Hsp90 expression in human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) from pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2006;25:169-82.

23. Mellembakken JR, Solum NO, Ueland T, Videm V, Aukrust P. Increased concentrations of soluble CD40 ligand, RANTES and GRO-alpha in preeclampsia--possible role of platelet activation. *Thromb Haemost* 2001;86:1272-6.
24. Fox SE, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine*. 2005;29:135-40.
25. Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Zuckerman B, Wang X. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*. 2009;123: 1320-8.
26. Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, Kuban K, McElrath T, O'Shea TM, Paneth N. Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. *Cytokine* 2011;53:66-73.
27. Silveira RC, Filho JB, Procianoy RS. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52: 1297-301.
28. Królak OB, Beck B, Olejnik I. Umbilical cord concentrations of chemokines (RANTES and MGSA/GRO- α) in preterm and term neonates. *Pediatr Inter* 2006;48: 586-90.
29. Fortes Filho JB, Costa MC, Eckert GU, Santos PG, Silveira RC, Procianoy RS. Maternal preeclampsia protects preterm infants against severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 2011; 158:372-6.

30. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFkappaB pathway. *Reprod Immunol*. 2007;73:101-7.
31. Makhlof MA, Simhan HN. Effect of tocolytics on interleukin-8 production by human amniotic and decidual cells. *J Reprod Immunol*. 2006;69:1-7.
32. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B, Rigó J Jr. Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res*. 2010;33:892-8.
33. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010;37:239-53.
34. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294 : H541-50..
35. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Dombrowski M, Erez O . Preeclampsia and small-for-gestational age are associated with decreased concentrations of a factor involved in angiogenesis: soluble Tie-2. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21:389-402.
36. Dunlevy JR, Couchman JR. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci*. 1995;108:311-21.
37. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005; 46:1077- 85.

38. Churchill D, Duley L Interventionist versus expectant care for severe pre-eclampsia before term. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3): CD003106. Review

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Vânia Naomi Hirakata e Gustavo Faulhaber por sua ajuda na análise estatística, e à Isaura Riedl pela revisão do Inglês. Este trabalho foi apoiado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pelo FIPE-HCPA.

Tabela 1 - Fatores maternos e neonatais associados com pré-eclampsia

RN prematuros			
	Mães com PE	Mães sem PE	P
Idade materna (anos)**	25.3 ±6.4	27.2 (±7.0)	0.187
Pre-natal (%)*	54 (98.2%)	58 (90.6%)	0.121
Diabetes gestacional (%)*	1 (1.8%)	5 (7.8%)	0.215
Infecção do trato urinário			
materno (%)*	10 (18.1%)	23 (35.9%)	0.062
Corioaminionite (%)	10 (18.1%)	18 (28.1%)	0.085
Uso de corticóide pré-natal (%)			
*	40 (72.7%)	47 (73.4%)	1.000
Parto Cesário (%)*	49 (89%)	34 (53%)	<0.0001
Idade gestacional (semanas±			
dias)***	30.7 ±6.3	28.6 ±3.2	0.057

Escore APGAR no 5º minuto**	8 (7 – 9)	8 (7 – 9)	0.788
PIG (%)*	39 (70.9%)	21 (32.8%)	<0.0001
Peso de nascimento (gramas)			
***	1328 ±413	1444 ±419	0.130
Escore SNAPPE II **	0 (0 – 18)	12 (0 – 22)	0.094
BR >18 hours (%)*	2 (3.6%)	23 (35.9%)	<0.0001
CPAP nasal(%)*	35 (63.6 %)	41 (64%)	1.000
Ventilação Mecânica (%)*	25 (46.9%)	30(45.5%)	1.000
DMH (%)*	13 (23.6%)	6 (9.4%)	0.062
ECN (%)*	7 (12.7%)	7 (10.9 %)	0.387
Convulsões (%)*	7 (12.7%)	16 (25%)	0.145
Hemorragia intraventricular			
(III-IV)*	5 (9.0%)	14 (21.8%)	0.108
Transfusão de hemácias (%)*	23 (41.8%)	33 (51.5%)	0.385
Rh-GCSF (%)*	15 (27.3%)	12 (18.7%)	0.375
Hemocultura positiva < 72			
horas de vida*	1 (1.8%)	2 (3.12 %)	0.500
Hemocultura positiva > 72			
horas de vida*	7 (12.7%)	9 (14%)	1.00
Neutropenia (< 1500)*	13 (23.6%)	5 (7.8%)	0.032
Nutrição Parenteral Total (%)*	36 (65.4%)	34 (53.1%)	0.240
Óbito (%)*	13 (23.6%)	16 (25%)	1.000
GRO-α (pg/mL)**	185.5 (63.9-306.7)	229.5 (116.6-321.3)	0.236
IL-8 (pg/mL)**	26.54 (3.6-87.2)	157.1 (86.4-261.3)	<0.0001

PE: pré-eclampsia; PIG: pequeno para idade gestacional; DMH: Doença da membrana

hialina; ECN: enterocolite necrosante; CPAP: *continuous positive airway pressure*; BR:

bolsa rota

* Teste qui-quadrado **Mann-Whitney ***Testes T

Os dados estão expressos como média ± DP ou mediana (p25-p75)

Tabela 2 - Fatores independentemente associados à pré-eclâmpsia materna

Fatores	Odds Ratio	Intervalo de confiança (95%)	P
IL-8	0.994	0.989 - 0.998	0.007
Parto cesáreo	4.764	1.257 - 18.05	0.022
PIG	6.681	2.041 - 21.872	0.022
BR >18 horas	6.389	1.154 - 35.384	0.034
Neutropenia	8.059	1.12 - 57.96	0.038
Idade gestacional	0.968	0.782 - 1.199	0.766

* A análise de regressão logística múltipla incluiu todas as variáveis com $p < 0.05$ da análise univariada e a idade gestacional ($p < 0.057$).

7 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

LEUKOCYTE ACTIVATION IN PRETERM NEWBORN INFANTS DELIVERED
BY PREECLAMPTIC MOTHERS

Fabrízia R. S. Faulhaber, MD

Renato S. Procianoy, MD, PhD

Ana Paula Vargas

Rita de Cássia Silveira, MD, PhD

Department of Pediatrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Newborn
Section, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Fabrízia R. S. Faulhaber

Rua Tito Livio Zambecari, 359/201

Porto Alegre, RS – CEP: 90450231.

Fone (51) 8408-8737

e-mail: rennosodero@ig.com.br

The authors do not have any conflict of interest disclose.

Abstract

Neutropenia is frequent in newborn infants of preeclamptic mothers. Information on leukocyte activation in those newborns is scarce, but IL-8 and GRO- α are the main pro-inflammatory cytokines involved. The aim was to study IL-8 and GRO- α plasma levels in preterm newborn infants of preeclamptic mothers.

Methods: Newborn infants with gestational age < 36 weeks and birth weight < 2000 grams were included and divided: non-preeclamptic and preeclamptic groups. Exclusion criteria: major congenital malformations, inborn errors of metabolism or chromosomal anomalies, STORCH infections, inborn preterm that died in the delivery room, and those whose mothers had chronic hypertension without preeclampsia. During the regular blood sample collection in the first 48 hours, a small amount was used for IL-8 and GRO- α measurement by enzyme immunoassay. Chi-square, Student's t test, Mann Whitney test, Kruskal-Wallis and multiple logistic regression model were employed.

Results: 119 preterm infants (64 non-preeclamptic and 55 preeclamptic). They were similar in birth weight, gestational age, Apgar scores at 5 minutes, sepsis, SDR, mechanical ventilation, TPN, NEC, intraventricular hemorrhage and death. The preeclamptic group had more neutropenia, SGA, C Section, and less rupture of membranes for > 18 hours. IL-8 was higher in the non-preeclamptic [157.1 (86.4-261.3) and 26.54 (3.6-87.2) $p < 0.001$ in non-preeclamptic and preeclamptic groups, respectively]. GRO- α was similar [229.5 pg/ml (116.6-321.3) and 185.5 pg/ml (63.9-306.7) $p = 0.236$ in non-preeclamptic and preeclamptic groups, respectively]. After multiple regression analysis only absence of preeclampsia was associated with high IL-8 levels.

Conclusions: Preterm newborn infants of preeclamptic mothers have a decreased plasma level of IL-8, suggesting that the leukocyte activation may be impaired in infants of preeclamptic mothers.

Abstract: 263 words

Keywords: Chemokine, neutropenia, newborn, preeclampsia, preterm infants.

Introduction

Preeclampsia remains a leading cause of maternal and fetal morbidity and mortality; it is the most prevalent hypertensive disorder in pregnancy, accounting for 3% to 14% of all gestations (1-5). Neutropenia is frequent in newborn infants of preeclamptic mothers. Its association with sepsis has shown conflicting results (6-10). Recently in a large population of very low birth weight infants delivered by preeclamptic mothers we found an association of neonatal neutropenia and death, independently of sepsis (10).

Chemotaxis is deficient in newborns; particularly in preterm infants. It may contribute to their high vulnerability to sepsis. Two chemokines are critical for the movement of leukocytes: IL-8 and GRO- α (11,12). There is scarce information on leukocyte activation in newborns of preeclamptic mothers. An activation of neutrophils and monocytes in the fetal circulation has been suggested during preeclampsia, resulting in elevated levels of chemokines and adhesion molecules in the maternal circulation (13-15).

We hypothesized that IL-8 and GRO- α are involved in the pathogenesis of preeclampsia and affect neonatal leukocyte activation. Thus, the aim of the present study was to compare IL-8 and GRO- α plasma levels in preterm newborn infants delivered by preeclamptic and non preeclamptic mothers.

Methods

Study population

From March 2008 to December 2009 we conducted a prospective cohort study of preterm infants born at the obstetrics center of our hospital and admitted to the neonatal intensive care unit (NICU) with gestational age lower than 36 weeks and birth weight lower than 2000 grams. Exclusion criteria were presence of major congenital malformations, inborn errors of metabolism or chromosomal anomalies, congenital TORCH infections (syphilis, toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus or herpes) or HIV+ mother, inborn preterm that died in the delivery room, and those whose mothers had chronic hypertension without preeclampsia during the gestational period.

Preterm infants included in the study were divided in preeclamptic (delivered by preeclamptic mothers) and control groups (all the neonates without maternal preeclampsia). Diagnosis of maternal preeclampsia was arterial hypertension (blood pressure ≥ 140 mmHg systolic and/or ≥ 90 mmHg diastolic) developing after 20 weeks gestation with proteinuria >300 mg in a 24-h urine sample, edema in a pregnant woman with no other cause for the symptoms (16).

Ethical considerations

The study protocol was approved by the institutional review boards and hospital's ethics committee. Informed Consent Form was read too, and signed by parents or guardians prior to the study. When a blood sample was required by the medical care team a minimal additional amount (200 μ L) was obtained in EDTA tube for cytokine analysis. No blood samples, venous or arterial punctures were performed exclusively for research purposes.

Variables and definitions

The following data were collected prospectively and later compared between the two groups: birth weight, gestational age, type of delivery, Apgar scores, Score for Neonatal Acute Physiology and Perinatal Extension II (SNAPPE-II), maternal data (age, prenatal, prenatal corticosteroid use, rupture of membranes, urinary tract infection, gestational diabetes), small for gestational age, use of total parenteral nutrition (TPN), Rh-GCSF, RBC transfusion, oxygen in mechanical ventilation or by nasal continuous positive airway pressure (CPAP); presence of neutropenia, positive blood cultures less than 72 hours after birth (early-onset sepsis) and more than 72 hours after birth (late-onset sepsis), Respiratory Distress Syndrome (RDS), grade III and IV of intraventricular hemorrhage (IVH), necrotizing enterocolitis (NEC), seizures, and death during hospital stay.

The gestational age (GA) was defined as the best estimate of GA based on last menstrual period, obstetric history and examination, obstetric ultrasound performed at 12 weeks' pregnancy, and confirmed by postnatal physical examination. The definition of infants who were small for GA (SGA) was a birth weight < 10th percentile for GA according to the gender-specific growth charts of Alexander et al (17). Prolonged rupture of membranes was considered the one more than 18 hours before delivery.

The complete blood count was obtained as deemed necessary by the clinicians caring for the infants in the first 48 hours of life, and not especially for the study. Total absolute neutrophil counts (ANC) were performed with a Sysmex 2100 (TOA Medical Electronic, Kobe, Japan). Preterm infants were considered to have neutropenia if the total ANC was < 1500/mm³ in the first 72 hours according to Mouzinho et al (18).

The main variables were the plasma levels of IL-8 and GRO- α ; blood samples (200 μ L) were collected in flasks with EDTA and plasma was separated by

centrifugation, and then stored in aliquots at - 80° C in a freezer at the research center of our institution until analysis.

All laboratory blind analysis was performed by someone not directly involved in the clinical data of the patients.

Chemokines plasma analysis

The measurement of IL-8 and GRO- α was performed using an enzyme immunoassay (Quantikine Human IL-8 and GRO- α , R & D Systems, Inc. MN, USA). The detection limit for IL-8 was 0.35 pg/ml, and for GRO- α 0.6 pg/ml, with intra and interassay coefficients of variation below 5% for both, IL-8 and GRO- α . Readings were carried out in an automated optical Spectramax reader at 450 nm. All samples were tested in duplicate.

Statistical analysis

The sample size calculation was performed based on previous study with venous cord blood IL-8 and GRO- α levels (19). For significance level of 5% and 90% power, the sample size was 49 in each group. Preterm infants were admitted sequentially until the sample size and an additional 25% was reached.

Continuous variables were described as mean \pm SD or median and interquartile range (p25-p75), while categorical variables as number and percentage. Comparison between groups was performed with the two-tailed chi-square test for categorical variables, and Students't or Mann-Whitney tests for continuous variables. Differences in IL-8 plasma levels among preeclamptic with neutropenia, preeclamptic without neutropenia and control groups were compared by Kruskal-Wallis test. Univariate analysis were performed, and the variables were included in multiple logistic

Regression model when they exhibited statistical significance ($p < 0.05$). All differences were considered significant if p-values were < 0.05 . Data were analyzed using Statistical Package for Social Sciences software version 18.0.

Results

During the study period, 119 inborn preterm infants fulfilled inclusion criteria, 55 delivered by preeclamptic mothers and 64 by non preeclamptic. The mean gestational age and birth weight were 29 ± 5 weeks and 1460 ± 419 grams, respectively. Median SNAPPE was 5 (0-22). Median APGAR scores at 1 and 5 minutes were 7 (5-8) and 8 (7-9), respectively. The median of Total absolute neutrophils counts (ANC) was 3590 cells/mm³ (2030-5570 cells/m³). The median sample collection timing was 28 (6-42) hours after birth, in both preeclamptic and non preeclamptic. All preterm infants had IL-8 and GRO-plasma levels obtained until 48 hours of life. Magnesium sulfate (MgSO₄) treatment was administered in 100% of preeclamptic mothers.

In univariate analysis, characteristics significantly associated with preeclampsia were the variables type of delivery, occurrence of premature rupture of membranes more than 18 hours, SGA, neutropenia, and the IL-8 plasma levels as shown in table 1. Although preeclamptic patients were born less prematurely, only the occurrence of SGA was statistically significant. Birth weight, presence of maternal urinary tract infection and chorioamnionitis, RDS, severe intraventricular hemorrhage and NEC were similar in both groups. There were no statistical differences in GRO- α level. IL-8 plasma levels were higher in the non-preeclamptic group (table 1).

Preeclamptic with neutropenia and without neutropenia had similar IL-8 plasma levels [31.88 88 pg/ml (5.36-74.15); 50.92 pg/ml (16.9-100.8), respectively], and were significantly lower than non preeclamptic patients [157.1 pg/ml (86.4-261.3); $p < 0.001$]. There was no significant association between maternal preeclampsia and gestational age. The multiple regression analysis showed that absence of preeclampsia was independently associated with high IL-8 plasma levels and PROM > 18 hours; and the presence of preeclampsia was independently associated with C-section delivery, born SGA and neutropenia, (table 2).

Discussion

Preterm infants delivered by preeclamptic mothers had IL-8 plasma levels in the first 48 hours lower than controls independently of neutropenia, gestational age or birth weight, suggesting that leukocyte activation is impaired in infants those infants. According to our findings, maternal preeclampsia is associated with neutropenia (6,8,10,18,20); and preeclampsia does not increase the occurrence of sepsis (10,21). We used the cutoff point for neutropenia described as appropriated for very low birth weight infants (18). In a previous multicenter study we showed that very low birth weight infants delivered by preeclamptic mothers had not increased risk of neonatal sepsis, even in those with neutropenia because it is known to be transient and doesn't have any association with higher mortality (10).

The strengths of our study were the very strict inclusion criteria; timing of blood samples for chemokines analysis, and the evaluation of neonatal peripheral blood sample instead of maternal or cord blood. Previous studies with newborns of preeclamptic mothers who measured inflammation- related chemokines in vitro or in

umbilical cord blood were limited to a small sample size (14,19,22,23). Mellembakken et al obtained a significant high IL-8 and GRO- α in umbilical cord vein in the preeclamptic group. They studied 20 preeclamptic pregnancies and 19 normal pregnancies, included term and preterm deliveries and had outlier values of IL-8 and GRO- α (19). An additional important question is whether the patients are comparable. Studies with different gestational ages lack when the outcome is chemokines plasma levels. The chemotaxis of neonatal neutrophils is low compared to that of adult neutrophils, and IL-8 is a potent stimulator of PMN chemotaxis (24). Hence we studied only preterm infants. Other studies have shown important differences between preterm and full term newborns (25,26).

Preterm infants are more likely to have been exposed to inflammatory stimuli than term ones (9, 27,28). In a prospective study of very low birth weight infants with clinical early-onset sepsis we showed a relationship between high plasma levels of IL-8 in the first days of life with later development of severe ROP (27). We have also demonstrated that in preeclampsia the risk for severe ROP is reduced in 80% (29). Therefore, in this study, finding low IL-8 plasma levels in preterm infants of preeclamptic mothers was not an unexpected.

In our study, magnesium sulfate ($MgSO_4$) treatment was administered to 100% of preeclamptic mothers. Magnesium sulfate has an anti-inflammatory effect during preterm labor causing lower IL-8 plasma levels in preterm infants delivered by preeclamptic than in those delivered by non preeclamptic mothers as demonstrated in a previous study (30). Magnesium sulfate inhibits the endotoxin-stimulated IL-8 production in both decidual and amniotic cells in vitro (31). Antenatal magnesium sulfate administration significantly reduces the endothelial cell activation as measured

by levels of IL-8 and ICAM-1 on human umbilical vein endothelial cell (HuVEC) after inflammatory responses in vitro (30).

There are findings indicating a central role of an angiogenic imbalance in the pathogenesis of preeclampsia (32). More recently a mechanism involving abnormal placentation leading to the release of vascular endothelial-damaging antiangiogenic factors has been proposed (33,34) Gotsch et al reported the occurrence of an antiangiogenic state in mothers with preeclampsia, detecting changes in the concentration of circulating angiogenic factors (35). IL-8 and GRO- α have been secreted by endothelial cells. We had a decreased IL-8 in preeclamptic patients and GRO- α was similar in both groups. There seem to be differences in angiogenic factors regarding preeclamptic mothers. The antiangiogenic factor reduces the number of endothelial cells, causing a reduced expression of IL-8, but not of GRO- α (36,37).

As the cause of preeclampsia is unclear, the development of rational strategies for prevention and treatment is difficult. The data from trials are insufficient for reliable conclusions about alternative strategies for prevention and treatment (38). Endothelial dysfunction as a cause of the clinical abnormalities in preeclampsia is a hypothesis that may open a therapeutic window. Therefore, these adaptive responses of newborn delivered by preeclamptic mothers need more investigation.

References

1. Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, Wilcox AJ, Irgens L, Skjaerven R. Trends in Fetal and Infant Survival Following Preeclampsia. *JAMA*, 2006; 296: 1357-62
2. Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Carroli G, Purwar M, Zavaleta N, Campódonico L, Ali MM, Hofmeyr GJ, Mathai M, Lincetto O, Villar J. Causes of

stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993 pregnancies in six developing countries. *Bull World health organ* 2006; 84:599-705.

3. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M; NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 2003 ;41: 437-45.

4. ACOG Committee on Practice Bulletins Obstetrics. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002;99:159-67.

5. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002; 287: 3183.

6. Doron MW, Makhoul RA, Katz VL, Lawson EE, Stiles AD. Increased incidence of sepsis at birth in neutropenic infants of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 1994;125:452-8.

7. Cetinkaya M, Ozkan H, Köksal N, Karali Z, Ozgür T. Neonatal outcomes of premature infants born to preeclamptic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23:425-30.

8. Koenig JM, Christensen RD. The mechanism responsible for diminished neutrophil production in neonates delivered of women with pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:467-73.

9. Zook KJ, Mackley AB, Kern J, Paul DA. Hematologic effects of placental pathology on very low birthweight infants born to mothers with preeclampsia. *J Perinatol* 2009;29: 8-12.

10. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Rugolo LMSS, Leone CR, Lopes JMA, Almeida MF, Brazilian Network of Neonatal Research. Sepsis and neutropenia in

very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 2010; 157:434-8.

11. Sullivan SE, Staba SL, Gersting JA, Hutson AD, Theriaque D, Christensen RD, Calhoun DA . Circulating concentrations of chemokines in cord blood, neonates, and adults. *Pediatr Res.* 2002; 51:653-7.

12. Greer IA, Haddad NG, Dawes J, Johnstone FD, Calder AA. Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989;96:978 –982.

13. Mellebacken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension.* 2002 ;39:155-60.

14. Laskowska M, Laskowska K, Leszczyńska-Gorzela B, Oleszczuk J. Comparative analysis of the maternal and umbilical interleukin-8 levels in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia with intrauterine normal growth and intrauterine growth retardation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007;20:527-32.

15. Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010;11:59.

16. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: s1–22.

17. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 163–168.

18. Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sánchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics.* 1994;94:76-82.

19. Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and Leukocyte activation in the Fetal Circulation During Preeclampsia. *Hypertension* 2001;38: 394-398.
20. Funke A, Berner R, Traichel B, Schmeisser D, Leititis JU, Neimeyer CM. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000;106:45-51.
21. Paul DA, Leef KH, Sciscione A, Tutte DJ, Stefano JL. Preeclampsia does not increase the risk for culture proven sepsis in very low birth weight infants. *Am J Perinatol* 1999, 16:367-22.
22. Gu Y, Lewis DF, Zhang Y, Groome LJ, Wang Y. Increased superoxide generation and decreased stress protein Hsp90 expression in human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) from pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2006;25:169-82.
23. Mellembakken JR, Solum NO, Ueland T, Videm V, Aukrust P. Increased concentrations of soluble CD40 ligand, RANTES and GRO-alpha in preeclampsia--possible role of platelet activation. *Thromb Haemost* 2001;86:1272-6.
24. Fox SE, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine*. 2005;29:135-40.
25. Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Zuckerman B, Wang X. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*. 2009;123: 1320-8.
26. Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, Kuban K, McElrath T, O'Shea TM, Paneth N. Inflammation-related proteins in the blood of

extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. *Cytokine* 2011;53:66-73.

27. Silveira RC, Filho JB, Procionoy RS. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52: 1297-301.

28. Królak OB, Beck B, Olejnik I. Umbilical cord concentrations of chemokines (RANTES and MGSA/GRO- α) in preterm and term neonates. *Pediatr Inter* 2006;48: 586-90.

29. Fortes Filho JB, Costa MC, Eckert GU, Santos PG, Silveira RC, Procionoy RS. Maternal preeclampsia protects preterm infants against severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 2011; 158:372-6.

30. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFkappaB pathway. *Reprod Immunol.* 2007;73:101-7.

31. Makhoulf MA, Simhan HN. Effect of tocolytics on interleukin-8 production by human amniotic and decidual cells. *J Reprod Immunol.* 2006;69:1-7.

32. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B, Rigó J Jr. Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res.* 2010;33:892-8.

33. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2010;37:239-53.

34. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294 : H541-50..
35. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Dombrowski M, Erez O . Preeclampsia and small-for-gestational age are associated with decreased concentrations of a factor involved in angiogenesis: soluble Tie-2. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21:389-402.
36. Dunlevy JR, Couchman JR. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci*. 1995;108:311-21.
37. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005; 46:1077- 85.
38. Churchill D, Duley L Interventionist versus expectant care for severe pre-eclampsia before term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(3): CD003106. Review

Acknowledgments

The authors would like to thank Vania Naomi Hirakata and Gustavo Faulhaber for their help with statistical analysis, and Isaura Riedl for English revision. This work was supported by Universidade Federal do Rio Grande do Sul and FIPE-HCPA.

Table 1 Maternal and Neonatal factors associated with preeclampsia

Preterm infants	P r e e c l a m p t i c		P value
	mothers (n=55)	mothers (n=64)	
Maternal age (years)**	25.3 ±6.4	27.2 (±7.0)	0.187
Prenatal care (%)*	54 (98.2%)	58 (90.6%)	0.121
Gestational Diabetes (%)*	1 (1.8%)	5 (7.8%)	0.215

Maternal Urinary tract

infection (%)*	10 (18.1%)	23 (35.9%)	0.062
Chorioamnionitis (%)	10 (18.1%)	18 (28.1%)	0.085
Prenatal corticosteroid use (%)*	40 (72.7%)	47 (73.4%)	1.000
C-section delivery (%)*	49 (89%)	34 (53%)	<0.0001
Gestational age (weeks± days)			
***	30.7 ±6.3	28.6 ±3.2	0.057
APGAR Score at 5 minutes**	8 (7 – 9)	8 (7 – 9)	0.788
SGA (%)*	39 (70.9%)	21 (32.8%)	<0.0001
Birth weight (grams)***	1328 ±413	1444 ±419	0.130
SNAPPE II Score **	0 (0 – 18)	12 (0 – 22)	0.094
PROM >18 hours (%)*	2 (3.6%)	23 (35.9%)	<0.0001
Oxygen therapy in nasal			
CPAP (%)*	35 (63.6 %)	41 (64%)	1.000
Oxygen therapy in Mechanical			
Ventilation (%)*	25 (46.9%)	30(45.5%)	1.000
RDS (%)*	13 (23.6%)	6 (9.4%)	0.062
NEC (%)*	7 (12.7%)	7 (10.9 %)	0.387
Seizures (%)*	7 (12.7%)	16 (25%)	0.145
Intraventricular hemorrhage			
(III-IV)*	5 (9.0%)	14 (21.8%)	0.108
RBC transfusion (%)*	23 (41.8%)	33 (51.5%)	0.385
Rh-GCSF (%)*	15 (27.3%)	12 (18.7%)	0.375
Positive Blood Culture < 72			
hours of life *	1 (1.8%)	2 (3.12 %)	0.500
Positive Blood Culture > 72			
hours of life*	7 (12.7%)	9 (14%)	1.00
Neutropenia (< 1500)*	13 (23.6%)	5 (7.8%)	0.032
Total Parenteral Nutrition (%)*	36 (65.4%)	34 (53.1%)	0.240
Death (%)*	13 (23.6%)	16 (25%)	1.000
GRO-α (pg/mL)**	185.5 (63.9-306.7)	229.5 (116.6-321.3)	0.236
IL-8 (pg/mL)**	26.54 (3.6-87.2)	157.1 (86.4-261.3)	<0.0001

SGA: small for gestational age; RDS: respiratory distress syndrome; NEC: necrotizing enterocolitis; CPAP: continuous positive airway pressure; PROM: Premature Rupture of membranes

* Chi-Square tests **Mann-Whitney ***T tests

Data are expressed as mean \pm SD or median (p25-p75).

Table 2 Factors independently associated with maternal preeclampsia

Factors	Odds Ratio	Confidence Interval (95%)	P value
IL-8	0.994	0.989 - 0.998	0.007
C-section	4.764	1.257 - 18.05	0.022
SGA	6.681	2.04 - 21.872	0.022
PROM >18 hours	6.389	1.154 - 35.384	0.034
Neutropenia	8.059	1.12 - 57.96	0.038
Gestational age	0.968	0.782 - 1.199	0.766

* Multiple logistic regression analysis included all variables with $p < 0.05$ in univariate analysis and Gestational age ($p < 0.057$).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pré-eclampsia é uma patologia fascinante, complexa e de origem multifatorial.

A disfunção endotelial provocada pela insuficiência placentária parece ser a causa central desta doença, com conseqüências tanto para a mãe (hipertensão arterial sistêmica, dano renal, neurológico, cardíaco, hepático) quanto para o feto (restrição do crescimento intra-uterino, prematuridade, neutropenia, sepse). Os principais mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial da pré-eclampsia seriam o desbalanço entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos, a placentação anormal e a ativação leucocitária.

Neste estudo avaliamos a ativação leucocitária em recém-nascidos prematuros de mães com pré-eclâmpsia, através da dosagem plasmática das principais citocinas relacionadas com a ativação e quimiotaxia de neutrófilos: IL-8 e GRO- α , e comparamos com recém-nascidos controles, sem pré-eclampsia materna. O comportamento destas quimiocinas foi diferenciado, sendo encontrados níveis reduzidos de IL-8 na pré-eclampsia e níveis similares de GRO- α entre os grupos.

Assim como em estudos prévios, os recém-nascidos de mães com pré-eclampsia apresentaram mais neutropenia nas primeiras 48 horas de vida quando comparados ao grupo controle. O grupo com pré-eclampsia também foi mais PIG,

apresentou mais parto cesariano e menos bolsa rota superior a 18 horas. Os grupos foram similares quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, escore de Apgar no 5º minuto, sepse, doença de membrana hialina, ventilação mecânica, nutrição parenteral total, enterocolite necrosante e hemorragia periventricular graus III e IV.

A pré-eclampsia uma doença multissistêmica e numerosos modelos têm sido propostos para explicar sua fisiopatogênese, mas esta permanece indefinida. A ativação leucocitária pode ser causa e/ou consequência, podendo desencadear um ciclo vicioso na patogênese da pré-eclampsia. Conseguimos demonstrar em nosso estudo níveis reduzidos de IL-8 em recém-nascidos de mães com pré-eclampsia, sugerindo que a ativação leucocitária neste pacientes possa estar prejudicada.

A ativação leucocitária e a disfunção endotelial como causa das alterações clínicas maternas e fetais na preeclampsia é uma hipótese que pode abrir uma janela terapêutica. Portanto, estudos futuros necessitam ser realizados para tentar esclarecer o exato mecanismo da resposta celular e humoral feto-neonatal resultante da pré-eclampsia materna.

ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente estudo busca descobrir o papel de algumas substâncias (interleucinas) doenças que os bebês prematuros de mães com pré-eclampsia podem apresentar. Estas substâncias poderão definir, no futuro, mais precocemente os bebês de maior risco.

Para isso, é necessário obter amostra de sangue desses bebês para o exame de laboratório. Seu filho ou tutelado não será submetido a exame de sangue exclusivamente para pesquisa. Quando o médico solicitar qualquer exame necessário, será coletado um pouco mais para a pesquisa (0,5 ml). A quantidade de sangue que será retirada a mais é pequena e não causa riscos para o paciente.

O conhecimento do papel dessas substâncias nas doenças que afetam os bebês prematuros de mães com pré-eclampsia, poderá estabelecer novos tratamentos no futuro, por isso, solicito seu consentimento na admissão de seu filho ou tutelado na pesquisa, para coletar esta quantia de sangue adicional.

Eu, _____, responsável pelo recém-nascido de _____, fui informado dos objetivos do estudo e sua justificativa, de forma detalhada e precisa. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho ou tutelado está envolvido, e os desconfortos ou possíveis riscos, tanto quanto os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento e terei plena liberdade de retirar meu filho da pesquisa se acreditar necessário.

Caso não concorde em participar do estudo, não haverá prejuízo na assistência do bebê.

Declaro, portanto, que autorizo a inclusão de meu filho ou tutelado na pesquisa realizada pela Dra. Rita de Cássia Silveira (3359-8749) e Dra. Fabrícia Faulhaber (8408-8737). Caso desejar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA também poderá dar mais informações a cerca de sua participação neste projeto de pesquisa (33598304).

_____/_____/_____

Nome do Responsável _____

Assinatura do Responsável _____

ANEXO II – FICHA DO PROTOCOLO DE PESQUISA

1.DADOS MATERNOS

PRÉ-NATAL: () SIM () NÃO No DE CONSULTAS: _____

IDADE MATERNA: ____ ANOS

No GESTAÇÕES: _____

STORCH: () ALTERADO () NORMAL () IGNORADO

DMG/ DM: () SIM () NÃO ITU/INF.OVULAR: () SIM () NÃO

BR: () >18h () < 18h LA: () ALTERADO () CLARO () IGNORADO

USO DE OCITOCINA () SIM () NÃO

USO DE CORTICÓIDE () SIM () NÃO

MÃE COM PRÉ-ECLAMPSIA () SIM () NÃO

HAS PRÉVIA: () SIM () NÃO

CULTURA ESTREPTO B: () POSITIVA () NEGATIVA () NÃO FEZ

USO DE SULFATO DE MAGNÉSIO: () SIM () NÃO

2.DADOS RECÉM-NASCIDO

NOME: _____

REGISTRO: _____

DATA NASCIMENTO: _____ SEXO: () F () M

DATA COLETA: (____ HORAS DE VIDA)

IGO: _____ IGBallard: _____

APGAR 1 ____ 5 ____

PN _____ TIPO DE PARTO () V () V+F () C

CLASSIF. IG/P: () AIG () PIG () GIG

SNAPPE II:

ASFIXIA NEONATAL () SIM () NÃO

VENTILAÇÃO MECÂNICA () SIM () NÃO

CPAP () SIM () NÃO

DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA () SIM () NÃO

ECN: () SIM () NÃO

CONVULSÃO: () SIM () NÃO

HPIV: () SIM () NÃO GRAU: _____

TRANSFUSÃO: () SIM () NÃO

FILGRASTIMA: () SIM () NÃO

HEMOGRAMA (____ HORAS DE VIDA):

_____ LEUCÓCITOS, _____ NEUTRÓFILOS, _____ MONÓCITOS, _____

LINFÓCITOS, _____ HG, _____ HT, _____ PLAQUETAS

INFECÇÃO NEONATAL: () SIM () NÃO

HEMOCULTURA / CULTURAS: () POSITIVA () NEGATIVA

QUAL? _____

MENINGITE? () SIM () NÃO

NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL: () SIM () NÃO

ÓBITO: () SIM () NÃO

DATA ALTA/ÓBITO: _____

ANÁLISE LABORATORIAL: INTERLEUCINA- 8: _____ PG/ML

GRO-ALPHA: _____ PG/ML