

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS -  
PEDIATRIA

**RELAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM A HIPÓXIA  
NEONATAL**

**RÉGIS OSORIO MARTINS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS -  
PEDIATRIA

**RELAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM A HIPÓXIA  
NEONATAL**

**RÉGIS OSORIO MARTINS**

**Orientadores:**

**Prof. Dra. Newra Tellechea Rotta**

**Prof. Dr. Diogo Onofre de Souza**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2005

M386r Martins, Régis Osório  
Relação da proteína S100B com a hipóxia neonatal / Régis Osório Martins ; orient. Newra Tellechea Rotta ; co-orient. Diogo Onofre de Souza. – 2005.

70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Hipoxia-isquemia encefálica 2. Recém-nascido 3. Proteína S100B 4. Traumatismos cerebrais I. Rotta, Newra Tellechea II. Souza, Diogo Onofre de III. Título.

NLM: WS 340

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores, **Prof. Dra. Newra Tellechea Rotta e Prof. Dr. Diogo Onofre Souza** que, com sabedoria e dedicação, possibilitaram que esta obra alcançasse êxito.

Aos **colegas da UTI neonatal** do Hospital Presidente Vargas, sem cujo inestimável empenho esta amostra não teria se constituído.

Aos **colegas da Neurologia Pediátrica e da UTI neonatal** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela colaboração na procura dos casos.

Aos **colegas bioquímicos** do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS pela realização das dosagens laboratoriais.

Aos **bolsistas** de iniciação científica, Rogério e Flávia, na realização das coletas sanguíneas e auxílio na revisão bibliográfica.

A minha querida família: **Sérgio, Myria, Fernando, Eliana e minha fonte de inspiração - Ricardo** pela compreensão, paciência, estímulo e crença.

E, finalizando, agradeço àquelas que foram imprescindíveis para realização deste estudo: **as crianças.**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Encefalopatia hipóxico-isquêmica/asfixia.....	2
1.1.1 Definição e epidemiologia.....	2
1.1.2 Aspectos anatomopatológicos .....	4
1.1.3 Neuroproteção .....	9
1.1.4 Quadro clínico .....	11
1.1.5 Diagnóstico.....	14
1.2 Proteínas da família S100 .....	17
1.2.1 Proteína S100B .....	18
2 JUSTIFICATIVA .....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral .....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 PACIENTES E MÉTODO .....	27
4.1 Delineamento do estudo .....	28
4.2 População .....	28
4.3 Amostra .....	28
4.4 Logística .....	29
4.5 Variáveis estudadas .....	30
4.6 Análise estatística .....	30
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
7 ARTIGO: RELAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM A HIPÓXIA NEONATAL .....	46
RESUMO .....	48
ABSTRACT .....	48
INTRODUÇÃO.....	49

---

PACIENTES E MÉTODO .....	50
RESULTADOS .....	51
DISCUSSÃO .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
ANEXOS .....	66
ANEXO A - Protocolo .....	67
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	68
ANEXO C - Características da Amostra .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSP	– <i>brain-specific protein</i>
CK	– creatina kinase
CPK	– creatinafosfoquinase
EEG	– Eletroencefalograma
EHI	– Encefalopatia hipóxico-isquêmica
GFP	– <i>glial fibrillary growth</i>
GNDF	– <i>glial neurotrophic derivate factor</i>
GPPG	– Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	– Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPV	– Hospital Presidente Vargas
IGF	– <i>insulin growth factor</i>
K	– potássio
KGF	– <i>keratin growth factor</i>
LCR	– líquido cefalorraquidiano
NFp	– <i>median neurofilament protein</i>

---

NGF	–	<i>nerve growth factor</i>
NSE	–	<i>neuron specific enolase</i>
RN	–	recém-nascido
SNC	–	sistema nervoso central
SPSS	–	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TGF	–	transformer growth factor
TGO	–	transaminase glutâmica oxalacética
TGP	–	transaminase glutâmica pirúvica
UFRGS	–	Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Variações nas dosagens da S100B ( $\mu\text{g/l}$ ) no 1 <sup>o</sup> -4 <sup>o</sup> dias de vida.....	54
Figura 2: Variações nas dosagens do lactato ( $\text{mmol/l}$ ) no 1 <sup>o</sup> -4 <sup>o</sup> dias de vida.....	55
Figura 3: Correlação entre dosagens da S100B( $\mu\text{g/l}$ ) e lactato ( $\text{mmol/l}$ ) - 1 <sup>o</sup> dia de vida.....	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Frequências das variáveis .....	52
Tabela 2: Variáveis estudadas x Grau de Encefalopatia.....	52
Tabela 3: Análise das Variáveis Laboratoriais x Grau de Encefalopatia .....	53

---

# **1 INTRODUÇÃO**

---

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Encefalopatia hipóxico-isquêmica/asfixia**

### ***1.1.1 Definição e epidemiologia***

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) é um dos distúrbios mais importantes na área da neurologia neonatal, principalmente pela gravidade das lesões que proporciona e pelo número significativo de recém-nascidos (RNs) afetados. Desenvolve-se a partir do comprometimento multissistêmico que resultou da asfixia perinatal. Pode ser caracterizada como um quadro de encefalopatia não progressiva da síndrome hipóxico-isquêmica (RUFO-CAMPOS et al., 2000; VOLPE, 2001).

Os termos encefalopatia hipóxico-isquêmica e asfixia, têm sido usados rotineiramente, entretanto, em muitos casos de EHI, não se evidencia bioquimicamente a asfixia, nem a hipóxia-isquemia (FERRIERO, 2004), mas permanece como uma importante causa de comprometimento crônico das capacidades neurológicas, entre elas estão a paralisia cerebral, o retardo mental, as dificuldades de aprendizado e a epilepsia (VANNUCI, 1990; MARIN-PADILLA, 2000; FERRIERO, 2004).

A EHI é definida clinicamente como um distúrbio das funções neurológicas presente na primeira semana de vida, e manifesta-se como dificuldade para iniciar ou manter a respiração, depressão do tônus muscular e reflexos, alteração do nível de consciência e freqüentes convulsões (VANNUCI, 1990; VOLPE, 2001; FERRIERO, 2004).

Volpe (2001) relata uma incidência de 1-2/1000 em EHI nos RNs a termo, sendo que 0,3/1000 irão apresentar déficits neurológicos significativos. Outros autores descrevem dados aproximados (VANNUCI, 1997; FERRIERO, 2004).

Conceitualmente, do ponto de vista bioquímico, a asfixia é definida como um prejuízo nas trocas gasosas respiratórias, levando a uma acidose metabólica. Há um aumento de glicólise e de produção de ácido láctico, diminuição da síntese de componentes de fosfatos de alta energia, acúmulo de potássio e de cálcio intracelular, surgimento de radicais livres, alteração no metabolismo de neurotransmissores assim como de aminoácidos excitadores (STAFELO, 1997; TOBERTSON et al., 1998; MARTINEZ-ORGADO et al., 1999; RUFO-CAMPOS et al., 2000).

Já no contexto clínico, a definição de asfixia perinatal inclui, além de dados clínicos, o escore de Apgar e achados bioquímicos como acidemia, hipoxemia e hipercapnia. A acidemia no sangue do cordão umbilical é o indicador mais sensível de asfixia no momento do nascimento, ocorrendo quando o pH da artéria umbilical é inferior a 7,2 (GILSTRAP et al., 1987; CARTER et al., 1993; PEREIRA, 2000).

O dano hipóxico-isquêmico cerebral se processa já no início do insulto e se estende até o período de recuperação, que se dá após a ressuscitação, também chamado de intervalo de reperfusão. A consequência imediata deste processo é o surgimento da morte celular que pode ser extensa. A possibilidade de prevenir ou tratar esse dano, ainda é muito limitada (VANNUCI, 1990; RUFO-CAMPOS et al., 2000; MACAIA, 2000).

### *1.1.2 Aspectos anatomopatológicos*

Os achados neuropatológicos da EHI variam consideravelmente de acordo com a idade gestacional, natureza do dano e tipo de intervenção. Entretanto, certas lesões características podem ser reconhecidas e fornecem subsídios para correlação clínica, entre elas: necrose neuronal seletiva, injúria cerebral parasagital, leucomalácia periventricular e necrose focal e multifocal (MARIN-PADILLA, 2000; VOLPE, 2001).

O padrão de distribuição das lesões do sistema nervoso central (SNC) depende essencialmente da idade gestacional, assim, nos prematuros as lesões anóxicas costumam localizar-se predominantemente nas regiões subcorticais profundas, em especial na substância periventricular. Já no RN a termo, as lesões predominam nas regiões córtico-subcorticais. A origem desse padrão de distribuição de lesão relaciona-se ao fato do SNC reagir a agressões patológicas de acordo com sua etapa de desenvolvimento, idade gestacional e com as características anatômicas peculiares a cada etapa (VOLPE, 2001).

Na hipóxia–isquemia global há uma diminuição da perfusão cerebral que ultrapassa a capacidade do cérebro incrementar a extração do oxigênio do sangue, pois não existe suficiente pressão arterial. O tempo superior a três minutos de bloqueio da circulação leva à degeneração dos neurônios piramidais do setor CA1 do hipocampo – região mais sensível à isquemia. Caso o bloqueio do fluxo ocorra em menor tempo, observa-se, então, inibição reversível na síntese protéica. Entretanto, se tal bloqueio repetir-se por, no mínimo, três episódios em um intervalo de uma hora, mesmo que curtos, se observará, ao redor do sétimo dia, degeneração de aproximadamente 60% dos neurônios CA1. À medida que aumentam as horas entre um bloqueio da circulação e outro subsequente, as células neuronais passam a

adquirir transformações que permitem suportar um ataque que seria letal em condições normais (GARCIA-SALMAN, 2004).

Já na hipóxia–isquemia de comprometimento focal, observa-se uma oclusão localizada em um determinado território vascular. Neste caso, vai se delimitar uma região isquêmica central, também chamada de "core", que mantém uma perfusão inferior a 20% do normal e evolui com rapidez para infarto e necrose tissular. Ao redor deste centro isquêmico, existe uma área denominada de "penumbra" com perfusão de 20–50% do normal e com abolição da atividade sináptica, mas com manutenção do potencial de membrana e, presumivelmente, da viabilidade celular. A zona de "penumbra" é uma área instável, dependente de glicólise anaeróbica e suscetível a ser incorporada à área do infarto no transcurso de poucas horas, mesmo que a hipóxia-isquemia não se prolongue. A recuperação funcional dessa zona constitui o fundamento do conceito de janela terapêutica. Demonstrou-se também, em modelos animais, um outro conceito relacionado à propagação da região isquêmica que se chama "*spreading depression*"; que seria uma supressão transitória da atividade elétrica com despolarização da membrana, iniciando no "core" e se propagando até a substância cinzenta cerebral e se expandindo à região isquêmica. Não está claro o mecanismo pelo qual determinada área cerebral suporta menos o impacto da hipóxia, especialmente quando há envolvimento global. Sugere-se correlação com uma maior densidade de receptores glutaminérgicos, ao contrário do que ocorre no cérebro do adulto (MACAIA, 2000; VOLPE, 2001).

O entendimento dos mecanismos da lesão cerebral na EHI tem evoluído nas últimas décadas, baseando-se em modelos animais que permitem uma correlação com humanos. Atualmente, sabe-se que há uma rede complexa de cascata bioquímica que resulta em diferentes formas de morte neuronal (RUFO-CAMPOS, 2000; GROW et al., 2002, GARCIA-SALMAN, 2004).

**Hipóxia:**

Na prática clínica é controverso afirmar se a hipoxemia sem a concomitante isquemia cerebral pode produzir dano cerebral (CASTILLO, 2000). Em ratos imaturos alterações transitórias na hipoxemia induzem apnéias, bradicardia e, posteriormente, convulsões, mas sem produzir danos neuropatológicos visíveis à microscopia. A exposição de ratos recém-nascidos a uma hipóxia crônica (9,5% oxigênio por 30 dias) resulta em atrofia cortical e da substância branca (JENSEN et al., 1991; MENT et al., 1998; GROW et al., 2002).

**Isquemia cerebral:**

Em situações fisiológicas a regulação do fluxo cerebral é independente de variações amplas da pressão de perfusão, graças a um mecanismo de autoregulação da circulação cerebral, no qual intervêm fatores miogênicos, bioquímicos, neurogênicos e peptidérgicos. Na isquemia estes mecanismos desaparecem na zona afetada e a pressão de perfusão passa a ser dependente da tensão arterial. O fluxo sanguíneo cerebral reduzido resulta em diminuição no fornecimento de oxigênio, assim como de outros substratos energéticos (CASTILLO, 2000).

O metabolismo anaeróbico que se estabelece durante a EHI diminui os estoques de glicose e fosfatos de alta energia como o ATP e a fosfocreatina, resultando em acúmulo de lactato e fosfatos inorgânicos (MUJSCE et al., 1990; GROW et al., 2002).

O cérebro consome 1/3 da sua energia na manutenção da transmissão sináptica, outros 2/3 no transporte de íons e preservação da sua integridade estrutural. Quando a perfusão cerebral decresce, estas funções se alteram progressivamente, até o surgimento da morte celular. Entretanto, nem todas as células respondem da mesma forma, pois existem variabilidades em razão da densidade neuronal, da diferença de perfusão cerebral e do distinto



metabolismo. Córtex cerebral, hipocampo, núcleo amigdaliano e cerebelo são mais sensíveis e sofrem trocas estruturais mais precocemente que outras áreas. Predominantemente, a substância cinzenta é a que mais sofre com a injúria, mas em 20% dos casos, por oclusão das pequenas artérias penetrantes que irrigam áreas mais profundas, a substância branca pode sofrer tal dano (CASTILLO, 2000).

A reperfusão é um fator importante a considerar, pois ocorre efeito deletério na reoxigenação do parênquima cerebral por ativação de uma cascata neurotóxica. Com a reperfusão há uma recuperação energética dos fosfatos, mas que é logo seguida por uma queda secundária de energia novamente, um ou dois dias mais tarde. Em neonatos humanos asfixiados, pode-se evidenciar tal perda energética com a realização de espectroscopia por ressonância magnética, onde se visualizará o dano neurológico (MACAIA, 2000; GROW et al., 2002).

### **Infecção e inflamação:**

Dados epidemiológicos evidenciam a relação entre infecção materna e dano cerebral neonatal. As citocinas e os polipeptídios, que são produzidas pela resposta imunológica têm participação no dano, diferenciação e morte celular. Interleucina-1 Beta, interleucina-6, fator alfa de necrose tumoral e interferon gama têm sido encontrados em concentrações aumentadas no líquido amniótico e sangue, naqueles que sofreram injúria cerebral, ou que apresentam paralisia cerebral (COHEN et al., 1996; CLARK, 1997; SILVEIRA, 2003).

Atualmente, desconhece-se se esses mediadores são os únicos responsáveis pela injúria cerebral. Infecção intra-uterina também pode iniciar uma injúria hipóxico-isquêmica indiretamente, por desencadear choque séptico e, conseqüentemente, diminuir a perfusão cerebral. Por outro lado, mediadores inflamatórios provenientes da mãe, ou do feto, podem

atravessar a barreira hematoencefálica imatura do recém-nascido e diretamente causar danos, ou aumentar a vulnerabilidade a uma subsequente hipóxia-isquemia (RUFO-CAMPOS et al., 2000; MACAIA, 2000; GROW et al., 2002).

### **Apoptose:**

Várias etapas distinguem a apoptose da morte por necrose. Existem múltiplos fatores que podem determinar se uma célula degeneraria por apoptose ou necrose, entre eles estão o estágio de desenvolvimento, o tipo celular, a gravidade da disfunção mitocondrial e a disponibilidade de ATP. Presumivelmente, toda célula que detecta sinais de "falha energética" irreversível em suas mitocôndrias, colocará em marcha seu programa gênico de apoptose, uma forma de "suicídio" celular, que não gera resposta inflamatória e permitirá uma deleção de células isoladas (MACAIA, 2000). A célula encolhe e seu núcleo se altera por condensação de seus componentes, acarretando a vacuolização citoplasmática. No final do processo, vários corpos apoptóticos são fagocitados por células vizinhas normais (PULERA et al., 1998; YUAN et al., 2000; SILVEIRA, 2003).

Entende-se a apoptose como um processo ativo e dependente da ativação de uma família de enzimas proteases - as capsases – e moduladas por outro grupo, a família das bcl-2. A cascata bioquímica da apoptose pode ser bloqueada farmacologicamente em vários pontos, pois seu curso é mais lento que a necrose, proporcionando uma maior janela terapêutica na prevenção da hipóxia-isquemia. Além disso, evidências substanciais sugerem uma participação fisiopatológica da apoptose na gênese da hipóxia-isquemia neonatal e para tal os inibidores das capsases poderiam atenuar o dano cerebral (MACAIA, 2000; GROW, 2002).

Ao contrário da apoptose, a necrose não consome energia. As células se rompem por extravasamento de seu conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, pois o insulto

isquêmico determina uma falha mitocondrial completa. Secundariamente a este processo, fagócitos migram para o local da lesão desencadeando toda a cascata inflamatória (MEHMET et al., 1996; PULERA et al., 1998; SILVEIRA, 2003).

### ***1.1.3 Neuroproteção***

A introdução do termo "neuroressuscitação", usado na década de 80, foi baseado na intenção de neurologistas e neurocirurgiões em tratar o edema cerebral que era o mais significativo componente da encefalopatia aguda estabelecida no quadro hipóxico-isquêmico. Tais encefalopatias ocorriam em acidentes vasculares cerebrais, trauma intracraniano ou infecção. O protocolo incluía medidas diretas e indiretas para controle da hipertensão intracraniana, combinadas com terapias de retardo, ou prevenção, do edema cerebral. Várias modalidades de tratamento tinham sua importância no passado, algumas até os dias de hoje. Hiperventilação, glicocorticóides, altas doses de barbitúricos, diuréticos osmóticos e hipotermia foram testados para tratamento do edema cerebral, mas com resultados não convincentes para os neonatologistas que adotavam, compreensivelmente, condutas mais conservadoras no manejo dos RNs anoxiados (VANNUCI et al., 1997; AZZOPARDI et al., 2000; DEBILLON, 2000; SHANKARAN et al., 2002).

Kelly e Luce (1993) comentam alternativas para a neuroproteção, entre elas são citados os bloqueadores de canal de cálcio como a nimodipina, por exemplo, assim como os antagonistas de neurotransmissores excitatórios, os inibidores de liberação dos radicais livres, os mediadores inflamatórios, os anticorpos antileucócitos e os gangliosídeos.

Em 2000 Legido et al. abordaram o futuro da neuroproteção referindo-se a alguns agentes que estariam sob investigação, entre eles o NGF (*nerve growth factor*) e o IGF (*insulin like growth factor*). Assim como para outros ramos da ciência, a terapia gênica também contribuirá para a neuroproteção, através da inibição da apoptose pelo proto-oncogene "bcl-2" que, originariamente, viria de uma translocação cromossômica de linfoma folicular. A Calbindin- D 28k – proteína ligante de cálcio – e a imunização de receptores antiNMDA são também alternativas promissoras.

Garcia-Salman (2004) aborda a neuroproteção endógena como uma alternativa para a necessidade de incrementar a sobrevivência neuronal e reduzir o tamanho da lesão isquêmica e os déficits neurológicos com o IGF (*insulin growth factor*), o TGF-beta (*transformer growth factor*) e o GDNF (*glial neurotrophic derivate factor*). Em modelos experimentais, a administração do IGF-1 entre 1 e 2 horas do ataque isquêmico, vai inibir a morte neuronal tardia, além de ter um valor potencial no resgate neuronal posterior à isquemia. Já o GDNF, que pertence à superfamília do TGF, promove a sobrevivência em várias linhas celulares. Por intermédio de um vetor viral, o GDNF é capaz de inibir a morte celular tardia. Também seria capaz de modular a expressão da tirosina hidroxilase, enzima cuja propriedade é de estimular a sobrevivência de neurônios piramidais. Outras biomoléculas, como KGF (*keratin growth factor*), *midkine*, VEGF (*vascular endotelial growth factor*) e os gangliosídeos são citadas com propriedades que variam desde a prevenção da morte neuronal tardia, até a diminuição no tamanho do infarto. A realidade tem demonstrado que evitar a morte por necrose é extremamente difícil, pois a janela terapêutica é muito estreita e porque os neurônios estão rodeados por grande quantidade de cálcio. Por outro lado, a proteção na morte por apoptose, que ocorre mais lentamente, poderia ter uma eficácia maior. A expressão genética seletiva é que vai determinar o destino dessas células que se debatem entre a degeneração e a sobrevivência. O indivíduo herda certo ritmo na evolução do seu SNC, assim como a

capacidade de adaptar-se, ou seja, a plasticidade cerebral (ROBERTSON, 1994; MACAIA, 2000; ROTTA, 2002). A melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que levam à morte neuronal e glial é fundamental para o diagnóstico e tratamento da EHI (MACAIA, 2000; GARCIA-SALMAN, 2004).

#### ***1.1.4 Quadro clínico***

O quadro clínico da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é determinado pela predominância da isquemia. Com frequência, mas não obrigatoriamente, é precedida por hipoxemia. A hipoxemia leva a dano cerebral, principalmente por distúrbio miocárdico e perda da autoregulação cerebrovascular. A duração desse processo, assim como a idade gestacional, determinará que tipo de alteração neuropatológica vai se evidenciar. Na vigência de um evento anóxico, frequentemente, outros órgãos são afetados, entre eles, por ordem decrescente de frequência, estão os rins, o coração, o pulmão e o trato gastrointestinal (MARIN-PADILLA, 2000; VOLPE, 2001).

Perlman et al. (1989) demonstraram, em estudo com 107 RNs a termo asfixiados, a frequência das manifestações em outros órgãos com associação ou não ao SNC. Aproximadamente 62% dos RNs apresentaram comprometimento do SNC, com um ou mais órgãos. O comprometimento sistêmico sem envolvimento cerebral foi observado em 16% dos asfixiados.

Dependendo do período, o RN asfixiado apresenta um determinado quadro clínico. Nas primeiras horas de anóxia, onde há um comprometimento hemisférico bilateral, pode-se observar nível de consciência deprimido como estupor ou coma, respiração periódica, ou até

falência respiratória, resposta pupilar inalterada, hipotonia e convulsões. À medida que as horas passam outros sinais surgem como, por exemplo, apnéias, sinais de comprometimento do tronco cerebral, alterações na sucção, progressão do tônus para hipertonia patológica, sinais focais como hemiparesia, entre outros (VOLPE, 2001).

O reconhecimento do quadro de EHI depende, principalmente, de história detalhada e exame neurológico minucioso. Atualmente, reconhece-se que todos os RNs submetidos a um quadro asfíxico que leve a um dano cerebral e conseqüentes seqüelas, apresentará um quadro de encefalopatia aguda, a qual se denomina de encefalopatia hipóxico-isquêmica. Os RNs com risco maior de desenvolver seqüelas neurológicas são aqueles que apresentam evidências de comprometimento de outros órgãos, com depressão da função cerebral no momento do nascimento e que se mantêm, durante dias ou semanas, com crises convulsivas freqüentes (RUFO-CAMPOS et al., 2000; MARIN-PADILLA, 2000).

A síndrome neurológica que acompanha a asfixia neonatal é o protótipo da encefalopatia hipóxico-isquêmica, pois a partir daí se evidencia o dano cerebral como conseqüência. Consideram-se 3 fatores como fundamentais na gênese da injúria cerebral, entre eles pode-se citar a evidência de sofrimento fetal, depressão ao nascimento e o surgimento da síndrome neurológica nas primeiras horas, ou dias de vida (VOLPE, 2001).

Nas primeiras 12 horas, distinguem-se os achados pelo comprometimento cerebral bilateral. Alterações respiratórias como a respiração periódica, ou irregular similar a Cheyne Stokes do adulto, ou da criança maior, pode estar presente em até 80% dos pacientes. Marcada hipoventilação, ou falência respiratória, também podem estar presentes nos mais severamente comprometidos (SASIDHARAN, 1992; VOLPE, 2001). As alterações oculares, traduzindo comprometimento do tronco cerebral, raramente são observadas nessa fase. No tônus muscular predomina a hipotonia e é mínima a movimentação espontânea dos membros,

exceto nos menos comprometidos, onde está preservada (VOLPE, 2001). Aproximadamente 50 a 60% dos RNs têm convulsões nas primeiras 6 h. As convulsões sutis são as mais freqüentes, entre elas estão os fenômenos oculares, as alterações na sucção ou os movimentos de língua, os movimentos de "pedalar" e as apnéias. Ao contrário dos prematuros, os RNs a termo apresentam crises convulsivas clônicas como manifestação mais freqüente. As crises focais são especialmente comuns - 40 a 80% - quando o envolvimento é por uma lesão isquêmica focal (MANNINO et al., 1983; LIEN et al., 1995; MERCURI et al., 1995; PERLMAN et al., 1996).

No período seguinte, de 12 a 24 horas, os RNs que sofreram um insulto maior nesta fase, vão permanecer em estado de estupor ou coma. Entretanto, observa-se em alguns uma "aparente" melhora no estado de alerta, mas que não é acompanhada por adequada fixação do olhar ou suficiente resposta sensorial. Concomitante a esse quadro, é comum evidenciarem-se convulsões severas e freqüentes, tremores, e fraqueza generalizada. O estado epilético não é raro nessa fase e a conduta terapêutica específica se faz necessária (VOLPE, 2001).

No período de 24 a 72 horas, os gravemente comprometidos, progridem para estupor profundo ou coma. Distúrbios oculomotores secundários a envolvimento do tronco cerebral tornam-se mais freqüentes (VOLPE, 2001). Em um estudo com grande série de pacientes, demonstrou-se, nessa fase, a maior incidência de óbito pela encefalopatia hipóxico-isquêmica (BARNETT et al., 1997).

Os RNs a termo que evoluem para óbito neste período, raramente apresentam sinais de hemorragia, embora alguns demonstrem quadro clínico sugestivo de hipertensão intracraniana como abaulamento das fontanelas e alargamento das suturas cranianas. Esses pacientes, segundo Volpe (2001), são aqueles que exibiram maior necrose neuronal a uma análise anatomopatológica.

Após as 72 horas, embora o nível de consciência aumente, em alguns pacientes pode persistir o estupor de leve a moderado. Esta persistência do nível de consciência menor obriga o clínico a descartar processos infecciosos. Os distúrbios da deglutição são muito comuns nesse período, principalmente a sucção, e alterações nos movimentos da língua, pois a inervação motora dos nervos cranianos correspondentes está afetada. As alterações de tronco cerebral são especialmente dramáticas quando a lesão consiste de necrose neuronal seletiva, pois envolve os núcleos basais e tálamo. A hipotonia generalizada, mais predominante nos membros, é característica desse período, mas também pode evidenciar-se hipertonia quando compromete gânglios basais. No aspecto relacionado à força, pode-se observar que no RN a termo, predomina o maior déficit nos membros superiores em comparação aos membros inferiores e a hemiparesia também pode estar presente. Enfatiza-se que esses achados clínicos descritos nas mais diversas fases, são variados e não permitem um prognóstico fácil, mas ter uma recuperação mais rápida, sem dúvida, significa evolução favorável. Trabalhos referem que aqueles que estiverem com exame neurológico normal com uma semana de vida, terão um prognóstico bom (SARNAT, 1976; SCOTT, 1976, VOLPE, 2001).

Sarnat e Sarnat (1976) classificaram em estágios os achados clínicos da EHI, e esses critérios persistem até hoje como um importante instrumento para o diagnóstico. Entretanto, Mac Lennan et al. (1999) afirmam que, apesar de muito usados, esses critérios apresentam diferenças de interpretação na definição dos quadros moderados e graves, assim como há dificuldade no uso em RNs abaixo de 34 semanas.

### ***1.1.5 Diagnóstico***

O reconhecimento do quadro de EHI depende de uma história completa do paciente e de



um adequado exame neurológico, mas é crescente a importância dos parâmetros metabólicos, assim como o eletroencefalograma (EEG) e a neuroimagem (VOLPE, 2001).

A EHI leve cursa com um bom prognóstico, mas nos casos moderados e graves o risco de morte, ou seqüelas, aumenta consideravelmente. As medidas neuroprotetoras estão em constante evolução e resultados em experimentos animais confirmam esse ponto. Portanto, é fundamental identificar-se os RNs que se beneficiarão com tais procedimentos, mediante a dosagem sérica de substâncias que podem indicar dano neurológico. A tomografia computadorizada, o potencial evocado somatosensorial, a ecografia e a ressonância magnética cerebral são exames úteis para auxílio no prognóstico, mas não nas primeiras 24 horas após o nascimento (FINER et al., 1981; OUNSTED et al., 1989). A ressonância magnética por espectroscopia revela alterações no metabolismo neuronal, mas não está disponível na maioria das situações por limitação de custo principalmente (JOUVET et al., 1999; RUFO-CAMPOS et al., 2000).

O EEG apresenta uma boa correlação com o espectro clínico e com o aparecimento de seqüelas no RN, principalmente nos quadros moderados a severos. Há relatos de maior valor preditivo do que o próprio exame neurológico. Nas fases iniciais, observa-se uma diminuição na amplitude e ritmos de base e, posteriormente, surgem pontas focais ou multifocais e com momentos de depressão global do traçado alternando descargas generalizadas de pontas e ondas lentas. Caso essas anomalias desapareçam de forma precoce, há chance de um melhor prognóstico (MARTINEZ BERMEJO et al., 1990; RUFO-CAMPOS et al., 2000).

Um grande número de moléculas está sendo estudado no intuito de relacionar com possíveis marcadores de lesão neurológica. Em trabalho realizado por Hagberg et al. (1993) demonstrou-se que os aminoácidos excitatórios, glutamato e aspartato, apresentavam altas

concentrações líquóricas em recém-nascidos que desenvolveram encefalopatia hipóxico-isquêmica.

A creatina quinase (CK) específica, enzima exclusiva de astrócitos e neurônios, também está presente no sangue após ultrapassar a barreira hematoencefálica rompida no dano hipóxico-isquêmico. Aproximadamente 80% dos RNs que evoluem desfavoravelmente apresentam níveis altos dessa enzima no sangue e, quando dosada no líquido cefalorraquidiano (LCR), apresenta maior especificidade. Uma enzima glicolítica, NSE (*neuron specific enolase*), que, por intermédio da sua subunidade gama está presente nos neurônios centrais ou periféricos, apresenta uma estreita correlação com a gravidade do quadro asfíxico, principalmente quando dosada no LCR (THORNBERG et al., 1995; NADGYMAN et al., 2001; BLENNOW et al., 2001). Entretanto, Wijnberger et al. (2002), em estudo realizado com coleta no cordão umbilical, salientam que a relação entre o dano cerebral e a elevação desta enzima pode não ser causal, já que está presente em várias estruturas como células do cordão, placenta e no líquido amniótico.

Outras publicações abordam a associação da NSE com a S100B, e suas respectivas dosagens séricas aumentadas, na recuperação da consciência pós-isquemia cerebral em cirurgias cardíacas de adultos, assim como no traumatismo craniano em crianças (POTAPOV et al., 2001; BERGER et al., 2002; MARTENS et al., 2002).

Componentes essenciais da glia e axônios, respectivamente, também chamados de BSP (*brain-specific proteins*), como o GFP (*glial fibrillary acidic proteic*) e o NFp (*median neurofilament*), estão significativamente aumentados em quadros hemorrágicos ou isquêmicos (BLENNOW et al. 1995; WHITELAW et al., 2001).

Estudos experimentais sugerem que reações inflamatórias mediadas por citocinas, possam participar na fisiologia do quadro hipóxico isquêmico e, conseqüentemente, suas

respectivas dosagens também já foram estudadas, entre elas podem-se citar as interleucinas, o fator de necrose tumoral e o fator de estimulação de granulócitos/monócitos (SAVMAN et al., 1998; SILVEIRA, 2003).

A amônia, a transaminases hepáticas, o lactato, o piruvato, o glutamato e a desidrogenase láctica também estão aumentados nos quadros asfíxico (CHOU et al., 1998; RUFO-CAMPOS et al., 2000; PU et al., 2002; YIQING et al., 2002; ESQUÉ-RUIZ et al., 2003).

## **1.2 Proteínas da família S100**

A família S100 foi, originariamente, caracterizada como um grupo de proteínas ácidas, de baixo peso molecular (10-12kDa) e que estão em abundância em tecido nervoso. Cada membro desta família tem um padrão único de expressão e, aproximadamente 50% delas, possuem a mesma seqüência de aminoácidos. As propriedades físicas e estruturais da família S100 sugerem que sejam ativadoras, ao contrário de outras ligantes de cálcio que atuam como tampões. A afinidade pelo cálcio é, entretanto, um importante parâmetro, no qual pode ser influenciado através da ligação com o Zn (zinco), aumentando a afinidade, ou o K(potássio), diminuindo-a. Entre elas estão a S100A6, S100B e a calgranulin C, nas quais mais se observou tal atividade (SCHAFER et al., 1996).

Atualmente, está descrito que S100 é uma família de proteínas ligantes de cálcio com 21 membros já discriminados que estão implicados nas mais variadas funções, tanto intracelulares como extracelular (ZIMMER et al., 1995; DONATO, 2003).

Há um consenso de que, em nível intracelular, a família S100 tem a função de regular a atividade de proteínas efetoras. Assim, na maioria das situações em que o cálcio está envolvido, a família S100 exerce funções regulatórias (NAGDYMAN et al., 2001).

Enquanto que dados imunocitoquímicos sugerem que a expressão da família S100, em tecidos maduros normais, adquire um padrão celular específico, também se observou que o nível desta expressão vai depender fortemente de fatores ambientais. Por exemplo, em cardiomiócitos normais o nível de S100B é indetectável, entretanto, em cobaias com pós-infarto induzido, está aumentada. A expressão genética da S100B pode ser represada em todos os tipos de células por elementos de regulação negativa, implicando, conseqüentemente, que a sua expressão em um determinado tecido dá-se apenas quando um fator contribui para tal evento. As funções intracelulares da família S100 consistem na regulação da fosforilação protéica, na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, na homeostase do cálcio, nas atividades enzimáticas, nos fatores de transcrição, no crescimento celular e sua diferenciação e na resposta inflamatória. Em relação às funções extracelulares, os componentes S100B, e alguns da subclasse S100A, teriam destacada participação (DONATO, 2003).

### ***1.2.1 Proteína S100B***

Moore, em 1965, descreve a S100B como uma proteína extraída do cérebro bovino, mas ausente em extratos de fígado, cuja solubilidade parcial em solução de sulfato de amônio atingiu 100% em pH neutro. Posteriormente, outros estudos demonstraram que esta fração de tecido cerebral continha uma mistura de polipeptídios alfa e beta que formam isoformas S100A1 (dímero alfa-alfa) e S100B (dímero beta-beta) da proteína S100. A calb3,

originariamente chamada de calbindin, também foi identificada como um membro desta família, apesar de ter um peso molecular significativamente menor (SCHAFER et al., 1996).

No SNC a S100A1 é predominantemente neuronal, enquanto que a S100B é encontrada em altas concentrações no citoplasma de astrócitos e, em menor concentração, nos oligodendrócitos e células de Schwann (ZIMMER et al., 1995). Assim como outras proteínas ligantes de cálcio, algumas proteínas da família S100, incluindo S100A4, S100A8, S100A9 e S100B, são secretadas de diferentes células. Na S100B, por exemplo, demonstrou-se que estimula o crescimento neuronal, atua na proliferação de melanócitos e na indução de apoptose em células de feocromocitoma. As concentrações nanomolares determinam para a S100B, uma função de fator de crescimento e diferenciação, enquanto que para concentrações micromolares induzem à apoptose. Também já se documentou astrocitose e proliferação neuronal em ratos. O mecanismo de ação das mais diversas funções da família S100 não está ainda bem estabelecido. Entretanto, a relação da S100B com células gliais e neurônios em concentrações nanomolares podem estimular o fluxo de cálcio e, conseqüentemente, levantar uma hipótese atraente deste íon mediar tais funções (SCHAFER et al., 1996).

Dados sugerem fortemente que a S100B deve ser um importante fator contribuinte do desenvolvimento e diferenciação neuronal e do dano cerebral, e aquelas alterações de sua concentração extracelular, seguidas de injúria cerebral, podem levar a uma amplificação da lesão associada a outros fatores conhecidos na gênese de processos neurodegenerativos. Embora o papel fisiológico da proteína S100B ainda não seja precisamente conhecido, está bem descrito que seus níveis no sangue e líquido estão aumentados em vários distúrbios agudos ou crônicos do SNC. Alterações séricas estão mais comumente relacionadas com diversos fatores que afetem sua síntese, distribuição, e metabolismo no SNC, incluindo injúria astrocítica aguda e gliose reativa, bem como podem refletir alterações na barreira hematoencefálica. Sabe-se que há uma relação diretamente proporcional entre os níveis de

S100B em LCR e sangue e a intensidade e extensão da injúria cerebral, permitindo, então, utilizar esta proteína como marcador bioquímico de dano, ou disfunção, cerebral (INGEBRITSEN et al., 1999; HERMANN et al., 2000; WALZ et al., 2000; LARA et al., 2001; MACHADO-VIEIRA et al., 2002; PORTELA et al., 2002).

Em trabalho onde se estudou a concentração sérica da proteína S100B, Portela et al. (2002), observaram que os valores não diferem quanto ao sexo e encontrou-se, também, uma correlação negativa quanto à idade, com uma maior concentração em neonatos. Várias teorias explicariam estes dados, entre elas a de que nesta fase da vida o processo de proliferação e maturação do SNC, está em intensa atividade nas células gliais e na formação de sinapses, por exemplo.

Assim como para a NSE, inúmeros estudos são publicados continuamente em várias áreas, relacionando a S100B como marcador de lesão neurológica. Mesmo diante de grandes avanços na anestesia, no *bypass* cardiopulmonar e nas técnicas cirúrgicas, a injúria cerebral de qualquer intensidade permanece como principal complicação pós-operatória de uma cirurgia cardíaca. Exame neurológico, tomografia computadorizada ou ressonância magnética são úteis, mas sua precocidade nem sempre se evidencia. Portanto, a identificação de um marcador bioquímico precoce seria potencialmente útil. Shaaban (2000) e Svenmarker (2002) concluíram que a proteína S100B pode ser útil na investigação de algum dano cerebral imediato nestas cirurgias.

O exato mecanismo para a liberação da S100B para o líquido, após uma isquemia miocárdica, como, por exemplo, um infarto, ainda é obscuro. A interrupção da circulação cerebral global determina edema cerebral e morte neuronal seletiva em algumas áreas vulneráveis. O aumento da S100B se origina, provavelmente, de um edema cerebral precoce, associado a um distúrbio na integridade da membrana celular da astroglia e disfunção na

barreira hematoencefálica. Estas células neuronais são as mais comuns no parênquima cerebral e reconhecidamente sensíveis a hipóxia. Entretanto, Hachimi-Idrissi (2002) et al. ponderam que um marcador na astroglia pode refletir um dano cerebral indireto, já que em suas pesquisas observaram uma concentração maior da S100B apenas nas primeiras horas. Isto poderia ser explicado pelo fato de que outros tecidos também liberariam a S100B como, por exemplo, o tecido adiposo.

Adipócitos, condrócitos e melanócitos são alguns tipos de células onde encontramos concentrações elevadas da S100B, assim como em certos tumores, entre eles melanomas, gliomas, schwannomas e neurinomas. Entretanto, deve-se salientar que em casos de diagnóstico inicial de tumores do SNC não se observou utilidade na sua dosagem, podendo ser promissora no seguimento daqueles pacientes que já têm o diagnóstico (ORTIZ-MUÑOZ et al., 2003).

Ao estudar a presença da proteína S100B em líquido amniótico de crianças com Síndrome de Down, Tort et al. (2004) não conseguiram evidenciar uma sensibilidade adequada para estabelecer que a sua dosagem seja útil no diagnóstico pré-natal desta cromossomopatia.

Gazzolo et al. (2002-2003) contribuíram significativamente com vários estudos da proteína S100B na área da perinatologia. A hemorragia cerebral, a suplementação de óxido nítrico e as concentrações no líquido amniótico de gêmeos foram algumas situações clínicas avaliadas por este grupo italiano. Das numerosas funções atribuídas à proteína S100B, o papel de neurotrofismo aparenta ser intrigante na perinatologia. Concentrações elevadas da proteína no líquido amniótico de gestações não-complicadas, foram correlacionadas com o aumento da idade gestacional e também com achados ecográficos indicativos de maturidade cerebral. Este indicativo do papel de neurotrofismo se reforça à medida que se observou um decréscimo

progressivo das concentrações da S100B a partir do terceiro trimestre de gestação, período em que o SNC já atingiu o seu maior grau de maturidade gestacional. Os autores argumentam que o estudo das concentrações dos constituintes cerebrais, entre estes a proteína S100B, pode se constituir como alternativa para marcador de dano cerebral, quando exames clínicos e achados radiológicos ainda estão silentes naqueles pacientes de idade precoce como os recém-nascidos.

Thorngren-Jerneck et al. (2004) abordaram o papel prognóstico da proteína S100B em RNs a termo com quadro de encefalopatia hipóxico-isquêmica. Salientam, os autores, o escasso número de trabalhos já realizados com estas características, principalmente com um *follow-up* daqueles RNs que demonstraram dosagens elevadas. Concluíram, então, que houve um pronunciado aumento das suas dosagens naqueles pacientes que sofreram de quadros moderados ou graves. A razão para o aumento da proteína S100B, após um quadro asfíxico, deve estar na presença de seu dímero alfa-beta e beta-beta que são altamente específicos para o SNC. Os autores também salientam que altas concentrações sanguíneas da proteína S100B podem ser deletérias, pois resultam em uma potente ativação de enzima geradora de óxido nítrico, substância responsável por morte astrocitária.



---

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

## **2 JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que além das funções intracelulares, como modulação da atividade de proteínas do citoesqueleto e do ciclo celular, a proteína S100B também pode desenvolver atividades extracelulares que parecem depender de sua concentração.

Está descrito que seus níveis no sangue e líquido cefalorraquidiano estão aumentados em distúrbios agudos e crônicos envolvendo o SNC. Sua quantificação nesses meios correlaciona-se com intensidade e extensão de injúrias no SNC, o que permite utilizá-la em estudos como marcador bioquímico de dano cerebral.

A motivação para realizar esta pesquisa se deve ao fato de que em nosso meio há poucos estudos que tenham utilizado a proteína S100B como auxílio no diagnóstico em patologias do SNC. Não foi encontrado, também, estudo com a proteína S100B na EHI.

---

## **3 OBJETIVOS**

---

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Verificar se existe relação da proteína S100B com a hipóxia neonatal.

### **3.2 Objetivos específicos**

Estudar se as variações das dosagens sanguíneas da proteína S100B correspondem a diferentes graus de comprometimento do SNC nos RNs.

Correlacionar as dosagens bioquímicas de outras substâncias com a S100B, inclusive o lactato, e que estariam envolvidas na hipóxia neonatal.

---

## **4 PACIENTES E MÉTODO**

---

## **4 PACIENTES E MÉTODO**

### **4.1 Delineamento do estudo**

Este estudo é observacional-prospectivo-longitudinal.

### **4.2 População**

RNs a termo atendidos no Hospital Presidente Vargas (HPV) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

### **4.3 Amostra**

RNs a termo, com diagnóstico clínico de EHI, atendidos nos Hospitais de Clínicas e Presidente Vargas de Porto Alegre.

Critérios de inclusão: RNs a termo que desenvolveram EHI nas primeiras 24 horas. Todos os RNs asfixiados cujos responsáveis assinaram o termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão: foram excluídos os recém-nascidos prematuros e os com alguma malformação.

Tamanho da amostra: para detectar diferença relativa a um tamanho de efeito de magnitude  $\geq 1$ , foram necessários 20 pacientes, fixando  $p=0,05$  e  $\beta=0,10$ .

#### **4.4 Logística**

Foi coletado (sem anticoagulante) no máximo 2 ml de sangue periférico, no primeiro e quarto dia de vida e levado ao laboratório de bioquímica da UFRGS, onde as amostras foram centrifugadas e o soro armazenado em freezer ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) até o dia da realização das dosagens. É importante salientar que a coleta fez parte da rotina de exames necessários para manejo dos doentes.

A quantificação dos níveis da proteína S100B no sangue foi realizada através de imunoensaio luminométrico (BYK-Sangtec, Dietzembach, German). Trata-se de uma reação imunológica do tipo "duplo sanduíche", na qual o segundo anticorpo está marcado com isoluminol, uma molécula que, quando excitada, libera energia em forma de luz. As dosagens foram feitas em triplicatas e aquelas com coeficiente de variação maior que 10% foram repetidas.

#### 4.5 Variáveis estudadas

Foram analisados e comparados:

- sexo, cor, peso, número de gestações, tipo de parto, índice de Apgar;
- grau de EHI: leve, moderado e grave;
- intercorrências neonatais: acidose, convulsões, óbito;
- dosagens bioquímicas: S100B e lactato (1-4 dias), CPK, CK-MB, TGO, TGP no primeiro dia.

O instrumento de classificação da EHI foi realizado através de um protocolo de avaliação clínica, onde constam dados de história clínica pré e pós-natais, exame neurológico, critérios clínicos de Sarnat (SARNAT e SARNAT, 1976) e exames laboratoriais (Anexo A).

#### 4.6 Análise estatística

As variáveis qualitativas foram descritas com frequências relativas percentuais e as quantitativas com média e desvio padrão, quando simétricas, ou mediana e amplitude interquartil, quando assimétricas. Foram comparadas as variáveis qualitativas entre os graus de EHI com o teste exato de Fischer e as quantitativas, quando simétricas, com o teste de Anova e, quando assimétricas, com o teste de Kruskal-Wallis. Para relacionar as variáveis quantitativas utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman, segundo a distribuição das variáveis. Ao comparar distribuições das dosagens laboratoriais no tempo,



---

foram utilizados os testes t de Student para dados pareados, ou o teste de Wilcoxon quando a variável não foi simétrica. Na análise entre os pacientes com e sem acidose e as dosagens laboratoriais, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, ou teste t de Student para grupos independentes. Foi considerado um nível de significância de 5%.

---

## **5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

---

## **5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Os procedimentos realizados na pesquisa como exame neurológico e coletas de sangue periférico para análise laboratorial não foram nocivos para os RNs, portanto, a pesquisa pode ser considerada de risco mínimo.

Este trabalho foi aprovado pelo GPPG do HCPA e pela Comissão de Ética e Pesquisa do HPV.

Os responsáveis pelos recém-nascidos assinaram termo de consentimento pós-informado (Anexo B).

Vários pacientes já são acompanhados no ambulatório de Neurologia infantil do HPV.

---

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. American Academy of Pediatrics committee on fetus and newborn and American College of Obstetricians and Gynecologists committee on obstetric practice. Use and abuse of the Apgar score. *Pediatrics* 1996; 98:141-2.
2. Azzopardi D, Robertson NJ, Cowan FM, Rutherford MA, Rampling M, Edwards D. Pilot study of treatment with whole body hypothermia for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2000; 106 (4):684-94.
3. Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Alessandri LM, O`Sullivan F, Burton PR et al. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case control-study. *BMJ* 1998; 317:1554-8.
4. Bakketeig LS. Only a minor part of cerebral palsy cases begin in labor. *BMJ* 1999; 319: 1016-7.
5. Barnett CP, Perlman M, Ekert PG. Clinicopathological correlations in postasphyxial organ damage: a donor organ perspective. *Pediatrics* 1997; 99:797-9.

6. Berger RP, Pierce MC, Wisniewski SR, Adelson PD, Clark RSB, Ruppel RA et al. Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics* 2002; 109(2):1-6.
7. Blennow M, Hagberg H, Rosengren L. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid: a possible indicator of prognosis in full-term asphyxiated newborn infants? *Pediatr Res* 1995; 37(3): 260-4.
8. \_\_\_\_\_, Savman K, Thoresen M, Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1171-5.
9. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993; 20:287-304.
10. Castillo J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Rev Neurol* 2000; 30(5): 459-64.
11. Chou YH, Yau TI, Wang PJ. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high risk neonates. *Acta Paediatr* 1998; 87:764-68.
12. Clark VM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1997; 49(4): S10-S14.
13. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:589-98.
14. Debillon T. Whole-body cooling after perinatal asphyxia: a pilot study in term neonates. *Dev Med Child Neurol* 2003; 45:17-23.

15. Donato R. Intracellular and extra cellular roles of S100 proteins. *Micr Res and Tech* 2003; 60:540-51.
16. Esqué-Ruiz MT, Figueras-Aloy J, Salvia-Roigés MD, Carbonell-Estrany X. Amoníaco y transaminasas em sangre en el recién nacido a término afectado de asfixia perinatal. *Rev Neurol* 2003; 36(9): 801-05.
17. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004; 351: 1985-95.
18. Finer NN, Robertson CM, Richards RT. Hipoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 1981; 98:112-17.
19. Garcia-Salman JD. Protección neuronal endógena: um enfoque alternativo. *Rev Neurol* 2004; 38(2): 150-55.
20. Gazzolo D, Masetti P, Melli M, Grutzfeld D, Michetti F. Elevated S100B protein as an early indicator of intracranial haemorrhage in infants subjected to extracorporeal membrane oxygenation. *Act Pediatr* 2002; 91: 218-.
21. Gazzolo D, Bruschetti M, Di Iorio R, Marinoni E, Lituânia M, Marras M et al. Maternal nitric oxide supplementation decreases cord blood S100B in intrauterine growth-retarded fetuses. *Clin Chem* 2002; 48(4): 647-50.
22. Gazzolo D, Lituania M, Bruschetti M, Bruschetti P, Michetti F. S100B protein concentrations in amniotic fluids are higher in monoamniotic than in diamniotic twins and singleton pregnancies. *Clin Chem* 2003; 49(6): 997-99.
23. Gazzolo D, Vinesi P, Bartocci M. Elevated S100B blood levels as early indicators of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Correlation with cerebral Doppler velocimetry. *J Neurol Sci* 1999; 41:30-5.

24. Gilstrap LC, Hauth JC, Hankins GD . Second-stage fetal heart rate abnormalities and type of neonatal acidemia. *Obstet Gynecol* 1987; 70:191-5.
25. Grow J, Barks JDE. Pathogenesis of hypoxic-isquemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol* 2002 (29): 585-602.
26. Hachimi-Idrissi S, Auwera M, Schiettecatte J, Ebinger G, Michotte Y, Huyghens L. S-100 protein as early predictor of regaining consciousness after out hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2002; 53: 251-57.
27. Hagberg H, Thornberg E, Blennow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K et al. Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Pediatr* 1993; 82: 925-9.
28. Hermann M, Ebert AD, Galazky I, Wunderlich MT, Kunz WS, Huth C. Neurobehavioral outcome prediction after cardiac surgery: role of neurobiochemicals markers of damage to neuronal and glial brain tissue. *Stroke* 2000; 31:645-50.
29. Ingebritsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Rommer B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S100 protein measurements to a magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* 1999; 45:468-75.
30. Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D. Epileptogenic effect of hipóxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol* 1991; 29:629-37.
31. Jouvét P, Cowan FM, Cox P. Reproducibility and accuracy of MR imaging of the brain after severe birth asphyxia. *Am J Neuroradiol* 1999; 20(7): 1343-48.
32. Kelly BJ, Luce JM. Current concepts in cerebral protection. *Chest* 1993; 103:1246-54.



33. Lara DR, Gama CS, Belmonte de Abreu P, Portela LV, Gonçalves C, Hauck S et al. Increased serum S100b protein in schizofrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiat Res* 2001; 35:11-14.
34. Lien JM, Towers CV, Quiligan EJ. Term early-onset neonatal seizures: obstetric characteristics, etiologic classifications, and perinatal care. *Obst Gynecol* 1995; 85:163-69.
35. Macaia A. Muerte celular en la hipoxia-isquemia neonatal. *Rev Neurol* 2000; 31(8): 784-89.
36. Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LVC, Gonçalves CA, Soares JC, Kapczinski F et al. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Europ Neuropsychopharm* 2002; 12: 269-72.
37. MacLennan A. A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: International Consensus Statement. *BMJ* 1999; 319:1054-9.
38. Mannino FL, Trauner DA. Stroke in neonates. *J Pediatr* 1983; 102:605-10.
39. Marin-Padilla M. Neuropathologic correlates of perinatal asphyxia. XXI Annual child neurology postgraduate course, Miami Beach, Florida, USA, May 24-26, 2000.
40. Martens P, Raabe A, Johnsson P. Serum S-100 and Neuron-specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 1998; 29:2363-66.
41. Martinez Bermejo A, López Martin V, Roche C. Contribucion del electroencefalograma neonatal al pronóstico del síndrome hipoxo-isquemico. *An Esp Pediatr* 1990; 32:7-10.

42. Martinez-Orgado J, Ruiz-Gayo M, Cano MV. Metabolismo neuronal en el dano hipoxo-isquêmico. Isquemia y reperfusion cerebral. RELAN 1999;1 (supl 1):235-42.
43. Mehmet H, Edwards Ad. Hypoxia, ischaemia, and apoptosis. Arch Dis Child 1996; 75:F73-F75.
44. Ment RL, Scharz M, Makuch RW. Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. Brain Res Develop 1998; 111:197-203.
45. Mercuri E, Cowan F, Rutherford M. Ischaemic and haemorrhagic brain lesions in newborn with seizures and normal Apgar scores. Arch Dis Child 1995; 73:F67-F74.
46. Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine. Clin Chem 2002; 48(12): 2097-2104.
47. Moster D, Lie RT, Irgens L, Bjerkedal T, Markestad T. The association of apgar score with subsequent death and cerebral palsy: A population-based study in term infants. J Pediatr 2001; 138(6): 798-803.
48. Mjuscce DJ, Christensen MA, Vanucci RC. Cerebral blood flow and edema in perinatal hypoxic-isquemic brain damage. Pediatr Res 1990; 27:450-3.
49. Nagdyman N, Komen W, Ko HK, Muller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. Pediatr Res 2001; 49: 502-06.
50. Nelson KB, Leviton A. How much of neonatal encephalopathy is due to birth asphyxia? Am J Dis Child 1991; 145:1325-31.

51. Ortiz-Muñoz B, Menéndez-López RA, Yayá-Tur L, Arribas-Alpuente L, Maíquez-Richart J, Bordes-Monmeneu M. Proteína S100 em tumores del sistema nervioso central. *Rev. Neurol.* 2003; 36(11):1011-15.
52. Ounsted M, Moar VA, Scott A. Small-for-dates babies, gestational age, and developmental ability at 7 years. *Early Hum Dev* 1989; 19: 77-86.
53. Painter MJ, Scher MS, Stein AD. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Eng J Med* 1999; 341:485-9.
54. Pereira DN. Efeitos da asfixia perinatal sobre a tireotrofina (TSH) e os hormônios da tireóide. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2000.
55. Perlman JM, Risser R. Can asphyxiated infants at risk for neonatal seizures be rapidly identified by current high-risk markers? *Pediatrics* 1996; 97:456-62.
56. Perlman JM, Tack ED, Martin T. Acute systemic organ injury in term infants after asphyxia. *Am J Dis Child* 1989; 143:617-20.
57. Portela LVC, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002; 48(6):1-3.
58. Potapov EV, Loebe M, Abdul-Khaliq H, Koster A, Stein J, Sodian R et al. Postoperative course of S-100B protein and Neuron – specific enolase in patients after implantation of continuous and pulsatile flow LVADs. *J Heart Lung Transpl* 2001; 20(12):1310-16.
59. Pu Y, Li QF, Zeng CM, Gao J, Qi J, Luo DX et al. Increased detectability of alpha brain glutamate/glutamine in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Neuroradiol* 2000 Jan; 21(1): 203-12.

60. Pulera MR, Adams LM, Liu H. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998; 29:2622-30.
61. Qiu H, Paneth N, Lorenz JM, Collins M. Labor and delivery factors in brain damage, disabling cerebral palsy, and neonatal death in low-birth-weight infants. *Am J Obst Gynecol* 2003 Oct; 189(4):1143-9.
62. Rennie JM, Chorley G, Boylan GB. Non expert use of the cerebral function monitor for neonatal seizure detection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004;89:F37-40.
63. Robertson C, Sauve RS, Christianson HE. Province-based study of neurologic disability among survivors weighing 500 through 1249 grams at birth. *Pediatrics* 1994; 93:636-40.
64. Rotta NT. Paralisia cerebral, novas perspectivas terapêuticas. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(1): S48-54.
65. Rufo-Campos M, Palencia-Luaces R. Encefalopatía hipóxico-isquémica del recién nacido a término. Recientes avances, marcadores de hipoxia y opciones terapêuticas. *Rev. Neurol* 2000; 31(7): 617-23
66. Rufo-Campos M. Importancia del síndrome hipoxo-isquémico en el desencadenamiento de las crisis epilépticas de lactante. Premio Extraordinário de la Real Academia de Medicina de Sevilla. Sevilla, 1999.
67. Rufo-Campos M. Manifestaciones epilépticas de la hipóxia-isquemia connatal. *Rev Neurol* 1999; 28(1): S29-33.
68. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976; 33:696-705.

69. Sasidharan P. Breathing pattern abnormalities in full term asphyxiated newborn infants. *Arch Dis Child* 1992; 67:440-42.
70. Savman K, Blennow M, Gustafson K, Tarkowski E, Hagberg H. Cytokine response in cerebrospinal fluid after birth asphyxia. *Pediatr Res* 1998; 43(6): 746-51.
71. Schafer BW, Heinzman CW. The S100 family of EF-hand calcium binding proteins: functions and pathology. *Tibs* 21, 1996; 134-39.
72. Scott H. Outcome of very severe birth asphyxia. *Arch Dis Child* 1976; 51:712-16.
73. Shaaban AM, Harmer M, Vaughan R. Serum S100 protein as a marker of cerebral damage during cardiac surgery. *Brit J Anesthesia* 2000; 85(2): 287-98.
74. Shankaran S, Laptook A, Wright LL, Ehrenkranz RA, Donovan EF, Fanaroff AA et al. Whole-body hypothermia for neonatal encephalopathy: animal observations as a basis for a randomized, controlled pilot study in term infants. *Pediatrics* 2002; 10 (2):377-85.
75. Silveira RC. Níveis plasmáticos e líquóricos de interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa em recém-nascido a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. Tese de Doutorado. Porto Alegre 2003.
76. Stafello ZM. Encefalopatia hipóxico-isquêmica. En Fejerman N, Fernandez-Alvarez E, *Neurologia pediátrica* 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana 1997; 173-82.
77. Svenmarker S, Sandstrom E, Karlsson T, Aberg T. Is there an association between release of protein S100B during cardiopulmonary bypass and memory disturbances? *Scand Cardio J.* 2002; 36: 117-22.

78. Thornberg E, Thiringer K, Hagberg H, Kjellmer I. Neuron specific enolase in asphyxiated newborns: association with encephalopathy and cerebral function monitor trace. *Arch Dis Childhood* 1995; 72: F39-F42.
79. Thorngren-Jerneck K, Alling C, Herbst A, Amer-Wahlin, Marsal K. S100 protein in serum as a prognostic marker for cerebral injury in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* 2004; 55(3): 406-12.
80. Tobertson NJ, Edwards AD. Recent advances in developing neuroprotective strategies for perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr* 1998; 10: 575-80.
81. Toet MC, van der Meij W, de Vries LS. Comparison between simultaneously recorded amplitude integrated electroencephalogram (cerebral function monitor) and standard electroencephalogram in neonates. *Pediatrics* 2002; 109:772-9.
82. Topp M, Langhoff-Roos J, Uldall P. Preterm birth and cerebral palsy. Predictive value of pregnancy complications, mode of delivery and Apgar scores. *Acta Obst Gynecol Scandinavian* 1997;76:843-8
83. Tort ABL, Portela LVC, Tavares MP, Gonçalves CA, Netto C, Giugliani R et al. Specificity and sensitivity of S100B levels in amniotic fluid for Down syndrome diagnosis. *Life Sciences* 2004; 76:379-84.
84. Vannuci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-isquemic encefalophaty. *Pediatrics* 1997; 100 (6):1004-14.
85. Vannuci RC. Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-isquemic encephalopathy. *Pediatrics* 1990; 85 (6): 961-68.
86. Volpe J. *Neurology of the newborn*; unit III, chapter 6-9, 4th edition, 2001.

- 
87. Walz R, Portela LVC, Tort ABL, Souza DO. Serum S100b levels in patients with HTLV-1 associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *Neurology* 2000; 54:2021-22.
  88. Whitelaw A, Rosengren L, Blennow M. Brain specific proteins in posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2001; 84: F90-F91.
  89. Wijnberger L, Nikkels PGJ, van Dongen AJCM, Noorlander CW, Mulder EJH, Schrama LH et al. Expression in the placenta of neuronal markers for perinatal brain damage. *Pediatr Res* 2002; 51(4): 492-96.
  90. Yiqing L, Silverstein FS, Skoff R, Barks JDE. Hypoxic-Ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res* 2002; 51: 25-33.
  91. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407(12):802-9.
  92. Zimmer D, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bulletin*, 1995; 37(4):417-29.

---

**7 ARTIGO: RELAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM A  
HIPÓXIA NEONATAL**

---



---

**RELAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM A HIPÓXIA NEONATAL**  
**S100B PROTEIN RELATED WITH NEONATAL HIPOXIA**

**Régis Osorio Martins<sup>1</sup>, Newra Telechea Rotta<sup>2</sup>, Luiz V. Portela<sup>3</sup>, Diogo O. Souza<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Mestrando, Neurologista infantil, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Pediatria da UFRGS.

<sup>2</sup> Livre Docente em Neurologia, Professora Adjunta do Departamento de Pediatria UFRGS.

<sup>3</sup> Prof. Adjunto, Phd do Departamento de Bioquímica UFRGS.

<sup>4</sup> Prof. Titular, MD, Phd do Departamento de Bioquímica UFRGS.

Endereço para correspondência: Régis Osorio Martins  
Rua: 24 de outubro, 1312/306  
Bairro: Auxiliadora  
90510-000 – Porto Alegre – RS  
e-mail: r.o.martins@terra.com.br

## RESUMO

A participação de marcadores bioquímicos na avaliação de quadros de asfixia neonatal é cada vez mais relevante. A proteína S100B tem um papel destacado nestas pesquisas. O objetivo deste estudo foi procurar destacar a importância da proteína S100B na avaliação de recém-nascidos a termo com quadros de encefalopatia hipóxico-isquêmica, assim como correlacionar com outras substâncias que também participam do processo isquêmico. Foram analisados 21 casos de recém-nascidos a termo que desenvolveram quadro de encefalopatia hipóxico-isquêmica, no período de setembro de 2003 a outubro de 2004. Realizadas coletas no 1º e 4º dia de vida e dosadas, por método imunocitoquímico, a proteína S100B e o lactato. Foi possível detectar uma correlação positiva entre as 2 substâncias, assim como, quando comparadas entre si, observou-se também significância estatística.

**Palavras-Chave:** S100B, Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica, Recém nascido, Asfixia.

## ABSTRACT

Biochemical markers have played an increasingly relevant role in the assessment of neonatal asphyxia. The S100B protein is particularly important in research conducted in this field. The purpose of this study was to underline the importance of S100B protein in the assessment of term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy, as well as to relate it to other substances also involved in the ischemic process. An assessment was made from September 2003 to October 2004 of twenty-one term newborn infants who developed hypoxic ischemic encephalopathy. Samples were collected on the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> day of life and S100B protein and lactate levels were calculated using the immune cytochemical method. A

positive relationship was found between the 2 substances. Additionally, a comparison between the two substances showed a statistically significant correlation.

**Key Words:** S100B, Hypoxic Ischemic Encephalopathy, newborn

## INTRODUÇÃO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) caracteriza-se, como um distúrbio de grande repercussão no organismo do recém-nascido (RN). Resultante de asfixia perinatal, essa encefalopatia compromete vários órgãos, além de trazer possíveis seqüelas como paralisia cerebral, epilepsia e retardo mental <sup>1,2</sup>.

Clinicamente se manifesta com envolvimento progressivo nas funções neurológicas, entre elas a de manutenção, ou início da respiração, do tônus, reflexos e força, alteração da consciência e freqüentes convulsões. Com uma incidência que varia, conforme autores, de 0,1 a 0,4% dos nascimentos, a EHI tem diagnóstico essencialmente clínico <sup>2,3</sup>.

O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) varia conforme a idade gestacional, a natureza do dano e o tipo de intervenção. Sabe-se que nos prematuros a distribuição das lesões predomina nas regiões mais profundas, periventriculares, enquanto que nos RNs a termo na região córtico-subcortical <sup>2,4</sup>.

Dependentes de uma cascata bioquímica complexa, diferentes formas de morte neuronal podem ocorrer. Na vigência de diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, surgem várias alterações no metabolismo anaeróbico como a glicólise, o acúmulo de fosfatos inorgânicos e de lactato <sup>4,5</sup>.

Para o diagnóstico do quadro da EHI, além de uma história clínica e adequado exame neurológico, cresce em importância, atualmente, os parâmetros metabólicos. Exames como tomografia, ressonância magnética, potencial somatosensorial são úteis para o prognóstico, mas não para as primeiras 24 horas, enquanto que a ressonância por espectroscopia tem suas limitações pelo custo<sup>1,6,7</sup>.

Atribui-se a um grande número de moléculas a participação como marcadores de lesão neurológica na vigência de um quadro de asfixia neonatal. Glutamato, aspartato, lactato, amônia, creatina quinase específica, NSE (*neuron specific enolase*) e outras substâncias, já foram estudadas no sangue periférico, no cordão umbilical, no líquido amniótico e no líquido cefaloraquidiano<sup>8-11</sup>. Estudos com a S100B, proteína ligante de cálcio predominante em astrócitos, quando dosada no líquido cefaloraquidiano e sangue, evidenciam relação direta com a lesão cerebral<sup>12-14</sup>. Contribuições significativas na área da perinatologia, como na administração de óxido nítrico, estudo da hemorragia cerebral e análise de líquido amniótico de gemelares demonstraram a utilidade da proteína S100B como marcadora de lesão cerebral<sup>11,15,16</sup>. Seu papel prognóstico foi evidenciado também quando se relacionou com quadros de EHI em RNs a termo, sendo possível encontrar uma associação com estágios moderados e graves<sup>11,17</sup>.

Foi objetivo deste trabalho verificar se a proteína S100B pode servir como marcador de lesão cerebral em RNs a termo que desenvolveram EHI; se suas variações evidenciam diferentes graus de comprometimento, assim como se há correlação com outras substâncias como o lactato.

## **PACIENTES E MÉTODO**

Este estudo constitui-se de uma análise longitudinal, com caráter prospectivo, de uma

amostra de RNs a termo que sofreram asfixia neonatal e conseqüente EHI, nascidos no Hospital Presidente Vargas (HPV) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) de setembro de 2003 a outubro de 2004. Foram excluídos os RNs prematuros ou com malformação.

As variáveis estudadas foram sexo, cor, peso, número de gestações, tipo de parto, grau de EHI (leve/moderado/grave) segundo Sarnat / Sarnat, intercorrências clínicas e dosagens bioquímicas de transaminases, CPK, CK-mb e S100B. Os resultados obtidos foram analisados pelo pacote estatístico SPSS 12.0.

As coletas de sangue arterial periférico foram realizadas no 1º e 4º dia de vida e levadas ao laboratório de bioquímica da UFRGS, centrifugadas e armazenadas em freezer (-70°C) até a realização das dosagens. As quantificações da proteína S100B foram realizadas por imunoenensaio luminométrico – BYK – Sangtec, Dietzembach, German.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do HPV e pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

## RESULTADOS

Foram 21 casos de RNs com EHI estudados, com coletas de sangue arterial periférico no 1º e 4º dia de vida, totalizando 42 amostras. Destas, apenas no vigésimo paciente não se realizou a segunda coleta por óbito no 3º dia. Registraram-se 7 RNs com quadro leve de EHI, 6 moderados e 8 graves. Constataram-se 2 óbitos (9,5%), ambos com EHI grave. Nesta amostra predominaram os brancos (71,4%) do sexo masculino (57,1%), ambos também mais freqüentes nos casos graves de EHI. Quanto ao tipo de parto, o vaginal foi o mais prevalente com 61,9% (Tabela 1).

Em 8 casos foi indicado parto cesáreo e observou-se que em 50% deles ocorreu EHI grave, entretanto, esta associação não foi estatisticamente significativa ( $p=0,424$ ). Todos os RNs encontraram-se adequados quanto ao peso para a idade gestacional, e a idade materna variou de 16 a 38 anos (média= $26\pm 8$  anos). Todas as mães relataram ter realizado pré-natal e a maioria era primigesta, entretanto, 30% dos casos não informaram o número de consultas.

Em relação as intercorrências clínicas convém salientar as convulsões que ocorreram em 52,4% dos casos. Houve significância estatística quando as convulsões foram relacionadas com a severidade da EHI ( $p= 0,003$ ). O Apgar no décimo minuto mostrou significância estatística ( $p=0,015$ ) quando comparado ao grau da EHI (Tabela 2).

**Tabela 1: Frequências das variáveis**

Variáveis	n=21	f (%)	
Sexo masculino	12	57,1	
Cor branca	15	71,4	
Parto vaginal	13	61,9	
Primigesta	9	42,9	
Grau de encefalopatia	Leve	7	33,3
	Moderado	6	28,6
	Grave	8	38,1
Óbito	2	9,5	
Convulsão	11	52,4	

**Tabela 2: Variáveis estudadas x Grau de Encefalopatia**

Frequência das Variáveis	Grau de Encefalopatia			Valor p
	Leve (n=7)	Moderado (n=6)	Grave (n=8)	
Sexo masculino**	42,9%	66,7%	62,5%	0,742
Cor branca**	57,1%	50%	100%	0,057
Parto vaginal**	57,1%	83,3%	50%	0,535
Apgar 1' *	3 (2 a 5)	2,5 (0 a 5)	1,5(1 a 3,8)	0,465
Apgar 5' *	6 (6 a 7)	6(4,5 a 6,3)	4,5 (2,3 a 6,8)	0,197
Apgar 10' *	8 (8,0 a 8,8)	7,0 (5,0 a 8,0)	4,5(2,5 a 5,5)	<b>0,015</b>
Convulsão**	0	45,5	54,5	<b>0,003</b>

\* As variáveis quantitativas assimétricas foram comparadas com Kruskal-Wallis, representadas por mediana e intervalo interquartis (25-75).

\*\* As variáveis qualitativas foram comparadas entre os grupos com teste exato de Fischer, nesta tabela, expressas em percentuais.

Não houve perdas nas coletas do primeiro dia de vida para dosagem da S100B, enquanto que para o lactato em 4 amostras, não foi possível a realização por hemólise. No quarto dia não se obteve a dosagem de 2 amostras de S100B e de 7 de lactato.

A análise bioquímica, realizada com a S100B (1<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> dias de vida), CPK, CK-mb, TGO, TGP e lactato (1<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> dias de vida), quando comparada com dados clínicos como peso, Apgar, grau de EHI e convulsões, não demonstrou significância estatística, mas tiveram valores acima do normal. (Tabela 3).

**Tabela 3: Análise das Variáveis Laboratoriais x Grau de Encefalopatia**

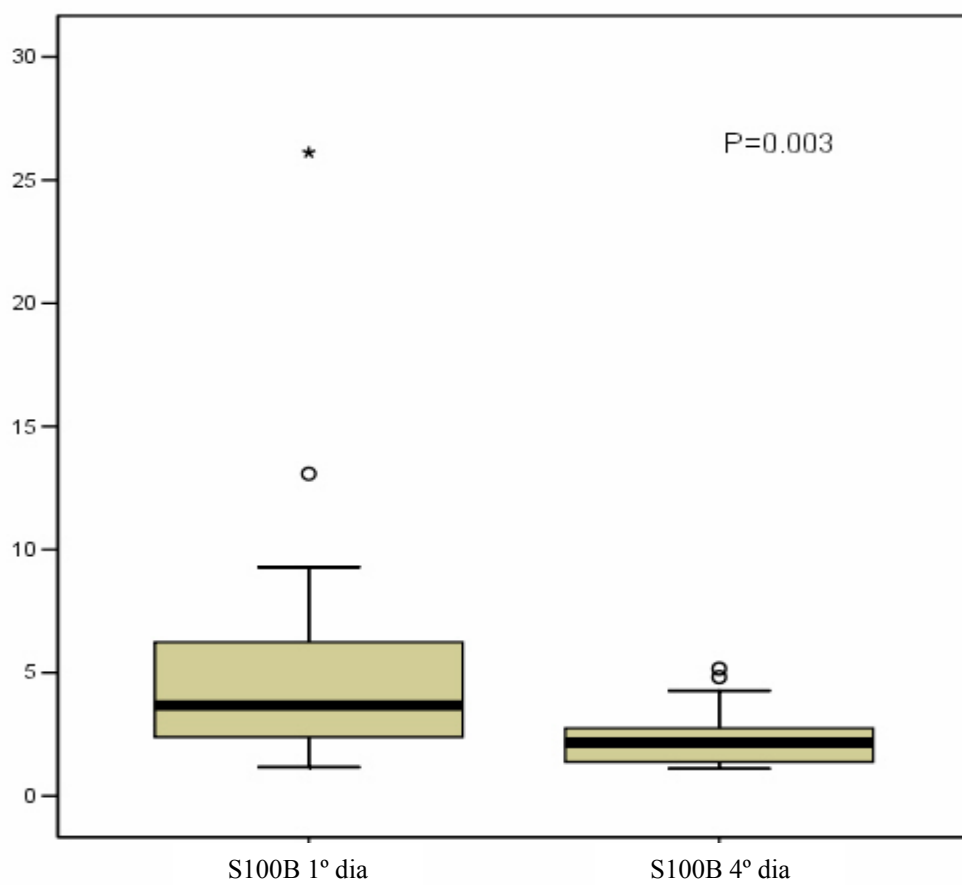
Variáveis	Grau de Encefalopatia			Valor p
	Leve	Moderado	Grave	
S1001dv* $\mu\text{g/l}$	3,7 (1,9 – 8)	3,7 (2,1 – 6,2)	4,6 (2,6 – 7,6)	0,807
S1004dv* $\mu\text{g/l}$	2,8 (1,5 – 4,8)	2,0 (1,4 – 2,4)	1,3 (1,2 – 2,9)	0,061
CPK*	763,5 (606 – 1374)	1432,5 (818,5 – 3150)	839 (243,8 – 2109)	0,281
CK-mb*	179 (104,6 – 411)	251 (100,9 – 615,8)	47 (22,1 – 597)	0,462
TGO*	71,5 (46,8 – 140)	107,5 (80,8 – 415,3)	112 (61,3 – 715,5)	0,315
TGP*	20 (8 – 32)	28,5 (26 – 194)	24 (19 – 283)	0,187

\* A análise de variáveis quantitativas assimétricas foram comparadas com Kruskal-Wallis, representadas por mediana e intervalo interquartis (25-75).

Foi possível documentar acidose nas primeiras 6 horas de vida em apenas 6 RNs (28,5%). Mesmo assim, houve forte associação entre acidose e S100B ( $p=0,029$ ), e o lactato ( $p=0,009$ ), no primeiro dia de vida.

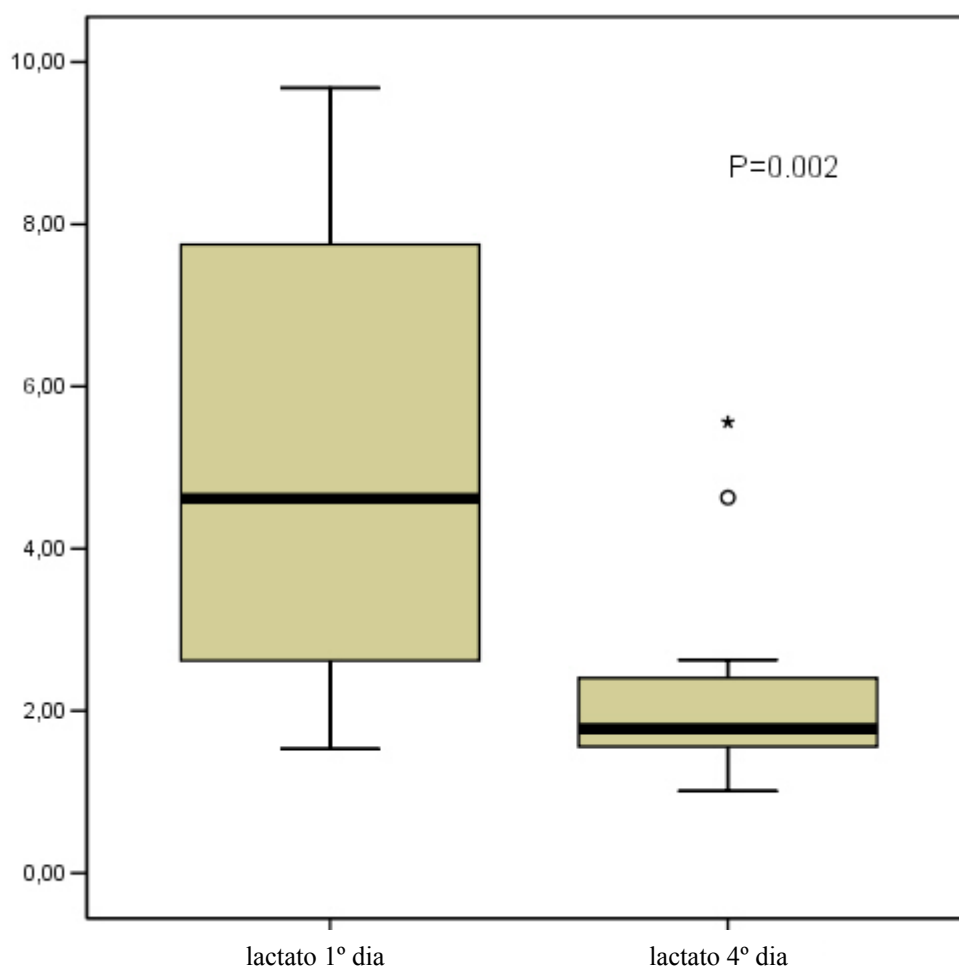
Quando comparadas entre si, nas suas variações, também se observou significância estatística na S100B 1<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> dias ( $p=0,003$ ) e no lactato 1<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> dias ( $p=0,002$ ) (Figuras 1 e 2). Da mesma forma, foi possível estabelecer uma correlação positiva moderada ( $r_s=0,483$ ) entre a S100B e o lactato no primeiro dia ( $p=0,050$ ) (Figura 3).

Não se observou significância estatística entre a S100B e o lactato com as demais enzimas – TGO, TGP, CPK e CK-mb.

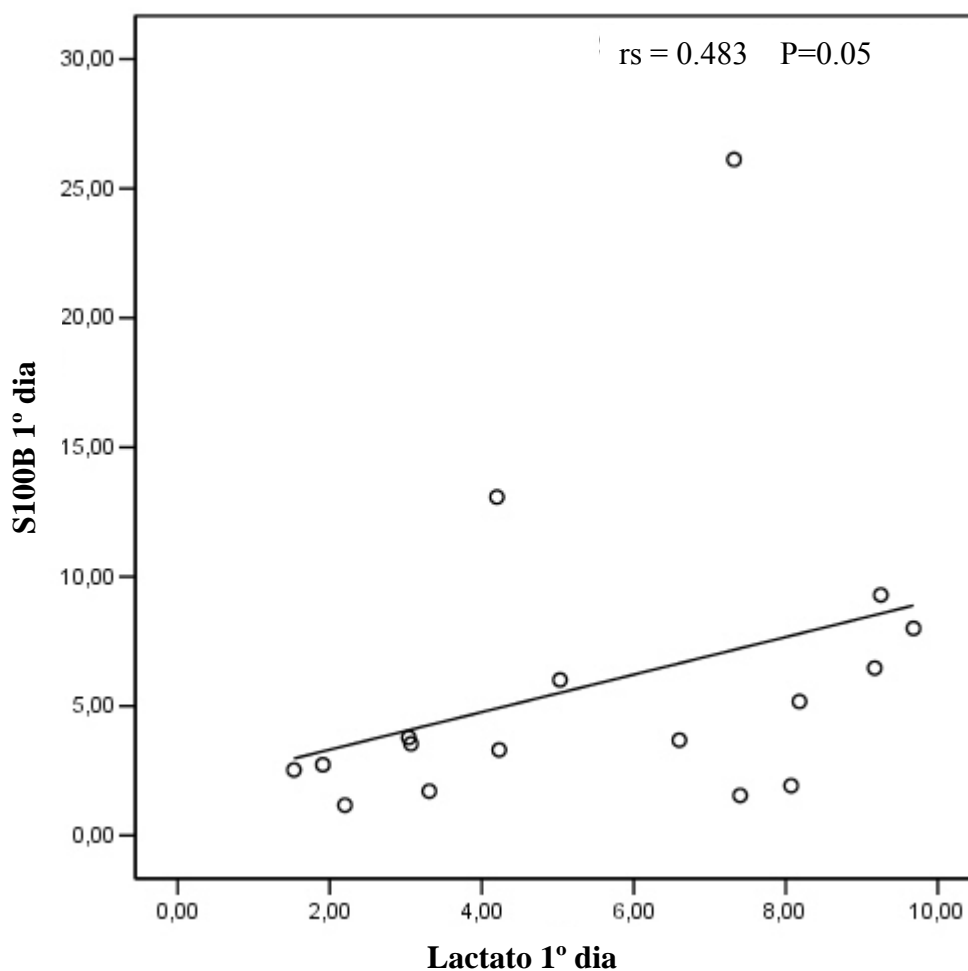


**Figura 1: Variações nas dosagens da S100B (µg/l) no 1º-4º dias de vida**





**Figura 2: Variações nas dosagens do lactato (mmol/l) no 1º-4º dias de vida**



**Figura 3: Correlação entre dosagens da S100B(µg/l) e lactato (mmol/l) - 1º dia de vida**

## DISCUSSÃO

Badawi et al. (1998) avaliaram os fatores de risco intraparto em RNs e sua associação com EHI, encontrando, em relação ao parto vaginal, aumento do risco em mais de duas vezes entre cesárea e parto vaginal instrumental e o surgimento da encefalopatia<sup>18</sup>. Em estudo com 961 RNs de baixo peso que relacionou tipo de parto, paralisia cerebral e morte neonatal, foi concluído que o único fator adverso encontrado em associação com parto vaginal foram alterações em achados ecográficos. Não houve associação significativa com surgimento de paralisia cerebral ou morte neonatal<sup>19</sup>.

Ao analisar os dados deste estudo se observa que houve predominância de parto vaginal (61,9%). Destes partos vaginais apenas dois foram instrumentais e um terceiro RN foi submetido a fórceps e subsequente cesárea de emergência. Estes dados aproximam-se daqueles observados por Silveira (2003) em estudo realizado na mesma instituição, onde foi detectado 58% de partos vaginais nos RNs com EHI. Por outro lado, a autora observou que o tipo de parto não apresenta correlação estatisticamente significativa com a gravidade da EHI, o que concorda com a presente pesquisa<sup>20</sup>.

Estudos recentes demonstram que o Apgar, especialmente baixo aos 5 minutos em RNs a termo, constitui um marcador específico para complicações da EHI, entre elas as crises convulsivas<sup>21</sup>. Entretanto, convulsões em RNs com EHI podem estar relacionadas também com desordens metabólicas, lesões estruturais ou malformações<sup>1</sup>.

Neste estudo, as convulsões estiveram presentes em 52,4% dos pacientes e foram mais prevalentes naqueles que apresentaram apgar  $\leq 5$  no quinto minuto e EHI grave, excetuando-se um caso com Apgar 7. O mesmo percentual foi encontrado por Pereira (2000) em estudo com asfisiados no mesmo serviço de neonatologia<sup>22</sup>.

Moster (2001) afirma em sua publicação que o escore baixo de Apgar no quinto minuto tem uma associação forte com subsequente morte ou paralisia cerebral<sup>21</sup>. Entretanto, a origem de muitos casos de paralisia cerebral está mais ligada a eventos antenatais. Estudos australianos demonstraram apenas uma pequena proporção relacionada com a hipóxia intraparto<sup>6</sup>. Dados recentes de pesquisa sugerem que, na grande maioria, os achados neuropatológicos causadores de paralisia cerebral, ocorrem como resultado de fenômenos multifatoriais que surgem tanto no desenvolvimento fetal como no período neonatal<sup>2</sup>.

Apgar baixo não é causado por uma única condição adversa, pois pode ser resultado de vários fatores, entre eles a hipóxia intraparto. A persistência de um baixo Apgar está mais

comumente relacionada com a efetividade da ressuscitação<sup>3</sup>. Os dados deste estudo indicam que 30% dos RNs com EHI moderada ou grave obtiveram apgar no quinto minuto  $\geq 5$ , concordando com dados da literatura que referem o Apgar como pobre preditor da evolução neurológica<sup>1</sup>.

Autores registram entre 15 a 20% de óbitos na idade neonatal nos quadros de EHI<sup>2</sup>. Quando o RN apresenta um Apgar 0-3 no 5º minuto apresentam um risco relativo de óbito = 16, quando comparados com aqueles de Apgar normal<sup>21</sup>. Estudos realizados no HCPA por Pereira (2000) e Silveira (2003) encontraram respectivamente 35,5% e 15,8% de óbitos em RNs com EHI<sup>20,22</sup>, enquanto que esta amostra encontrou 9,5%. Tais dados demonstram uma diminuição evidente na mortalidade neonatal no período de 4 anos em nosso meio, o que reflete o resultado dos avanços no diagnóstico e no manejo precoces do RN asfíxiado.

Thorngren-Jerneck et al. (2004), baseando-se no diagnóstico clínico e laboratorial, encontraram 62 asfíxiados a termo em 4 anos de estudo. Seus critérios foram Apgar  $< 7$  no quinto minuto e acidose em artéria umbilical ( $\text{pH} < 7,10$  e/ou Excesso de Base  $> 12$ )<sup>17</sup>. Embora deva ser coletada em todo parto que indique sinais de asfíxia, a acidemia metabólica não define o momento da hipóxia e também não se correlaciona diretamente com o surgimento de paralisia cerebral. Quando não é realizada a coleta de gasometria arterial na primeira hora de vida, não é possível afirmar que aquela hipóxia seja a causadora ou tenha contribuído para os sinais clínicos que posteriormente possam surgir<sup>1,6,20</sup>. Além disso, muitos casos de encefalopatia neonatal grave não estão associados a hipoxemia intraparto<sup>6</sup>.

Na análise desta amostra populacional de asfíxiados, ocorreram dificuldades técnicas para a realização da coleta sanguínea ao nascimento, para obtenção do pH do cordão umbilical, indicador mais sensível de asfíxia. O fato de que o limite para essa coleta foi de até 6 horas após o nascimento, permitiu que muitos destes pacientes já estivessem sendo

submetidos a medidas de suporte ventilatório e ou medicamentoso, o que alterou os resultados bioquímicos. No entanto, o pequeno número de RNs com acidose comprovada não impediu que este resultado fosse significativo, quando cotejado com a análise bioquímica.

Uma das principais premissas na avaliação precoce de um RN asfiziado é a análise bioquímica de determinadas moléculas. Várias substâncias são consideradas marcadoras de lesão cerebral <sup>1,9-11</sup>. Experimentos animais já evidenciaram que aminoácidos excitatórios como, por exemplo, glutamato e aspartato, estão envolvidos na patogênese de lesões cerebrais e que seus agonistas são altamente tóxicos em cérebros imaturos <sup>8</sup>. Os índices lactato e lactato/piruvato também podem servir como parâmetro de gravidade na asfiziia perinatal <sup>10</sup>. Outras substâncias também são citadas como, por exemplo, transaminases, NSE, interleucinas e amônia <sup>1,9,11,14</sup>.

No presente estudo, pode se observar a correlação com dados da literatura no que se refere ao aumento nas concentrações séricas das enzimas transaminases, creatinoquinases (CPK) e CK-mb <sup>1</sup>, entretanto, não houve significância estatística quando comparadas com o grau de EHI. A justificativa para tal situação, provavelmente, deve-se ao pequeno número de casos deste estudo, no entanto, o trabalho de Nagdyman e colaboradores (2001), com 29 casos, demonstrou diferença significativa nos quadros de EHI moderados e graves, quando se estudou a CK-mb em coletas seriadas a partir de 2 horas de vida <sup>11</sup>.

A introdução de técnicas eletroquímicas tem permitido uma rápida e acurada dosagem de metabólitos celulares importantes na cadeia bioquímica da asfiziia, entre eles piruvato e lactato. O lactato, produto final da glicólise anaeróbica, converte-se em piruvato quando se restaura o oxigênio no tecido. Chou et al. (1998) demonstraram que tais dosagens podem constituir um método quantitativo auxiliar na avaliação da hipóxia <sup>10</sup>. Quando comparado com valores normais de referência de laboratórios dos hospitais onde se realizou esta pesquisa

(0,33-1,33 mmol/l), foi possível observar um significativo aumento nas dosagens do lactato (1,01-9,25 mmol/l).

A proteína S100B é produzida e liberada primariamente pelos astrócitos no SNC, onde exerce funções tróficas em neurônios e na glia <sup>23</sup>. Vários estudos já demonstraram sua participação como marcador bioquímico periférico em quadros onde há comprometimento cerebral, entre eles traumatismos cranianos, acidentes vasculares cerebrais, tumores do SNC, Alzheimer, esquizofrenia e lupus eritematoso sistêmico <sup>12,14,24-26</sup>. Entretanto, segundo observações de Wijnberger et al. (2002), devido à meia-vida curta da S100B (25 min-2 h), não é possível estabelecer uma relação causal direta com o dano cerebral, exceto em eventos agudos <sup>16</sup>.

Estudos com RNs asfixiados ou com hemorragia intraventricular demonstram associação com o incremento das dosagens da S100B. Concluem que essa proteína pode ser considerada, entre outros, como um marcador de comprometimento cerebral disponível atualmente <sup>11,12,27</sup>.

Thorngren-Jerneck et al. (2004) observaram um considerável aumento da S100B naqueles RNs a termo que apresentaram quadros de EHI moderados e graves, assim como nos casos de óbito neonatal e paralisia cerebral até o 18º mês. Esses autores realizaram coletas de amostras sanguíneas do 1º até o 4º dia de vida e as dosagens dos RNs com EHI foram decrescentes, mas acima dos valores médios dos controles. Os autores encontraram uma significativa correlação entre a dosagem da S100B no 1º dia e acidose <sup>17</sup>.

No presente estudo, apesar do pequeno número de casos, também se evidenciou associação da S100B e do lactato dosadas no 1º dia com acidose. Este evento possibilita ressaltarmos a importância da S100B na cadeia anaeróbica e sua conseqüente degeneração celular, na qual o lactato participa. Entretanto, não foi possível detectar significância

estatística da S100B com os graus de encefalopatia. Tal situação, que provavelmente se atribui ao menor número de casos, discorda dos achados da literatura recente<sup>11,17</sup>. Acrescenta-se também que a rotina de coleta das amostras sanguíneas deste estudo, não se restringiu às primeiras 2 horas onde se evidencia uma maior concentração da proteína S100B pela sua meia vida curta. Os valores normais de referência da S100B variam com a idade sendo maior no período neonatal. Tal evidência explica-se pela intensa atividade de maturação neuronal e da glia presente nesta fase da vida<sup>13</sup>. Escassos estudos conseguiram obter uma curva de valores da proteína S100B, correlacionada com o tempo da coleta que permitisse encontrar o momento certo para sua detecção e conseqüentemente maior confiabilidade como um marcador bioquímico. Salientam os autores que repetidas dosagens devem ser úteis para predição de eventual dano cerebral<sup>11,13,17</sup>. Ao compararem-se os valores obtidos das amostras de S100B neste estudo, observa-se uma significativa diferença entre as coletas realizadas no 1º e 4º dia de vida. Esta situação assemelha-se com dados da literatura<sup>17</sup>.

**CONCLUSÕES:** A proteína S100B pode servir como marcador de lesão cerebral no Rn a termo com EHI, com resultados decrescentes a partir do primeiro dia; as variações das dosagens sanguíneas da proteína S100B não corresponderam a diferentes graus de EHI e não se correlacionaram com outras substâncias envolvidas na EHI, exceto o lactato.

É evidente que as possibilidades de intervenções neuroprotetoras estão aumentando progressivamente para todas as idades. É necessário distinguir aqueles pacientes que se beneficiarão de tais intervenções. Provavelmente, o estudo de várias substâncias que, combinadas, fossem capazes de indicar precocemente sinais lesionais cerebrais, estaria no início do entendimento da neuroproteção. Para tal objetivo, a proteína S100B tem um futuro promissor, desde que associada a outros marcadores bioquímicos e aos dados clínicos.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Rufo-Campos M, Palencia-Luaces R. Encefalopatía hipóxico-isquémica del recién nacido a término. Recientes avances, marcadores de hipoxia y opciones terapéuticas. *Rev Neurol* 2000; 31(7):617-23
2. Volpe J. *Neurology of the newborn*; unit III, chapter 6-9, 4th edition, 2001.
3. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004; 351: 1985-95.
4. Macaia A. Muerte celular en la hipoxia-isquemia neonatal. *Rev Neurol* 2000; 31(8):784-89
5. Grow J, Barks JDE. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol* 2002 (29): 585-602.
6. MacLennam A. A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. *BMJ* 1999; 319: 1054-9.
7. Thorngren-Jerneck K, Ohlsson T, Sandell A, Erlandsson K, Strand S, Ryding E et al. Cerebral glucose metabolism measured by Positron Emission Tomography in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* 2001; 49:495-501.
8. Hagberg H, Thornberg E, Blennow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K et al. Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1993; 82: 925-9.
9. Esqué-Ruiz MT, Figueras-Aloy J, Salvia-Roigés MD, Carbonell-Estrany X. Amoníaco y transaminasas en sangre en el recién nacido a término afectado de asfixia perinatal. *Rev Neurol* 2003; 36(9): 801-05.



10. Chou YH, Yau TI, Wang PJ. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high risk neonates. *Acta Pediatr* 1998; 87:764-68.
11. Nagdyman N, Wolfgang K, Ko HK, Muller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001; 49: 502-06.
12. Whitelaw A, Rosengren L, Blennow M. Brain specific proteins in posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 2001; 84:F90-F91.
13. Portela LV, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 48, No 6, 2002.
14. Berger RP, Pierce MC, Wisniewski SR, Adelson PD, Clark RSB, Ruppel RA et al. Neuron specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics* 2002, vol.109, 2:1-6.
15. Gazzolo D, Bruschetti M, Di Iorio R, Marinoni E, Lituânia M, Marras M et al. Maternal nitric oxide supplementation decreases cord blood S100B in intrauterine growth-retarded fetuses. *Clin Chem* 2002; 48(4): 647-50.
16. Wijnberger L, Nikkels PGJ, Angelique JCM, Noorlander CW, Mulder EJH, Schrama JH et al. Expression in the placenta of neuronal markers for perinatal brain damage. *Pediatr Res* 2002; 51(4): 492-96.
17. Thorngren-Jerneck K, Alling C, Herbst A, Amer-Wahlin I, Marsal K. S100 protein in serum as a prognostic marker for cerebral injury in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* 2004; 55(3): 406-12.

18. Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Alessandri LM, O'Sullivan F, Burton PR et al. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case control-study. *BMJ* 1998; 317:1554-58.
19. Qiu H, Paneth N, Lorenz JM, Collins M. Labor and delivery factors in brain damage, disabling cerebral palsy and neonatal death in low- birth weight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(4): 1143-9.
20. Silveira RC. Níveis plasmáticos e liquóricos de interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa em recém-nascido a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2003.
21. Moster D, Lie RT, Irgens LM, Bjerkedal T, Markestad T. The association of apgar score with subsequent death and cerebral palsy: A population-based study in term infants. *J Pediatr* 2001; 138(6): 798-803.
22. Pereira DN. Efeitos da asfíxia perinatal sobre a tireotrofina (TSH) e os hormônios da tireóide. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2000.
23. Donato R. Intracellular and extra cellular roles of S100 proteins. *Micr Res Technique* 2003; 60:540-51.
24. Ortiz-Muñoz B, Menéndez-López A, Yayá-Tur R, Arribas-Alpuente L, Maiquez-Richart J, Bordes-Monmeneu M. Proteína S100 em tumores del sistema nervioso central. *Rev. Neurol.* 2003; 36(11): 1011-15.
25. Manev H, Manev R. S100B: an old neurotrophic factor with putative new roles in psychiatric illnesses. *J. Psychiat Res* 2001; 35:347-48.

- 
26. Lara DR, Gama CS, Belmonte de Abreu P, Portela LV, Gonçalves C, Hauck S et al. Increased serum S100b protein in schizofrenia: a study in medication-free patients. *J. Psychiat. Res.* 2001; 35:11-14.
  
  27. Blennow M, Savman K, Ilves P, Thoresen M, Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Pediatr* 2001; 90: 1171-75.

---

---

## **ANEXOS**

---

**ANEXO A - Protocolo**

GRUPO A ( ) GRUPO B ( )

- ID: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

DN: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: 1-F 2-M ( ) PN: \_\_\_\_\_g Cor:

IG: \_\_\_\_\_semanas Parto: 1-vaginal 2-cesárea ( )

P/IG: Apgar: 1º min \_\_\_ 5º min \_\_\_ 10º min \_\_\_ 15º min \_\_\_ 20º min \_\_\_

Intercorrências neonatais:

- Dados maternos: Idade: \_\_\_ Cor: \_\_\_ Nº de gestações: \_\_\_ Pré-natal: 1-S 2-N ( )

Intercorrências pré-natais:

- Dados laboratoriais: S100B (24h) \_\_\_\_\_ (96h) \_\_\_\_\_ Lactato sérico (horas de vida): \_\_\_\_\_

Gasometria arterial ( horas de vida): pH \_\_\_ pCO<sub>2</sub> \_\_\_ EB \_\_\_ pO<sub>2</sub> \_\_\_ horas

Outros exames:

- Exame neurológico: PC: \_\_\_ BA: \_\_\_ AP: \_\_\_ PT: \_\_\_

Fascias: \_\_\_\_\_ Nervos cranianos: \_\_\_\_\_ Tono: \_\_\_\_\_ Força: \_\_\_\_\_

Reflexos profundos: \_\_\_\_\_ Reflexos superficiais: \_\_\_\_\_

Reflexos primitivos: \_\_\_\_\_ Sensibilidade: \_\_\_\_\_

Grau de EHI ( Sarnat e Sarnat , 1976) \_\_\_\_\_

## **ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O objetivo deste estudo é dosar, no sangue, os valores de uma proteína denominada S100B que poderá vir a ser útil na identificação de crianças com comprometimento cerebral. Há poucos estudos na comunidade científica a respeito deste tema e para que, futuramente, possa haver uma melhor abordagem no que diz respeito aos cuidados e tratamento desses pacientes, estamos desenvolvendo o presente estudo. O seu consentimento ou não em participar deste estudo em nada alterará os cuidados médicos e de enfermagem que seu filho (a) terá durante a internação. Sua participação será a de permitir, quando necessário, a retirada de sangue, em no máximo 2 coletas, de veia periférica, de seu filho (a) após o nascimento (max. 2 ml). Esta retirada não trará nenhuma repercussão clínica no seu filho (a) e salientamos que a coleta será feita juntamente com outros exames que se façam necessários naquele momento. Os pesquisadores garantem também que, para fins de pesquisa, seus nomes não serão divulgados.

### **DECLARAÇÃO**

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de coerção, ou constrangimento dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que meu filho (a) será submetido (a), dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, bem como da:

1. segurança de receber resposta a qualquer dúvida relacionada com a pesquisa;
2. liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação dos cuidados ao meu filho (a);
3. segurança de privacidade.

O pesquisador é o Dr. Régis Osório Martins (Fone: 91772062), e a orientadora é a Prof. Dra. Newra Telechea Rotta (Fone: 99714567). Este documento foi revisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Presidente Vargas.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do responsável:

Pesquisador: Dr. Régis Osório Martins

Orientadora: Prof. Dra. Newra Telechea Rotta

## ANEXO C - Características da Amostra

	reg.	D/N	sexo	PN	cor	capurro	parto	peso/ig	apgar	id-mãe	cor-mãe	gest.
1	33728	05/09/03	M	3270	B	39	vag	aig	0/1/1	16	b	1
2	36802	22/09/03	F	2430	B	37,4	ces.	aig	6/oito	36	b	2
3	39118	01/10/03	M	3520	B	38,1	vag	aig	0/seis	33	b	1
4	39757	09/10/03	M	3040	B	40,5	vag	aig	5/seis	16	b	1
5	40596	18/10/03	F	3000	P	40,4	vag	aig	0/3/5	17	p	2
6	41612	30/10/03	M	3370	B	39,5	vag	aig	05/set	16	m	1
7	42131	04/11/03	M	3580	B	41	vag	aig	1/2/4/4	21	b	3
8	50101	09/03/04	M	3180	P	40,3	vag	aig	2/sete/nove	17	p	1
9	50539	17/03/04	F	2650	M	37,6	vag	aig	2/seis	29	m	2
10	967535/6	07/05/04	F	2870	B	40	vag	aig	3/seis	30	b	4
11	967629/7	09/05/04	F	3520	B	38,3	ces.	aig	04/set	18	b	1
12	54032	13/05/04	F	3370	B	41,3	vag	aig	4/seis/8	28	b	1
13	969478/7	31/05/04	F	3675	B	40,5	ces.	aig	1/seis/oito	28	b	2
14	55965	11/06/04	M	3130	B	37,1	vag	aig	1/quatros/5	38	b	2
15	55985	13/06/04	M	3270	M	40,3	ces.	aig	4/seis/8	21	m	1
16	9710013	17/06/04	M	3305	B	39	ces.	aig	1/tres/4	27	b	2
17	57900	15/07/04	M	3000	B	37	ces.	aig	5/quatros/8	38	b	8
18	59099	01/08/04	F	2940	B	39,2	ces.	aig	2/cinco/seis	21	b	1
19	62502	22/09/04	M	3290	P	37,3	vag	aig	03/set	35	p	4
20	64105	14/10/04	M	3060	B	39,2	ces.	aig	05/set	30	b	5
21	55238	27/10/04	F	3040	M	39,5	vag	aig	1/cinco/set	38	p	5

	pré-natal	S100-1dv	S100-4dv	CPK	CK-mb	TGO	TGP	Grau-Ehi	acid-6h	mortal.	convul são	lact 1dv	Lact 4dv
1	s/9cons	8,165	x	4050	1283	900	369	grave	sim	óbito	sim	x	x
2	s/9cons	3,304	2,713	676	132	55	24	leve	não		não	4,23	x
3	s/12cons	5,175	2,427	1765	308	95	28	mod.	não		sim	8,18	1,81
4	s/11cons	1,707	1,86	847	49,7	53	20	mod.	x		sim	3,31	1,74
5	s	2,245	1,411	1200	193	414	137	mod.	não		sim	x	1,3
6	s/4cons	3,78	2,491	2680	611	419	365	mod.	x		sim	3,04	1,42
7	s	5,575	1,293	260	19,3	61	26	grave	x		sim	x	1,78
8	s	1,92	2,782	739	104,6	40	10	leve	x		não	8,07	x
9	s/6cons	13,076	3,4	2850	1908	134	20	leve	não		não	4,2	2,18
10	s	2,529	1,219	x	x	x	x	grave	x		não	1,53	2,08
11	s/8cons	2,73	1,107	x	x	x	x	grave	x		sim	1,91	1,01
12	s/8cons	3,68	4,823	788	411	88	x	leve	x		não	6,6	5,56
13	s/5cons	8	5,165	x	179	x	x	leve	sim		não	9,68	4,63
14	s/10cons	6,009	1,347	1462	368,3	x	x	grave	não		sim	5,03	1,64
15	s/8cons	9,291	1,211	4560	630	90	28	mod.	sim		sim	9,25	2,63
16	s	26,119	4,27	195	23	x	x	grave	sim		sim	7,32	1,73
17	s	1,67	1,413	396	3,6	49	6	leve	não		não	2,2	1,48
18	s/11cons	1,544	2,468	1012	26	162	22	grave	não		sim	7,4	x
19	s/4cons	6,467	1,51	882	192	158	40	leve	sim		não	9,17	x
20	s	3,611	x	666	68	62	18	grave	sim	óbito	não	x	x
21	s/7cons	4	2,85	733	118	120	29	mod.	não		não	3,07	x

## ABREVIATURAS

Reg	-	Registro	parto	-	vaginal/cesárea
D/N	-	data de nascimento	P/IG	-	peso para idade gestacional
Sexo	-	Masculino/Feminino	apgar	-	1/5/10/20 minutos
PN	-	Peso de nascimento	id-mãe	-	idade da mãe
Cor	-	Branca/Mista/Preta	cor-mãe	-	branca/mista/preta
Capurro	-	Idade gestacional do RN	gest.	-	número de gestações