

Thiago Arpini Valerio<sup>1\*</sup>, Ana Carolina Cancelier<sup>1\*</sup>, Larissa Constantino<sup>1</sup>, Fabricia Petronilho<sup>1</sup>, Cristiane Ritter<sup>1</sup>, Felipe Dal-Pizzol<sup>1</sup>

## Marcadores inflamatórios e oxidativos em sangue de cordão umbilical como preditores de gravidade em sepse neonatal

*Inflammatory and oxidative cord blood parameters as predictors of neonatal sepsis severity*

\*Estes autores contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.

1. Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Criciúma (SC), Brasil.

Trabalho realizado no Hospital Nossa Senhora da Conceição - Tubarão (SC), Brasil e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Criciúma (SC), Brasil.

**Conflitos de interesse:** Nenhum.

Submetido em 9 de Fevereiro de 2012

Aceito em 6 de Março de 2012

**Autor correspondente:**

Felipe Dal-Pizzol

Av. Universitária, 1105

CEP: 88806-000 – Criciúma (SC),

Brasil.

E-mail: piz@unesc.net

### RESUMO

**Objetivos:** Sepse neonatal corresponde a uma síndrome complexa, causada por resposta inflamatória sistêmica descontrolada, associada a um foco infeccioso que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou mesmo a morte. Apresenta incidência elevada em neonatos prematuros, sendo importante correlacionarmos fatores prognósticos para otimizar nosso diagnóstico precoce e resposta a terapêutica nestes pacientes. Este estudo teve por objetivo determinar a relação entre marcadores inflamatórios e parâmetros oxidativos com fatores prognósticos em sepse neonatal precoce.

**Métodos:** Foi realizado um estudo observacional, prospectivo e foram coletados os dados de 120 pacientes, da maternidade de hospital universitário. Foram incluídos na pesquisa neonatos prematuros (< 37 semanas de gestação) com pelo menos um outro fator de risco

para sepse neonatal. Foram determinados os níveis de interleucina (IL)-6, IL-10, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de proteínas carboniladas em sangue do cordão umbilical e sua relação com gravidade de sepse.

**Resultados:** Os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e IL-6, mas não IL-10 e proteínas carboniladas, apresentaram correlação significativa com o escore de gravidade SNAPPE-II ( $r=0,385$ ,  $p=0,017$  e  $r=0,435$  /  $p=0,02$ , respectivamente). Não houve relação dos marcadores com a mortalidade dos pacientes.

**Conclusão:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e IL-6 têm uma correlação de média a moderada com o escore de gravidade SNAPPE-II, mas não com mortalidade.

**Descritores:** Sepse/sangue; Recém-nascido; Sangue fetal/química; Unidades de terapia intensiva neonatal; Estresse oxidativo; Interleucina-6; Interleucina-10

### INTRODUÇÃO

Sepse é uma síndrome complexa, causada por resposta inflamatória sistêmica sem controle efetivo do organismo de um indivíduo, de origem infecciosa, caracterizada por manifestações múltiplas, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou mesmo a morte.<sup>(1)</sup> A sepse neonatal precoce ocorre nos primeiros seis dias de vida e a sepse neonatal tardia após a primeira semana de vida (>6 dias). A importância clínica dessa distinção é que na sepse precoce os microorganismos são adquiridos durante o parto. Já na sepse tardia, é mais frequentemente causada por organismos adquiridos após o nascimento, através de fontes nosocomiais ou comunitárias.<sup>(2,3)</sup>

A identificação de pacientes de alto risco é um grande desafio no cuidado de pacientes críticos.<sup>(4,5)</sup> A maioria das decisões nos pacientes com sepse severa é baseada na clínica e na análise laboratorial,<sup>(4)</sup> ambas com pouca acurácia. Além disso, é

necessário um maior entendimento na fisiopatologia da inflamação sistêmica, sendo importante identificar preditores de gravidade mais acurados.<sup>(4,6)</sup>

Ao longo dos anos, vários marcadores foram sugeridos para o diagnóstico precoce da sepse, dentre os quais está a dosagem sérica de algumas citocinas - interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e de seus receptores solúveis (receptor do TNF), proteínas de fase aguda (proteína C-reativa) e procalcitonina.<sup>(7-9)</sup> Recentemente demonstramos relação entre marcadores oxidativos e desenvolvimento de sepse neonatal,<sup>(10)</sup> mas há carência na literatura de informação sobre marcadores precoces de gravidade de sepse neonatal. Neste sentido o presente estudo pretende determinar a relação entre marcadores inflamatórios e oxidativos de sangue de cordão umbilical com gravidade de sepse neonatal precoce.

## MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal de caso-controle, retrospectivo, documental, onde foi coletado sangue do cordão umbilical de 120 recém-nascidos prematuros consecutivos na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição, Tubarão, SC, Brasil, no período de fevereiro a setembro de 2005 conforme previamente descrito.<sup>(10)</sup> Os dados foram primariamente coletados para determinar a relação dos biomarcadores com diagnóstico de sepse neonatal.<sup>(10)</sup> Neste estudo utilizamos os dados coletados dos casos do estudo original. A aprovação do estudo foi dada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, sob o número de protocolo 168/2005.

### Coleta das amostras

As amostras do sangue de cordão umbilical foram obtidas apertando o cordão umbilical após o parto do recém-nascido e antes da entrega da placenta em um tubo de vidro. Essas amostras foram centrifugadas a 1000g por 10 minutos e adicionado nitrogênio líquido e armazenado a - 80 ° C até serem analisadas.

### Critérios de inclusão e exclusão

Neste estudo, foram incluídos neonatos prematuros (<37 semanas de gestação) com pelo menos um outro fator de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal: ruptura prematura de membranas > 18 horas antes do parto, colonização materna com o estreptococo do grupo B, febre intraparto com a temperatura axilar superior a 37,5 ° C, ou a presença de corioamnionite. Alguns parâmetros analisados podem ser elevados em crianças nascidas a partir de gestantes com pré-eclâmpsia e/ou diabetes e em bebês com restrição de crescimento intra-uterino, sendo, neste estudo, excluídos.

### Diagnóstico de sepse

Com base na *Conferência de Consenso sobre Definições de Sepse e de Disfunção de Múltiplos Órgãos em pediatria de 2002*, a sepse foi definida comprovada, quando uma cultura de sangue ou cultura bacteriana de um sítio normalmente estéril foi positiva para um patógeno provável e, como altamente provável, se as culturas bacterianas foram negativas, tendo a presença de uma síndrome clínica e biológica associadas à infecção.

Evidências clínica e biológica da presença de sepse incluem: hiperleucocitose, definida por uma contagem de leucócitos no sangue > 25000/mm<sup>3</sup>; leucopenia, definida como uma contagem de leucócitos no sangue < 4000/mm<sup>3</sup>; neutropenia, definida como uma contagem de neutrófilos do hemograma < 1300/mm<sup>3</sup>; trombocitopenia, definida como uma contagem de plaquetas < 150000/mm<sup>3</sup>; hiperglicemia, definida como glicemia > 7mmol /l e proteína C reativa > 20g/l. Quarenta recém-nascidos preencheram os critérios (sepse comprovada n = 20; altamente provável n = 20) e foram incluídos no grupo sepse.

Como parâmetro de gravidade de sepse, determinamos cinco variáveis medidas no diagnóstico da síndrome: proteína C reativa, lactato, bicarbonato, glicemia e o escore SNAPPE-II.<sup>(11)</sup> Além disto, os pacientes foram seguidos até morte ou alta da UTI para determinar mortalidade na terapia intensiva.

### Marcadores inflamatórios e oxidativos em sangue de cordão umbilical

Para a determinação de danos oxidativos, foi determinado o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de proteína carbonil. Para a mensuração das TBARS, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma, St. Louis, MO), e, em seguida, aquecidas em um banho de água fervente por 15 minutos. Os equivalentes de malondialdeído foram determinados pela absorvância a 535nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma, St. Louis, MO) como padrão externo. BHT foi adicionado às amostras para impedir a produção de malondialdeído durante a análise.<sup>(12)</sup> Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (nmol) por miligrama de proteína.

O dano oxidativo às proteínas foi avaliado pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina (Sigma, St. Louis, MO) sendo a absorvância lida a 370nm<sup>(13)</sup> e os resultados apresentados como nmol/mg proteína.

Para análise dos marcadores inflamatórios, foram utilizados kits de comerciais enzimáticos imunoabsorventes para a

detecção de IL-6 e IL-10 (Quantikine, R & D Systems Europe, Abingdon, UK), sendo os resultados expressos como pg/mg proteína.

A relação dos marcadores com a mortalidade foi comparada pelo teste *t* de Student. Correlação entre os parâmetros estudados foi feita por correlação de Pearson. Distribuição normal das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Um nível de significância de 0,05 ou menos foi considerado estatisticamente significativo. *A posteriori* foi calculado o poder da amostra (tendo em vista que o estudo foi originalmente desenhado para outro fim) e com 10 pacientes no grupo não-sobrevivente, para um alfa = 0.05 e um poder de 0.80 permitiria detectar uma diferença média de 20% projetando um sigma de 0.15 nos marcadores analisados.

## RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos 40 pacientes, sendo 20 casos de sepse neonatal comprovada e 20 casos de sepse neonatal provável. Dentre estes, 30 pacientes sobreviveram e 10 pacientes vieram a óbito. Variáveis clínicas relevantes foram publicadas previamente.<sup>(10)</sup>

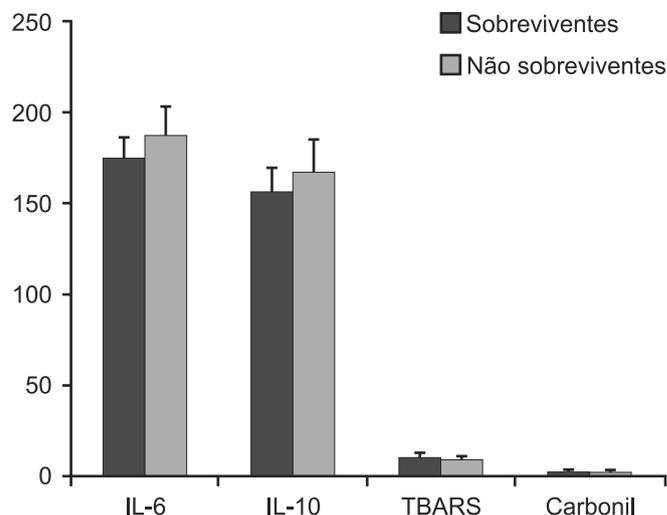
TBARS apresentou correlação média e significativa com o escore de gravidade SNAPPE-II ( $r=0,385$  /  $p=0,017$ ), mas não com glicemia sérica ( $r=0,288$  /  $p=0,08$ ), proteína C reativa ( $r=0,027$  /  $p=0,87$ ), lactato ( $r=-0,233$  /  $p=0,49$ ) ou bicarbonato ( $r=0,10$  /  $p=0,95$ ). A IL-6 apresentou correlação moderada com o escore de gravidade SNAPPE-II ( $r=0,435$  /  $p=0,02$ ), mas não com bicarbonato ( $r=0,341$  /  $p=0,09$ ), proteína C reativa ( $r=0,124$  /  $p=0,21$ ), lactato ( $r=0,221$  /  $p=0,25$ ) ou glicemia ( $r=0,12$  /  $p=0,32$ ). Não houve correlação significativa entre os níveis de proteínas carboniladas e qualquer dos parâmetros de gravidade analisados, mesmo padrão observado para os níveis de IL-10.

Nenhum dos parâmetros analisados foi relacionado com mortalidade nestes pacientes (Figura 1).

## DISCUSSÃO

A busca por um marcador ideal, com alta sensibilidade e especificidade, representa um desafio em diversas doenças estudadas pela área da saúde. O presente estudo não pode determinar um papel importante dos marcadores avaliados no prognóstico e gravidade do paciente com sepse neonatal precoce. Apesar de haver correlação significativa entre IL-6 e TBARS com escore SNAPPE-II esta correlação é média a moderada e nenhum dos marcadores podem prever desfecho nestes pacientes.

Já se vem estudando marcadores precoces de sepse neonatal há alguns anos, e a utilização das interleucinas em sangue



**Figura 1- Níveis de marcadores inflamatórios e de dano oxidativo coletados em sangue de cordão e sua relação com mortalidade em pacientes com sepse neonatal.**

IL-6 - interleucina-6; IL-10 - interleucina-10; TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

de cordão parece promissor. Níveis elevados de IL-6 e IL-1 $\beta$  em sangue de cordão podem, com um alto índice de confiança, confirmar ou descartar sepse neonatal.<sup>(10,14-17)</sup> Recentemente um algoritmo que inclui os níveis de IL-6 se mostrou altamente efetivo em selecionar recém-nascidos com grande probabilidade de desenvolver sepse neonatal precoce.<sup>(18)</sup> A IL-6 é considerada importante marcador da resposta inflamatória sistêmica, caracterizando-se como citocina “de alarme”, pois alcança rapidamente picos de concentração sérica em quadros infecciosos. Eleva-se até de 2 a 4 dias antes do aparecimento dos sintomas, mantendo-se estável nas primeiras horas do quadro, com seus níveis decaindo após 24 horas do estabelecimento da sepse.<sup>(17)</sup> Níveis de IL-6 materna são capazes de prever nascimento prematuro e desfechos desfavoráveis nesta população, predominantemente hemorragia intraventricular.<sup>(19)</sup> Apesar de a IL-6 em sangue de cordão parecer ser promissora como marcadora diagnóstica<sup>(10)</sup> seu uso como marcador de desfecho não é apoiado pelos nossos resultados. Como alguns dos marcadores apresentam correlação até moderada com marcadores clássicos de gravidade, poderiam ser utilizados para antecipação da gravidade da doença, mesmo antes da presença de sinais clínicos ou bioquímicos de infecção.

A IL-10 é a principal citocina contra-reguladora da resposta imune inata. Atua como citocina antiinflamatória agindo por “feedback” negativo, ou seja, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Elevadas concentrações de IL-10 reduzem a produção de TNF- $\alpha$ ; IL-6 e IL-8 pelos monócitos, enquanto ativam (por “feedback” positivo) a produção

de IL-1Ra. A supressão de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6, o que sugere que esta citocina possua grande poder antiinflamatório, tanto que quando a IL-10 endógena é neutralizada por anticorpos monoclonais, observa-se que a mortalidade aumenta.<sup>(14,16,17)</sup> A magnitude da resposta da IL-10 parece correlacionar-se com a gravidade do processo inflamatório e a concentração de citocinas pró-inflamatórias, com a ativação da TNF- $\alpha$ . Níveis elevados de IL-10 e de IL-6 indicam quadro infeccioso no neonato e a IL-10 permanece elevada por 48 horas após o início do quadro infeccioso.<sup>(18)</sup> Apesar disto, nossos resultados não apontam para um papel na determinação de IL-10 em sangue de cordão como marcador prognóstico de sepse neonatal.

Além disso, a sepse promove um estado de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e antioxidantes, gerando um excesso de radicais livres de oxigênio. Essas moléculas têm a função de destruir o agente agressor, porém, não são específicas e podem determinar lesão no paciente.<sup>(20)</sup> Durante a sepse ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode culminar com dano tecidual.<sup>(21)</sup> Comprovadamente, durante os quadros de sepse neonatal há um aumento da produção de EROs e um evidente desequilíbrio entre pró e anti-oxidantes<sup>(10,20,22)</sup> e os níveis destas moléculas podem estar relacionadas com o desenvolvimento de sepse neonatal.<sup>(10)</sup> Apesar disto, não demonstramos relação entre gravidade de sepse neonatal e níveis de marcadores de dano oxidativo.

Algumas limitações devem ser pontuadas na interpretação de nossos resultados. Não dispomos da informação do tempo decorrido entre o parto e o desenvolvimento de sepse. Devido a característica cinética das variações destes marcadores isto pode influenciar na interpretação dos resultados. Segundo, a amostra aqui estudada inclui paciente com sepse comprovada e provável, então os resultados devem ser interpretados a luz desta limitação. Como demonstramos previamente,<sup>(10)</sup> existem diferenças em relação ao peso de nascimento e APGAR no primeiro minuto entre estas populações, portanto trata-se de uma população heterogênea o que pode influenciar nossos resultados. Terceiro, nossa amostra apresenta poder para detectarmos uma diferença de 20% nos marcadores analisados, neste sentido como as diferenças aqui detectadas são menores do que este nível os resultados podem ser negativos em rela-

ção ao desfecho por este motivo. Entretanto, acreditamos que variações menores do que 20% nestes marcadores carecem de significado biológico e por isso esta limitação é de menor importância.

## CONCLUSÃO

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e IL-6 têm uma correlação de média a moderada com o escore de gravidade SNAPPE-II, mas não com mortalidade. Neste contexto, podem ser marcadores precoces que alertam gravidade, mas não prognóstico, antes mesmo da instalação do quadro infeccioso.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** Neonatal sepsis is a complex syndrome involving an uncontrolled systemic inflammatory response associated with an infection. It may result in the dysfunction or failure of one or more organs or even death. Given its high incidence in premature neonates, the identification of prognostic factors to optimize the early diagnosis and therapeutic interventions are highly desirable. This objective study determine the relationship between inflammatory markers and oxidative parameters as prognostic factors in early neonatal sepsis.

**Methods:** We conducted a prospective observational study by collecting data from 120 patients in the maternity unit of a university hospital. Preterm (<37 weeks of pregnancy) infants with at least one additional risk factor for neonatal sepsis were included. The levels of interleukin (IL)-6, IL-10, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls and their association with sepsis severity were determined in the cord blood.

**Results:** Levels of IL-6 and TBARS, but not IL-10 and protein carbonyls, demonstrated a mild to moderate correlation with the SNAPPE-II severity score ( $r=0.435$ ,  $p=0.02$  and  $r = 0.385$ ,  $p = 0.017$ , respectively). No correlations were found between these markers and mortality.

**Conclusion:** TBARS and IL-6 have a mild to moderate correlation with SNAPPE-II, but none of the studied markers were able to predict mortality in our sample.

**Keywords:** Sepsis/blood; Infant, newborn; Fetal blood/chemistry; Intensive care units, neonatal; Oxidative stress; Interleukin-6; Interleukin-10

---

## REFERÊNCIAS

1. Carvalho PRA, Trotta EA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. J Pediatr (Rio J). 2003;79 (Supl 2):S195-204.
2. Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005;6(1):2-8. Review.

3. Bizarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics*. 2005;116(3):595-602.
4. Rubin LG, Sánchez PJ, Siegel J, Levine G, Saiman L, Jarvis WR; Pediatric Prevention Network. Evaluation and treatment of neonates with suspected late-onset sepsis: a survey of neonatologists' practices. *Pediatrics*. 2002;110(4):e42.
5. Holmes A, Doré CJ, Saraswatula A, Bamford KB, Richards MS, Coello R, Modi N. Risk factors and recommendations for rate stratification for surveillance of neonatal healthcare-associated bloodstream infection. *J Hosp Infect*. 2008;68(1):66-72.
6. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49.
7. Marshall JC, Reinhart K; International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med*. 2009;37(7):2290-8. Review.
8. Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Sepse neonatal: diagnóstico e tratamento. *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75(Supl 1):S57-62.
9. Cianciarullo MA, Ceccon MEJ, Yamamoto L, Del Negro GMB, Okay TS. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. *Rev Bras Crescimento Desenvol Hum*. 2008;18(2):135-47.
10. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, Constantino L, Machado R, Ritter C, Dal-Pizzol F. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med*. 2009;10(4):467-71.
11. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr*. 2001;138(1):92-100.
12. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-21.
13. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346-57.
14. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89(3):F229-35.
15. Malamitsi-Puchner A, Protonariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum Dev*. 2005;81(4):387-92.
16. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol*. 2005;174(6):3765-72.
17. Zeitoun AA, Gad SS, Attia FM, Abu Maziad AS, Bell EF. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(4):299-305.
18. Buhimschi CS, Bhandari V, Dulay AT, Nayeri UA, Abdel-Razeq SS, Pettker CM, et al. Proteomics mapping of cord blood identifies haptoglobin "switch-on" pattern as biomarker of early-onset neonatal sepsis in preterm newborns. *PLoS One*. 2011;6(10):e26111.
19. Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, et al. Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. *Am J Perinatol*. 2010;27(8):631-40.
20. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005;88(3):228-36.
21. Ritter C, Andrades M, Frota Júnior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med*. 2003;29(10):1782-9.
22. Mrozek JD, Georgieff MK, Blazar BR, Mammel MC, Schwarzenberg SJ. Effect of sepsis syndrome on neonatal protein and energy metabolism. *J Perinatol*. 2000;20(2):96-100.