

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PREDITORES URINÁRIOS DE SEPSE NEONATAL TARDIA

DANIELA SILVA RODRIGUES DA COSTA

UBERLÂNDIA

2017

DANIELA SILVA RODRIGUES DA COSTA

PREDITORES URINÁRIOS DE SEPSE NEONATAL TARDIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração : Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah

Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837p
2017

Costa, Daniela Silva Rodrigues da, 1981
Preditores urinários de sepse neonatal tardia / Daniela Silva Rodrigues da Costa. - 2017.
56 f. : il.

Orientadora: Vânia Olivetti Steffen Abdallah.
Coorientadora: Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo.
Coorientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Recém-nascidos - Peso baixo - Teses.
3. Sepse Neonatal - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Abdallah, Vânia
Olivetti Steffen. II. Azevedo, Vivian Mara Gonçalves de Oliveira. III.
Goulart Filho, Luiz Ricardo. IV. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Silva Rodrigues da Costa

PREDITORES URINÁRIOS DE SEPSE NEONATAL TARDIA

Presidente da banca (orientadora): Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Banca Examinadora:

Titular: Profa. Dra. Marisa Márcia Mussi

Instituição: Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

Titular: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Suplente: Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Ambrósio

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Marco Aurélio e filho Gustavo, aos meus pais Jair e Sueli e a minha irmã Quézia que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, a presença de vocês significou segurança e certeza de que não estou sozinha nesta caminhada. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela paz que trouxe ao meu coração em todos os momentos e pela certeza de poder confiar, e descansar Nele.

Aos pais e seus bebês que permitiram a realização deste projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, especialmente por ter acreditado em mim e em minha capacidade na realização do projeto e por sua paciência, disposição e competência.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo por sua disponibilidade, paciência e competência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por sua disposição em ajudar e guiar na busca da excelência e também a toda a equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia em especial, Patricia Terra, Larissa Prado, Aline Teodoro e Roberta.

A toda a equipe multidisciplinar do Serviço de Neonatologia pelo apoio. Agradeço, a toda a equipe de enfermagem, e administrativa por sua colaboração.

Em especial a Enfermeira Waleska, minha coordenadora, e todas as Enfermeiras, por acreditarem em mim e se esforçarem para que eu pudesse concluir esta jornada.

Aos professores participantes do exame de qualificação, Profa. Dra. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia e Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Ambrósio, pelas sugestões e correções.

Aos professores participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Profa. Dra. Marisa Márcia Mussi, Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Ambrósio por aceitarem tal convite com tanto carinho e disposição.

Aos meus pais e irmã, pelo incentivo e apoio incondicional, e por sempre me fazerem entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao meu esposo Marco Aurélio e meu filho Gustavo, que me deram apoio e incentivo nas horas de desânimo e cansaço e por compreenderem os momentos de minha ausência dedicados ao estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com esta conquista!

Muito obrigada a todos, sem vocês não seria possível.

RESUMO

Introdução: A sepse neonatal é uma das principais causas de morbimortalidade em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, e a dificuldade no seu diagnóstico precoce tem levado ao uso excessivo de antibióticos e ao surgimento de microrganismos resistentes. A busca de novos marcadores bioquímicos, que sejam capazes de prever precocemente o risco de desenvolver sepse, tem sido alvo de muitos estudos, em especial os biomarcadores urinários, cuja coleta é realizada de forma segura e não invasiva. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de sepse neonatal, em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer, por meio dos biomarcadores urinários. **Método:** Estudo realizado com recém-nascidos menores que 34 semanas de idade gestacional e peso de nascimento menor que 1500 gramas. A coleta de urina foi realizada entre 48-72h de vida e foram dosados 27 biomarcadores. Os recém-nascidos incluídos foram divididos em dois grupos de acordo com a evolução de cada um: GC – grupo controle (não desenvolveu sepse) e GS – grupo de estudo (desenvolveu sepse tardia). **Resultados:** 35 recém-nascidos foram avaliados, 12 do GC e 23 do GS. Os resultados evidenciaram elevação precoce estatisticamente significativa em 11 biomarcadores no GS em relação ao GC (IL-4 ($p=0,042$), IL-5 ($p=0,039$), IL-7 ($p=0,022$), IL-9 ($p=0,009$), IL-15 ($p=0,015$), IL-17A ($p=0,009$), TNF- α ($p=0,015$), MiP-1 α ($p=0,011$), MiP-1 β ($p=0,002$), RANTES ($p=0,021$) e G-CSF ($p=0,009$)). A ventilação mecânica foi a única variável clínica que apresentou associação estatisticamente significativa com 6 destes 11 biomarcadores (IL-5 $p=0,04$; IL-7 $p=0,02$; IL-15 $p=0,03$; IL-17A $p=0,03$; MiP-1 β $p=0,02$ e G-CSF $p=0,04$). **Conclusão:** A urina se apresenta como um fluido promissor na dosagem de biomarcadores e com grande potencial para avaliação do risco de sepse neonatal. A elevação precoce na urina destas citocinas, sugere que estas podem ser utilizadas como preditores da sepse tardia neonatal.

Palavras chaves: recém-nascido; muito baixo peso ao nascer; urina; citocinas; biomarcadores; sepse neonatal

ABSTRACT

Introduction: Neonatal sepsis is one of the main causes of morbimortality in the Neonatal Intensive Care Units, and the difficulty in its early diagnosis has led to the excessive use of antibiotics and the emergence of resistant microorganisms. The search for new biochemical markers, that are capable to early predict the risk of developing sepsis, has been the subject of many studies, especially urinary biomarkers, which are collected safely and non-invasively. The objective of this study was to evaluate developing neonatal sepsis in very low birth weight preterm infants, using urinary biomarkers. **Method:** The study was performed included newborns with gestational age less than 34 weeks and birth weight less than 1500 grams. Urine collection was performed between 48-72h of life and 27 biomarkers were dosed. The study included newborns younger than 34 weeks gestational age and birth weight less than 1500 grams. The included newborns were divided into two groups according to the evolution of each: GC - control group (did not develop sepsis) and GS - a study group (developed late sepsis). **Results:** 35 newborns were evaluated, 12 of the CG and 23 of the GS. The results showed a statistically significant early elevation in 11 GS biomarkers in relation to the CG (IL-4 ($p = 0.042$), IL-5 ($p = 0.039$), IL-7 ($P = 0.015$), IL-15 ($p = 0.015$), IL-17A ($p = 0.009$), TNF- α ($p = 0.015$), MiP- 0.021) and G-CSF ($p = 0.009$)). Mechanical ventilation was the only clinical variable that presented a statistically significant association with 6 of these 11 biomarkers (IL-5 $p = 0.04$, IL-7 $p = 0.02$, IL-15 $p = 0.03$, IL-17A $p = 0.03$, MiP-1 β $p = 0.02$ and G-CSF $p = 0.04$) **Conclusion:** Urine is a promising fluid in the dosage of biomarkers and with great potential for the evaluation of the risk of neonatal sepsis. The early increase in the urine of these cytokines suggests that these can be used as predictors of late neonatal sepsis.

Key words: newborn; Very low birth weight; urine; Cytokines; Biomarkers; Neonatal sepsis

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figure 1** – Flowchart of sample selection 32
- Figure 2** – Interleukins (IL) with significant p value IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-17a in studied groups 37
- Figure 3** - Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MiP) MiP-1 α , MiP-1 β , regulated on activation normal T -expressed and secreted (RANTES), and tumoral necrosis factor (TNF- α) in studied groups, with significant p value 38

LISTA DE TABELAS/ QUADROS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Quadro 1. Principais funções das citocinas estudadas	21
-------------------------------------------------------------	----

ARTIGO

Table 1 - Very low birth weight infants' and maternal characteristics.	34
Table 2 - Urinary biomarkers in diferente groups studied	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

RN	Recém-nascido
RNT	Recém-nascido termo
RNPT	Recém-nascido pré-termo
MBP	Muito baixo peso
IG	Idade Gestacional
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
g	gramas
IL – 1 β	Interleucina 1 beta
IL – 1ra	Interleucina 1 receptor antagonista
IL – 2	Interleucina 2
IL – 4	Interleucina 4
IL – 5	Interleucina 5
IL – 6	Interleucina 6
IL – 7	Interleucina 7
IL – 8	Interleucina 8
IL – 9	Interleucina 9
IL – 10	Interleucina 10
IL – 12p70	Interleucina 12 porção 70
IL – 13	Interleucina 13
IL – 15	Interleucina 15
IL – 17a	Interleucina 17a
MIP – 1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP – 1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
IFN – γ	Intérferon gamma
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
RANTES	Regulador na ativação normal de células T expressa e secretada

Eotaxin	Eotaxina
IP – 10	Proteína quimiotática
MCP – 1	Fator de ativação de monócitos-1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócitos e macrófagos
TGF- β	Fator de transformação do crescimento

ARTIGO

VLBW	Very low birth weight
IL – 1 β	Interleukin 1 beta
IL – 1ra	Interleukin 1 antagonist receptor
IL – 2	Interleukin 2
IL – 4	Interleukin 4
IL – 5	Interleukin 5
IL – 6	Interleukin 6
IL – 7	Interleukin 7
IL – 8	Interleukin 8
IL – 9	Interleukin 9
IL – 10	Interleukin 10
IL – 12p70	Interleukin 12 portion 70
IL – 13	Interleukin 13
IL – 15	Interleukin 15
IL – 17A	Interleukin 17A
MIP – 1 α	Macrophage 1 alpha inflammatory protein
MIP-1 β	Macrophage 1 beta inflammatory protein
IFN- γ	Gamma interferon
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
Eotaxin	Eotaxin

IP – 10	Chemotactic protein
MCP-1	Monocyte activation factor 1
VEGF	Vascular endothelial growth fator
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
PDGF	Platelet derived growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1- O Recém-nascido pré-termo	16
2.2- O Sistema Imune e a Resposta Inflamatória do RNPT	16
2.3- Sepses Neonatal	19
2.4. Os Biomarcadores	20
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
ARTIGO – Urinary predictors of late neonatal sepsis	26
Abstract	28
Highlights	29
Abbreviations	29
1. Introduction	30
2. Method	31
2.1. Study subjects and sample collection	31
2.2. Measurements	32
2.3. Statistical analysis	33
3. Results	33
4. Discussion	39
Conflict of interest statement	42
Authorship contributions	42
Funding	42
Acknowledgments	42
5. References	43
REFERÊNCIAS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	46
APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
APENDICE B – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS	54
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	56
ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	57

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias, as novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas e o aperfeiçoamento dos profissionais, tem possibilitado a sobrevivência de recém-nascidos com peso e idade gestacional cada vez menores (GOLDENBERG et al., 2008; PASSINI et al., 2014).

No período neonatal, a sepse representa uma das doenças mais graves com altas taxas de morbidade e mortalidade. Em todo o mundo, 15% das mortes neonatais são causadas por sepse, e este índice aumenta quanto menor o peso e a idade gestacional ao nascer (WHO, 2012). Isto acontece, muitas vezes, pela inabilidade do sistema imune, em especial nos recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer (RNPT MBP), em responder, de forma adequada, contra os agravos infecciosos (HUANG et al., 2016; LEVY, 2007).

Para o diagnóstico da sepse, os sinais e sintomas clínicos são inespecíficos e as alterações de exames laboratoriais, muitas vezes, acontecem de maneira tardia. A cultura do sangue é considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da sepse, porém apresenta baixa sensibilidade e o resultado definitivo não é imediato. Por isso, faz-se necessário o início precoce de antibióticos, de maneira empírica (COLAIZY et al., 2016; FREITAS et al., 2012).

Estudos têm sido realizados na busca da descoberta de novos biomarcadores capazes de avaliar o risco infeccioso e o diagnóstico precoce da sepse (SARAFIDIS et al., 2017; SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013). Alguns marcadores têm sido utilizados na prática clínica como a proteína C reativa e a procalcitonina. Outros ainda em processo de investigação científica (PRUCHA, BELLINGAN, ZAZULA, 2015; AURITI et al., 2012).

A dosagem de biomarcadores urinários tem se mostrado promissora quanto a avaliação de risco, diagnóstico e prognóstico de sepse, pela possibilidade de serem dosados de maneira efetiva neste fluido corporal (SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER, et al., 2014). A principal vantagem é a forma de coleta da urina, sendo esta não invasiva e indolor, permitindo a obtenção de várias amostras para acompanhamento. Portanto, mais segura e vantajosa para o recém-nascido (RN).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- O Recém-nascido pré-termo

O grande avanço na terapia intensiva nos últimos anos, em especial da neonatologia, com o desenvolvimento de novas tecnologias e possibilidades diagnósticas e terapêuticas, aperfeiçoou os cuidados dispensados ao RN. Consequentemente, tem sido observado maior sobrevida de crianças nascidas prematuramente e/ou com baixo peso, sendo hoje a prematuridade a principal causa de internação em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (NG et al., 2006; WYNN, 2017).

O período neonatal é definido como aquele que se inicia ao nascimento e termina aos 28 dias de vida completos. Os RN são classificados quanto ao peso ao nascer e a idade gestacional. Quanto ao peso de nascimento são classificados como baixo peso (menor que 2500g), muito baixo peso (menor que 1500g) e extremo baixo peso (menor que 1000g). Quanto à idade gestacional são classificados em recém-nascidos pré-termo (RNPT) aqueles que ao nascimento tenham até 37 semanas incompletas, em recém-nascidos de termo (RNT) aqueles com 37 semanas completas até 42 semanas incompletas e em recém-nascido pós-termo aqueles com 42 semanas completas ou mais. Os RNPT ainda podem ser classificados em pré-termo moderado ou tardio (IG entre 32 e <37 semanas), muito pré-termo, (IG entre 28 e <32 semanas), e extremamente pré-termo (IG menor que 28 semanas de gestação) (WHO, 2012)

A classificação dos RN quanto ao peso e IG são de fundamental importância para a prática diária no atendimento ao RN. O conhecimento destas variáveis permite o manejo adequado do RN, na antecipação diagnóstica e na instituição precoce de tratamentos (SHAPIRO-MENDONZA et al., 2008; KARDATZKE, ROSE, ENGLE, 2017; WHO, 2012).

2.2- O Sistema Imune e a Resposta Inflamatória do RNPT

O sistema imune tem como função principal proteger o indivíduo contra invasores externos, podendo ser vírus, bactérias, parasitas, alérgenos, mantendo a homeostase do organismo. A primeira linha de defesa do organismo é composta por barreiras físicas

como a pele queratinizada, as mucosas do trato respiratório e as barreiras químicas como as enzimas (CRUVINEL et al., 2010; MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

A função imune é dividida em inata e adaptativa (LEVY, 2007). A imunidade inata, também chamada de não específica ou natural, é a primeira linha de defesa do organismo, direcionada contra qualquer tipo de antígeno, com a finalidade de controlar a infecção. É composta por neutrófilos e células apresentadoras de antígenos e capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos e apresentá-los à receptores, iniciando, desta forma, a resposta inflamatória (LEVY, 2007; MUSSAP et al., 2013; SUGITHARINI et al., 2014; WYNN; WONG, 2010; YE et al., 2017).

A resposta imune adaptativa, também conhecida como específica, é aquela adquirida após a exposição a um antígeno, como na vacinação, ou após uma infecção. É capaz de gerar resposta eficaz e específica quando o organismo é exposto novamente ao antígeno. Esta resposta é mediada por células (linfócitos T sensibilizados) e por anticorpos (linfócitos B-humoral). No recém-nascido pré-termo esta resposta é ineficaz e inespecífica devido à baixa produção de células T e B, não gerando uma adequada memória imunológica. Portanto, a defesa inicial do RNPT é baseada na imunidade inata (LEVY, 2007; YE et al., 2017).

O desenvolvimento do sistema imune se inicia por volta da 6ª semana de gestação estendendo-se até o final dos 10 anos de vida. Durante a gestação, o feto se mantém em contato com o líquido amniótico, responsável por estimular os tecidos linfoides por meio de várias citocinas e fatores de crescimentos, sendo fundamental para o adequado desenvolvimento intra-útero. (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017).

O nascimento prematuro interrompe este estado anti-inflamatório, causando uma desordem nas resposta anti e pró-inflamatórias, quando o RNPT entra em contato com vários antígenos do meio externo (GOMEZ-GALLEGO et al., 2016; GLASS et al., 2015; KELLY; COUTTS, 2000).

Após o nascimento, o RNPT fica exposto a inúmeras situações de estresse e o sistema imune libera citocinas pró-inflamatórias em pequenas quantidades, sendo estas responsáveis pela amplificação e perpetuação da resposta imune (LUSYATI et al., 2013; MACHADO et al., 2014; POLIN; RANDES, 2010; SUGITHARINI et al., 2013; TREND et al., 2016; WYNN; WONG, 2010; YE, et al. 2017).

Outro fator importante é que, o extrato córneo, responsável pela função de barreira epidérmica, só se torna maduro entre 32 e 34 semanas de idade gestacional até as duas

primeiras semanas pós-natal, tornando assim a epiderme mais suscetível e incapaz de realizar o bloqueio dos microrganismos (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005; RIZZAN, 2011). O RNPT, muitas vezes logo após o nascimento é submetido a vários procedimentos invasivos que provocam quebra das barreiras primárias de proteção, consequente aumentando a susceptibilidade à infecções e ativação da resposta inflamatória (MUSSI-PINHATA; DO NASCIMENTO, 2001; ROMANELLI, et al., 2013)

Ressalta-se ainda que a alimentação enteral precoce é fundamental para estimular o desenvolvimento do trato gastrointestinal dos RNPT, atuando também na prevenção da sepse (FREITAS, et al., 2011). O leite humano possui compostos celulares e bioativos advindos da circulação materna capazes de estimular as defesas inatas contra os microrganismos patogênicos. Além disso, possui fatores antimicrobianos, anti-inflamatórios, imuno-moduladores e células de defesa como neutrófilos, macrófagos e linfócitos maternos. (RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015; RODRIGUEZ et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2010).

A quebra de qualquer barreira protetora permite o contato entre os agentes patogênicos e o organismo desencadeando a ativação de células dendríticas e macrófagos, principais produtores de interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α). A ação destes últimos, voltam para os macrófagos, determinando resposta autócrina através da produção e secreção de outras citocinas inflamatórias como: IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, INF- γ e outros fatores de crescimento. O TNF- α e a IL-1 ainda atuam no endotélio vascular produzindo hipertermia e atração de novos polimorfonucleares com leucocitose, degranulação de neutrófilos e liberam óxido nítrico, causando vasodilatação local, seguida de edema e hipotensão. (ANDRADE et al., 2015; BHANDARI, 2014; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; LEVY, 2007; MUSSAP et al., 2013).

Desta forma inicia-se a resposta inflamatória sistêmica (SIRS), através da amplificação da resposta pró-inflamatória, com a atração de neutrófilos e outras células de defesa, o que aumenta consideravelmente as citocinas pró-inflamatórias. (DENNING et al., 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017; GLASS et al., 2015; NG et al., 2010; SEGURA-CERVANTES et al., 2016; SHARMA et al., 2017). A ativação sistêmica das citocinas pró-inflamatórias provoca lesões em diferentes órgãos e consumo de plaquetas durante a coagulação intravascular disseminada, desencadeando a disfunção de múltiplos órgãos (MACHADO et al., 2014; SUGITHARINI; PREMA;

BERLA THANGAM, 2013; SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; WYNN; WONG, 2010).

Para equilibrar a resposta inflamatória, inicia-se um aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e TGF- β), conhecida como síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória, na busca da homeostase do organismo (MACHADO et al., 2014).

2.3- Sepses Neonatal

A sepsis é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada frente ao agente infeccioso (SINGER et al., 2016). Considerada uma condição sistêmica de origem bacteriana, viral ou fúngica associado a alterações hemodinâmicas e outras manifestações clínicas. (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

Atualmente, a sepsis é a principal causa de óbito em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (SHAH; PADBURY, 2014; DESSI et al., 2014). A incidência descrita nos RNPT MBP varia de 20 a 30% em todo o mundo. (DESSI et al., 2014; GEBREMEDHIM; BERHE; GEBREKIRSTOS, 2016; HUANG et al., 2016). Esta disfunção orgânica está associada a maior tempo de internação, elevação dos custos hospitalares e, a longo prazo, comprometimento do desenvolvimento neuropsicomotor (GEBREMEDHIM; BERHE; GEBREKIRSTOS 2016)

A sepsis neonatal é dividida em precoce, que ocorre nos primeiras 48-72h de vida, relacionada a fatores maternos e de parto, e tardia, quando ocorre após 72hs de nascimento e está associada a assistência à saúde (SHAH; PADBURY, 2014; GILFILLAN; BHANDARI, 2017).

Pode ser definida ainda como clínica, sem confirmação laboratorial, ou laboratorialmente confirmada, com cultura de sangue positiva. Dentre os principais sintomas clínicos temos: instabilidade térmica (hipotermia ou hipertermia), piora do desconforto respiratório, com aumento das necessidades de oxigênio suplementar ou outras modalidades de suporte ventilatório, intolerância alimentar, intolerância à glicose hipotatividade/letargia, instabilidade hemodinâmica (hipotensão arterial e vasodilatação periférica), entre outros. Seu diagnóstico é difícil, pois os sinais e sintomas são os mesmos de outras condições não infecciosas próprias deste período de vida, como imaturidade do

centro regulador da temperatura, síndrome do desconforto respiratório do RN e trato gastrointestinal pouco desenvolvido, o que dificulta o diagnóstico precoce (BHANDARI, 2014; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; CARVALHO et al., 2015; DENNING et al., 2017; GILFILLAN, 2017; GLASS, 2015; MACHADO et al., 2014; RIOS; ROMANELLI, 2013; SHANE; STOLL, 2014; WYNN; WONG, 2010).

Como os sinais e sintomas clínicos são inespecíficos para o diagnóstico, utiliza-se também exames laboratoriais, sendo a cultura do sangue, considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da sepse. No entanto, o resultado definitivo deste exame é tardio, sendo ainda de baixa sensibilidade (DONG; SPEER, 2015; MITHAL et al., 2017). Deste modo, a antibioticoterapia é frequentemente instituída de maneira empírica, antes mesmo dos resultados dos exames laboratoriais confirmatório, na tentativa de diminuir os efeitos nocivos da sepse. Isto causa mudança no perfil dos agentes etiológicos e resistência antimicrobiana, alteração da microbiota do RNPT, com repercussões importantes no organismo e mudança no perfil epidemiológico das unidades, culminando no aparecimento de cepas bacterianas cada vez mais resistentes aos antibióticos existentes (DONG; SPEER, 2015; GEBREMEDHIN; BERHE; GEBREKIRSTOS, 2016; GOMEZ-GALLEGU et al., 2016; HODZIC; BOLOCK; GOOD, 2017; MITHAL et al., 2017).

A busca por novos métodos diagnósticos se faz necessária, principalmente para o diagnóstico precoce da sepse, para minimizar o uso indiscriminado de antibióticos. A dosagem de biomarcadores em vários fluidos corporais tem sido estudada e aliada a prática clínica para fins de diagnóstico precoce e prognóstico (GARCIA-SIMON et al., 2015; MAGALHAES et al., 2017; NG et al., 2006; STOJEWSKA et al., 2016; VALERIO et al., 2012).

2.4. Os Biomarcadores

Incessante busca tem sido feita a procura de biomarcadores com rápido tempo de resposta, sensíveis e específicos, acessíveis e não invasivos, capazes de avaliar o risco infeccioso e diagnosticar, precocemente, a sepse (ANDRADE et al., 2015; BHANDARI, 2014; HASSANEEN; MARON, 2017; GARCIA-SIMON et al., 2015).

Os principais biomarcadores em estudo são as citocinas, envolvidas tanto na resposta pró-inflamatória, quanto na anti-inflamatória (AKDIS et al., 2011; AKDIS et al., 2016; BHANDARI, 2014; FATTAH et al., 2017).

As citocinas são proteínas reguladoras intercelulares, responsáveis pela estimulação e diferenciação de vários tipos de células e também pelo controle e produção de outras citocinas. Elas são divididas de acordo com a resposta inflamatória. As pró-inflamatórias, são as principais responsáveis por iniciar uma defesa efetiva contra agentes patogênicos, no entanto, a superprodução destas citocinas pode ser prejudicial e resultar em lesão tecidual. As anti-inflamatórias são responsáveis por regular o processo inflamatório exacerbado, mantendo a homeostase (AKDIS et al., 2011; AKDIS et al., 2016; NG et al., 2006, CURFS; MEINS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). No Quadro 1 são apresentadas as principais citocinas estudadas nesta dissertação e suas funções.

Quadro 1. Principais funções das citocinas estudadas nesta dissertação

Citocinas	Principais funções
IL-1 β ^[1]	Indução de proteínas pró-inflamatórias, hematopoiese e diferenciação das células T _h 17
IL1-Ra ^[1]	Antagonista da IL-1
IL-2 ^[1]	Proliferação de células efectoras T e B, diferenciação e proliferação de células natural killer e fator de crescimento de células B
IL-4 ^[1]	Indução de T _h 2, fator de sobrevivência para as células T e B
IL-5 ^[1]	Diferenciação de células mielóides, incremento da atividade quimiotática e capacidade de adesão em eosinófilos, remodelação e cicatrização de feridas
IL-6 ^[1]	Síntese de proteínas de fase aguda; diferenciação, produção de IgG, IgM, hematopoiese IgA
IL-7 ^[1]	Maturação de megacariócitos, indução de síntese de mediadores inflamatórios em monócitos
IL-8 ^[1]	Atrai neutrófilos, células NK, células T, basófilos, eosinófilos; mobilização de células hematopoiéticas; Angiogênese
IL-9 ^[1]	Fator de crescimento de mastócitos, inibição de citocinas T _h 1, produção de IgE, produção de quimiocinas e muco em células epiteliais brônquicas
IL-10 ^[1]	Supressão imune
IL-12P70 ^[1]	Produção de INF γ
IL-13 ^[1]	Ativação de eosinófilos e mastócitos, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos, defesa contra infecções parasitárias
IL-15 ^[1]	Ativação de células T, ativação e proliferação de células natural killer, diferenciação T _h 2 e supressão de rinite alérgica
IL-17a ^[1]	Indução de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos
TNF- α ^[2]	É um potente mediador da resposta inflamatória e função imune
INF- γ ^[2]	Propriedades antivirais, promove a atividade citotóxica, inibição do crescimento celular, regulação da interação leucocitária e endotelial local
IP-10 ^[2]	Fator quimiotático para monócitos e células T

MCP-1 ^[2]	Aumentado durante a infecção e inflamação caracterizada por infiltração de leucócitos
MiP-1 α ^{[2][3]}	Quimiotaxia para monócitos e migração de macrófagos natural killer
MiP-1 β ^{[2][3]}	Quimiotaxia para monócitos e migração de macrófagos natural killer
FGF basic ^[5]	Regula a angiogênese
GM-CSF ^[2]	Precursor de células hematopoiéticas, linfócitos T, neutrófilos
G-CSF ^[2]	Ativação e diferenciação de neutrófilos e granulócitos
Eotaxin ^[3]	Migração de eosinófilos e basófilos
PDGF-BB ^[2]	Causa vasoconstrição na musculatura vascular
VEGF ^[4]	Extremamente importante na angiogênese
RANTES ^[2]	Quimiotaxia para monócitos e aumenta a liberação de histamina

(^[1] AKDIS et al., 2016; ^[2] CURFS; MEINS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; ^[3] PALOMINO; MARTI, 2015; ^[4] FERRARA; HOUCK; JAKEMAN, 1992; ^[5] ZHENG et al., 1997)

A dosagem das citocinas para o diagnóstico de sepse, apresenta algumas dificuldades, como o fato de a maioria delas serem produzidas logo após o estímulo infeccioso. Por terem meia-vida curta (6 a 8 horas) e já sofrerem clearance da circulação periférica, quando o RN ainda não manifestou alterações clínicas, não são facilmente detectáveis (BHANDARI, 2014). Além disso, o alto custo para realização dessas dosagens não permite, ainda, sua utilização como marcadores de sepse na prática clínica. Por fim, há também a necessidade de mais pesquisas científicas que estabeleçam valores de referência para essa faixa etária (BHANDARI, 2014; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017; HEDEGAARD; WISBORG, 2015).

Vários fluidos corporais têm sido utilizados para dosagens de biomarcadores na avaliação do risco e diagnóstico da sepse neonatal, como o sangue periférico e de cordão umbilical do recém-nascido (CAMPOS et al., 2010), aspirado traqueal (JÓNSSON et al., 1997), líquido amniótico (HILLIER et al., 1993) e saliva (HASSANEEM; MARON, 2017). Estudos sugerem que várias citocinas plasmáticas são também excretadas intactas na urina (MOLDCRWER et al., 1997), por isso esta tem sido utilizada para dosagem de biomarcadores, especialmente em adultos (GARCIA-SIMON et al., 2015). Mais recentemente, alguns estudos tem utilizado a urina como fonte de biomarcadores na avaliação da sepse neonatal (SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; LI et al., 2013; MIKLASZLWSKA et al., 2015).

Um desafio que se impõe para a monitorização de diversas patologias que acometem o RNPT MBP em uma UTIN, inclusive a sepse, é a coleta de sangue frequente para exames laboratoriais. Contudo, mesmo com a tentativa de minimizar a necessidade de coleta de sangue, através de técnicas de micrométodos e a monitorização transcutânea, o volume coletado ainda é alto, causando redução rápida e significativa da massa eritrocitária (SHANNON, 1990; CARVALHO et al., 1989). A urina surge então com a vantagem de ser coletada de forma não invasiva, indolor e também possibilita, de maneira efetiva, a dosagem de vários biomarcadores (SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; MIKLASZLWSKA et al., 2015; LI et al., 2013).

O papel do rim na eliminação plasmática destas citocinas nos pacientes sépticos, é muito importante, e mesmo no RNPT, apesar de sua imaturidade renal, há concentração adequadas desses biomarcadores na urina nos RN que desenvolveram sepse (GRAZIANE, 2006; PYNN, 2015; SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER, et al., 2014; MOLDCRWER et al., 1997).

Diante disso, a utilização da urina para a dosagem de biomarcadores com objetivo de se avaliar o risco, diagnóstico e prognóstico da sepse neonatal é possível e, se confirmada, pode ser implementada na prática clínica.

O Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Uberlândia é um serviço de referência em atendimento ao RN de alto risco para 86 municípios da região. Conta com 15 leitos de Unidade de Terapia Intensiva, 26 leitos de Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais, 5 leitos de Unidade de Cuidados Intermediários Canguru, 18 leitos de Alojamento Conjunto e também ambulatório de seguimento de RNPT. A busca da qualidade na assistência prestada, o comprometimento com o ensino, com a formação de novos profissionais e também com a pesquisa são alvos constantes a serem alcançados. Mais recentemente surgiu a possibilidade de parceria com o Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, de padrão e referência internacional para pesquisa em vários eixos, dentre eles a sepse. Esta parceria tem sido importante e promissora, especialmente na avaliação de biomarcadores no período neonatal, considerando várias condições particulares dessa faixa etária.

A revisão precedente mostrou que existe ainda uma lacuna na literatura científica a respeito da investigação de biomarcadores urinários na sepse neonatal. E a hipótese que motivou este trabalho foi de que os marcadores urinários poderiam estar alterados

precocemente nos RNPT MBP que, durante sua evolução, apresentariam quadro compatível a sepse tardia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o desenvolvimento de sepse neonatal em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer, por meio da dosagem de biomarcadores urinários.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os valores das dosagens de vinte e sete biomarcadores urinários (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, TNF- α , INF- γ , IP-10, MCP-1, MiP-1 α , MiP-1 β , FGF basic, GM-CSF, G-CSF, Eotaxin, PDGF-BB, VEGF, RANTES), dos RNPT MBP com e sem diagnóstico sepse tardia.
- Avaliar as dosagens dos biomarcadores urinários em diferentes condições maternas (idade materna, hipertensão arterial, diabetes gestacional, uso de corticoide antenatal, corioamnionite, tipo de parto).
- Avaliar as dosagens dos biomarcadores urinários em diferentes características do recém-nascido (peso ao nascer, sexo, idade gestacional) e condições clínicas neonatais (necessidade de reanimação em sala de parto, uso de ventilação mecânica invasiva, uso de surfactante, SNAPPE II, enterocolite e desfecho).

ARTIGO – Urinary predictors of late neonatal sepsis

Title: Urinary predictors of late neonatal sepsis

Authors: Daniela Silva Rodrigues da Costa^{a *}, Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo^{a†}, Maria Carolina de Campos Martins^a, Andreia de Albuquerque Freitas^a, Lidia Mayrink de Barros^a, Camila Piqui Nascimento^a, Aline Teodoro de Paula^b, Patrícia Terra Alves^b, Larissa Prado Maia^b, Roberta Rezende Rosa^b, Wallisen Tadashi Hattori^a, Daniela Marques de Lima Mota Ferreira^c, Luiz Ricardo Goulart^{b†}, Vânia Olivetti Steffen Abdallah^{a†}.

^a Graduation Program in Health Sciences, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

^b Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

^c Neonatal Service, Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

† Co-senior authors.

***Corresponding authors:**

Daniela S.R. Costa. Av. Pará 1720, Campus Umuarama, Bl. 2H, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil - +55 34 3218-2389. E-mail: daniela.costa@ufu.br.

Luiz R. Goulart. Av. Amazonas, s/n, Campus Umuarama, Laboratory of Nanobiotechnology, Bl. 2E, Sl. 248, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil - +55 34 3225-8440. E-mail: lr_goulart@ufu.br.

Abstract

Neonatal sepsis is the main cause of death among newborns. Biomarkers have been investigated in some body fluids to assess neonatal sepsis, but none of the markers are able to predict the risk of sepsis. Urine is presented as a promising sample due to the removal of excessive cytokines levels through kidneys. Our hypothesis was that urinary inflammatory markers ought to be raised in very low birth weight infants early after birth, which could be related with sepsis. The study included newborns with less than 34 weeks of gestational age with birth weight less than 1500 grams. Urine samples were collected between 48-72 hours and 27 biomarkers were quantified by a high resolution MagPix (Luminex) cytokine panel. Newborns (35) were divided into two groups: GC – control (no sepsis) and GS (late sepsis). Early increase of 11 biomarkers (IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17a, TNF α , MiP-1 α , MiP-1 β , RANTES, and G-CSF) was detected in the GS group, classified as late sepsis. Thus, urine is a promising body fluid in the dosage of biomarkers and has a great potential to assess the risk of neonatal sepsis. The early increase of these cytokines in urine indicates that they may be used as predictors' of late neonatal sepsis.

Key words: Infant, Very Low Birth Weight, Urine, Cytokines, Biomarkers, Neonatal Sepsis.

Highlights

- A method for early diagnosis of neonatal sepsis is necessary.
- Urine is a promising fluid to assess the neonatal sepsis.
- There is early increase of 11 urinary cytokines in infants of late sepsis.

Abbreviations

VLBW-very low birth weight, IL- interleukin, TNF-tumor necrosis factor, INF- interferon, IP-inducible protein, MCP/MCAF-monocyte chemotactic protein/monocyte chemotactic activating factor, MiP- macrophage inflammatory protein, FGF-fibroblast growth factor, GM-CSF- granulocyte macrophage colony stimulating factor, G-CSF- granulocyte colony stimulating factor, PDGF- platelet derived growth factor, VEGF- vascular endothelial growth factor, RANTES- regulated on activation normal T-expressed and secreted, GC – control group, GS –late sepsis group

1. Introduction

Neonatal sepsis is the main cause of death among newborns in Neonatal Intensive Care Units [1,2]. Around the world, 15% of neonatal deaths are caused by infection [2,3]. Sepsis is associated with a longer hospitalization, and a consequent increase in hospital costs, as well as a long term disturbance of neuro-psychomotor development [3].

Clinical signs and symptoms of neonatal sepsis are non-specific and the results of laboratorial tests are, sometimes, provided too late [4,5]. The gold standard for sepsis diagnosis is blood culture, however, the results takes too long, leading to empirical treatments that contribute to a change in the profile of etiological agents and antimicrobial resistance [4,5].

Several body fluids have been used in dosage of biomarkers in risk assessment and diagnosis of neonatal sepsis, such as umbilical cord blood and newborn blood [6,7], tracheal aspirate [8], amniotic fluid [9] and saliva [10]. Studies suggest that several plasma cytokines are also excreted intact in urine [11], so that it has been used in biomarkers dosage, especially in adults [12]. Recently, some studies have used urine as a source of biomarkers for neonatal sepsis evaluation [7, 16, 28]. Urine collection is beneficial, especially for very low birth weight (VLBW) infants, because it is a non-invasive procedure [7], easy to perform, with low risk of complications and not painful.

The kidney has a role in removing some pro-inflammatory plasma cytokines from the plasma of septic patients while diuresis is preserved [13]. Thus, we raised the hypothesis that the urinary inflammatory markers ought to be raised in VLBW infants, which could be related with sepsis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the neonatal sepsis by urinary biomarkers in VLBW infants.

2. Method

2.1. Study subjects and sample collection

This cross-sectional study included VLBW infants less than 34 weeks of gestational age with birth weight less than 1500 grams, who were born at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Uberlândia, between September 2015 and April 2016. This study considered as exclusion criteria: early sepsis, death until 5-day-old, and twin pregnancy.

This study was approved by the Ethics Committee on Research of the Universidade Federal de Uberlândia, registered by number 974.356. The informed consent form was signed by parents or guardians of each infant.

This study divided all infants in two groups: control group (GC) without sepsis and sepsis group (GS) with late sepsis (Fig.1).

Maternal and neonatal characteristics were obtained through patients' records. Neonatal sepsis was defined as a systemic condition of bacterial, viral or fungal origin associated with hemodynamic changes and other clinical manifestations. It was considered as late sepsis the one whose demonstrations performed after 72 hours (3 days) of life [5]. Clinical sepsis was defined as the presence of clinical signs of infection with concomitant antibiotic treatment for more than 3 days. Proven sepsis was defined as bacterial growth on blood culture in neonate with signs of clinical sepsis. In the sepsis group (GS) it was included all infants with clinical and confirmed late sepsis diagnosis.

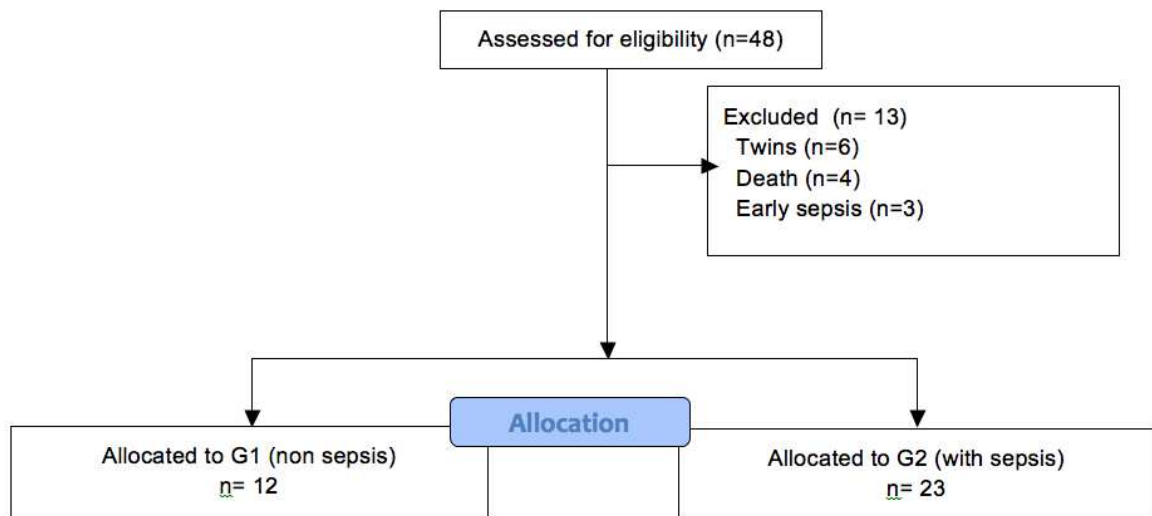


Fig.1. Flowchart of sample selection.

2.2. Measurements

Urine samples were collected between 48 and 72 hours of life with a collector bag and were frozen in ultra-freezer at -80 °C until the analysis. The urinary cytokines of VLBW infants of both groups were quantified by a multiplex system on a Bio-Plex MagPix™ analyzer (Luminex, California – USA), using the Bio-Plex kit Pro Human Cytokine 27-plex Assay™ (Bio-Rad). The following cytokines were analyzed: eotaxin, interleukins (IL) 1 beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, tumor necrosis factor α (TNF- α), Interferon gamma (INF- γ), inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemotactic protein 1/ monocyte chemotactic activating factor (MCP-1/MCAF), macrophage inflammatory protein (MiP)- MIP-1 α , MIP-1 β , fibroblast growth factor (FGF basic), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), platelet derived growth factor (PDGF-BB), vascular endothelial growth factor (VEGF), and regulated on activation normal T - expressed and secreted (RANTES). The equipment' software made data analysis and the cytokines' concentration was obtained by

comparison with the equivalent of each cytokine standard curve to obtain the value in pg/mL.

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS 20.0 (IBM, USA) and GraphPad Prism 7.00 software. The studied groups were compared by Mann-Whitney and Fisher's exact. The Spearman's correlation and Mann-Whitney test was used to relate clinical variables and the values of biomarkers. It was considered a significance level of $p < 0.05$ for all tests.

3. Results

Among all the infants who were born in the study period, 35 infants met the inclusion criteria and 12 did not present sepsis (GC=12) and 23 presented late sepsis (GS = 23). In the sepsis group, 14 infants presented clinical sepsis and 9 had confirmed sepsis with positive blood cultures. The division of groups was made according to the evolution of each infant.

Maternal and VLBW infant's characteristics are shown in table 1. The median maternal age was 27 (± 8) years-old and 28 (± 9) years-old in GC and GS, respectively. The median of gestational age was 29 (± 3) weeks in GC and 28 (± 2) weeks in GS. The median time until the sepsis diagnosis was 7 (± 4) days.

The group with late sepsis (GS) presented a significant increase of 11 urinary biomarkers when compared to the group without sepsis (GC) (Table 2 and figures 2 and 3).

An association analysis between the maternal and infants clinical variables with these 11 biomarkers was performed. We observed a statistically significant difference

among 6 of these 11 biomarkers with the use of invasive mechanical ventilation: IL-5 ($p = 0.04$), IL-7 ($p = 0.02$), IL-15 ($p = 0.03$), IL-17 ($p = 0.03$), MiP-1 β (0.02) and G-CSF ($p = 0.04$). We did not observe any correlation with the metric variables.

Table 1. Very low birth weight infants' and maternal characteristics.

Characteristics	Group C n = 12	Group S n = 23	P
<i>Infants</i>			
Sex			0,153 ^b
Male	5 (41,7%)	16 (69,6%)	
Birth weight	1245(615–1499)	948 (488 – 1477)	0,04 ^a
APGAR at 5 minute	9 (8 – 10)	8 (3 – 10)	0,011 ^a
Resuscitation at birth	8 (66,7%)	16 (69,6%)	1,00 ^b
Surfactant	5 (41,7%)	19 (82,6%)	0,022 ^b
SNAPPE II	35 (14-71)	45 (10-86)	0,210 ^a
Mechanical ventilation	5 (41,7%)	22 (95,7%)	0,001 ^b
Enterocolits	0	5 (22,7%)	0,137 ^b
Outcomes			0,141 ^b
Survived	12 (100%)	18 (78,3%)	
Death	0	5 (21,7%)	
<i>Maternal</i>			
Hipertensive disorder	4 (33,3%)	4 (17,3%)	0,402 ^b
Gestacional diabetes	2 (16,7%)	2 (8,7%)	0,590 ^b
Prenatal steroid	10 (83,3%)	19 (82,6%)	1,000 ^b
Corioamnionitis	1 (8,3%)	4 (17,4%)	0,640 ^b

Mode of delivery		1,000 ^b
Vaginal	4 (33,3%)	9 (39,1%)
Cesarean	8 (66,7%)	14 (60,9%)

Categorical data were presented as number (percentage) and numerical data as median (minimum – maximum).

^a Mann Whitney test, ^b Fisher exact; SNAPPE II - Score for Neonatal Acute Physiology

- Perinatal Extension II, GC= control group, GS=late sepsis.

Table 2. Urinary Biomarkers in diferent groups

Urinary Biomarkers	GC N=12	GS N=23	p
IL-1 β	0,77 (0,46 – 42,99)	4,42 (0,34 – 213,89)	0,007*
IL-1ra	4972,08 (808,77 – 34322,97)	10652,67 (9,82 – 40912,05)	0,754
IL-2	4,47 (3,48 – 6,10)	3,67 (0,58 – 18,03)	0,164
IL-4	0,19 (0,07 – 0,74)	0,57 (0,07 – 5,64)	0,042*
IL-5	0,79 (0,79 – 1,45)	1,45 (0,51 – 22,08)	0,039*
IL-6	2,34 (1,11 – 25,70)	7,95 (1,00 – 270,11)	0,079
IL-7	2,19 (0,35 – 5,12)	3,47 (0,85 – 45,71)	0,022*
IL-8	8,11 (2,10 – 191,79)	20,83 (2,10 – 156,75)	0,231
IL-9	1,92 (1,09 – 7,40)	6,17 (1,09 – 45,94)	0,009*
IL-10	7,98 (4,49 – 17,79)	10,53 (2,28 – 39,60)	0,149
IL-12 P70	911,56 (648,42 – 1463,12)	1083,08 (555,98 – 1741,04)	0,366
IL-13	115,55 (90,02 – 151,53)	138,11 (84,69 – 454,20)	0,051
IL-15	413,59 (81,46 – 1088,35)	676,44 (193,84 – 1332,91)	0,015*
IL-17a	428,51 (286,00 – 914,65)	636,76 (286,00 – 3542,26)	0,009*
INF- γ	15,37 (10,15 – 46,52)	21,34 (4,72 – 242,51)	0,139
TNF- α	4,16 (0,89 – 14,83)	11,25 (1,65 – 77,28)	0,015*
MiP-1 α	0,22 (0,06 – 0,56)	0,82 (0,06 – 32,46)	0,011*
MiP-1 β	4,86 (1,72 – 23,25)	20,12 (0,27 – 254,28)	0,002*
CM-CSF	36,66 (30,44 – 58,21)	39,33 (13,51 – 97,63)	0,602
RANTES	4,41 (2,26 – 2384,97)	8,79 (1,96 – 14838,00)	0,021*
Eotaxin	718,57 (420,92 – 1290,62)	935,96 (408,06 – 2687,25)	0,126
Basic FGF	355,69 (114,44 – 633,19)	423,86 (103,46 – 1313,20)	0,149
VEGF	0,29 (0,14 – 0,95)	0,49 (0,01 – 1,61)	0,281
PDGF-BB	3,42 (2,03 – 165,03)	9,08 (1,80 – 4000,62)	0,071
IP-10	272,42 (82,26 – 2830,29)	243,27 (46,93 – 9793,61)	0,677
MCP-1	77,82 (29,95 – 140,62)	109,13 (29,58 – 679,11)	0,251
G-CSF	14,04 (2,59 – 55,93)	31,59 (5,08 – 2033,96)	0,009*

U Mann Whitney test, * statistically significant, GC- control group, GS – sepsis group,

interleukins (IL), tumor necrosis factor α (TNF- α), Interferon gamma (INF- γ), inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemotactic protein 1/ monocyte chemotactic activating

factor (MCP-1/MCAF), macrophage inflammatory protein (MiP), fibroblast growth factor (FGF basic), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), platelet derived growth factor (PDGF-BB), vascular endothelial growth factor (VEGF), and regulated on activation normal T - expressed and secreted (RANTES).

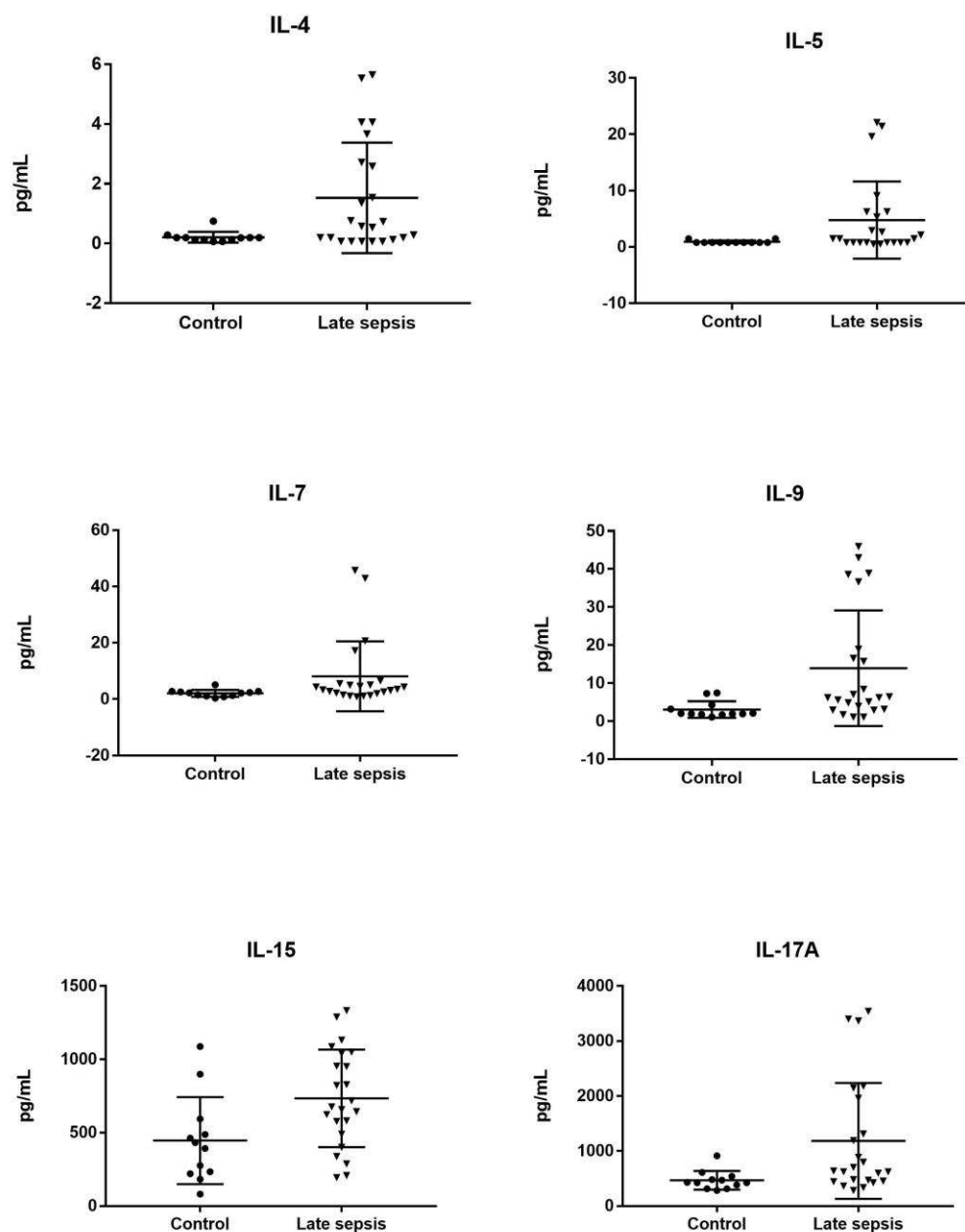


Fig. 2. Interleukins with significant p value (IL) IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-17a in studied groups

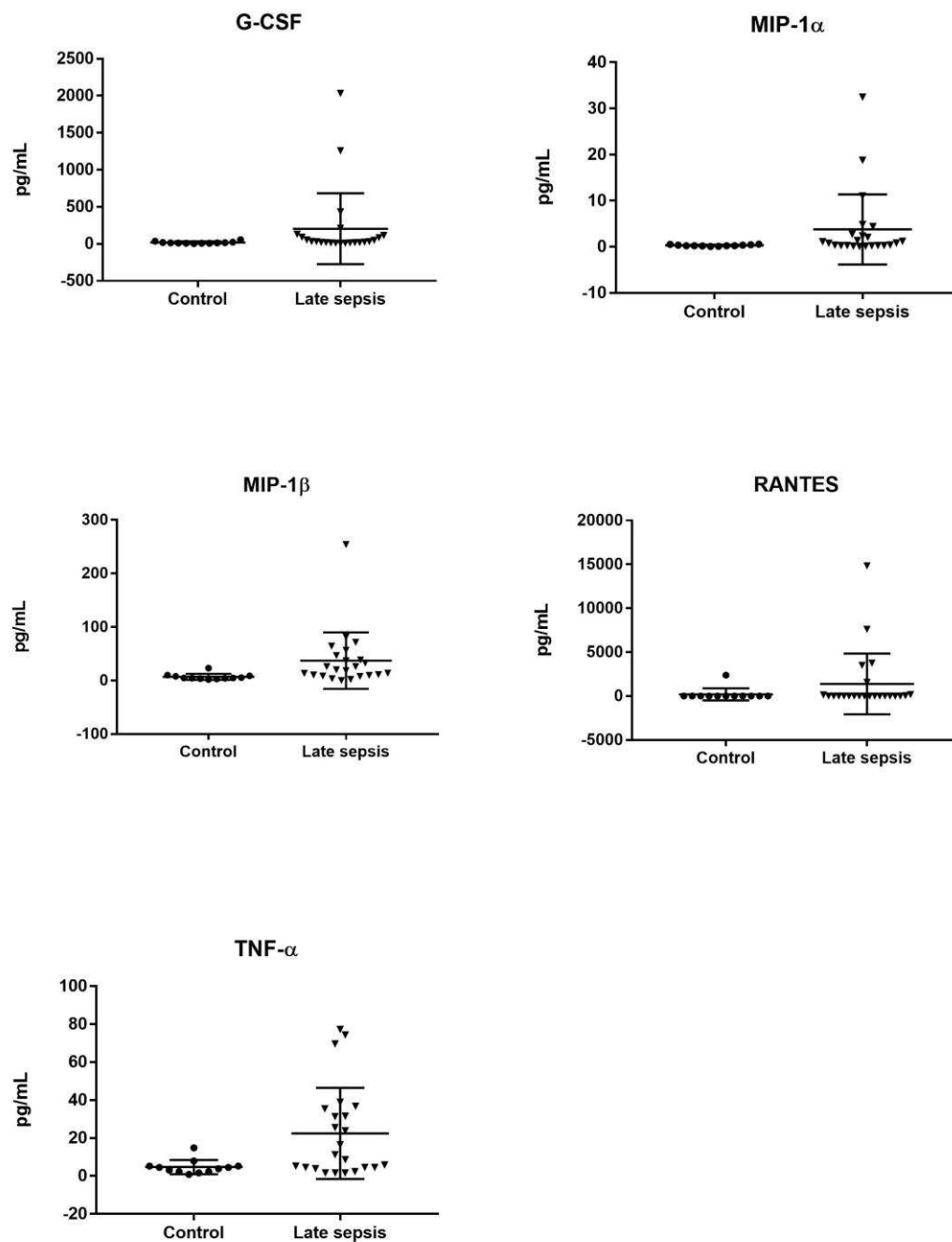


Fig. 3. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MiP) MiP-1 α , MiP-1 β , regulated on activation normal T -expressed and secreted (RANTES), and tumoral necrosis factor (TNF- α) in studied groups, with significant p value.

4. Discussion

This study showed an early increase (48-72 hours) of 11 urinary biomarkers in VLBW infants who developed late sepsis, such as IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17a, TNF α , MiP-1 α , MiP-1 β , RANTES, and G-CSF.

Early diagnosis of neonatal sepsis is still a challenge in Neonatal Intensive Care Units, considering its high morbimortality rate [2]. There have been studied exams that can be quickly and early used for prediction and for diagnosis of this condition. For this reason, the dosage of the biomarkers is indicated as an instrument for this purpose [14,15,16].

Different blood and urinary biomarkers were already studied in adults in several clinical conditions such as heart failure, after renal transplantation, in sepsis as a complementary way of diagnosis and prognostic definition [17,18,11,19]. Recently, the dosages of blood biomarkers in the neonatal period have been described [20,21].

It is well known that there is a quick activation of cells and production of pro-inflammatory cytokines during the immune response, which is easily found in blood and urine, resulting in an imbalance in the immune response. [11]

The immune response in VLBW infants has some peculiarities that can modify their responses against the insults. These neonates do not get any benefits from the transplacental transfer of maternal antibodies, what mainly happens during the third trimester of pregnancy. Otherwise, the immune response is immature, resulting in low production of pro-inflammatory cytokines due to infectious agents [22]. Despite the immature immune response of newborns, studies have been demonstrated the importance of serum and urinary dosage of biomarkers in the neonatal period [14,15,16].

This study has demonstrated high levels of urinary biomarkers during the first 48-72 hours in VLBW infants who presented sepsis diagnosis when compared with those without this condition. It was confirmed an increase of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, which can inhibit the production of IL-1 and TNF α , through the suppression of mast cells and act as a regulator of immune response [23]. The TNF α , which has an important role because it is the first anti-inflammatory mediator produced when there is an infectious stimulus, blocks the spread of the pathogen agent. Pro-inflammatory cytokines IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 and IL-17a, which also were increased in the group with sepsis, have redundant functions of activation, differentiation and stimulation of different cells such as lymphocytes, natural killer (NK), and production of other cytokines. In addition, chemokines MiP-1 α , MiP-1 β , and RANTES, considered pro-inflammatory with chemotactic properties, had elevated values in the sepsis group. Those cells are responsible for recruiting defense cells to the site of infection and G-CSF, which particularly acts in the bone marrow stem cells by stimulating its differentiation in mainly neutrophils polymorphonuclear [23,24]. These results demonstrated a predominance of pro-inflammatory cytokines, which confirms the initial hypothesis of this study.

Studies using blood biomarkers have demonstrated the importance of biomarkers for early diagnosis of neonatal sepsis, such as IL-9, IL-1 β , TNF α and RANTES [14,15,20,25]. Recently, other studies have used urinary dosage of biomarkers to assess neonatal sepsis [16, 26, 27,28]. Even with the attempt to minimize the need for blood collection through micromethod techniques, as well as transcutaneous monitoring, the volume collected is still high, causing a rapid and significant reduction in erythrocyte mass [31]. The urine thus emerges with the advantage of being a non-invasive, painless collection form that effectively enables the dosing of several biomarkers.

A study conducted by Saguna Narasimhulu et al (2013) [7], in newborns admitted to NICU with suspected sepsis, also observed a rise in pro-inflammatory cytokines, IL-8, IP-10 and MCP-1, in the urine of neonates at risk of developing sepsis.

The invasive mechanical ventilation was the only clinical variable associated with the increase of 6 biomarkers in VLBW infants who developed late sepsis. One of the most common complications associated with mechanical ventilation is sepsis [29]. A study by Bohrer et al (2010) [30], also found alterations in IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF α in infant's blood after 2 hours of mechanical ventilation. This release of pro-inflammatory cytokines and reduction of anti-inflammatory, suggest the occurrence of lung injury caused by mechanical ventilation.

This hypothesis was confirmed, once urinary inflammatory markers were increased in VLBW infants with sepsis, which can reflect a systemic inflammation due to the removal of pro-inflammatory cytokines of plasma. Despite some limitations in this study, such as the sample size and the evaluation of one dosage (between 48-72hours) of urinary biomarkers, our results can contribute to further confirm specific urinary biomarkers as predictors of neonatal sepsis. It also highlights the importance of monitoring various medical conditions and treatments offered to VLBW neonates which can lead to changes in biomarkers.

Therefore, we conclude that the use of urine is promising for the dosage of biomarkers, with early increase in the urine of IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17a, TNF α , MiP-1 α , MiP-1 β , RANTES and G-CSF, suggesting that these biomarkers can be used as predictors of late neonatal sepsis.

Conflict of interest statement

The author(s) declare that there are no conflicts of interest.

Authorship contributions

DC, VA, DF, LRG, VOA designed the study; DC, MM, AF, LB, CPN were involved in the collection of samples and data; WT, DC, ATP, RRR, VMGA, VOA, and LRG performed the statistical analyses and interpreted the results; ATP, PTA, LMP performed the laboratory analyses. All authors were involved in writing the paper and have approved its final version.

Funding

The authors thanks the Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES, and FAPEMIG, for supporting the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology- INCT-TeraNano (CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant numbers CNPq-465669/2014-0 and FAPEMIG CBB-APQ-03613-17.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the patients and parents, the neonatal unit and the hospital laboratory team, for participating and collaborating with this study.

5. References

- [1] B.A.Shah, J.F. Padbury, Neonatal sepsis an old problem with new insights, *Virulence*. 5 (2014) 170-178. doi: <https://dx.doi.org/10.4161/viru.26906>.
- [2] A. Dessi, C. Pravettoni, G. Ottonello, F. Birocchi, F. Cioglia, V. Fanos, Neonatal sepsis, *JPNIM*. 3 (2014). doi: <https://dx.doi.org/10.7363/030273>.
- [3] D. Gebremedhin, H. Berhe, K. Gebrekirstos, Risk Factors for Neonatal Sepsis in Public Hospitals of Mekelle City, North Ethiopia, 2015: Unmatched Case Control Study, *PLoS ONE*. 11 (2016) e0154798. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154798>.
- [4] Y. Dong, C.P. Speer, Late-onset neonatal sepsis: recent developments, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal*. 100 (2015) 257-263. doi: <https://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2014-306213>.
- [5] A.L. Shane, P.J. Sánchez, B. Stool, Neonatal Sepsis, *Lancet*. (2017). doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31002-04](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31002-04).
- [6] D.P. Campos, M.V. Silva, J.R. Machado, L.R. Castellano, V. Rodrigues, C.H.C. Barata, Early-onset neonatal sepsis: cord blood cytokine levels at diagnosis and during treatment, *J. Pediatr*. 86 (2010) 509-514. doi: <https://dx.doi.org/10.2223/JPED.2043>.
- [7] S.Saguna Narasimhulu, K.D. Hendricks-Munoz, W. Borkowsky, P. Mally, Usefulness of urinary immune biomarkers in the evaluation of neonatal sepsis: a pilot project, *Clin. Pediatr*. 52 (2013) 520-526. doi: <http://dx.doi.org/10.1177/0009922813482751>.
- [8] B. Jónsson, K. Tullus, A. Brauner, Y. Lu, G. Noack, Early increase of TNF- α and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal*. 77 (1997) 198-201. doi: <https://dx.doi.org/10.1136/fn.77.3.F198>.
- [9] S.L. Hillier, S.S. Witkin, M.A. Krohn, H. Watts, N.B. Kiviat, D.A. Eschenbach, The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection, *Obstet. Gynecol*. 81 (1993) 941-48.
- [10] M. Hassaneen, J.L. Maron, Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations, *Front. Public. Health*. 83 (2017). doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2017.00083>.
- [11] L.L. Moldcrwer, The validity of blood and urinary cytokine measurements for detecting the presence of inflammation, In: S.S. Carlson-Newberry, R.B. Costello, *Emerging Technologies for Nutrition Research –Potencial for Assessing Military Performance Capability*, Whashington DC: National Academy Press (1997). 417-430.
- [12] M. Garcia-Simon, J.M. Morales, V. Modesto-Alapont, V. Gonzalez-Marrachelli, R. Vento-Rehues, A. Jorda-Minãna, J. Blanquer-Olivas, D. Monleon, Prognosis

- biomarkers of severe sepsis and septic shock by HNMR urine metabolomics in the intensive care unit. *PloS ONE*. 10 (2015) e0140993. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140993>.
- [13] G. Graziani, G. Bordone, V. Bellato, S. Finazzi, C. Angelini, S. Badalamenti, et al, Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study, *J. Nephrol*. 19 (2006) 176-182.
 - [14] M. Stojewska, M. Wasek-Buko, B. Jakub, D. Wisneiwska-Ulfig, A. Goleniowska-Krol, A. Szymanska, U. Godula-Stuglik, Evaluation of serum chemokine RANTES concentration as a biomarker in the diagnosis of early-onset severe infections in neonates, *Postepy. Hig. Med. Dosw*. 70 (2016) 272-279.
 - [15] P.C. Ng, K. Li, T.F. Leung, R.P.O. Wong, G. Li, K.M. Chui, E. Wong, F.W.T. Cheng, T.F. Kok, Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants, *Clin. Chem*. 52 (2006) 1181-1189.
 - [16] M. Miklaszewska, P. Korohoda, P. Kwinta, T. Tomazik, K. Zachwieja, B. Klich, M. Traczyk, D. Drozd, J.A. Pietrzyk, Clinical Validity of urinary interleukin 18 and interleukin 6 determinations in preterm newborns, *Przegląd Lekarski*. 72 (2015) 589-596
 - [17] M. Rivera, R. Taléns-Visconti, S. Sirera, V. Berlomeu, A. Salvador, R. Cortés, F.G. Burgos, V. Climent, R. Payá, L. Martinez-Dolz, M.J. Sancho-Tello, A. González-Molina, Soluble TNF- α and interleukin-6 receptors in the urine of heart failure patients. Their clinical value and relationship with plasma levels, *Eur. J. Heart Fail*. (2004) 877-882.
 - [18] A.B. Pereira, N.A. Rezende, A.L. Teixeira Junior, M.M. Teixeira, A.C. Simões e Silva, Cytokines and chemokines in renal transplantation, *J. Bras. Nefrol*. 31 (2009) 286-296.
 - [19] N.P. O'Grady, M. Tropea, A.F. Suffredini, et al, Detection of Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α and MIP-1 β during experimental endotoxemia and human sepsis, *J. Infect. Dis*. 179 (1999) 136-141.
 - [20] R.C. Magalhaes, J.M. Moreira, E.L.M. Vieira, N.P. Rocha, D.M. Miranda, A.C. Simões e Silva, Urinary levels of IL-1 β and GDNF in preterm neonates as a potential biomarkers of motor development: a prospective study, *Mediators of Inflammation*. (2017).doi: <https://doi.org/10.1155/2017/8201423>.
 - [21] J. Patkai, B. Mesples, M.A. Dommergues, G. Fromont, E.M. Thornton, J.C. Renaud, P. Evrard, P. Gressens, Deleterious effects of IL-9-activated mast cells and neuroprotection by antihistamine drugs in the developing mouse brain, *Pediatr. Res*. 50 (2001)222-230.
 - [22] A.A. Sharma, R. Jen, A. Buther, P.M. Lavoie, The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area, *Clin. Immunology*. 145 (2012) 61-68. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2012.08.006>.

- [23] J.H.A.J. Curfs, J.F.G.M. Meins, J.A.A. Hoogkamp-Korstanje, A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers, *Clin. Microbiology Reviews*. 10 (1997) 742-780.
- [24] P.P.V. Varella, W.C.N. Forte, Cytokines: a review, *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.* 24 (2001) 146-154.
- [25] T.A. Valério, C. Cancelier, L. Constantino, F. Petronilho, C. Ritter, F. Dal-Pizzol, Inflammatory and oxidative cord blood parameters as predictors of neonatal sepsis severity, *Rev. Bras. Ter. Intensiva*. 24 (2012) 30-34.
- [26] V. Fanos, P. Caboni, G. Corsello, M. Stronati, D. Gazzolo, A. Noto, M. Lussu, A. Dessi, M. Giuffrè, S. Lacerenza, F. Serraino, F. Garofoli, L.D. Serpero, B. Liori, R. Carboni, L. Atzori, Urinary H-NMR and GC-MS metabolomics predict early and late onset neonatal sepsis, *Early Hum. Dev.* (2014) 78-83.
- [27] M. Gilfillan, V. Bhandari, Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: clinical practice guideline, *Early Hum. Dev.* 105 (2017) 25-33 doi: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2016.12.002>.
- [28] Y. Li, X. Li, X. Zhou, et al, Impact of sepsis on the urinary level of interleukin 18 and cystatin C in critically ill neonates, *Pediatr. Nephrol.* 28 (2013) 135-144. doi: <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2285-7>.
- [29] P.P. Maiya, D. Vishwanath, S. Hegde, T.P. Srinivas Shivaprasad, C.C. Shantala, P.U. Umakumaran, B. Naveen, R.K. Hegde, Mechanical Ventilation of newborns: experience from a level II NICU, *Indian Pediatrics*. 32 (1995) 1275-1280.
- [30] B. Bohrer, R.C. Silveira, E.C. Neto, R.S. Procianoy, Mechanical Ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines, *J. Pediatr.* 156 (2010) 16-19. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.peds.2009.07.027>.
- [31] K.M. Shannon, Recombinant erythropoietin in pediatrics: a clinical perspective, *Pediatric Annals*. 19 (1990) 197-206

REFERÊNCIAS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St Louis, v. 127, n. 3, p. 701–721, mar. 2011.

AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 138, n. 4, p. 984–1010, oct. 2016.

ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clin. Nutr.**, New York, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, dec. 2015.

AURITI, C. et al. Procalcitonin in detecting neonatal nosocomial sepsis. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 5, p. F368–F370, 2012.

BHANDARI, V. Effective biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis. **J. Pediatric Infect Dis Soc**, v. 3, n. 3, p. 234–245, sep. 2014.

CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. **Pediatr Clin North Am**, Philadelphia, v. 60, n. 2, p. 367-89, Apr 2013

CAMPOS, D. P. et al. Early-onset neonatal sepsis: cord blood cytokine levels at diagnosis and during treatment. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p. 509–514, 2010.

CARVALHO, C. G. et al. Plasma cytokine levels fall in preterm newborn infants on nasal CPAP with early respiratory distress. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120486, 2015.

CARVALHO, M. et al. Perda sanguínea iatrogênica em recém-nascidos abaixo de 1500g. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, Vol. 65 n.6 217-219, 1989.

CHAUHAN, N.; TIWARI, S.; JAIN, U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. **Microb Pathog**, London, v. 107, p. 234–242, apr. 2017.

COLAIZY, T. T. et al. Impact of Optimized Breastfeeding on the Costs of Necrotizing Enterocolitis in Extremely Low Birthweight Infants. **J Pediatr**, New York, v. 175, p. 100–105.e2, aug. 2016.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema Imunitário – parte 1: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434- 461. Campinas 2010.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, Boston, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DENNING, T. W. et al. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. **Semin Perinatol**, Chicago, v. 41, n. 1, p. 15–28, feb. 2017.

DESSI, A., PRAVETTONI, C., OTTONELLO, G., BIROCCHI, F., CIOGLIA, F., FANOS, V. Neonatal sepsis. **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, Quartu Sant'Elena. v. 3, n. 2, oct. 2014.

DONG, Y.; SPEER, C. P. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 100, n. 3, p. F257-63, 2015.

FATTAH, M. et al. Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. **J Nat Sci, Biol and Med**, v. 8, n. 1, p. 32, jan-jun 2017.

FREITAS, B.A.C.; LEÃO, R.T; GOMES, A.P.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Terapia nutricional e sepse neonatal. Vol 23, n.4.p. 492-498. 2011.

FREITAS, B. A. C. et al. Sepse tardia em pré-termos de uma unidade de terapia intensiva neonatal: análise de três anos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 1, p. 79–85, 2012.

FERRARA, N; HOUCK, K, JAKEMAN, L. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**. vol 13, 1992 18–32

GARCIA-SIMON, M. et al. Prognosis biomarkers of severe sepsis and septic shock by 1h NMR urine metabolomics in the intensive care unit. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2015.

GEBREMEDHIN, D.; BERHE, H.; GEBREKIRSTOS, K. Risk factors for neonatal sepsis in public hospitals of Mekelle City, North Ethiopia, 2015: Unmatched case control study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–10, may 2016.

GILFILLAN, M.; BHANDARI, V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. **Early Hum Dev**, New York, v. 105, p. 25–33, feb. 2017.

GLASS, H. C. et al. Outcomes for extremely premature infants. **Anesth Analg**, v. 120, n. 6, p. 1337-51, Jun 2015.

GOLDENBERG, R. L. et al. Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth. **Lancet**, v. 371, p. 75-84, 2008.

GOMEZ-GALLEGO, C. et al. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 21, n. 6, p. 400–405, dec. 2016.

GRAZIANI, G; BORDONE, G; BELLATO, V; FINAZZI, S.; ANGELINI, C; BADALAMENTI, S; et al. Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study. **J Nephrol.**, v.19 n. 2, 176-82, mar 2006.

HASSANEEN, M.; MARON, J.L. Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations. **Front Public Health**. V.5 n 83. Apr 2017

HEDEGAARD, S. S.; WISBORG, K.; HVAS, A. M. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis--a systematic review. **Infect Dis**, London, v. 47, n. 3, p. 117-24, Mar 2015.

HILLIER, S.L.; WITKIN, S.S.; KROHN, M.A.; WATTS, H.; KIVIAT, N.B.; ESCHENBACH, D.A. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery,

amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection. **Obstet Gynecol.** Vol 81 n. 6, 941-948. Jun 1993.

HODZIC, Z.; BOLOCK, A. M.; GOOD, M. The Role of Mucosal Immunity in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. **Front Pediatr**, v. 5, n. 40, mar 2017.

HUANG, F. K. et al. Bird's Eye View of a Neonatologist: Clinical Approach to Emergency Neonatal Infection. **Pediatr Neonatol**, v. 57, n. 3, p. 167–173, jun. 2016.

JÓNSSON, B. et al. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 77, n. 3, p. F198-201, 1997.

KARDATZKE, M. A.; ROSE, R. S.; ENGLE, W.A. Late preterm and early term birth: at-risk populations and targets for reducing such early birth. **Neo Reviews.** Vol 18 n.5 may 2017

KELLY, D.; COUTTS, A G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proc. Nutr Soc**, v. 59, p. 177–185, may. 2000.

LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 379–390, may 2007.

LUSYATI, S. et al. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. **J Neonatal Perinatal Med**, v. 6, n. 2, p. 153-63, 2013.

MAGALHÃES, R. C. et al. Urinary Levels of IL-1 β and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

MIKLASZEWSKA, M. et al. Clinical validity of urinary interleukin 18 and interleukin 6 determinations in preterm newborns. **Przegląd Lekarski**, v. 72, n. 11, p. 589–596, 2015.

MITHAL, L. B. et al. Cord blood acute phase reactants predict early onset neonatal sepsis in preterm infants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.

MOLDCRWER, L. L. The validity of blood and urinary cytokine measurements for detecting the presence of inflammation. In: CARLSON-NEWBERRY S. S.; COSTELLO R.B. **Emerging Technologies for Nutrition Research** –Potencial for Assessing Military Performance Capability. Whashington. 417-30.1997

MUSSAP, M. et al. The importance of biomarkers in neonatology. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 18, n. 1, p. 56-64, Feb 2013

MUSSI-PINHATA, M. M.; NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais hospitalares. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 77, n. SUPPL. 1, p. S81–S96, 2001.

MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo : um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1 (suplemento), p. 59–68, 2005.

NG, P.C.; Hugh, S.L. Diagnostic markers for neonatal sepsis. **Curr Opin Pediatr**, vol. 18, p. 125-131, 2006

NG, P. C.; LAM, H. S. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol*, v. 37, n. 3, p. 599-610, Sep 2010.

PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. *Einstein, São Paulo*, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PASSINI, R. et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): Prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, e109069 2014.

POLIN, R. A.; RANDIS, T. M. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis. **Genome Med**, v. 2, n. 9, p. 58, Sep 2010

PRUCHA, M., BELLINGAN, G., ZAZULA, R. Sepsis biomarkers. **Clin Chim Acta**. Vol. 440. 97-103. Feb 2015

PYNN, J. M. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: potential biomarker for late-onset sepsis. **Pediatr Res**, v. 78, n. 1, p. 76-81, Jul 2015

MACHADO, J. et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

RIOS, J. F. S., ROMANELLI, R. M. C. Sepsis tardia laboratorialmente confirmada em neonatos com peso de nascimento menor que 1500g. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 4, n. 2, p. 127–131, 2014.

RIZZAN,D. The newborn immune system with fetal and maternal aspects. *Rev. Ped. SOPERJ*, vol 12 n 1 2011

RODRIGUEZ, N. A.; CAPLAN, M. S. Oropharyngeal administration of mother's milk to prevent necrotizing enterocolitis in extremely low-birth-weight infants: theoretical perspectives. **J Perinat Neonatal Nurs**, v. 29, n. 1, p. 81-90, Jan-Mar 2015.

RODRIGUEZ, N. A. et al. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. **J Perinatol**, v. 29, n. 1, p. 1-7, Jan 2009.

RODRIGUEZ, N. A. et al. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. **Adv Neonatal Care**, v. 10, n. 4, p. 206-12, Aug 2010.

ROMANELLI, R. M. C. et al. Risk factors and lethality of laboratory-confirmed bloodstream infection caused by non-skin contaminant pathogens in neonates. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 189–196, 2013.

SEGURA-CERVANTES, E. et al. Inflammatory Response in Preterm and Very Preterm Newborns with Sepsis. **Mediators of Inflamm**, v. 2016,p. 6740827, 2016.

SHAH, B. A.; PADBURY, J. F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 170–178, 2014.

- SHANE, A. L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **Lancet**, v. 6736, n. 17, p. 1–11, 2017.
- SHANE, A. L.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. **Journal of Infection**, v. 68, n. SUPPL1, p. S24–S32, 2014.
- SHANNON, K.M. Recombinant erythropoietin in pediatrics: a clinical perspective. *Pediatric Annals*, vol 11 n 3 197-206 1990
- SHARMA, D. et al. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. **J Matern Fetal Neonatal Med**, p. 1-37, Apr. 2017
- SARAFIDIS, K. et al. Urine metabolomics in neonates with late-onset sepsis in a case-control study. **Nature Publishing Group**, p. 1–9, 2017.
- SHAPIRO-MENDOZA, C. K. et al. Effect of Late-Preterm Birth and Maternal Medical Conditions on Newborn Morbidity Risk. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. e223–e232, feb 2008.
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801–10, 2016.
- STOJEWSKA, M. et al. Evaluation of serum chemokine RANTES concentration as a biomarker in the diagnosis of early-onset severe infections in neonates. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 70, p. 272–279, apr 2016.
- SUGITHARINI, V. et al. TLR-mediated inflammatory response to neonatal pathogens and co-infection in neonatal immune cells. **Cytokine**, v. 69, n. 2, p. 211–217, oct. 2014.
- SUGITHARINI, V.; PREMA, A.; BERLA THANGAM, E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. **Inflam Res**, v. 62, n. 12, p. 1025–1034, dec. 2013.
- SUGUNA NARASIMHULU, S. et al. Usefulness of urinary immune biomarkers in the evaluation of neonatal sepsis: a pilot project. **Clinical pediatrics**, v. 52, n. 6, p. 520–6, 2013.
- SYLVESTER, et al. Urine Protein Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Necrotizing Enterocolitis in Infants. **J Pediatr**, v. 164, n. 3, p. 607-612, mar 2014.
- TREND, S. et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. **Br J Nutr**, 115, p. 1–16, 2016.
- VALERIO, T. A. et al. Marcadores inflamatórios e oxidativos em sangue de cordão umbilical como preditores de gravidade em sepse neonatal. **Rev Bras Ter Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 30–34, 2012.
- WHO, March of dimes, PMNCH, Save the children: Born too soon. The Global Action Report on Preterm Birth. **CP Howson, MV Kinney, JE Lawn Eds. World Health Organization Publ. Geneva**, n. 5, p. 1–126, 2012.
- WYNN, J. L. Defining Neonatal Sepsis. **Curr Opin Pediatr**. v. 28, n. 2, p. 135–140, 2017.
- WYNN, J. L.; WONG, H. R. Pathophysiology and Treatment of Septic Shock in Neonates. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 2, p. 439–479, jun 2010.

YE, Q. et al. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. **Pediatr Res**, v. 81, n. 4, p. 616621, Apr 2017

ZHENG, J.; VAGNONI, K.E.; BIRD, I.M. et al. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II Type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. **Biol. Rep.**, v.56, p.1189-1197, 1997

APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Recém-nascido

Prezada senhora, o(a) menor (a), pelo qual a senhora é responsável, está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **“Avaliação de biomarcadores no período neonatal”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Daniela Marques de L. M. Ferreira, Patrícia Terra Alves, Lídia Mayrink de Barros, Heloísio dos Reis, Aive Oliva Santos, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa, Andréia de Albuquerque Freitas, Angela Maria Oliveira e Larissa Prado Maia. Neste pesquisa nós estamos buscando novos exames que possam nos mostrar mais precocemente se o bebê recém-nascido está com infecção. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por um destes pesquisadores: Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lídia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas, após o nascimento do seu bebê, durante a sua internação hospitalar na Maternidade do Hospital das Clínicas da UFU. A participação do(a) seu(sua) filho (o) será autorizando a utilização de uma amostra do sangue e urina dele que já é colhido para exames de rotina referentes aos cuidados médicos. Se o seu filho tiver nascido prematuro e adoecer com suspeita que esteja com infecção será autorizando também a utilização de uma amostra do líquido e secreção traqueal (que apenas será colhido para fazer o diagnóstico desta infecção, se houver necessidade, por decisão da equipe médica que está cuidando do seu bebê). Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a identidade dele(a) será preservada. O (A) menor não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos consistem no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta do sangue e urina, porém estes materiais já serão coletados rotineiramente para os cuidados dele(a) durante a internação e no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta de secreção traqueal e líquido, que também serão colhidos rotineiramente no caso dele ter suspeita de infecção. Os benefícios que haverão, mesmo que não diretamente, são o avanço no diagnóstico mais cedo das infecções nos bebês possibilitando início do tratamento mais rápido e contribuindo para diminuir a mortalidade dos bebês.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre

cada uma das etapas do estudo.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Se houver qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Dra. Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lídia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas - Hospital das Clínicas, Serviço de Neonatologia - Av. Pará, 1720. Bairro Umuarama - Telefones: 3218-2112 / 3218-2454.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia – A. João Naves de Ávila, 2121 bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG – CEP: 38408-100 – Telefone: 3239-4131.

Uberlândia, de de 20....

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor _____
consinto na participação dele no projeto citado acima, após ter sido devidamente esclarecida.

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

APENDICE B – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

Projeto de Pesquisa: **Desenvolvimento e Avaliação de Biomarcadores Associados à Patologias no Período Neonatal e Implicações Diagnósticas e Prognósticas**

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

Nº sujeito pesquisa

Nº prontuário MÃE

Nº prontuário RN

Nome RN

DADOS MATERNOS, DE PRÉ-NATAL E PARTO

Idade Materna Estado Civil () solteira () casada () amasiada () viúva () divorciada

Escolaridade () 1a 3 anos () 4 a 7 anos () 8 a 11 anos () 12 ou + () ignorado

Gesta: Nº abortos Nºfilhos vivos

Nº consultas pré-natal Corticoide antenatal () não () sim, 1 doses () sim, 2 doses () sim, ≥ 3 doses

Anormalidades do pré-natal () infecção urinária () corioamnionite () sofrimento fetal agudo
 () pré-eclampsia () sífilis () ruprema, quantas horas? ____
 () RCIU () TPP () oligodramnio
 () anormalidade congênita () diabetes () drogas ilícitas
 () toxoplasmose () HIV () HBsAg () DPP

Uso de ATB () Não () Sim Quando? () 1º trim. () 2º trim. () 3º trim () 48 horas antes parto

Qual ATB? _____ Tipo de parto () vaginal () cesariana

DADOS DO RECÉM NASCIDO

Data nascimento Sexo () Masc. () Fem. () Indeterminado

Gemelaridade () Sim () Não Boletim de Apgar 1º min _____ 5º min _____

Peso nascimento Idade Gestacional Clínica

Classificação do RN () PIG () AIG () GIG

Surfactante () sim () não Uso de β-bloqueadores () sim () não

Hemotransusão () Não () Sim Idade: Hemocomponente:

Infecções () diarreia () meningite () onfalite () conjuntivite () HIV () infecções cutânea
 () sífilis () CMV () rubéola congênita () toxoplasmose

Dispositivos e Procedimentos: V.M. ____ dias CPAP nasal ____ dias PICC ____ dias SVD ____ dias
 Cat. Umb. () não () sim (arterial, venoso) ____ dias NPP ____ dias
 CVC ____ dias Drenos ____ dia Procedimento Cirúrgico () não () sim

Nº SUJEITO DA PESQUISA:

DESFECHO

() Alta hospitalar

() Transferência

() Óbito

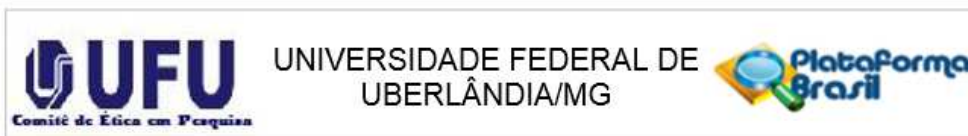
Data:

Idade:

Diagnósticos:

OBSERVAÇÕES:

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Biomarcadores Associados à Patologias no Período Neonatal e Implicações Diagnósticas e Prognósticas

Pesquisador: VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36471314.5.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.356

Data da Relatoria: 18/12/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP/UFU, considera que as pendências foram respondidas de maneira clara e adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os itens foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer 887.483 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

