



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**LÍDIA MAYRINK DE BARROS**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES  
ASSOCIADOS À SEPSE NO PERÍODO NEONATAL**

UBERLÂNDIA - MG  
2019

**LÍDIA MAYRINK DE BARROS**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES  
ASSOCIADOS À SEPSE NO PERÍODO NEONATAL**

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 Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-orientadoras:

Profa. Dra. Vânia O. Steffen Abdallah

Profa. Dra. Daniela M. L. M. Ferreira

UBERLÂNDIA  
2019

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

---

B277a Barros, Lídia Mayrink de, 1975  
2019 Avaliação de biomarcadores associados à sepse no período neonatal  
[recurso eletrônico] / Lídia Mayrink de Barros. - 2019.  
  
Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Coorientadora: Vânia Olivetti Steffen Abdallah.  
Coorientadora: Daniela M. L. M. Ferreira  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1213>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.  
  
1. Ciências médicas. 2. Sepse neonatal. 3. Cítocinas. 4. Cordão  
umbilical. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962, (Orient.). II. Abdallah,  
Vânia Olivetti Steffen, (Coorient.). III. Ferreira, Daniela Marques de  
Lima Mota, 1974, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## **LÍDIA MAYRINK DE BARROS**

### **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS À SEPSE NO PERÍODO NEONATAL**

Uberlândia, 08 de fevereiro de 2019

Resultado: aprovada

#### **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)  
UFU - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

---

Prof. Dr. Mario Leon Silva Vergara  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magda Regina Silva Moura  
Faculdade de Medicina de Araguari – IMEPAC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yara Cristina de Paiva Maia  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Martins Prado Bonini  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

**“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e ele o fará”**  
**Salmos 37:5**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha querida mãe **Anna Maria Cotta Mayrink** que teria ficado imensamente feliz e orgulhosa de ver o caminho que percorri na minha vida pessoal e profissional até esse momento. Com você aprendi a fazer tudo com amor e dedicação!

Saudades...

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me guiar nessa trajetória e me dar força nos momentos de dificuldades,

Ao meu esposo **Rodrigo Penha de Almeida**, meu porto seguro, por me fortalecer nos momentos de dificuldades, me consolar nos momentos de desespero e me alegrar nos momentos de tristeza,

Aos meus filhos **Daniel e Lucas Mayrink Almeida**, a quem eu tento ensinar a cada dia a se superarem,

Ao meu pai **Lélio Avelino de Barros**, simplesmente a pessoa mais inteligente que eu conheço, e que desde muito cedo me ensinou a importância da autonomia e de ser responsável pelos meus atos e escolhas; a lembrança de você trabalhando e estudando isolado no quarto nas nossas férias na casa da Vovó Lydia é muito viva para mim e me consolava nos momentos em que tive que fazer o mesmo para escrever essa tese,

A minha doce irmã **Lélia Mayrink de Barros**, que sempre me mostrou que a vida pode ser mais leve e sem complicações,

Aos meus sogros, cunhados (as) e sobrinhos (as), que mesmo de longe sempre apoiaram e admiraram o meu empenho profissional,

A **Kátia Oliveira e Liliam Cristina** minhas funcionárias, anjos que Deus colocou em meu caminho, pela grande ajuda em casa e por todo cuidado e amor dispensados a minha família,

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart** pelo suporte e ensinamentos e por me mostrar que as dificuldades se fazem presentes para nos indicar que somos capazes de superá-las,

As minhas co-orientadoras **Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah**, que desde a época da graduação despertou em mim o interesse pela docência e pesquisa e que através do seu convite esse doutorado se tornou possível e **Profa. Dra. Daniela M. L. M. Ferreira**, pela valiosa ajuda na fase final dessa tese, sempre na tentativa de aprimoramento,

A **Roberta Rezende Rosa**, pelo competente e importante trabalho na análise de dados, peça absolutamente fundamental para a consolidação da tese,

A **Andreia A. Freitas, Daniela S. R. Costa, Aive O. Santos e Camila P. Nascimento** pela ajuda na coleta de dados,

A equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia, **Aline Teodoro de Paula, Patrícia Terra e Larissa P. Maia**, pelo suporte na análise laboratorial,

A **Vivian M. G. O. Azevedo** pela ajuda na revisão dos artigos dessa dissertação,

Aos membros da banca de qualificação e da banca examinadora da dissertação, por terem gentilmente aceitado participar da avaliação deste estudo, e pelas valiosas sugestões,

À **Universidade Federal de Uberlândia**, em especial à **Pós-Graduação em Ciências da Saúde** por contribuir com a minha formação,

Às agências brasileiras de financiamento, **CNPq, CAPES e FAPEMIG**, por fornecer apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóticas e Nanobiotecnologia - INCT-TeraNano (CNPq / CAPES / FAPEMIG, números de Subsídios CNPq-465669 / 2014-0 E FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

E por fim, aos **pequenos prematuros** que chegaram apressados e tão indefesos a esse mundo e à suas mães, que tanto se dedicam a eles e que permitiram a realização dessa pesquisa.

## RESUMO

**Introdução:** A sepse neonatal continua sendo um desafio pela alta incidência e letalidade e pela dificuldade no diagnóstico, especialmente entre os recém-nascidos (RN) pré-termo de muito baixo peso. O diagnóstico precoce e o início do tratamento apropriado têm um papel crucial na melhoria da sobrevida destes recém-nascidos.

**Objetivo:** Avaliar a presença de biomarcadores em sangue de cordão umbilical e periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso que possam auxiliar na predição da sepse neonatal.

**Método:** Foram dosados 27 biomarcadores com um kit de alta precisão (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay) em sangue do cordão umbilical e no sangue periférico no 2º, 7º, 14º e 28º dias de vida, dos RN com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento inferior a 1.500g, sem malformações congênitas maiores, que nasceram durante um período de 8 meses. Os RN foram acompanhados e divididos em 2 grupos: grupo controle e grupo sepse de acordo com a presença de sepse. Para os marcadores com diferença estatística foi realizado a curva ROC e encontrado o melhor cutoff que poderia ajudar a predizer a sepse e calculado a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor predictivo positivo e negativo.

**Resultados:** Durante o período estudado nasceram 48 RN elegíveis.

**Na análise do sangue do cordão umbilical** foram excluídos 9 RN por não ter sido possível a coleta do sangue no momento do nascimento, e divididos em 2 grupos: grupo controle (n=12) e grupo sepse (n=27), sendo 15 (56%) sepse clínica e 12 (44%) sepse comprovada, com média da idade no dia da sepse de 7 dias. Os RN do grupo sepse apresentaram menores concentrações de MCP-1 do que os RN do grupo controle. Os RN com valores de MCP-1 menores que 130,2 pg/mL no sangue do cordão umbilical apresentaram chance 9 vezes maior de sepse no período neonatal com sensibilidade de 81,2% e especificidade de 66,6%. Já no sangue periférico de 2 dias de vida houve um comportamento inverso. Os RN com valores de MCP-1 maiores que 111,3 pg/mL apresentaram chance 7,2 vezes maior de sepse no período neonatal com sensibilidade de 70,8% e especificidade de 75%.

**Na análise do sangue periférico do RN,** foram excluídos os RN com sepse precoce (n=5), e os que faleceram antes do 7º dia de vida (n=5), e após divididos em 2 grupos: grupo controle (n=14) e grupo sepse tardia (n=24), sendo 14 (58,3%) sepse clínica e 10 (41,7%) sepse comprovada, com média da idade no dia da sepse de 11,1 dias. Foram então escolhidos para

análise as amostras de sangue do 2º e 7º dia de vida do RN, antes do diagnóstico de sepse. No 2º dia de vida, os RN do grupo sepse tardia apresentaram maiores concentrações de IL1-ra, IL-6, IP-10, e MCP-1 e menores concentrações de FGF basic, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, PDGF-BB e TNF- $\alpha$ . No 7º dia de vida apresentaram maiores concentrações de VEGF, IL-8, IL-15 e IL1-ra e menores concentrações de IL-6, IL-13, IP-10 e IL-5. Destacamos a IL-5 e a IL-6 no 2º dia de vida que apresentaram os maiores valores de odds ratio (55 e 53,3) e acurácia (83,6 e 87,6) e o VEGF no 7º dia de vida (odds ratio 46,2 e acurácia 84,8).

**Conclusão:** Concluímos que alguns biomarcadores podem ajudar a predizer a sepse, em especial o MCP-1 no cordão umbilical, a IL-5 e a IL-6 no 2º dia de vida e o VEGF no 7º dia de vida. Todos esses marcadores, com exceção da IL-6 são ainda muito pouco explorados na sepse neonatal, merecendo atenção especial em novos estudos.

**Palavras-chave:** sepse neonatal, recém-nascido pré-termo de muito baixo peso, citocinas, biomarcadores, cordão umbilical, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

## ABSTRACT

**Introduction:** Neonatal sepsis continues to be a challenge because of its high incidence and lethality and difficult diagnosis, especially among preterm newborns (NB) with very low birth weight. Early diagnosis and initiation of appropriate treatment play a crucial role in improving the survival of these newborns.

**Objective:** Evaluate the presence of biomarkers in umbilical and peripheral cord blood of very low birth weight newborns that may aid in the prediction of neonatal sepsis.

**Methods:** Twenty-seven biomarkers were measured with a high precision kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay) in umbilical cord blood and peripheral blood at the 2nd, 7th, 14th and 28th days of life of the newborns of gestational age of less than 34 weeks and birth weight of less than 1,500 g, without major congenital malformations, who were born during a period of 8 months. The newborns were followed up and divided into 2 groups: the control group and the sepsis group according to the presence of sepsis. For the markers with statistical difference, the ROC curve was performed and the best cutoff was found to help predict sepsis. The sensitivity, specificity, accuracy, positive and negative predictive value were also calculated.

**Results:** 48 eligible infants were born during the study period.

**In the analysis of umbilical cord blood,** 9 newborns were excluded because they were not able to collect blood at birth, the others were divided in 2 groups: control group ( $n = 12$ ) and sepsis group ( $n = 27$ ). In the sepsis group, the sepsis was clinical sepsis in 15 (56%) and proved sepsis in 12 (44%), with average age on day of sepsis of 7 days. NB with sepsis had lower concentrations of MCP-1 than the control group. NB with MCP-1 values lower than 130.2 pg / mL in umbilical cord blood presented a 9-fold higher chance of sepsis during the neonatal period with sensitivity of 81.2% and specificity of 66.6%. In the peripheral blood of 2 days of life there was an inverse behavior. NB with MCP-1 values greater than 111.3 pg / mL had a 7.2-fold higher chance of sepsis in the neonatal period with a sensitivity of 70.8% and specificity of 75%.

**In the analysis of the peripheral blood of the newborn,** NB with early sepsis ( $n = 5$ ) and those who died before the 7th day of life ( $n = 5$ ) were excluded and after divided into 2 groups: control group ( $n = 14$ ) and late-onset sepsis group ( $n = 24$ ). In the sepsis group, the sepsis was clinical sepsis in 14 (58.3%) and proven sepsis in 10 (41.7%), with average age on the day of sepsis of 11.1 days. Blood samples from the 2nd and 7th day of life of the

newborn, before the diagnosis of sepsis, were then selected for analysis. On the second day of life, the NB of the late-onset sepsis group had higher concentrations of IL1-ra, IL-6, IP-10, and MCP-1 and lower concentrations of FGF basic, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 , IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, PDGF-BB and TNF- $\alpha$ . On the 7th day of life, they had higher concentrations of VEGF, IL-8, IL-15 and IL1-ra and lower concentrations of IL-6, IL-13, IP-10 and IL-5. We highlight IL-5 and IL-6 in the second day of life that presented the highest values of odds ratio (55 and 53.3) and accuracy (83.6 and 87.6) and VEGF on the 7th day of life (odds ratio 46.2 and accuracy 84.8).

**Conclusion:** We concluded that some biomarkers may help to predict sepsis, especially MCP-1 in the umbilical cord, IL-5 and IL-6 in the second day of life and VEGF in the 7th day of life. All of these markers, with the exception of IL-6, are still poorly explored in neonatal sepsis, deserving special attention in new studies.

**Key words:** neonatal sepsis, very low weight preterm newborn, cytokines, biomarkers, umbilical cord, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), vascular endothelial growth factor (VEGF).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	pág
<b>Figura 1</b> - Alterações no desenvolvimento que ocorrem no sistema imunológico humano no início da vida .....	23
<b>Quadro 1</b> - Principais referências de artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação no diagnóstico da sepse neonatal em sangue periférico dos recém-nascidos .....	41
<b>Quadro 2</b> - Principais resultados dos artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação no diagnóstico da sepse neonatal .....	43
<b>Quadro 3</b> - Principais resultados dos artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação na predição da sepse neonatal em sangue de cordão umbilical .....	47
<b>Quadro 4</b> - Principais resultados dos artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação na predição da sepse neonatal em sangue de cordão umbilical .....	48
<b>ARTIGO 1</b>	
<b>Figura 1</b> – Comparação do MCP-1 entre os grupos controle e sepse no sangue de cordão umbilical (A) e do recém-nascido com 2 dias de vida (C) e suas respectivas curvas ROC (B e D) .....	58
<b>ARTIGO 2</b>	
<b>Figura 1</b> – Flowchart da alocação de pacientes no estudo .....	73
<b>Figura 2</b> - Níveis de VEGF no 7º dia de vida em relação ao dia de ocorrência da sepse no grupo sepse .....	76
<b>Figura 3</b> – Análise da cinética do G-CSF no dia da sepse clínica sem confirmação (A) e sepse comprovada (B), considerando o dia 0 como o dia da suspeita de sepse.	77

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b> - Dados maternos, gestacionais e dos recém-nascidos do grupo controle e do grupo sepse .....	57
<b>Tabela 2</b> - Valores do odds ratio, intervalo de confiança, risco relativo, sensibilidade e especificidade para o MCP-1 como preditor da sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida .....	59

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b> - Dados clínicos e demográficos da gestação, nascimento e evolução do recém-nascido .....	74
<b>Tabela 2</b> - Valores da área da curva ROC, cutoff (em pg/mL), odds ratio, intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e acurácia para os biomarcadores com diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e sepse no 2º dia de vida .....	75
<b>Tabela 3</b> - Valores da área da curva ROC, cutoff (em pg/mL), odds ratio, intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e acurácia para os biomarcadores com diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e sepse no 7º dia de vida .....	76

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Eotaxin	Eotaxina
FGF basic	Fator de crescimento do fibroblasto
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HCU-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1ra	Interleucina 1 receptor antagonista
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
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-12	Interleucina 12
IL-12p70	Interleucina 12 porção 70
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-17A	Interleucina 17A
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa

MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
PCR	Proteína C reativa
PCT	Procalcitonina
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B
RANTES	Regulador na ativação normal de células T expressa e segregada
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RNPT MBP	Recém-nascido pré-termo de muito baixo peso
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

	pág
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Considerações iniciais .....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	19
2.1- Recém-nascido pré-termo e seu sistema imune .....	19
2.2- Sepse neonatal .....	23
2.3- Biomarcadores no diagnóstico da sepse neonatal .....	26
2.4 - Sangue de cordão umbilical no diagnóstico da sepse neonatal .....	45
3. OBJETIVOS .....	50
4. ARTIGO 1 .....	51
Título: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) como um marcador preditivo para sepse neonatal no sangue de cordão umbilical e periférico	
5. ARTIGO 2 .....	68
Título: Cinética de biomarcadores na predição da sepse neonatal tardia	
6. CONCLUSÃO .....	86
7. PERSPECTIVAS .....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
9. APÊNDICES .....	99
10. ANEXOS .....	107

## 1- INTRODUÇÃO

A sepse é uma infecção complicada pela disfunção de um ou mais órgãos (KAWASAKI, 2017). No período neonatal, ou seja, os primeiros 28 dias de vida, é uma das doenças mais graves pela sua alta incidência e alta letalidade. A Organização Mundial da Saúde estima que 15% das mortes neonatais são causadas pela sepse, índice consideravelmente maior entre os recém-nascidos pré-termo (WHO, 2012). Esse grupo de recém-nascidos (RN) possui um sistema imune ainda imaturo, incapaz de responder adequadamente aos agravos infecciosos (LEVY, 2007; SHARMA et al., 2012). Além da maior incidência e letalidade, a sepse durante o período neonatal apresenta outras particularidades, como a dificuldade no diagnóstico, uma vez que os sinais e sintomas são inespecíficos e facilmente confundidos com as condições que são esperadas nesta população, tais como desconforto respiratório, apnéia da prematuridade e dismotilidade gastrointestinal (BEKHOF et al., 2013). Ainda, os exames laboratoriais atualmente disponíveis, em especial hemograma e as proteínas de fase aguda, podem não contribuir adequadamente para o diagnóstico (QUADIR; BRITTON, 2018; ROSENFELD et al., 2018). Todos esses fatores associados têm levado ao uso excessivo de antibióticos no ambiente de terapia intensiva neonatal e o surgimento de organismos resistentes (TZIALLA et al., 2015).

Assim, muitos estudos clínicos têm sido realizados nos últimos 30 anos na tentativa de identificar biomarcadores capazes de auxiliar no diagnóstico precoce da sepse neonatal e vários artigos de revisão foram escritos tentando organizar o conhecimento acerca desses novos biomarcadores. Entretanto, é consenso, mesmo nas revisões mais atuais acerca do assunto que, a despeito dos dados promissores de alguns biomarcadores, nenhum é capaz isoladamente de diagnosticar corretamente a sepse neonatal (GILFILLAN; BHANDARI, 2017; MEMAR et al., 2019; MONASTERO; PENTYALA, 2017; SHARMA et al., 2018; TZIALLA et al., 2018). Além disso, seria interessante a detecção de algum marcador inflamatório que pudesse predizer o quadro de sepse, antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos (NAKSTAD; SONERUD; SOLEVÅG, 2016). Nesse sentido, o sangue de cordão umbilical, que é a primeira amostra hematológica do RN, ainda hoje é considerado uma possibilidade na predição da sepse (IROH TAM; BENDEL, 2017; SU et al., 2014).

Grande parte dos estudos realizados para o diagnóstico de sepse incluem a análise de RN à termo e pré-termo, constituindo um aspecto desfavorável, uma vez que a cinética do processo biológico associado à resposta biológica e aos biomarcadores podem diferir

marcadamente em relação a idade gestacional (HEDEGAARD; WISBORG; HVAS, 2015), indicando a necessidade de se estudar o grupo dos RN pré-termo em separado. Ainda, a grande maioria desses estudos é realizada em países desenvolvidos. A contribuição dos países em desenvolvimento e em especial dos serviços nacionais na análise de citocinas em sangue periférico (SILVEIRA; PROCIANOY, 1999) e em sangue de cordão umbilical (CAMPOS et al, 2010; CANCELIER et al, 2009; KUROKAWA et al, 2013) ainda é pequena. Além disso os estudos identificados na literatura avaliaram, em geral, as proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT) e apenas poucos biomarcadores. Portanto, existe um grande número de citocinas ainda não avaliadas em estudos clínicos e que podem ser potenciais marcadores para o diagnóstico da sepse neonatal.

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU) é uma unidade hospitalar conveniada ao Sistema Único de Saúde (SUS), que pertence à Universidade Federal de Uberlândia, de alta complexidade e de referência para 30 municípios das macro e microregiões do Triângulo Mineiro. O Serviço de Neonatologia do HCU-UFU é uma unidade de referência para atendimento de recém-nascidos pré-termo (RNPT) e apresenta protocolos clínicos elaborados pela equipe multidisciplinar de acordo com as melhores práticas estabelecidas pela medicina baseada em evidência. Assim como todos os serviços de neonatologia, esta unidade enfrenta problemas relacionados às infecções neonatais. Dentro deste contexto, é de grande importância o conhecimento do comportamento de novos marcadores no recém-nascido, com objetivo de viabilizar um tratamento adequado em tempo hábil. A coleta de sangue rotineira ao nascimento e em diferentes momentos faz parte do protocolo de assistência do Serviço de Neonatologia e motivou a equipe em contribuir com as linhas de pesquisa mundiais na tentativa de buscar correlacionar os biomarcadores com o diagnóstico precoce da infecção neonatal. O Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da UFU é referência internacional no desenvolvimento de novos biomarcadores, inclusive na sepse adulta, e associou-se ao Serviço de Neonatologia da UFU para proporcionar um trabalho conjunto com o intuito de buscar estratégias para aprimorar o diagnóstico de sepse neonatal, visando reduzir a morbi-mortalidade decorrente das infecções relacionadas à assistência à saúde em neonatologia.

Espera-se, a partir deste estudo, demonstrar as alterações que ocorrem nos níveis de vários biomarcadores no sangue de cordão umbilical e no sangue periférico de RN pré-termo com sepse neonatal. Pretende-se ainda, identificar entre eles qual (ou quais) seriam o melhor marcador que poderia ajudar na predição e/ou no diagnóstico precoce da sepse neonatal,

almejando, assim, otimizar a assistência direcionada a eles.

### **1.1- Considerações iniciais**

A formatação desta tese segue o modelo alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Uberlândia, e que especifica a necessidade de inclusão de artigos científicos. Primeiramente, será apresentada uma fundamentação teórica, como forma de revisão da literatura, sobre os temas abordados na tese. Posteriormente, serão apresentados dois manuscritos elaborados a partir dos dados obtidos neste estudo.

O primeiro manuscrito intitulado “**Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) como um marcador preditivo para sepse neonatal no sangue de cordão umbilical e periférico**” refere-se à avaliação dos 27 biomarcadores no sangue de cordão umbilical de RNPT muito baixo peso (MBP). Os 39 RN incluídos foram divididos em 2 grupos (12 no grupo controle e 27 no grupo sepse) e foi identificado a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) como um possível marcador e validado esse achado com o sangue periférico do RN de 2 dias. Esse artigo será submetido para a revista *Pediatric Critical Care*.

O segundo manuscrito intitulado “**Cinética de biomarcadores na predição da sepse neonatal tardia**” refere-se à avaliação dos 27 biomarcadores no sangue periférico do RNPT MBP com 2 e 7 dias de vida. Os 38 RN incluídos foram divididos em 2 grupos (14 no grupo controle, e 24 no grupo sepse tardia) e foi identificado que vários deles podem ajudar a predizer a sepse tardia, em especial a interleucina 5 (IL-5) e a interleucina 6 (IL-6) no 2º dia de vida e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no 7º dia de vida. Esse manuscrito será submetido para a revista *Cytokine*.

## 2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1- Recém-nascido pré-termo e seu sistema imune

Nos últimos anos observou-se um grande avanço na terapia intensiva em especial da terapia intensiva neonatal, com o desenvolvimento de novas tecnologias e possibilidades diagnósticas e terapêuticas e dessa forma maior sobrevida de crianças nascidas prematuramente e/ou com baixo peso (NG; LAM, 2006; WYNN, 2016).

O período neonatal é definido como aquele que se inicia ao nascimento e termina aos 28 dias de vida completos. O recém-nascido (RN) é classificado quanto a idade gestacional e ao peso ao nascer. Em relação à idade gestacional são classificados como pré-termo (nascimento com até 37 semanas incompletas), termo (nascimento com 37 semanas completas até 42 semanas incompletas) e pós-termo (nascimento com 42 semanas completas ou mais). Em relação ao peso de nascimento são classificados como baixo peso (menor que 2.500g), muito baixo peso (menor que 1.500g) e extremo baixo peso (menor que 1.000g) (WHO, 2012). A classificação do RN quanto ao peso e idade gestacional é muito importante para a prática diária, pois contribui para o manejo adequado, auxiliando no diagnóstico e na instituição precoce do tratamento quando indicado (KARDATZKE; ROSE; ENGLE, 2017; SHAPIRO-MENDOZA et al., 2008; WHO, 2012). Dados da Organização Mundial da Saúde referem que 11% de todas as crianças nascem prematuras, representando cerca de 15 milhões de RNPT ao ano (BLENCOWE et al., 2013).

O RNPT é mais vulnerável à infecção e isso pode ser atribuído a dois motivos principais: a imaturidade do desenvolvimento, levando a déficits do sistema imunológico, como por exemplo a falta de transferência transplacentária de anticorpos maternos que ocorrem normalmente no terceiro trimestre de gestação e a necessidade de intervenções médicas, que são de fundamental importância para a sobrevida mas que interferem nas barreiras protetoras, como por exemplo a ventilação mecânica e os acessos venosos (SHARMA et al., 2012).

A primeira linha de defesa do organismo é composta por barreiras físicas, como a pele queratinizada e as mucosas do trato respiratório e as barreiras químicas, como as enzimas (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005). O extrato córneo do RN, responsável pela função de barreira epidérmica, só se torna maduro naqueles nascidos prematuramente, 2 semanas após o nascimento. Dessa forma, a epiderme do RNPT é menos capaz de realizar o bloqueio dos

microrganismos tornando-o mais suscetível (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005). Além disso, o RNPT é geralmente submetido a vários procedimentos invasivos, que provocam quebra das barreiras primárias de proteção e consequente aumento da susceptibilidade à infecções e ativação da resposta inflamatória (MUSSI-PINHATA; NASCIMENTO, 2001; ROMANELLI et al., 2013).

O desenvolvimento do sistema imune inicia-se por volta da sexta semana de gestação estendendo-se por toda a infância. Durante a gestação, o feto está em contato com o líquido amniótico, responsável por estimular os tecidos linfóides por meio de várias citocinas e fatores de crescimento, sendo fundamental para o adequado desenvolvimento intra-útero (CAMACHO-GONZALEZ; SPERMAN; STOLL, 2013; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017). O nascimento prematuro interrompe este estado, causando uma desordem nas respostas anti e pró-inflamatórias, levando o RNPT a entrar em contato com vários抗ígenos do meio externo (GLASS et al., 2015; KELLY; COUTTS, 2000).

A função imune é dividida em inata e adaptativa. A proteção contra patógenos é alcançada através de ações coordenadas entre elas (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抗ígenos 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 inata inicia-se após injúria tecidual ou quebra de barreira protetora, permitindo contato entre o organismo e agentes patogênicos com ativação primária de células dendríticas e macrófagos, que são os principais produtores de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) cujas ações voltam-se para os próprios macrófagos e determinam resposta autócrina com a produção e secreção de outras citocinas inflamatórias (IL-6, interleucina 8 [IL-8], interleucina 12 [IL-12], interleucina 17 [IL-17], interferon gama [IFN- $\gamma$ ] e outros fatores de crescimento). Além disso, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 atuam sobre o endotélio vascular e produzem hipertensão, atração de novos polimorfonucleares levando a leucocitose e degranulação de neutrófilos, que liberam óxido nítrico (NO) e outros derivados do oxigênio provocando vasodilatação local seguida de edema e perda do tônus vascular (ANDRADE et al., 2015; BHANDARI, 2014; CAMACHO-GONZALEZ; SPERMAN; STOLL, 2013; LEVY, 2007; MUSSAP et al., 2013). Desta forma inicia-se a atração de neutrófilos e outras células de defesa de primeira ordem proporcionando

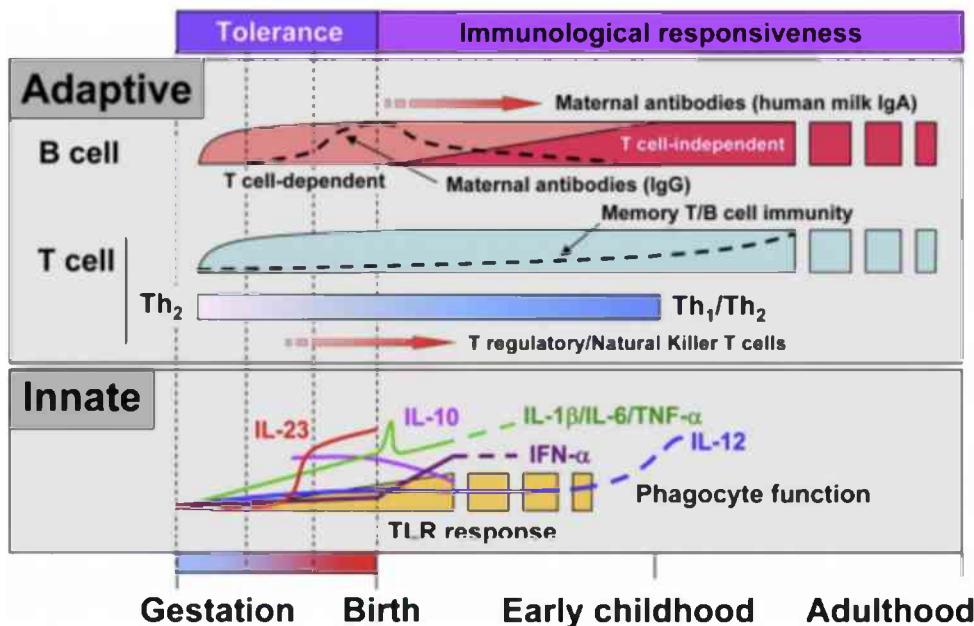
um aumento considerável nas citocinas pró-inflamatórias. Essa amplificação da resposta pró-inflamatória é conhecida como a resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (DENNING et al., 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017; GLASS et al., 2015; NG; LAM, 2010; SEGURA-CERVANTES et al., 2016; SHARMA et al., 2018). A ativação em nível sistêmico das citocinas pró-inflamatórias pode gerar lesões em órgãos distantes e consumo de plaquetas durante a coagulação intravascular disseminada (CIVD) o que desencadeia a disfunção de múltiplos órgãos (DMO) (MACHADO et al., 2014; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013; WYNN; WONG, 2010). Para contrabalancear a resposta pró-inflamatória, inicia-se um aumento das citocinas anti-inflamatórias (interleucina 10 [IL-10], interleucina 4 [IL-4] e fator de transformação do crescimento beta [TGF- $\beta$ ]) buscando a normalização do sistema como um todo, conhecida com a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (MACHADO et al., 2014). O RNPT tem uma produção de citocinas significativamente menor quando comparado ao RN termo, e é provável que esta resposta inflamatória reduzida na vida fetal sirva para proteger contra os potenciais efeitos prejudiciais de um sistema imunológico em ativação. No entanto, a vantagem evolutiva da atenuação das defesas imunitárias inatas no útero tornam-se claramente uma desvantagem clínica após um parto prematuro (SHARMA et al., 2012).

A **imunidade adaptativa**, também conhecida como específica, é aquela adquirida após a exposição a um antígeno, 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 RNPT esta resposta é pouco expressiva e ineficaz devido à baixa produção de células T e B, não gerando uma adequada memória imunológica. Crianças nascidas a termo beneficiam-se da proteção suplementar proporcionada pelos anticorpos maternos transferidos através da placenta. Os pré-termo, no entanto, perdem substancialmente essa transferência transplacentária de anticorpos maternos, que ocorre principalmente durante o terceiro trimestre de gestação (SHARMA et al., 2012).

Assim, a defesa inicial do RNPT é baseada na imunidade inata (LEVY, 2007; SHARMA et al., 2012; YE et al., 2017). A imunidade adaptativa desenvolve-se plenamente apenas mais tarde, nos primeiros anos de vida (SHARMA et al., 2012). De fundamental importância para a imunidade adaptativa é a diferenciação de células T em células auxiliares efetoras (T helper). As citocinas surgiram como indutores críticos de Th, que são chamadas de Th1 ou Th2 de acordo com suas propriedades funcionais e pelas citocinas que a induzem (MOSMANN et al.,

2005). Os eventos cuidadosamente orquestrados que regulam a homeostase do sistema imunológico e o desenvolvimento de uma resposta imune protetora é coordenado em grande parte pelas citocinas produzidas por Th1 e Th2. Um desequilíbrio de Th1 e Th2 podem ser responsáveis tanto pela ocorrência como pela progressão de várias doenças e suas complicações resultantes (SHURIN et al., 1999). As citocinas do tipo Th1, como o IFN- $\gamma$ , interleucina 2 (IL-2) e IL-17, desempenham um papel fundamental na defesa precoce aos patógenos e na indução da imunidade mediada por células. As citocinas do tipo Th2, como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 direcionam o sistema imune para a tolerância imunológica e não para a defesa contra infecções microbianas. Evidências acumuladas sugerem que as respostas Th1 em recém-nascidos estão comprometidas, incluindo uma produção deficiente de citocinas tipo Th1 por células T grupamento de diferenciação 4 (CD4+) neonatais e hiporesponsividade dos macrófagos neonatais à estimulação por IFN- $\gamma$ . Estas deficiências contribuem para a fraca imunidade celular em recém-nascidos com tendência para uma resposta tipo Th2 (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004; SCHAUB et al., 2008).

A Figura 1 ilustra os eventos maturacionais que ocorrem nas funções imunes adaptativas e inatas na transição de um estado de tolerância fetal para a exposição a microorganismos e outros抗ígenos ambientais após o nascimento. Podemos perceber que na gestação há um estado de “tolerância fetal” seguida por um estado de resposta imunológica após o nascimento. Na função adaptativa transferência de anticorpos transplacentária (IgG) ocorre principalmente durante a fase final da gestação e, conforme já citado, o RNPT não se beneficia dessa proteção suplementar. Percebemos também um predomínio da resposta Th2 durante a gestação. Na função imune inata podemos observar uma atenuação global da resposta de citocinas durante a gestação, com uma exacerbação crescente próxima ao nascimento e no início da vida.



**Figura 1:** Alterações no desenvolvimento que ocorrem no sistema imunológico humano no início da vida (SHARMA et al., 2012).

#### Painel superior: Funções imunes adaptativas

Materno: transferência de anticorpos transplacentária (imunoglobulina G - IgG) que ocorre principalmente durante o final da gestação, seguida pela proteção dos anticorpos maternos (entre eles a imunoglobulina A - IgA) adquirida através do leite materno após o nascimento. A resposta de anticorpos do próprio bebê torna-se plenamente madura mais tarde, durante a primeira infância.

Neonatal: as células T são amplamente influenciadas pelas respostas do tipo 2 e com altas proporções de substâncias reguladoras e naturais.

#### Painel inferior: Funções imunes inatas

Pró-inflamatório (IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12, IL-23) e anti-viral (interferon alfa - IFN-α). As respostas de citocinas são amplamente atenuadas em prematuros, enquanto a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 é relativamente alta durante a gestação tardia e no nascimento.

## 2.2- Sepse neonatal

Recém-nascidos pré-termo têm uma alta incidência de sepse neonatal especialmente o grupo dos RNPT MBP. Aproximadamente 21% dos RNPT pesando menos de 1.500g, desenvolvem um ou mais episódios de sepse confirmada por cultura de sangue (CAMACHO-GONZALEZ; SPERMAN; STOLL, 2013). Ao contrário da mortalidade relacionada as patologias respiratórias, que mostram um declínio constante, a mortalidade por infecção neonatal em RNPT aumentou nos últimos 20 anos (BERRINGTON et al., 2012). As infecções neonatais são responsáveis por aproximadamente 23,4% das mortes registradas em neonatos

todo ano no mundo (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017). Ainda, os RN que sobrevivem a sepse neonatal podem apresentar sequelas neurológicas devido ao acometimento do sistema nervoso no choque séptico ou à hipóxia severa (LEAL et al., 2018).

A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada frente ao agente infeccioso (SINGER et al., 2016). É portanto, uma infecção complicada pela disfunção de um ou mais órgãos (KAWASAKI, 2017). A sepse neonatal é definida como uma síndrome clínica de resposta inflamatória sistêmica acompanhada por bactеремia nos primeiros 28 dias de vida (GOLDSTEIN et al., 2005).

De acordo com o início e modo de infecção, a sepse neonatal pode ser classificada em precoce e tardia. A sepse precoce se inicia nos primeiros 3 dias de vida, é adquirida por transmissão vertical de organismos invasivos e está relacionada a fatores de risco maternos, gestacionais e/ou periparto. A sepse tardia ocorre após esse período e é, em grande parte, causada por organismos adquiridos do meio ambiente após o nascimento (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017). A frequência da sepse precoce é menor em relação a sepse tardia, porém é responsável por uma maior taxa de mortalidade (PUOPOLI, 2008). Em um estudo no nosso serviço foi detectado no período de 1 ano uma incidência de sepse neonatal precoce de 8,5% dos RN internados no serviço, o que representou um terço dos episódios de sepse, associada a alta mortalidade (44,1%) (BARBOSA et al., 2014).

O fator neonatal mais importante que predispõe a sepse é a prematuridade associada ao baixo peso ao nascer (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017). Os RNPT, especialmente os RNPT MBP, apresentam taxas de incidência 10 a 25 vezes maiores de desenvolver sepse em relação os nascidos a termo com peso normal (CORTESE et al., 2016). Outros fatores de risco neonatal incluem sexo masculino, baixa pontuação do Apgar no 1º e 5º minutos de vida, desconforto respiratório, desordens fetais, anemia, hemorragia intraventricular, hipotermia e distúrbios metabólicos (CORTESE et al., 2016). Além dos fatores de risco neonatais, existem fatores maternos também considerados como de risco para a sepse neonatal. O parto prematuro (< 37 semanas), a ruptura prematura de membranas (antes do início do trabalho de parto), a ruptura prolongada de membranas ( $\geq 18$  horas), a infecção ou colonização materna periparto e o baixo status socioeconômico estão fortemente associados a sepse neonatal (CHAN et al., 2013; CORTESE et al., 2016).

Os sinais iniciais de infecção em neonatos são inespecíficos e também podem estar simplesmente associados à prematuridade ou à transição para a vida extra-uterina (IROH TAM; BENDEL, 2017; SHAH; PADBURY, 2014). Os principais sinais clínicos sugestivos de sepse

incluem: instabilidade térmica, anormalidades da coloração da pele (cianose, palidez, icterícia), desconforto respiratório (apnéia, taquipnéia, dispnéia, necessidade de ventilação mecânica), anormalidades cardiocirculatórias (bradicardia, taquicardia, aumento do tempo de enchimento capilar, hipotensão), anormalidades neurológicas (hipotonía, hiporeflexia, irritabilidade, letargia, convulsão) e sintomas gastrointestinais (distensão abdominal, resíduos gástricos, vômitos) (SU et al., 2014).

Assim, o diagnóstico de sepse neonatal é difícil de ser estabelecido e continua a ser um desafio. A hemocultura positiva é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de sepse, porém o seu resultado demora de 48 a 72 horas (IROH TAM; BENDEL, 2017; TZIALLA et al., 2018; VAN HERK; STOCKER; VAN ROSSUM, 2016). A inoculação de pequeno volume de sangue (0,5 a 1 mL) diminui a sensibilidade e teoricamente, para otimização dos resultados 6 mL de sangue seriam necessários, o que não é possível (SHAH; PADBURY, 2014). Ainda a sensibilidade pode estar diminuída pelo uso de terapia antimicrobiana materna e pela baixa ou intermitente bacteremia no recém-nascido infectado (TZIALLA et al., 2018). Além disso, a sepse neonatal não pode ser sempre excluída nos resultados negativos de culturas (SHAH; PADBURY, 2014; TAPPERO; JOHNSON, 2010). Para o RN termo assintomático com suspeita de sepse neonatal, a cultura negativa após 36 a 48 horas é suficiente para a descontinuação da antibioticoterapia empírica. Em neonatos doentes não se pode atuar da mesma maneira, devendo considerar outros fatores como sinais clínicos e resultados hematológicos para descontinuar o tratamento (BENITZ, 2010).

Ao longo dos anos, o exame mais utilizado para auxiliar na detecção de um processo infeccioso antes que os resultados das culturas estivessem disponíveis, foi o hemograma, sendo avaliado o número total de leucócitos, número de neutrófilos, número de neutrófilos imaturos, a relação de neutrófilos imaturos / neutrófilos totais e número de plaquetas, conforme descritos por Rodwell (RODWELL; LESLIE; TUDEHOPE, 1988). Porém o hemograma apresenta baixa sensibilidade e portanto poderia apenas contribuir para a suspeita de sepse, sem confirmar ou ser útil na decisão de iniciar ou suspender o antibiótico (TAPPERO; JOHNSON, 2010). Um grande estudo de coorte realizado com 166 mil RN encontrou que, embora baixas contagens de células brancas sanguíneas e de neutrófilos absolutos e altos índices de neutrófilos imaturos sobre neutrófilos totais (I/T) estejam associados a infecção, a baixa sensibilidade da contagem completa de células sanguíneas torna estes índices marcadores diagnósticos insatisfatórios para descartar a infecção (HORNIK et al., 2012). Recentemente foi novamente demonstrado que

valores de neutrófilos (neutrófilos totais, neutrófilos imaturos e a relação imaturo / neutrófilos total) são preditores pobres de sepse neonatal tardia (ROSENFELD et al., 2018).

O diagnóstico precoce, antes que ocorra deterioração clínica, é de particular interesse dos neonatologistas, uma vez que o tempo para início da terapêutica parece ser de grande importância e representa um dos maiores determinantes da sobrevida na sepse neonatal. Assim, um dos grandes esforços na redução da taxa de mortalidade neonatal é focada na procura de marcadores bioquímicos que sejam capazes de predizer precocemente o risco de desenvolvimento de doenças agudas neonatais e o monitoramento do curso da doença no recém-nascido grave e agudamente doente (MUSSAP et al., 2013).

### **2.3- Biomarcadores no diagnóstico da sepse neonatal**

Prestadores de cuidados neonatais avaliaram inúmeros testes laboratoriais à procura de um que seja útil para o diagnóstico de sepse neonatal, ajudando a confirmar rapidamente o diagnóstico e acompanhar a evolução. A contínua procura por biomarcadores para detecção de infecção se deve ao fato de suas potenciais aplicações, basicamente em três circunstâncias (BENITZ, 2010). Primeiro, no caso de um RN com sinais clínicos, um biomarcador poderia auxiliar a decisão de iniciar o tratamento com antibiótico e posteriormente verificar retrospectivamente aqueles que não foram infectados e que os antibióticos poderiam ser descontinuados com segurança após um intervalo de tratamento empírico. Segundo, entre aqueles RN com fatores de risco históricos (por exemplo ruptura prolongada de membranas), um biomarcador que identificaria sepse antes mesmo da presença de sinais clínicos. Nestas situações, atualmente as escolhas são ou o início de terapia empírica, seguida da dependência de culturas e exames de reagentes de fase aguda para identificar RN para os quais o tratamento era desnecessário, ou observação clínica próxima, com início de terapia para RN que desenvolvem sinais clínicos de infecção. Em terceiro lugar, um biomarcador para monitorar a resposta à terapia ou prognóstico em RN nos quais a infecção é confirmada. Nenhum teste atualmente disponível ou combinação de testes tem sensibilidade e especificidade suficientes para atingir esses objetivos (BENITZ, 2010).

O biomarcador ideal deveria ter as seguintes propriedades clínicas: 1) fornecer um algoritmo com ponto de corte bem definido com sensibilidade e valor preditivo negativo aproximando-se de 100%; 2) detectar precocemente a infecção; 3) identificar precocemente um

patógeno específico ou uma categoria de patógenos; 4) monitorar o progresso da doença; 5) orientar o tratamento antimicrobiano; 6) prever a gravidade da doença no início da infecção e prever o prognóstico (NG; LAM, 2010). Pierrickos e Vicent (2010) realizaram extensa revisão da literatura (3.370 artigos) e encontraram 178 biomarcadores diferentes avaliados quanto ao uso potencial na sepse em geral, adulta e pediátrica, mostrando que, apesar da maioria deles ter sido testada clinicamente, principalmente como marcadores prognósticos, poucos foram estudados como marcadores de diagnóstico da sepse. E nenhum teve especificidade e sensibilidade suficientes para diferenciar sepse de resposta inflamatória por outras causas e portanto, nenhum biomarcador sozinho poderia ajudar e ser rotineiramente implantado na prática clínica. Dessa forma, apesar de extensa investigação ao longo das últimas décadas, ainda não há um único teste que satisfaça os critérios que o tornariam o marcador ideal para a diagnóstico precoce da sepse no recém-nascido (BENITZ, 2010; PIERRAKOS; VINCENT, 2010; TAPPERO; JOHNSON, 2010; GILFILLAN; BHANDARI, 2017; MEMAR et al., 2019; MONASTERO; PENTYALA, 2017; SHARMA et al., 2018; TZIALLA et al., 2018).

Os **reagentes de fase aguda** foram os primeiros biomarcadores a serem estudados, no final da década de 80. São marcadores diagnósticos produzidos principalmente pelo fígado, como parte de uma resposta imediata à infecção ou lesão tecidual. Este grupo de proteínas tem uma ampla gama de atividades que contribuem para a defesa do hospedeiro, incluindo neutralizar agentes inflamatórios, minimizar o dano ao tecido local, e participar da reparação tecidual (HOFER et al., 2012; MUSSAP et al., 2013). Vários reagentes de fase aguda têm sido estudados em relação a sepse neonatal, sendo a proteína C reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT) as mais amplamente investigadas e utilizadas nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais para auxiliar no diagnóstico da sepse neonatal. A indução tardia da síntese hepática da PCR durante a resposta inflamatória à infecção diminui a sua sensibilidade durante as primeiras fases da sepse, portanto, a PCR é considerada um biomarcador muito específico, mas não muito sensível na infecção bacteriana, não havendo necessariamente correlação entre a evolução da sepse e as alterações no seu nível sérico (MUSSAP et al., 2013). Apesar de ser o marcador mais antigo, ainda hoje é alvo de estudos, frequentemente como comparação com os novos marcadores (HALIL et al., 2018; RASHWAN et al., 2018). No presente momento o PCR é o único marcador disponível para uso clínico na maioria dos serviços nacionais. Por outro lado, a PCT é liberada na circulação dentro de 3 horas após o início da cascata da imunidade inata, atinge um platô com 6 horas e permanece elevada durante 24 horas, o que a torna um marcador promissor para as fases iniciais da infecção além de um identificador sensível de RN

infetados (HEDEGAARD; WISBORG; HVAS, 2015; MUSSAP et al., 2013). Uma metanálise mostrou a superioridade do PCT em relação a PCR (YU et al., 2010), embora o PCT ainda não esteja amplamente disponível para uso clínico. Ambas têm intervalos de referências que podem sofrer influência dependendo da idade gestacional, da idade pós-natal e das condições clínicas do paciente, sendo afetadas por condições não infecciosas (HOFER et al., 2012; VOULOUMANOU et al., 2011).

Na década de 90, as **citocinas**, outro grupo de marcadores de fase aguda, passaram a ser estudados, na tentativa de se encontrar marcadores mais precoces e com maior sensibilidade para o diagnóstico da sepse neonatal. Os níveis de citocinas aumentam rapidamente na sepse neonatal, antes mesmo que o recém-nascido desenvolva sinais ou sintomas de sepse e antes do aumento dos níveis das proteínas de fase aguda (SHAH; PADBURY, 2014). As citocinas pró-inflamatórias são proteínas solúveis que são produzidas e secretadas, principalmente por monócitos e macrófagos imediatamente após a invasão bacteriana. O hospedeiro, para fazer frente ao processo infeccioso, também produz as citocinas anti-inflamatórias, que neutralizariam os efeitos das pró-inflamatórias, de maneira a ocorrer uma homeostase entre estes mediadores e finalização com sucesso do processo infeccioso. Nos estudos clínicos atenção especial têm sido dada à IL-6, IL-8, IL-10, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF  $\alpha$ . Numa revisão de 31 estudos (MEHR; DOYLE, 2000) os revisores concluíram que as citocinas são promissores marcadores de infecção no período neonatal, mas as grandes variações encontradas na metodologia e nos resultados destes estudos e o pequeno número de neonatos avaliados inviabilizam a realização de uma metanálise para orientar o clínico quanto ao valor da dosagem dessas citocinas para o diagnóstico precoce da sepse neonatal. As pesquisas com esse grupo de biomarcadores prosseguem até os dias atuais (BHANDARI, 2014; FATTAH et al., 2017; HALIL et al., 2018; RASHWAN et al., 2018). Um recente estudo mostrou que a IL-6, IL-8 e IL-10 podem ser citocinas promissoras para diagnosticar sepse neonatal. A IL-6 recebeu destaque devido à sua potencial capacidade de estabelecer o diagnóstico da sepse neonatal assim como prever o risco de mortalidade de acordo com a condição clínica, além de apresentar ponto de corte relativamente uniforme nos estudos (MONASTERO; PENTYALA, 2017).

Nessa tese os biomarcadores estudados podem ser divididos em 3 grandes grupos:

**1- Citocinas:** são proteínas reguladoras intercelulares, responsáveis pela estimulação e diferenciação de vários tipos de células e também pelo controle e produção de outras citocinas (AKDIS et al., 2016). São produzidas por diversas células, especialmente os monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e são divididas de acordo com a resposta inflamatória. As pró-inflamatórias, principais responsáveis por iniciar uma defesa efetiva contra agentes patogênicos, e as anti-inflamatórias responsáveis por regular o processo inflamatório exacerbado, mantendo a homeostase (AKDIS et al., 2016; CURFS; MEINS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; NG; LAM, 2006). Nesse grupo de citocinas pró e anti-inflamatóricas encontram-se: IFN- $\gamma$ , interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, interleucina 7 (IL-7), interleucina 9 (IL-9), IL-10, IL-12 porção 70 (IL-12p70), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), interleucina 17A (IL-17A) e TNF- $\alpha$ .

**2- Quimiocinas:** são uma grande família de pequenas citocinas, geralmente de baixo peso molecular, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de atrair células específicas de defesa (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; LUSTER, 1998). Nesse grupo encontram-se: eotaxina, IL-8, quimiocina CXCL10 (proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$  [IP-10]), MCP-1, proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), proteína inflamatória de macrófago 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), regulador na ativação normal de células T expressa e segregada (RANTES).

**3- Fatores de crescimento:** além do papel no desenvolvimento de granulócitos e macrófagos são capazes de afetar a maturação celular (BAILIE et al., 1994). Os fatores de crescimento têm múltiplas funções, destacando-se a estimulação da divisão celular, angiogênese, quimiotaxia, indução ou inibição da diferenciação celular, transformação ou indução da síntese de proteínas (ORNITZ; ITOH, 2001). As principais fontes são macrófagos, linfócitos e plaquetas. Nesse grupo encontram-se o fator de crescimento de fibroblasto (FGF basic), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B (PDGF-BB) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

A seguir são apresentados, em ordem alfabética, os biomarcadores avaliados nesta dissertação, suas funções e os estudos realizados correlacionando-os com a sepse neonatal.

- **Eotaxin - Eotaxina**

É uma **quimiocina** que atua na migração de eosinófilos e basófilos (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; LUSTER, 1998).

Foi avaliada em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). Outro estudo não encontrou diferença do eotaxin entre os grupos (LUSYATI et al., 2013).

- **FGF basic - Fator de crescimento do fibroblasto**

É uma grande família de **fatores de crescimento** polipeptídicos. São fatores homeostáticos e funcionam no reparo tecidual e na resposta à lesão (ORNITZ; ITOH, 2001), com importante papel na regulação da angiogênese (ZHENG et al., 1997).

Apenas o FGF21, um membro da família FGF foi estudado na sepse neonatal, encontrando-se aumentado nos RN com sepse, sendo considerado um marcador útil (SIAHANIDOU et al., 2018).

- **G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos**

É um **fator de crescimento** hematopoiético, produzido pela medula óssea, que estimula a proliferação e diferenciação das células progenitores hematopoiéticas dos neutrófilos granulocíticos (BAILIE et al., 1994; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

Há descrições do uso do G-CSF em situações de complicações infecciosas em RN com neutropenia severa (contagem absoluta de neutrófilos polimorfonucleares < 500) e em doenças hematológicas que cursam com neutropenia (CASTAGNOLA; DUFOUR, 2014).

Foi avaliado em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle, melhorando o seu poder diagnóstico quando associado a IL-8 (FISCHER et al., 2002). Uma concentração  $\geq$  200 pg / mL estabeleceu uma sensibilidade de 95% e valor preditivo negativo de 99% para previsão precoce de infecções neonatais bacterianas e fúngicas (KENNON et al., 1996).

- **GM-CSF** - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

É um precursor de células hematopoiéticas, linfócitos T e neutrófilos (BAILIE et al., 1994; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). É um **fator de crescimento** que induz a maturação das células dendríticas, e também a ativação de granulócitos, a proliferação da microglia, a diferenciação das células naturais T killer e a sobrevivência e diferenciação do macrófago alveolar (FRANCISCO-CRUZ et al., 2014).

Ensaios clínicos recentes mostraram os efeitos benéficos dos fatores estimuladores de colônias no tratamento da neutropenia na sepse neonatal. O tratamento com GM-CSF está associado a um aumento na contagem absoluta de neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas e diminuição da mortalidade em RN neutropênicos sépticos em estado crítico (BILGIN et al., 2001). O G-CSF e o GM-CSF promovem a liberação de progenitores de neutrófilos da medula óssea e aumentam a sobrevivência dos neutrófilos na circulação, aumentando a reserva de neutrófilos circulantes para melhor combater a sepse (MOLLOY et al., 2005).

Foi avaliada em um estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse, não sendo encontrado diferença em RN com sepse neonatal quando comparado ao grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IFN- $\gamma$**  - Interferon  $\gamma$

É uma citocina pró-inflamatória produzida pelo sistema imunitário inato (células natural killer, macrófagos e células mielomonocíticas) e pelo sistema imunitário adaptativo (células Th1, linfócitos T citotóxicos e células B). Induz a ativação de macrófagos, promovendo atividades citotóxicas de outras células e induzindo a apoptose de células epiteliais na pele e mucosa. Além de seu papel no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 o IFN- $\gamma$  também inibe o crescimento celular e a apoptose e controla a extensão da resposta imune levando a morte celular induzida por ativação de células T CD41 (AKDIS et al., 2016; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

Foi avaliado em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (NG et al., 2003; SEGURA-CERVANTES et al., 2016). Outro estudo não encontrou diferença do IFN- $\gamma$  entre os grupos mostrando que não foi capaz de predizer a sepse (BENDER et al., 2008).

- **IL-1 $\beta$**  - Interleucina-1 $\beta$

É uma interleucina pró-inflamatória. Induz a hematopoiese e a diferenciação das células Th17.

É um mediador importante da resposta inflamatória e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação e apoptose (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse encontrando-se aumentada em pacientes com sepse neonatal precoce quando comparados aos do grupo controle (BASU et al., 2015; DE BONT et al., 1993; DE BONT et al., 1995; KURT et al., 2007; LUSYATI et al., 2013; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). AYAZI et al. (2014) encontraram sensibilidade de 27% e especificidade de 71%. Por outro lado, outros estudos não evidenciaram aumento dos seus níveis (NG et al., 2007; SHERWIN et al., 2008; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999; UCAR et al., 2008).

- **IL-1ra** - Interleucina-1 receptor antagonista

É uma citocina anti-inflamatória. A IL-1 é a única citoquina para a qual é conhecido um antagonista natural, a IL-1ra (SCHREUDER et al., 1997). A IL-1ra e IL-1 são sintetizadas e liberadas em resposta ao mesmos estímulos (AKDIS et al., 2016). A IL-1ra atua como um inibidor específico para os outros dois membros funcionais da família IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), competindo com a ligação ao receptor de IL-1 e, assim, bloqueando a função de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SCHREUDER et al., 1997). Algumas citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, aumentam a síntese de IL-1ra, mas também inibem a síntese de IL-1 $\beta$  (DINARELLO, 1997).

Já foi avaliado em estudo clínico em RN para diagnóstico precoce de sepse neonatal sendo considerado um preditor de sepse, estando aumentada um ou mais dias antes do diagnóstico clínico (KÜSTER et al., 1998). Outros trabalhos dosando a IL-1ra no momento da sepse também encontraram níveis aumentados (DE BONT et al., 1995; FISCHER et al., 2002; LUSYATI et al., 2013).

- **IL-2** - Interleucina-2

É uma citocina pró-inflamatória. Responsável pela proliferação de células efetoras T e B, diferenciação e proliferação de células natural killer e fator de crescimento de células B (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, estando aumentada (NG et al., 2003) ou sem diferença em RN com sepse neonatal quando comparado ao grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IL-4 - Interleucina-4**

É uma citocina anti-inflamatória. A IL-4 é produzida por células Th2, células linfóides inatas tipo 2, basófilos, mastócitos e eosinófilos. Regula as condições alérgicas e a resposta imune protetora contra helmintos e outros parasitas extracelulares, sendo o principal estímulo do desenvolvimento de células Th2. Também suprime o desenvolvimento de imunidade do tipo 1, incluindo células Th1 e macrófagos, aumenta os receptores de células B, aumenta a expressão de grupamento de diferenciação 23 (CD23), prolonga a vida útil das células T e B em cultura e medeia a adesão e inflamação tecidual (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (LUSYATI et al., 2013; NG et al., 2003; SEGURA-CERVANTES et al., 2016).

- **IL-5 - Interleucina-5**

É uma citocina anti-inflamatória. A IL-5 foi inicialmente descrita como um fator de crescimento de eosinófilos e células B. É principalmente produzida por células grupamento de diferenciação 41 (CD41) Th2, eosinófilos ativados, mastócitos, células grupamento de diferenciação 81 (CD81), células natural killer. Seu receptor compartilha a cadeia b com interleucina 3 (IL-3) e GM-CSF. A IL-5 promove a proliferação, ativação, diferenciação, sobrevivência e adesão de eosinófilos. As células Th2 que secretam IL-5 recrutam eosinófilos e contribuem para a indução da hiperreatividade das vias aéreas em pacientes asmáticos (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em apenas um estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse, estando aumentada em RN com sepse neonatal quando comparado ao grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IL-6 - Interleucina-6**

É uma citocina pró-inflamatória. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica multifuncional envolvida na regulação de respostas imunes, respostas de fase aguda, hematopoiese e inflamação. É produzida por células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta a diferentes estímulos (IL-1, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) durante a inflamação sistêmica. Na imunidade inata, a IL-6 direciona o tráfego e a ativação de leucócitos e induz a produção de proteínas de fase

aguda pelos hepatócitos. A IL-6 promove proliferação de células T, diferenciação e sobrevivência de células B e produção de IgG, IgA e imunoglobulina M (IgM) em células plasmáticas. Além disso, a IL-6 induzida por alérgenos promove inflamação das vias aéreas. (AKDIS et al., 2016). É uma citocina envolvida na inflamação, resposta infeciosa e também na regulação do processo metabólico, regenerativo e neural (SCHELLER et al., 2011).

É a citocina mais estudada na sepse neonatal, desde a década de 90 (BUCK et al., 1994; DE BONT et al., 1993; GROLL et al., 1992; PANERO et al., 1997; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999) até os dias atuais (HALIL et al., 2018; NAKSTAD, 2018). Inúmeros estudos a descrevem como um bom marcador, com valores aumentados nos pacientes com sepse quando comparados com os controles (BENDER et al., 2008; FATTAH et al., 2017; HE et al., 2017; MIRZARAHIMI et al., 2017; NAKSTAD, 2018; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013; YE et al., 2017). É muito estudada em associação com outros marcadores em especial com os reagentes de fase aguda PCR e PCT (AL-ZAHRANI et al., 2015; CELIK et al., 2010; DOELLNER et al., 1998; MIRZARAHIMI et al., 2017; MOSQUERA et al., 2009; RASHWAN et al., 2018), mostrando-se um marcador mais sensível porém menos específico que a PCR no diagnóstico da sepse neonatal (BUCK et al., 1994; GANESAN et al., 2016; HOTOURA et al., 2012). Um estudo, entretanto, considerou a IL-10 e a IL-12p70 melhores marcadores quando comparados a IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (SHERWIN et al., 2008). Os valores de referência ainda são bastante divergentes. Um cut-off de 32 pg/mL forneceu uma sensibilidade de 85,7 - 100% e especificidade de 74 - 80,2% no diagnóstico da sepse neonatal (HOTOURA et al., 2012; WU et al., 2016). Já um cut-off de 250 pg/mL forneceu uma sensibilidade de 71% e especificidade de 88% na sepse neonatal precoce (BENDER et al., 2008).

- **IL-7 - Interleucina-7**

A IL-7 está presente na maioria das células T e nos progenitores de células B e macrófagos da medula óssea. Atua cooperando com a sinalização através do receptor pré-célula-T para coordenar a proliferação, diferenciação e o receptor de células T como uma recombinação de timócitos. A sinalização de IL-7 contribui para a sobrevivência, proliferação e desenvolvimento de memória B e células T e natural Killer. Induz a maturação de megacariócitos, e a síntese de mediadores inflamatórios em monócitos (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em apenas um estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse, estando aumentada em RN com sepse neonatal quando comparado ao grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IL-8 - Interleucina-8**

A IL-8 foi identificada como um quimiotático específico de neutrófilos e posteriormente classificada como um membro da família de **quimiocinas CXC**. A IL-8 é produzida por uma variedade de células, como monócitos e macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais e epiteliais, após estimulação com IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  ou receptores do tipo toll (TLRs). As principais funções efetoras da IL-8 são a ativação e o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção ou lesão. Além dos neutrófilos, a IL-8 também atrai células natural killer, células T, basófilos e eosinófilos GM-CSF ou IL-3 (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em estudos clínicos em RN, sendo observado valores aumentados nos pacientes com sepse quando comparados com os controles (BENDER et al., 2008; FISCHER et al., 2002; KOCABAS et al., 2007; KURT et al., 2007; LUSYATI et al., 2013; NAKSTAD, 2018; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). Por outro lado, outros estudos não conseguiram evidenciar aumento dos seus níveis nos RN com sepse (GONZALEZ et al., 2003; HE et al., 2017; SHERWIN et al., 2008). Uma meta análise de 8 estudos (548 RN) mostrou que a IL-8 tem moderada acurácia para o diagnóstico de sepse neonatal e é um biomarcador útil para o diagnóstico precoce de sepse neonatal, devendo entretanto ser combinada com os sintomas e sinais clínicos, laboratoriais e resultados microbiológicos (ZHOU et al., 2015).

- **IL-9 - Interleucina-9**

Células Th2 e células linfoides inatas tipo 2 são as principais fontes de produção de IL-9. Mastócitos e eosinófilos secretam IL-9 em menor grau. A IL-9 inibe a produção de citocinas pelas células Th1, promove a produção de imunoglobulina E (IgE) pelas células B, induz a secreção de quimiocinas e muco pelas células epiteliais brônquicas e promove a proliferação de mastócitos. A IL-9 tem papéis importantes na patogênese dos modelos de asma e nas infecções por helmintos (AKDIS et al., 2016). Também é parte da resposta tipo Th2 e pode atuar como fator de crescimento de células T (MACHADO et al., 2014).

Ainda não foi explorada no período neonatal como marcador de sepse.

- **IL-10 - Interleucina-10**

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida principalmente por monócitos, células T, células B, uma pequena fração de células natural killer, macrófagos e células dendríticas. A IL-10 inibe a expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocinas. Clinicamente, pode mediar a tolerância a alérgenos. Em contraste com seus efeitos

inibitórios sobre as células T, a IL-10 promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B humanas e aumenta a produção de IgG (AKDIS et al., 2016). Desempenha um papel central em limitar a resposta imune do hospedeiro ao patógeno (IYER; CHENG, 2012).

Já foi avaliado em vários estudos clínicos em RN, sendo observado valores aumentados nos RN com sepse quando comparados com os controles (BENDER et al., 2008; LUSYATI et al., 2013; NG et al., 2007; SEGURA-CERVANTES et al., 2016; SHERWIN et al., 2008; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013; ZEITOUN et al., 2010).

- **IL-12p70 - Interleucina-12p70**

É uma citocina pró-inflamatória. A forma bioativa da IL-12 (IL-12p70), descrita pela primeira vez como fator estimulador de células natural killer, é produzida por monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos, microglia e células dendríticas. Inibe as funções imunes dependentes da IL-12, agindo como um antagonista dos receptores da IL-12 e medeia o desenvolvimento e a manutenção de células Th1 induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 e natural killer. Além disso, desempenha um papel importante para a indução de células linfoides inatas tipo 1. A IL-12 ativa indiretamente a atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral dos macrófagos (AKDIS et al., 2016).

Já foi avaliado em estudos clínicos em RN, sendo observado valores aumentados nos RN com sepse quando comparados com os controles (NG et al., 2007; SHERWIN et al., 2008; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). Em outro estudo não houve diferença dos seus níveis entre os RN com e sem sepse (LUSYATI et al., 2013).

- **IL-13 - Interleucina-13**

É uma citocina anti-inflamatória. A IL-13 é expressa por células Th2 ativadas, mastócitos, basófilos, eosinófilos e células natural killer. A IL-13 ativa as mesmas vias de transdução de sinal que a IL-4 e induz a produção de IgE. Também ativa e recruta mastócitos e eosinófilos e promove sua sobrevivência (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em apenas 2 estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se diminuída em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (LUSYATI et al., 2013). Outro estudo não encontrou diferença entre os grupos (SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013).

- **IL-15 - Interleucina-15**

A IL-15 é estruturalmente homóloga à IL-2. Tem a capacidade de induzir a proliferação de células T, células natural killer e células linfóides inatas. Embora a IL-15 compartilhe algumas funções com IL-2, como ativação de células T, estimulação de células natural killer, proliferação celular e atividade citolítica, diferenças em suas funções biológicas foram identificadas (AKDIS et al., 2016).

Foi avaliada em apenas 1 estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IL-17A - Interleucina-17A**

É uma citocina pró-inflamatória. A IL-17A atua em uma variedade de células, que reagem aumentando a expressão de citocinas, quimiocinas e metaloproteíneases pró-inflamatórias. Ao induzir células a produzir quimiocinas, o IL-17A atrai neutrófilos para mediar as defesas contra diferentes patógenos e promove aumento da produção de TNF- $\alpha$  (AKDIS et al., 2016; CROSS, 2016).

Foi avaliada em apenas 1 estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse, encontrando-se aumentada em RN com sepse neonatal quando comparados aos do grupo controle (LUSYATI et al., 2013).

- **IP-10 - Proteína 10 induzida por interferon  $\gamma$**

É uma **quimiocina**, também conhecida como quimiocina CXCL10, que exerce um papel quimiotático para monócitos e células T (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; NG et al., 2007). É um potente inibidor da atividade angiogênica induzida por IL-8 e FGF basic (STRIETER et al., 1995).

Foi avaliado em estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse neonatal precoce (SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013) e tardia sendo considerado um marcador sensível e precoce (NG et al., 2007).

- **MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos -1**

É uma **quimiocina** com potente ação quimioatrativa específica para macrófagos e linfócitos mononucleares. É produzido por um grande número de células: endoteliais, epiteliais, mesangiais, astrocíticas, monocíticas, microgliais, musculares lisas e fibroblastos. Sua secreção

é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF (DESHMANE et al., 2009; MELGAREJO et al., 2009).

Foi avaliada em estudo clínico em RN para diagnóstico de sepse neonatal sendo encontrados valores aumentados em pacientes com sepse (LUSYATI et al., 2013; NG et al., 2007; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013).

- **MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$**  - Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa e beta

São **quimiocinas** que desempenham um papel de quimiotaxia para monócitos, eosinófilos, macrófagos e células natural killer (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; LUSTER, 1998).

Foram avaliadas em estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse encontrando-se aumentadas em pacientes com sepse neonatal precoce quando comparados os do grupo controle (LUSYATI et al., 2013; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). Por outro lado, outro estudo em RN encontrou que a MIP-1 $\alpha$  e a MIP-1 $\beta$  não apresentaram diferença entre os RN com e sem sepse neonatal precoce (HE et al., 2017).

- **PDGF-BB** - Fator de crescimento derivado de plaquetas

É um **fator de crescimento** que regula o crescimento e a divisão celular, desempenhando um papel significativo na formação de vasos sanguíneos e provocando vasoconstricção na musculatura vascular. Embora o PDGF seja sintetizado, armazenado e liberado pelas plaquetas, ele também é produzido por outras células, incluindo células musculares lisas, macrófagos ativados e células endoteliais (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). Na sepse sabe-se que o fator de crescimento derivado de plaquetas promove a integridade estrutural da parede do vaso e aumenta a capacidade de cicatrização da ferida (BRUECKMANN et al., 2007).

Foi encontrado apenas 1 estudo clínico avaliando o PDGF-BB em RN para diagnóstico de sepse, estando aumentado em pacientes com sepse neonatal precoce quando comparados os do grupo controle (SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013).

- **RANTES** - Regulador na ativação normal de células T expressa e segregada

É uma **quimiocina** que atua na quimiotaxia para monócitos, células T, eosinófilos e basófilos e aumenta a liberação de histamina (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

Foi avaliado em poucos estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse neonatal precoce

sendo considerado um marcador útil para o diagnóstico de infecção neonatal severa (STOJEWSKA et al., 2016). Por outro lado, outros estudos com RN não observaram alteração dos seus níveis (LUSYATI et al., 2013; NG et al., 2007) e outro observou-se diminuição em pacientes com sepse neonatal precoce (SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013).

- **TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral alfa

É uma importante citocina envolvida na defesa do hospedeiro, inflamação e apoptose. Desempenha um papel duplo na regulação das respostas imunes, agindo tanto como um mediador pró-inflamatório, iniciando uma forte resposta inflamatória, como um mediador imunossupressor, inibindo o desenvolvimento de doenças auto-imunes e tumorais, e exibindo um papel vital na manutenção da homeostase imunológica limitando a extensão e a duração dos processos inflamatórios. O TNF-  $\alpha$  possui um papel importante na defesa do hospedeiro contra patógenos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, em particular contra infecções bacterianas intracelulares (AKDIS et al., 2016; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; WYNN; WONG, 2010).

É um dos biomarcadores mais estudados no período neonatal, desde a década de 90 (DE BONT et al., 1993; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999). Já foi avaliado em vários estudos clínicos em RN para diagnóstico de sepse neonatal sendo encontrado valores aumentados em pacientes com sepse (BASU et al., 2015; FATTAH et al., 2017; HE et al., 2017; KOCABAS et al., 2007; KURT et al., 2007; LUSYATI et al., 2013; NG et al., 2007; SEGURA-CERVANTES et al., 2016; SUGITHARINI; PREMA; THANGAM, 2013). Por outro lado, outros estudos em RN não observaram alteração dos seus níveis (BENDER et al., 2008; SHERWIN et al., 2008).

- **VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular

É um **fator de crescimento** regulador fundamental da angiogênese normal e anormal. Evidências indicam que o VEGF é essencial para a vasculogênese e angiogênese embrionárias e para a proliferação de vasos sanguíneos no trato reprodutivo feminino e para a formação óssea (FERRARA, 1999). Atua também como quimiotático para monócitos e pode inibir a maturação de células dendríticas (PAULUS; JENNEWEIN; ZACHAROWSKI, 2011). Parece ter um papel importante no desenvolvimento da microvasculatura da mucosa intestinal e sua deficiência poderia predispor a ocorrência de enterocolite necrosante (BOWKER; YAN; DE PLAEN, 2018).

Na literatura encontramos apenas 1 estudo dosando o VEGF na sepse neonatal sendo encontrado maiores concentrações em RN pré-termo com sepse do que aqueles sem sepse (SIAVASHI et al., 2017).

Os quadros 1 e 2 apresentam um resumo dos estudos clínicos destes 27 biomarcadores no diagnóstico da sepse neonatal e os principais achados, por ordem de ano de publicação. Podemos observar que desde a década de 90 estão sendo publicados estudos avaliando os biomarcadores na sepse neonatal e que os estudos continuam até os dias atuais. Além disso observamos que o tamanho da amostra é variável, sendo que a metade dos estudos avaliam menos de 100 RN. Também vale a pena comentar a quantidade de biomarcadores avaliados em cada estudo. Os estudos mais antigos (1992 e 1993) incluíram apenas a IL-6. A maioria utiliza poucos marcadores e apenas 2 estudos de 2013 avaliam um painel maior de marcadores (referências 27 e 28 do quadro 1). Por fim percebemos que entre os 27 biomarcadores avaliados nessa tese, a IL-6 é sem dúvida a citocina mais estudada, seguida do TNF- $\alpha$ . Por outro lado 15 biomarcadores (eotaxin, basic FGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB e VEGF) foram avaliados em apenas 1 ou 2 estudos e ainda, a IL-9 nunca foi avaliada na sepse neonatal. Daí a importância de estudar esses biomarcadores para investigar a possibilidade de serem possíveis marcadores na predição da sepse neonatal.

Até o presente momento, a utilização de algum outro biomarcador na sepse no período neonatal além das proteínas de fase aguda, ainda não ocorre na prática clínica, devido aos custos para sua detecção e também pela necessidade de mais pesquisas científicas estabelecendo valores normais para essa faixa etária (SHARMA et al., 2018; MEMAR et al., 2019).

**Quadro 1 - Principais referências de artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação no diagnóstico da sepse neonatal em sangue periférico dos recém-nascidos.**

	1º autor	Ano	Revista de publicação	Amostra	Tipo de sepse	Grupos avaliados
1	GROLL et al.	1992	Pediatr Infect Dis J	20 RN	sepse	Sepse comprovada x sem Sepse
2	DE BONT et al.	1993	Pediatr Res	32 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
3	BUCK et al.	1994	Pediatrics	222 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
4	DE BONT et al.	1995	Pediatr Res	57 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
5	GEIGER et al.	1996	Eur J Pediatr	40 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
6	KENNON et al.	1996	J Pediatr	156 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
7	PANERO et al.	1997	Pediatr Infect Dis J	149 RN	sepse precoce e tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
8	DOELLNER et al.	1998	J Pediatr	241 RN	sepse precoce	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
9	SILVEIRA et al.	1999	Acta Paediatr	117 RN	sepse precoce	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
10	DØLLNER et al.	2001	J Clin Epidemiol	166 RN	sepse precoce	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
11	ROMAGNOLI et al.	2001	Eur J Pediatr	59 RN	sepse	Sepse comprovada x sem Sepse
12	FISCHER et al.	2002	Intensive Care Med	190 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
13	GONZALEZ et al.	2003	J Perinat Med	75 RN	sepse tardia	Sepse comprovada x sem Sepse
14	NG et al.	2003	Arch Dis Child Fet Neon	147 RN	sepse tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
15	HARRIS et al.	2005	J Pediatr	84 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica
16	KOCABAS et al.	2007	Turk J Pediatr	55 RN	sepse precoce e tardia	Sepse x sem Sepse
17	KURT et al.	2007	Mediators Inflamm	53 RN	sepse	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
18	NG et al.	2007	Pediatr Res	155 RN	sepse tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica
19	BENDER et al.	2008	Dan Med Bull	123 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse
20	SHERWIN et al.	2008	Am J Perinatol	117 RN	sepse precoce e tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica
21	UCAR et al.	2008	Mediators Inflamm	36 RN	sepse tardia	Sepse x sem Sepse
22	MOSQUERA et al.	2009	An Pediatr (Barc)	42 RN	sepse precoce e tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
23	CELIK et al.	2010	J Clin Lab Anal	282 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
24	URAS et al.	2010	Balkan Med J	58 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
25	ZEITOUN et al.	2010	Scand J Infect Dis	98 RN	sepse precoce e tardia	Sepse x sem Sepse
26	HOTOURA et al.	2012	Inflammation	82 RN	sepse tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
27	LUSYATI et al.	2013	J Neonatal Perinatal Med	77 RN	sepse tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
28	SUGITHARINI et al.	2013	Inflamm Res	179 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse
29	AYAZI et al.	2014	Infez Med	83 RN	sepse	Sepse (sem grupo controle)
30	AL-ZAHRANI et al.	2015	J Infect Dev Ctries	100 RN	sepse precoce	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
31	BASU et al.	2015	J Perinatol	64 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse

32	GANESAN et al.	2016	J Clin Diagn Res	80 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
33	SEGURA-CERVANTES et al.	2016	Mediators Inflamm	83 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
34	STOJEWSKA et al.	2016	Postepy Hig Med Dosm	129 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse
35	WU et al.	2016	J Biol Regul Homeos Age	125 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
36	FATTAH et al.	2017	J Nat Sc Biol Med	320 RN	sepse precoce e tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica x sem Sepse
37	HE et al.	2017	Schok	151 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse
38	KHAERTYNOV et al.	2017	J Immunol Res	33 RN	sepse precoce e tardia	Sepse x sem Sepse
39	MIRZARAHIMI et al.	2017	Pediatr Reports	31 RN	sepse precoce	Sepse (sem grupo controle)
40	SIAVASHI et al.	2017	J Cell Biochem	133 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
41	YE et al.	2017	Pediatr Res	840 RN	sepse	Sepse comprovada x sem Sepse
42	HALIL et al.	2018	Comb Chem High Th Sc	101 RN	sepse	Sepse x sem Sepse
43	NAKSTAD	2018	Infect Drug Resist	30 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse
44	RASHWAN et al.	2018	Pediatr Neonatol	168 RN	sepse precoce e tardia	Sepse comprovada x Sepse clínica
45	SIAHANIDOU et al.	2018	Clin Chem Lab Med	77 RN	sepse	Sepse x sem Sepse

### Tipo de sepse:

*Sepse: sem especificação em relação ao tempo de aparecimento da sepse; Sepse precoce: antes de 72hs; Sepse tardia: após 72 hs*

### Grupos avaliados:

*Sepse: sinais clínicos de sepse independente da hemocultura (clínica + comprovada); Sepse comprovada: sinais clínicos com hemocultura positiva;*

*Sepse clínica: sinais clínicos com hemocultura negativa*

**Quadro 2-** Principais resultados dos artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação no diagnóstico da sepse neonatal (\* numeração das referências de acordo com o quadro 1)

27	--			--		↑	↑	↑	↑	--	↑	↑	↑		↑	--	↓	↑	↑	↑	↑	↑	--	↑			
28	↑					↑					↑		↑			↑	↑	--	↑		↑	↑	↑	↓	↑		
29						x																					
30																											
31						↑																				↑	
32																											
33						↑					↑		↑													↑	
34																										↑	
35																											
36																										↑	
37																				--	--					↑	
38						--				--			↑													↑	
39													x														
40																										↑	
41																											
42																											
43																											
44																											
45		↑																									
	Eota xin	Basic FGF	G CSF	GM CSF	IFN $\gamma$	IL 1 $\beta$	IL 1ra	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6	IL 7	IL 8	IL 9	IL 10	IL 12 p70	IL 13	IL 15	IL 17A	IP 10	MCP 1	MIP $\alpha$	MIP $\beta$	PDGF BB	RAN TES	TNF $\alpha$	VEGF

(↑) aumentado nos RN com sepse

(↓) diminuído nos RN com sepse

(--) sem relação com a sepse

(x) sem comparação com grupo controle

## 2.4 - Sangue de cordão umbilical no diagnóstico da sepse neonatal

O sangue do cordão umbilical é a primeira fonte biológica do RN, e tem composição celular semelhante à do sangue periférico do feto durante o último estágio de gestação. Apresenta a vantagem de possibilitar a utilização de maiores volumes de sangue sem arriscar a instabilidade hemodinâmica do RN. Além disso, não requer um procedimento invasivo para coleta e nem a exposição do RN à dor, evitando assim o estresse iatrogênico e complicações de procedimentos (IROH TAM; BENDEL, 2017).

Um estudo prospectivo comparou amostras pareadas do cordão umbilical e do sangue venoso periférico extraído durante as primeiras horas após o nascimento de 350 RN com algum fator de risco para sepse e mostrou que os índices hematológicos do sangue do cordão umbilical são potencialmente úteis desde que os limites dos valores das células sanguíneas sejam ajustados para os percentis corretos (ROTHSHEINKER-OLSHINKA et al., 2014). De modo semelhante, outro estudo demonstrou similaridade nos níveis de hematócrito, plaquetas e elevação de leucócitos entre o sangue de cordão umbilical e o sangue periférico (BEERAM et al., 2012).

Alguns estudos têm colaborado no melhor entendimento da relação dos biomarcadores em sangue de cordão umbilical com os eventos perinatais. Um grande estudo de 27 biomarcadores em sangue de cordão umbilical de 927 RN, correlacionando-os com a idade gestacional, encontrou que alguns estão aumentados no nascimento pré-termo quando comparados ao termo (IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ ), outros estão diminuídos (IL-1 $\beta$ , IL-18) e outros não se alteram (IL-6, IL-12, IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , RANTES) (MATOBA et al., 2009). Posteriormente, utilizando o mesmo banco de dados foi desenvolvido um modelo matemático dos 27 biomarcadores associados com eventos adversos neonatais em RNPT (CORDEIRO et al., 2016). Além da idade gestacional, os achados gestacionais, incluindo o stress materno pré-natal e as complicações neonatais exercem influência sobre os níveis de citocinas em sangue de cordão umbilical (ANDERSSON et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2010).

As citocinas não atravessam a barreira placentária e sua elevação pode ser encontrada em sangue de cordão umbilical, sugerindo a possibilidade de predizer quais RN irão desenvolver sepse (SHAH; PADBURY, 2014). Assim, há vários anos o sangue de cordão umbilical tem ganhado atenção na possibilidade de ajudar no diagnóstico precoce da sepse, em especial da sepse neonatal precoce (MILLER et al., 1990; SANTANA et al., 2001; WEEKS et

al., 1997) e os estudos continuam até os dias atuais (FAN; YU, 2012; NAKSTAD, 2018; ROTSHENKER-OLSHINKA et al., 2014). Um estudo envolvendo RN com dois ou mais fatores de risco para sepse neonatal precoce encontrou que, comparado com a cultura de sangue periférico, a cultura de sangue de cordão umbilical tem 100% de sensibilidade e 95% de especificidade (MEENA et al., 2015). A procalcitonina foi avaliada por Salguero et al. (2017) apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 95,2% (cut off de 0,6 ng/mL) em sangue de cordão umbilical, na detecção de sepse neonatal precoce. Uma meta-análise de 15 estudos avaliou os marcadores inflamatórios do cordão umbilical e do soro materno em 2.178 episódios de infecção neonatal suspeita, e mostrou que PCT e IL-6 no sangue do cordão umbilical podem fornecer informações importantes para o diagnóstico da sepse neonatal precoce, auxiliando na sua identificação precoce. A PCR e a contagem de leucócitos não forneceram informações igualmente úteis para incluir ou excluir o diagnóstico (SU et al., 2014).

Por outro lado, uma revisão dos estudos que avaliaram biomarcadores no sangue de cordão umbilical em relação à sepse neonatal precoce concluiu que o PCR isolado tem pouca utilidade no diagnóstico da sepse neonatal e que nenhum dos outros marcadores encontrados nos estudos (PCT, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), pode ser utilizado individualmente para confirmar ou excluir o diagnóstico. Quando combinada com outros marcadores hematológicos e com o quadro clínico, a confiabilidade da PCT pode ser melhorada e, tanto para a IL-6 como para a IL-8, o uso combinado com fatores de risco clínicos como prematuridade e a ruptura prematura de membranas, pode melhorar o valor diagnóstico (FAN; YU, 2012).

Os quadros 3 e 4 apresentam um resumo dos estudos clínicos destes 27 biomarcadores em sangue de cordão umbilical no diagnóstico da sepse neonatal e os principais achados, por ordem de ano de publicação. Podemos observar que os estudos também iniciaram-se na década de 90 e continuam até os dias atuais, sendo que o número de estudos em cordão umbilical é bem inferior que no sangue periférico. A maioria utiliza poucos marcadores e entre os 27 biomarcadores avaliados nessa tese, a IL-6 é a citocina mais estudada, seguida da IL-10 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, 19 biomarcadores (eotaxin, basic FGF, GM-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES e VEGF) nunca foram avaliados em sangue de cordão umbilical no diagnóstico da sepse neonatal. Novamente percebemos a importância de estudar esses biomarcadores para investigar a possibilidade de serem possíveis marcadores na predição da sepse neonatal.

**Quadro 3-** Principais referências de artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação na predição da sepse neonatal em sangue de cordão umbilical

	<b>1º autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista de publicação</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo de sepse</b>	<b>Grupos avaliados</b>
1	MILLER et al.	1990	J Pediatr	92	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
2	SANTANA et al.	2001	Acta Paediatr	261	Sepse precoce	Sepse x sem sepse X dç não infecciosa
3	HATZIDAKI et al.	2005	Acta Obstet Gynecol Scand	109	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
4	CANCELIER et al.	2009	Pediatr Crit Care Med	120	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
5	LAVOIE et al.	2010	J Infect Dis	30	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
6	CAMPOS et al.	2010	J Pediatr	55	Sepse precoce	Sepse (sem grupo controle)
7	MERCER et al.	2012	Am J Obstet Gynecol	196	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
8	CERNADA et al.	2012	Acta Paediatr	128	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
9	KUROKAWA et al.	2013	Turk J Ped	46	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
10	COBO et al.	2013	Plus One	176	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
11	STEINBERGER et al.	2014	Scand J Clin	218	Sepse precoce	Sepse x sem sepse
12	NAKSTAD	2018	Infect Drug Resist	30 RN	sepse precoce	Sepse x sem Sepse

**Tipo de sepse:**

*Sepse: sem especificação em relação ao tempo de aparecimento da sepse; Sepse precoce: antes de 72hs; Sepse tardia: após 72 hs*

**Grupos avaliados:**

*Sepse: sinais clínicos de sepse independente da hemocultura (clínica + comprovada); Sepse comprovada: sinais clínicos com hemocultura positiva;*

*Sepse clínica: sinais clínicos com hemocultura negativa*

**Quadro 4-** Principais resultados dos artigos clínicos que avaliaram um ou mais dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação na predição da sepse neonatal em sangue de cordão umbilical (\* numeração das referências de acordo com o quadro 3)

*	Eota xin	Basic FGF	G CSF	GM CSF	IFN γ	IL 1β	IL 1ra	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6	IL 7	IL 8	IL 9	IL 10	IL 12 p70	IL 13	IL 15	IL 17A	IP 10	MCP 1	MIP α	MIP β	PDGF BB	RAN TES	TNF α	VEGF	
1						↓					↑																↓	
2						--					↑		↑														--	
3											↑																	
4											↑					↑												
5						--					↑					↑	↓										--	
6						x					x			x													x	
7						↑					↑					--											--	
8											↑																	
9											↑		↑			↓	↓											
10											↑																	
11											↑																	
12											↑		↑															

(↑) aumentado nos RN com sepse

(↓) diminuído nos RN com sepse

(--) sem relação com a sepse

(x) sem comparação com grupo controle

Concordando com Salguero et al. (2017) é grande a expectativa que o uso do sangue de cordão umbilical possa fornecer informações precoces e possa ajudar na identificação, no momento do nascimento, de quais recém-nascidos deveriam ser considerados de maior risco e receberem uma abordagem diagnóstica e terapêutica mais intervencionista, frente aqueles com menor probabilidade de sepse, que se beneficiariam com um manejo mais conservador, podendo contribuir para a detecção precoce da sepse neonatal e para a diminuição da mortalidade. E por isso as pesquisas com sangue de cordão umbilical continuam.

**3- OBJETIVOS:****GERAL:**

Avaliar a presença de biomarcadores em amostras biológicas de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso que possam auxiliar na predição da sepse neonatal.

**ESPECÍFICOS:**

- Determinar a dosagem de 27 biomarcadores em sangue de cordão umbilical recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida.
- Determinar a cinética de 27 biomarcadores em sangue periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal tardia nos primeiros 28 dias de vida.

#### 4- ARTIGO 1

### **Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) como um marcador preditivo para sepse neonatal no sangue de cordão umbilical e periférico**

#### **Autores:**

Lidia M. Barros, MD, MSc; Roberta R. Rosa, PhD; Daniela M. L. M. Ferreira, MD, PhD;  
Andreia A. Freitas, MD, MSc; Daniela S. R. Costa, MSc; Aive O. Santos, MSc; Camila P.  
Nascimento; Vivian M. G. O. Azevedo, PhD; Aline T. Paula, PhD; Patrícia T. Alves, PhD;  
Larissa P. Maia, MSc; Vânia O. S. Abdallah, MD, PhD; Luiz Ricardo Goulart, PhD

**Instituição:** Universidade Federal de Uberlândia – Departamento de Pediatria

Av Pará, 1720 – Uberlândia, MG, Brasil – 38405-320

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG forneceram apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranotica e Nanobiotecnologia - INCT-TeraNano (CNPq / CAPES / FAPEMIG, CNPq-465669/2014 -0 e FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

**Palavras chaves:** sepse neonatal, recém-nascido pré termo de muito baixo peso, cordão umbilical, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), biomarcadores

**Resumo:**

**Objective:** Determinar a dosagem de 27 biomarcadores em sangue de cordão umbilical recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida.

**Design:** Estudo prospectivo caso controle.

**Setting:** Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

**Subjects:** Trinta e nove recém nascidos (RN) com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g.

**Interventions:** Nenhuma.

**Measurements and Main Results:** 27 biomarcadores foram dosados com um kit de alta precisão (*Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay*) em sangue do cordão umbilical e do RN com 2 dias de vida, divididos em 2 grupos: controle (12 RN sem sepse nos primeiros 28 dias de vida) e sepse (27 RN com sepse clínica ou comprovada). Não houve diferença das variáveis maternas e neonatais entre os grupos, exceto um menor peso de nascimento, menor apgar de 1º minuto e maior tempo de ventilação mecânica no grupo sepse. Apenas a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p=0,013$ ). Os RN com MCP-1 menor que 130,2 pg/mL no sangue do cordão umbilical apresentaram uma chance 9 vezes maior de sepse no período neonatal ( $p=0,015$ , sensibilidade 81,2% e especificidade 66,6%). Por outro lado, os RN com MCP-1 maior que 111,3 pg/mL no sangue periférico de 2 dias de vida apresentaram uma chance 7,2 vezes maior de sepse no período neonatal ( $p=0,014$ , sensibilidade 70,8% e especificidade 75%).

**Conclusions:** Os nossos resultados evidenciaram que o valor diminuído de MCP-1 em sangue de cordão umbilical pode ajudar a predizer a ocorrência de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida, assim como o valor aumentado no sangue do RN com 2 dias de vida.

## INTRODUÇÃO:

Em contraposição aos contínuos avanços na assistência perinatal observados nas últimas décadas, a mortalidade neonatal ainda é expressiva, especialmente nos países em desenvolvimento, e os recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer (RNPT MBP), ou seja, aqueles com peso de nascimento inferior a 1500 gramas, são os principais responsáveis por esta alta mortalidade (1). Entre as principais causas destaca-se a sepse neonatal, que é responsável também por aumento no tempo de hospitalização e nos custos (2). O diagnóstico de sepse neonatal é difícil de ser estabelecido pois as manifestações clínicas são inespecíficas e continua a ser um desafio, particularmente em RNPT MBP devido a imaturidade do sistema imunológico (1). Essa dificuldade no diagnóstico, aliada a alta taxa de mortalidade tem levado ao uso excessivo de antibióticos no ambiente de terapia intensiva neonatal e o surgimento de organismos resistentes. O diagnóstico de certeza da sepse é dado pela hemocultura positiva, mas, além da demora na obtenção do resultado, apresenta índice de positividade muito variável (3). O diagnóstico precoce é de particular interesse dos neonatologistas, uma vez que o tempo para início da terapêutica parece ser de grande importância e representa um dos maiores determinantes da sobrevida na sepse neonatal (4). Assim, um dos grandes esforços na redução da taxa de mortalidade neonatal é focada na procura de novos marcadores bioquímicos que sejam capazes de predizer precocemente o diagnóstico de sepse neonatal (4).

Outro desafio que se impõe para o diagnóstico e controle da infecção em RNPT MBP em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) é a necessidade de coletas de sangue frequentes para exames laboratoriais. Mesmo com as tentativas atuais de minimizar esse problema, através de técnicas de micrométodos e a monitorização transcutânea, o volume coletado ainda é alto causando redução rápida e significativa da massa eritrocitária (5). Assim, pesquisas tem sido realizadas utilizando-se outros sítios de coleta que não o sangue periférico do recém nascido, na tentativa de minimizar os prejuízos da coleta de sangue, em especial a

anemia, e, além disso, evitar a dor, que tem sido uma preocupação cada vez maior na humanização dos cuidados dentro da UTIN. O sangue do cordão umbilical tem composição celular semelhante à do sangue periférico do feto durante o último estágio de gestação (6, 7). Pode ser obtido de forma não invasiva, sem dor, e em maiores volumes, sem arriscar a estabilidade hemodinâmica do recém-nascido (7). Há alguns anos o sangue de cordão umbilical tem ganhado atenção na possibilidade de ajudar no diagnóstico precoce da sepse neonatal precoce (8, 9). Alterações nos níveis de proteínas de fase aguda e de algumas citocinas tem sido descritas no sangue do cordão umbilical, sugerindo a possibilidade de predizer o curso clínico dos recém-nascidos (10-12). Porém os estudos com sangue de cordão umbilical avaliaram em geral as proteínas de fase aguda (proteína C reativa e procalcitonina) e apenas alguns poucos biomarcadores (os mais comuns IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ). A associação de sepse com alta mortalidade e morbidade e a dificuldade no diagnóstico justificam estudos focados em novos biomarcadores que possam predizer precocemente o risco (3), principalmente utilizando-se outros possíveis sítios de coleta, como o cordão umbilical.

O objetivo desse estudo foi determinar a dosagem de 27 biomarcadores em sangue de cordão umbilical e periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida.

## MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram estudados todos os recém-nascidos (RN) com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g, sem malformações congênitas maiores nascidos no Hospital de Clínicas (HCU-UFU), no período de setembro de 2016 a abril de 2017. Foram avaliados os dados demográficos maternos, gestacionais e do recém-nascido e o desenvolvimento de sepse durante os primeiros 28 dias de vida.

A coleta de sangue do cordão umbilical ocorreu logo após o nascimento e a de sangue periférico do RN com 2 dias de vida. As amostras foram centrifugadas e armazenadas a -80° C e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia para dosagem dos biomarcadores. O diagnóstico de sepse neonatal foi realizado de acordo com o protocolo da UTIN sendo considerado sepse clínica a presença de sinais clínicos e laboratoriais sugestivos de infecção acompanhados do uso de antibióticos por um período mínimo de 7 dias e sepse comprovada aquela em que houve crescimento bacteriano em hemocultura.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (no. 974.356/2014). Os pais dos recém nascidos foram previamente informados e consultados sobre a participação de seus filhos no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Análise do painel de biomarcadores.** Nas amostras de sangue foi realizado um painel de 27 marcadores bioquímicos (Bio-Plex MagPix Analyzer Luminex) usando o kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad)*. Os biomarcadores analisados foram: eotaxina, fator de crescimento de fibroblasto (FGF basic), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 porção 70 (IL-12p70), interleucina-13 (IL-13), interleucina-15 (IL-15), interleucina-17A (IL-17A), proteína 10 induzida por interferon  $\gamma$  (IP-10), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), proteína inflamatória de macrófago 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B (PDGF-BB), regulador na ativação normal de células T expressa e segregada (RANTES), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A intensidade de fluorescência

média de cada amostra foi medida. Os dados foram analisados pelo software Luminex (XPONENT) e as concentrações dos biomarcadores foram obtidas em comparação com a curva padrão equivalente de cada biomarcador. Os valores obtidos foram expressos em pg/mL.

**Análise estatística.** Os dados demográficos maternos e neonatais foram comparados usando os testes U de Mann-Whitney e X<sup>2</sup> ou teste exato de Fischer quando apropriados. As variáveis quantitativas foram testadas quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilks, e comparados os grupos com teste t de Student ou Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas usando teste exato de Fischer. Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para análise dos biomarcadores os valores 'outliers' foram identificados pelo programa e excluídos. Análise de curva ROC foi feita para cada biomarcador e o valor de cut-off foi determinado de acordo com a melhor sensibilidade e especificidade apresentadas. O teste de contingência foi realizado utilizando o Teste exato Fisher para obter os valores de odds ratio. O nível de significância foi de 5% para as comparações. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, California USA).

## RESULTADOS:

Durante o período de estudo nasceram 48 RN elegíveis na instituição, sendo que 9 foram excluídos por não ter sido possível a coleta do sangue de cordão no momento do nascimento. Foram então incluídos 39 RN, classificados retrospectivamente em 2 grupos:

**Grupo 1 (grupo controle):** 12 RN que não receberam diagnóstico de sepse durante os primeiros 28 dias de vida.

**Grupo 2 (grupo sepse):** 27 RN que receberam diagnóstico de sepse e tratamento com antibiótico durante os primeiros 28 dias de vida. Destes, 4 RN apresentaram sepse precoce e 23 RN sepse tardia. A média da idade no dia da sepse foi 7 (1-20) dias. Em 12 casos (44,4%) a

sepse foi confirmada por hemocultura positiva, sendo identificado os agentes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptococcus B*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter cloacae* e *Candida albicans*.

As características maternas e gestacionais e os dados clínicos e sobre a evolução dos RN estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significante das variáveis maternas e neonatais entre os grupos, exceto um menor peso de nascimento ( $0=0,017$ ), menor apgar de 1º minuto ( $p=0,019$ ) e maior tempo de ventilação mecânica ( $p=0,001$ ) no grupo sepse. No grupo controle houve apenas 1 óbito (8,33%) (com 2 dias de vida, em decorrência de prematuridade extrema), sendo que alta hospitalar dos sobreviventes aconteceu em média com 60,9 (40-125) dias. No grupo sepse houve 7 óbitos (25,9%), com média de 19,4 (4-43) dias. A alta hospitalar dos sobreviventes neste grupo aconteceu em média com 76,4 (41-124) dias.

Tabela 1 - Dados maternos, gestacionais e dos recém-nascidos do grupo controle e do grupo sepse

Características	Controle n=12	Sepse n=27	<i>p</i>
Idade materna <sup>1</sup>	26,7 (16-38)	28,7 (14-41)	0,445
Acompanhamento de pré-natal	11 (91,7%)	27 (100%)	0,307
Corticoide antenatal	9 (75%)	21 (77,8%)	>0,999
Hipertensão arterial	9 (75%)	11 (40,7%)	0,082
Diabetes gestacional	1 (8,3%)	4 (14,8%)	>0,999
Rotura prolongada de membranas	1 (8,3%)	7 (25,9%)	0,393
Corioamnionite	0 (0%)	6 (22,2%)	0,150
Tipo de parto			
Vaginal	3 (25%)	9 (33,3%)	0,719
Cesáreo	9 (75%)	18 (66,7%)	
Idade gestacional (sem)	29,4	27,8	0,058
Peso de nascimento (g)	1159	919,6	0,017*
Sexo masculino	6 (50%)	18 (66,7%)	0,477
Apgar 1º minuto <sup>1</sup>	6 (3-9)	4 (0-9)	0,019*
Apgar 5º minuto <sup>1</sup>	8 (5-10)	7 (3-10)	0,083
Tempo total de VM (dias) <sup>1</sup>	4 (0-45)	13 (0-81)	0,001*
Óbito	1 (8,3%)	7 (25,9%)	0,393

sem: semanas; g: gramas; VM: ventilação mecânica

<sup>1</sup>Valores expressos em mediana (mínimo – máximo)

Teste Mann Whitney para dados ordinais e Teste exato de Fisher para dados nominais

A análise dos 27 biomarcadores no sangue do cordão umbilical dos RNPT MBP não mostrou diferença estatística entre os grupos controle e sepse, exceto para a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Figura 1: A e B), com valores menores no grupo sepse. Após essa análise inicial, foi então avaliado este biomarcador específico (MCP-1) no sangue periférico de 2 dias de vida do RN e também foi encontrado diferença estatisticamente significante (Figura 1: C e D), com valores maiores no grupo sepse.

Os valores do odds ratio, risco relativo, sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo da análise do MCP-1 no sangue de cordão umbilical e no sangue periférico do RN estão na Tabela 2. A análise de correlação evidenciou que o MCP-1 não apresentou correlação significativa com nenhum dado materno, gestacional ou neonatal.

Figura 1: Comparação do MCP-1 entre os grupos controle e sepse no sangue de cordão umbilical (A) e do recém-nascido com 2 dias de vida (C) e suas respectivas curvas ROC (B e D)

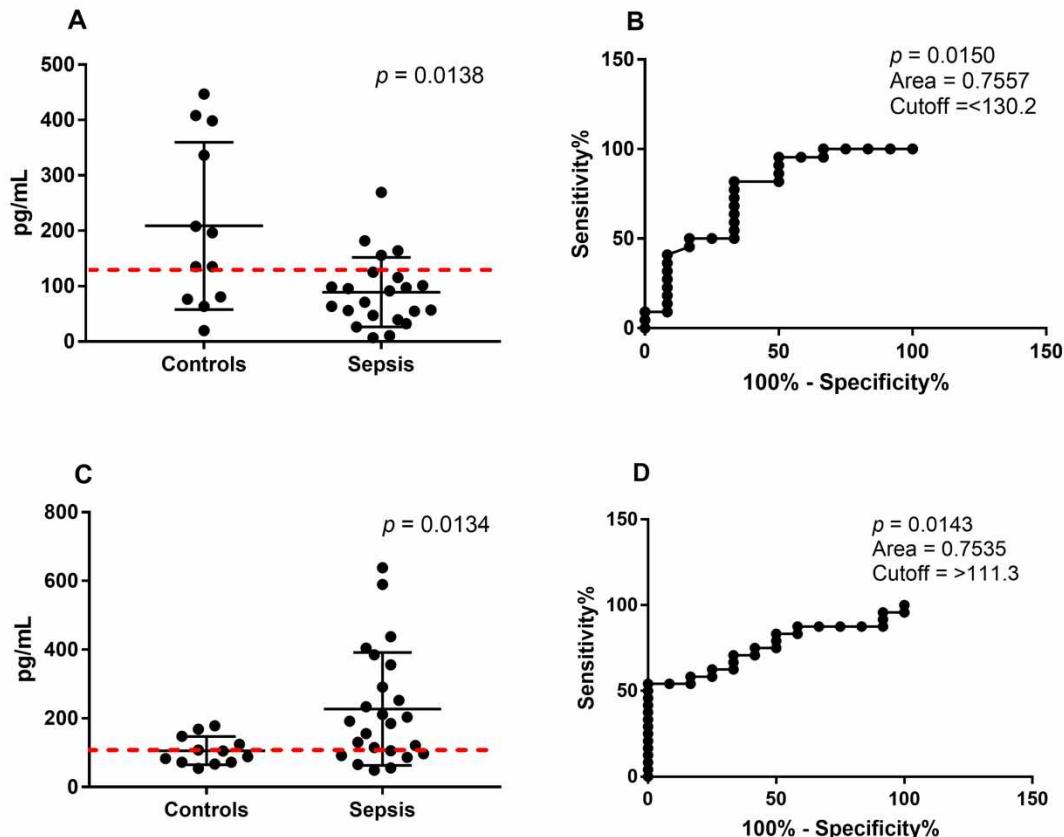


Tabela 2 – Valores do odds ratio, intervalo de confiança, risco relativo, sensibilidade e especificidade para o MCP-1 como preditor da sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida.

	MCP-1 no Cordão umbilical	MCP-1 no Sangue periférico do RN
OR	9 (p=0,008)	7.2 (p=0,008)
CI (OR)	1.933 – 43.620	1.779 – 24.930
RR	2.455	2.197
CI (RR)	1.261 – 6.023	1.263 - 4.330
Sensibilidade	0.818	0.708
Especificidade	0.666	0.75
Acurácia	74.245	72.910
VPP	0.818	0.809
VPN	0.666	0.631

OR – odds ratio; CI – intervalo de confiança; RR – risco relativo;

VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo

## DISCUSSÃO:

Esse trabalho é o primeiro que conseguiu identificar, após avaliar um grande número de biomarcadores, por meio de um painel de alta precisão, uma relação estatisticamente significativa do MCP-1 com a sepse tardia. Parece existir uma provável disfunção deste biomarcador no sangue do cordão e no sangue periférico do RN, evidenciada pela baixa expressão da MCP-1 no sangue de cordão umbilical e uma alta expressão no sangue do RN com 2 dias de vida, ambos indicando com precisão similar o maior risco de sepse neonatal.

O MCP-1 é uma quimiocina. As quimiocinas são pequenas proteínas responsáveis pela atração de células específicas de defesa. Duas principais subfamílias (CXC e CC) já foram investigadas em sepse. As quimiocinas CXC são tipicamente quimiotáticos para neutrófilos, enquanto as quimiocinas CC são capazes de atrair e ativar células mononucleares. As principais representantes da família de quimiocinas CXC são a IL-8 e a IP-10, responsáveis pela atração e degranulação de neutrófilos e envolvidas nas fases iniciais do processo inflamatório (13). O MCP-1 é uma quimiocina CC com potente ação quimioatrativa para monócitos, e um mediador

regulador envolvido em várias doenças inflamatórias. É produzido por um grande número de células: endoteliais, epiteliais, mesangiais, astrocíticas, monocíticas, microgliais, musculares lisas e fibroblastos (14, 15). Sua secreção é induzida por citocinas pró inflamatórias, como a IL-1 e TNF (14). O MCP-1 demonstra quimiotaxia específica para macrófagos e linfócitos mononucleares e possui várias funções biológicas quando combinado com os correspondentes receptores. Ele induz as células a expressarem moléculas carreadoras, a produzirem IL-1 e IL-6 e leva a liberação de quimiocinas por basófilos e mastócitos (16). Outras quimiocinas CC são o MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES. Sabe-se que a produção de quimiocinas é essencial para a resposta de defesa do hospedeiro contra os agentes bacterianos, mas a superprodução desses mediadores pode conduzir a disfunção de múltiplos órgãos e óbito (17). O MCP-1 é produzida abundantemente durante a gestação pelo endométrio, miométrio, células placentárias e trofoblásticas (18) e desempenha um papel específico na angiogênese endometrial, apoptose, proliferação e diferenciação celular (19), sendo essencial para manter a gestação (18). Os dados são muito escassos sobre o papel da MCP-1 na infecção neonatal, mas com os nossos resultados podemos inferir que a disfunção de MCP-1 está envolvida na predisposição para a sepse neonatal.

Dentro do nosso limite de conhecimento não há nenhum artigo na literatura avaliando a relação de MCP-1 com sepse neonatal em sangue de cordão umbilical. Há estudos apenas avaliando a relação do MCP-1 de sangue de cordão com eventos perinatais que encontraram diminuição do MCP-1 nos RN de mães com pré eclampsia (20), aumento nos RN de mães com corioamnionite (20) e aumento nos RNPT (20, 21). Em sangue periférico de RN encontramos na literatura apenas três estudos (22-24) todos mostrando aumento dos níveis de MCP-1 nos pacientes com sepse neonatal. Há também avaliação da relação do MCP-1 de sangue periférico de RN com eventos perinatais mostrando aumento dos níveis de MCP-1, entre outros marcadores, nos RN expostos a corioamnionite (25). Em urina foi encontrado níveis aumentados

de MCP-1 em RN com sepse quando comparados aos RN sem sepse (26). Ampliando a pesquisa na literatura para outras faixas etárias encontramos alguns artigos que estudaram MCP-1 em população adulta com sepse, correlacionando-o com o prognóstico da sepse, sendo demonstrado correlação positiva entre este biomarcador e mortalidade (16, 27-28). Os autores sugerem que o MCP-1 pode desempenhar um importante papel imunomodulador no controle do equilíbrio entre fatores pro e anti inflamatórios na sepse.

No presente estudo encontramos que os RN com valores de MCP-1 maiores que 111,3 pg/mL no sangue periférico de 2 dias de vida apresentaram chance 7,2 vezes maior de sepse no período neonatal com sensibilidade de 70,8% e especificidade de 75%, confirmando o achado esperado de aumento de MCP-1 no sangue do RN com sepse. Mas encontramos um comportamento inverso no sangue de cordão, onde os RN com valores de MCP-1 menores que 130,2 pg/mL no sangue do cordão umbilical apresentaram chance 9 vezes maior de sepse no período neonatal com sensibilidade de 81,2% e especificidade de 66,6%. Com base nas evidências apresentadas, acreditamos que o MCP-1 seja um importante fator para a defesa do RN imediatamente ao nascer. Contudo, níveis de MCP-1 muito baixos no cordão umbilical ao nascimento podem ser deletérios à homeostase imunológica do RN, e nesse caso é possível que haja um mecanismo sistêmico compensatório nos primeiros dois dias de vida em que as células do RN tentam se ajustar ao desequilíbrio, aumentando a produção de MCP-1. Assim, tanto os níveis reduzidos de MCP-1 ao nascer quanto o seu aumento compensatório exacerbado nos primeiros dois dias de vida podem ser fatores predisponentes à infecção, e essa disfunção imunológica pode levar ao insulto e lesões teciduais no período pós-natal, resultando em sepse.

De modo similar, há descrição de valores diminuídos de outros biomarcadores (IL-10 e IL-12p70) no sangue de cordão de RNPT que desenvolveram sepse neonatal precoce, e os autores sugerem que isso possa indicar comprometimento de citocinas imunoregulatórias que acionam as células Th2 (29). Em outro trabalho, esses mesmos biomarcadores estão

aumentados em sangue periférico de RN com sepse (30). Relação inversa do MCP-1 (valores menores no sangue de cordão umbilical e maiores no sangue do RN com 1 e 4 dias de vida) foi também encontrada em RN com retardo de crescimento intrauterino (31).

No nosso estudo os outros biomarcadores avaliados no sangue de cordão umbilical não mostraram relação positiva com a sepse neonatal. Na literatura vários trabalhos conseguiram evidenciar valores aumentados de algumas citocinas no sangue de cordão umbilical e uma maior incidência de sepse neonatal precoce. A IL-6 tem sido sem dúvida a mais estudada, com resultados significativamente maiores em sangue de cordão umbilical de RN com sepse neonatal precoce quando comparados aos RN sem infecção (10, 29, 32-36). Além da IL-6 outras citocinas também foram estudadas em sangue de cordão umbilical e demonstradas como tendo relação positiva em RN com sepse neonatal precoce, como a IL-8 (29, 37), IL-10 (33), G-CSF (34) e GM-CSF (38). Porém a literatura avalia a relação desses biomarcadores dosados em sangue de cordão umbilical apenas com o desenvolvimento de sepse neonatal precoce, não avaliando o período neonatal completo. Quando realizamos essa análise ampliada, avaliando todas as sepses ocorridas até 28 dias de vida, verificamos que esses marcadores já potencialmente descritos em outros trabalhos em sangue de cordão umbilical como preditores da sepse neonatal precoce não mostraram relação com a sepse durante os primeiros 28 dias de vida, apenas o MCP-1. Assim, podemos inferir que os RN que apresentam tais citocinas (como a IL-6) aumentadas no cordão umbilical parecem ter maior chance de desenvolvimento de sepse neonatal precoce, porém após esse período inicial o risco não está aumentado. Por outro lado, os RN com valores alterados de MCP-1 estariam em risco de desenvolver sepse durante todo o primeiro mês de vida. Vale comentar que apesar de vários trabalhos terem encontrado relação positiva de alguns biomarcadores em sangue de cordão umbilical com sepse neonatal precoce, outros não conseguiram demonstrar essa relação, como o IL-10 (34), TNF- $\alpha$  (34) e G-CSF (38). Essas diferenças encontradas nos trabalhos nos levam a acreditar que há uma elevada

heterogeneidade na produção de marcadores bioquímicos em neonatos que irão desenvolver sepse, indicando que nem todos comportam-se com um padrão definido de baixa ou alta produção de biomarcadores.

Esse estudo tem como limitação o tamanho pequeno da amostra de pacientes sendo necessário comprovação dos dados encontrados em uma amostra maior. Por outro lado, apesar da amostra pequena ela foi restrita aos prematuros de muito baixo peso, que são o grupo de maior risco para sepse e maior mortalidade dentro de uma UTIN e onde a cinética dos biomarcadores pode ser diferente. Além disso, o presente estudo ampliou o tempo de avaliação, incluindo a ocorrência de sepse durante todo o período neonatal (os primeiros 28 dias de vida), e ampliou grandemente o número de marcadores estudados com um kit de alta resolução de 27 biomarcadores, quando a grande maioria dos trabalhos consideram apenas os primeiros 2 a 3 dias de vida do RN (sepse precoce) e estudam apenas poucos marcadores com técnicas laboratoriais menos sofisticadas como o ELISA.

## **CONCLUSÃO:**

Os resultados da análise de 27 biomarcadores em RNPT MBP, evidenciaram que o valor diminuído de MCP-1 em sangue de cordão umbilical poderia predizer a ocorrência de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida, assim como o valor aumentado no sangue do RNPT MBP aos 2 dias de vida.

## **REFERÊNCIAS:**

- 1- CORTESE F, SCICCHITANO P, GESUALDO M, et al: Early and late infections in newborns: where do we stand? A review. *Pediatr NeonatoloL* 2016; 57:265-273

- 2- FLEISCHMANN-STRUZEK C, GOLDFARB DM, SCHLATTMANN P, et al: The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med* 2018; 6:223-230
- 3- TZIALLA C, MANZONI P, ACHILLE C, et al: New diagnostic possibilities for neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 2018; 35:575-577
- 4- MUSSAP M, NOTO A, CIBECCHINI F, et al: The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med* 2013; 18:56-64
- 5- JAKACKA N, SNARSKI E, MEKURIA S: Prevention of iatrogenic anemia in critical and neonatal care. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25:191-197
- 6- ROTSHENKER-OLSHINKA K, SHINWELL ES, JUSTER-REICHER A, et al: Comparison of hematologic indices and markers of infection in umbilical cord and neonatal blood. *J Mater Fetal Neonatal Med* 2014; 27:625-628
- 7- TAM PYI, BENDEL CM: Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatr Res* 2017; 82:574-583.
- 8- FAN Y, Yu JL: Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr* 2012; 8:101-108
- 9- SU H, CHANG SS, HAN CM, et al: Inflammatory markers in cord blood or maternal serum for early detection of neonatal sepsis—a systemic review and meta-analysis. *J Perinatol* 2014; 34:268-274
- 10-CERNADA M, BADIA N, MODESTO V et al: Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2012; 101:203-207
- 11-HOWMAN RA, CHARLES AK, JACQUES A, et al: Inflammatory and haematological markers in the maternal, umbilical cord and infant circulation in histological chorioamnionitis. *PloS One* 2012; 7:e51836

- 12- MITHAL LB, PALAC HL, YOGEV R, et al: Cord blood acute phase reactants predict early onset neonatal sepsis in preterm infants. *PloS One* 2017; 12:e0168677
- 13- LUSTER AD: Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-445
- 14- DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29:313-326
- 15- MELGAREJO E, MEDINA MA, SANCHEZ-JIMENEZ F, et al: Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:998-1001
- 16- ZHU T, LIAO X, FENG T, et al: Plasma monocyte chemoattractant protein 1 as a predictive marker for sepsis prognosis: a prospective cohort study. *Tohoku J Exp Med* 2017; 241:139-147
- 17- RAMNATH RD, NG SW, GUGLIELMOTTI A, et al: Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:810-818
- 18- DENISON FC, KELLY RW, CALDER AA, et al: Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum Reprod* 1998; 13:3560-3565
- 19- KAYISLI UA, MAHUTTE NG, ARICI A: Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47:213-221
- 20- TAKAHASHI N, UEHARA R, KOBAYASHI M, et al: Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine* 2010; 49:331-337
- 21- MATOBA N, YU Y, MESTAN K, ET al: Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* 2009; 123:1320-1328
- 22- NG PC, LI K, CHUI KM et al: IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. *Pediatr Res*, 2007; 61: 93-99

- 23-LUSYATI S, HULZEBOS CV, ZANDVOORT et al: Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *J Neonatal Perinatal Med* 2013; 6:153-163
- 24-SUGITHARINI V, PREMA A, THANGAM EB: Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res* 2013; 62:1025-1034
- 25-WEITKAMP JH, GUTHRIE SO, WONG HR, et al: Histological chorioamnionitis shapes the neonatal transcriptomic immune response. *Early Hum Dev* 2016; 98:1-6
- 26-NARASIMHULU SS, HENDRICKS-MUNOZ KD, BORKOWSKY W et al: Usefulness of urinary immune biomarkers in the evaluation of neonatal sepsis: a pilot project. *Clin Pediatr* 2013; 52:520-526
- 27-MERA S, TATULESCU D, CISMARU C, et al: Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 2011; 119:155-163
- 28-BARRE M, BEHNES M, HAMED S et al: Revisiting the prognostic value of monocyte chemotactic protein 1 and interleukin-6 in the sepsis-3 era. *J Crit Care* 2018; 43:21-28
- 29-KUROKAWA CS, HASHIMOTO M, RUGOLO LMS, et al: Cord blood cytokine levels in focal early-onset neonatal infection after preterm premature rupture of membranes. *Turk J Pediatr* 2013; 55:598-605
- 30-SHERWIN C, BROADBENT R, YOUNG S, et al: Utility of interleukin-12 and interleukin-10 in comparison with other cytokines and acute-phase reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. *A J Perinatol* 2008; 25:629-636
- 31-BRIANA D D, BOUTSIKOU M, BAKA S, et al: Perinatal plasma monocyte chemotactic protein-1 concentrations in intrauterine growth restriction. *Mediators Inflamm* 2007; 65032. doi: 10.1155/2007/65032
- 32-STEINBERGER E, HOFER N, RESCH B: Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest* 2014; 74:432-436

- 33-CANCELIER AC, PETRONILHO F, REINK A, et al: Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med* 2009; 10:467-471
- 34-MERCER BM, CROUSE DT, GOLDENBER RL, et al: The antibiotic treatment of PPROM study: systemic maternal and fetal markers and perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 145.e1-145.e9
- 35-COBO T, KACEROVSKY M, ANDRYS C, et al: Umbilical cord blood IL-6 as predictor of early-onset neonatal sepsis in women with preterm prelabour rupture of membranes. *PloS One* 2013; 8:69341
- 36-HATZIDAKI E, GOURGIOTIS D, MANOURA A, et al: Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:632-638
- 37-SANTANA C, GUINDEO MC, GONZALEZ G, et al: Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2001; 90:1176-1181
- 38-BAILIE KEM, IRVINE AE, BRIDGES JM et al: Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res* 1994; 35:164-170

## 5- ARTIGO 2

**Título:**

**Cinética de biomarcadores na predição da sepse neonatal tardia**

**Autores:**

Lidia M. Barros, MD, MSc; Roberta R. Rosa, PhD; Daniela M. L. M. Ferreira, MD, PhD; Andreia A. Freitas, MD, MSc; Daniela S. R. Costa, MSc; Aive O. Santos, MSc; Camila P. Nascimento; Vivian M. G. O. Azevedo, PhD; Aline T. Paula, PhD; Patrícia T. Alves, PhD; Larissa P. Maia, MSc; Vânia O. S. Abdallah, MD, PhD; Luiz Ricardo Goulart, PhD

**Instituição:** Universidade Federal de Uberlândia – Departamento de Pediatria

Av Pará, 1720 – Uberlândia, MG, Brasil – 38405-320

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG forneceram apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranotica e Nanobiotecnologia - INCT-TeraNano (CNPq / CAPES / FAPEMIG, CNPq-465669/2014 -0 e FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

**Palavras chaves:** sepse neonatal tardia, recém-nascido pré termo de muito baixo peso, biomarcadores, citocinas, cinética, predição da sepse, interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

**Conflito de interesses:** nenhum

**Resumo:**

A sepse neonatal tardia apesar de ter sua incidência diminuída nos últimos anos, continua sendo um desafio pela dificuldade no diagnóstico e pela alta letalidade, especialmente entre os recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso. O diagnóstico precoce e o início do tratamento apropriado tem um papel crucial na melhoria da sobrevida destes recém-nascidos. A despeito dos dados promissores de alguns dos biomarcadores, nenhum é capaz isoladamente de diagnosticar corretamente a sepse neonatal e pouco tem-se estudado sobre a sua utilização como preditor da sepse. O objetivo desse estudo foi determinar a cinética de 27 biomarcadores em sangue periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal tardia nos primeiros 28 dias de vida. Foi colhido sangue no 2º, 7º, 14º e 28º dias de vida, dos recém-nascidos com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento inferior a 1.500g, sem malformações congênitas, durante um período de 8 meses. Foram excluídos aqueles com sepse precoce ou que evoluíram a óbito antes do 7º dia de vida. Os RN foram divididos em 2 grupos: grupo controle (14 recém-nascidos sem diagnóstico de sepse neonatal tardia), e grupo sepse tardia (24 recém-nascidos com diagnóstico de sepse). A média da idade no dia da sepse foi 11,1 (5-19) dias. Foram então escolhidos para análise de 27 biomarcadores as amostras de sangue do 2º e 7º dia de vida do recém-nascido, antes do diagnóstico de sepse tardia, através de um kit de alta precisão (*Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay*). No 2º dia de vida, os recém-nascidos do grupo sepse tardia apresentaram maiores concentrações de IL1-ra, IL-6, IP-10, e MCP-1 e menores concentrações de FGF basic, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, PDGF-BB e TNF-α do que os recém-nascidos do grupo controle. E no 7º dia de vida, mais próximo da ocorrência da sepse, apresentaram maiores concentrações de VEGF, IL-8, IL-15 e IL1-ra e menores concentrações de IL-6, IL-13, IP-10 e IL-5. Concluímos que em especial a IL-6 e a IL-5 no 2º dia de vida e o VEGF no 7º dia de vida, que apresentaram os maiores valores de odds ratio e acurácia, são capazes de predizer a sepse neonatal tardia. Todos esses marcadores, com exceção da IL-6, são ainda muito pouco explorados na sepse neonatal, merecendo atenção especial em novos estudos.

## 1- INTRODUÇÃO:

A sepse neonatal é uma infecção sistêmica que acomete recém-nascidos e é associada a altas taxas de morbidade e mortalidade (1). A incidência da sepse neonatal tardia, isto é, a infecção que ocorre após 72 horas do nascimento, tem diminuído nos últimos anos, porém sua letalidade continua alta (2). Os recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso (RNPT MBP) são especialmente vulneráveis pelo seu sistema imune imaturo, incapaz de responder adequadamente aos agravos infecciosos e tendem a desenvolver complicações mais graves (3, 4).

Além da incidência e letalidade elevados, a sepse durante o período neonatal apresenta outras particularidades, como a dificuldade no diagnóstico, uma vez que os sinais e sintomas são inespecíficos e facilmente confundidos com outras condições clínicas comuns nesta população, tais como desconforto respiratório, apneia da prematuridade e dismotilidade gastrointestinal (5). O diagnóstico precoce e o início do tratamento apropriado tem um papel crucial na melhoria da sobrevida destes recém-nascidos.

O padrão ouro para o diagnóstico da infecção bacteriana ou fúngica sistêmica ainda é o isolamento de patógenos do sangue periférico. Porém, o resultado é demorado e apresenta baixa sensibilidade e dessa forma, o diagnóstico de sepse não pode ser excluído, mesmo com resultado negativo (6). O exame mais usado atualmente é o hemograma combinado com as proteínas de fase aguda, em especial a proteína C reativa. No entanto, um estudo recente demonstrou que o screening de neutrófilos é um pobre preditor de sepse neonatal tardia (7). Além disso, a proteína C reativa, considerada um biomarcador útil para o diagnóstico de sepse neonatal, possui uma acurácia moderada e seus resultados devem ser combinados com sintomas e sinais clínicos, resultados microbiológicos e laboratoriais (8). Assim, outros marcadores são necessários para identificar com melhor precisão os recém-nascidos que devem ou não receber antibioticoterapia, evitando assim a exposição excessiva, que está associada à alterações no microbioma gastrointestinal, ao surgimento de microorganismos resistentes e ao aumento de infecções fúngicas (9, 10, 11).

Estudos clínicos tem sido realizados com análise laboratorial de alguns biomarcadores, em especial a IL-6, no momento da suspeita de infecção, afim de encontrar o melhor biomarcador para diagnóstico precoce de sepse neonatal. É consenso, mesmo nas revisões mais atuais, que a despeito dos dados promissores de alguns dos biomarcadores, nenhum é capaz isoladamente de diagnosticar corretamente a sepse neonatal (1, 4, 12-14). Além do diagnóstico

precoce da sepse, seria interessante a detecção de algum marcador inflamatório que pudesse predizer o quadro de sepse, antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos (15). Como a administração precoce de antibióticos é uma das maneiras mais eficazes de melhorar o resultado e prognóstico da sepse neonatal, o curso da doença poderá ser melhorado nos recém-nascidos se for possível a detecção da sepse antes dos sintomas clínicos (14). O objetivo desse estudo foi determinar a cinética de 27 biomarcadores em sangue periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso para a predição de sepse neonatal tardia nos primeiros 28 dias de vida.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS:**

Foram estudados todos os recém-nascidos de um hospital universitário com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento inferior a 1.500g, que nasceram entre setembro de 2016 a abril de 2017. Foram excluídos os recém-nascidos que apresentaram malformações congênitas maiores, os que faleceram antes do 7º dia de vida e aqueles com sepse precoce (<72 h de vida), pois o objetivo do estudo foi avaliar se algum biomarcador poderia prever a ocorrência de sepse antes do diagnóstico clínico. Os dados demográficos maternos, gestacionais e do recém-nascido e o desenvolvimento de sepse tardia, durante os primeiros 28 dias de vida, foram avaliados.

A coleta de sangue foi realizada com 2, 7, 14 e 28 dias de vida, de acordo com a rotina de cuidados dos recém-nascidos da unidade. As amostras foram centrifugadas e armazenadas a -80º C e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia da mesma instituição para dosagem dos biomarcadores.

O diagnóstico de sepse neonatal foi realizado de acordo com o protocolo da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) sendo considerado sepse clínica a presença de sinais clínicos e laboratoriais sugestivos de infecção, acompanhados do uso de antibióticos por um período mínimo de 7 dias e sepse comprovada aquela em que houve crescimento bacteriano em hemocultura.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (no. 974.356/2014). Os pais dos recém-nascidos foram previamente informados e consultados sobre a participação de seus filhos no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**2.1- Análise do painel de biomarcadores.** Nas amostras de sangue foi realizado um painel de 27 marcadores bioquímicos (Bio-Plex MagPix Analyzer Luminex) usando o kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad)*. Os biomarcadores analisados foram: eotaxina, fator de crescimento de fibroblasto (FGF basic), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 porção 70 (IL-12p70), interleucina-13 (IL-13), interleucina-15 (IL-15), interleucina-17A (IL-17A), proteína 10 induzida por interferon  $\gamma$  (IP-10), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), proteína inflamatória de macrófago 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B (PDGF-BB), regulador na ativação normal de células T expressa e segregada (RANTES), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A intensidade de fluorescência média de cada amostra foi medida. Os dados foram analisados pelo software Luminex (XPONENT) e as concentrações dos biomarcadores foram obtidas em comparação com a curva padrão equivalente de cada biomarcador. Os valores obtidos foram expressos em pg/mL.

**2.2 - Análise estatística.** Os dados demográficos maternos e neonatais foram comparados usando os testes U de Mann-Whitney e  $X^2$  quando apropriados. As variáveis quantitativas foram testadas quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilks, e comparados os grupos com teste t de Student ou Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas usando teste exato de Fischer. Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para análise dos biomarcadores os valores 'outliers' foram identificados pelo programa e excluídos. Análise de curva ROC foi feita para cada biomarcador e o valor de cut-off foi determinado de acordo com a melhor sensibilidade e especificidade apresentadas. O teste de contingência foi realizado utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância considerado foi de 5% para as comparações. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, California USA).

### 3- RESULTADOS:

Durante o período de estudo nasceram 48 recém-nascidos elegíveis na instituição, sendo que 5 foram excluídos pois evoluíram a óbito antes do 7º dia de vida e 5 devido diagnóstico de sepse precoce. Foram então incluídos 38 recém-nascidos, conforme figura 1.

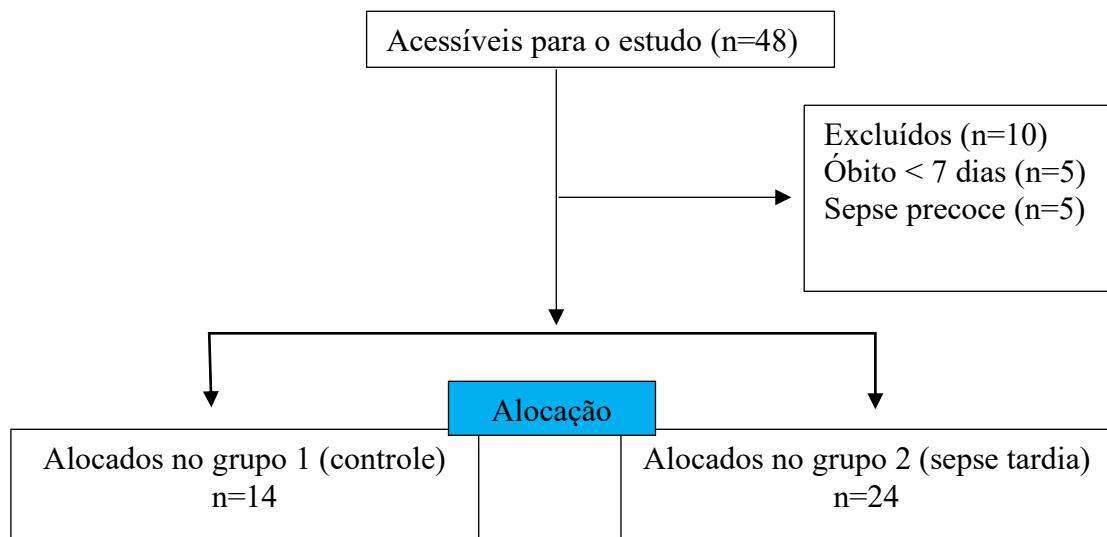


Figura 1 – Flowchart da alocação de pacientes no estudo

No grupo 2, foi considerada sepse clínica em 14 (58,3%) RN e sepse comprovada em 10 (41,7%), sendo que 2 RN apresentaram mais de 1 episódio de sepse (máximo de 3). Os agentes identificados na hemocultura foram *Staphylococcus aureus* (2), *Staphylococcus coagulase negativo* (5), *Enterobacter cloacae* (1), *Serratia marcescens* (1), *Candida albicans* (2) e *Candida parapilosis* (1). Não houve diferença das variáveis demográficas entre os grupos sepse clínica e sepse comprovada.

As características clínicas dos recém-nascidos estão apresentadas na Tabela 1. No grupo sepse os recém-nascidos apresentavam menor peso de nascimento, menor Apgar de 1º e 5º minutos, maior tempo de ventilação mecânica, de oxigenoterapia e nutrição parenteral e maior incidência de displasia broncopulmonar.

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos da gestação, nascimento e evolução do recém-nascido

	<b>Controle n=14</b>	<b>Sepse tardia n=24</b>	<b>p</b>
Corioamnionite	1 (7,1%)	4 (16,7%)	0,633
Parto vaginal	4 (28,6%)	15 (62,5%)	0,091
Idade gestacional (sem) <sup>1</sup>	29,4 (24-32)	27,8 (24-33)	0,169
Peso de nascimento (g) <sup>1</sup>	1172 (615-1499)	952,6 (488-1477)	0,028*
Sexo masculino	6 (42,9%)	15 (62,5%)	0,317
Apgar 1º minuto <sup>1</sup>	6 (2-9)	4 (1-9)	0,046*
Apgar 5º minuto <sup>1</sup>	9 (8-10)	7 (3-10)	0,007*
Tempo total de VM (dias) <sup>1</sup>	5,9 (0-45)	15,7 (0-81)	0,007*
Tempo total de O2 (dias) <sup>1</sup>	21,8 (1-105)	46,3 (2-170)	0,006*
Tempo total de NP (dias) <sup>1</sup>	12,4 (7-17)	21,5 (8-59)	0,009*
HPIV	2 (14,3%)	10 (41,7%)	0,147
DBP <sup>2</sup>	2 (14,3%)	15 (68,1%)	0,002*
ROP <sup>2</sup>	2 (14,3%)	9 (40,1%)	0,141
Óbito	0	5 (20,8%)	0,136
Duração da internação entre os sobreviventes <sup>1</sup>	64,7 (34-147)	67,3 (12-106)	0,318

sem: semanas; g: gramas; VM: ventilação mecânica; O2: oxigenoterapia; NP: nutrição parenteral;

HPIV: hemorragia periintraventricular; DBP: displasia broncopulmonar; ROP: retinopatia da prematuridade

<sup>1</sup>Valores expressos em média (mínimo – máximo)

<sup>2</sup> Avaliados entre os sobreviventes aos 28 dias de vida (n=22)

Teste Mann Whitney para dados ordinais e teste exato de Fisher para dados nominais

A média da idade no dia da sepse do grupo 2, considerando o 1º diagnóstico de sepse, foi 11,1 (5-19) dias. Foram então escolhidos para análise dos biomarcadores as amostras de sangue do 2º e 7º dia de vida do recém-nascido, antes do diagnóstico de sepse tardia. Não houve diferença dos biomarcadores entre os recém-nascidos com sepse clínica e comprovada, exceto para a IL-7.

Na análise do sangue colhido no 2º dia de vida do recém-nascido encontramos 16 biomarcadores com diferença estaticamente significativa entre os grupos (Basic FGF, IFN-γ, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IP-10, MCP-1, PDGF-BB, TNF-α) e para esses biomarcadores foi realizado a curva ROC e encontrado o melhor cutoff pela análise da curva. Na Tabela 2, estão apresentados em ordem decrescente dos valores de OR, com destaque para os 8 biomarcadores com valores de OR superior a 20.

Tabela 2 – Valores da área da curva ROC, cutoff (em pg/mL), odds ratio, intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e acurácia para os biomarcadores com diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e sepse no **2º dia** de vida

2º dia	AUC	p ROC	Cutoff	OR	IC	Sens	Esp	Acur
IL-6	0.89	0.0004	> 14.8	53.3	5.0-601.0	84.2	90.9	87.6
IL-5	0.90	<0.0001	< 12.6	55.0	6.2-613.1	95.6	71.4	83.6
IL-13	88.0	0.0001	< 259.4	40.0	6.3-209.9	87.0	85.7	86.3
IFN- $\gamma$	88.8	0.0001	< 76.2	36.7	5.7-194.0	86.7	84.6	85.8
IL-9	87.0	0.0002	< 42.5	27.5	4.6-141.0	83.3	84.6	84.0
IL-4	83.3	0.0009	< 3.7	23.3	4.1-103.7	87.5	76.9	82.2
PDGF-BB	77.5	0.0064	< 885.9	22.0	3.3-97.7	85.7	78.6	82.1
IL-12p70	86.4	0.0003	< 1413	20.9	3.1-105.7	79.2	84.2	81.9
IL-17a	78.6	0.0004	< 3366	18.3	3.2-75.6	83.3	78.6	80.9
IP-10	80.0	0.0069	> 330.1	15.6	2.5-72.7	87.0	70.0	78.5
IL-1ra	79.2	0.0064	> 353.1	12.6	2.0-67.4	90.0	58.3	74.2
IL-7	73.4	0.0250	< 8.7	8.5	1.5-34.4	73.9	75.0	74.5
IL-10	79.5	0.0063	< 22.5	7.1	1.5-29.3	72.7	72.7	72.7
MCP-1	71.7	0.0430	> 111.3	7.1	1.5-29.3	72.7	72.7	72.7
TNF- $\alpha$	75.6	0.0120	< 59.0	6.7	1.4-24.3	75.0	69.2	72.2
Basic FGF	74.0	0.0170	< 1106	6.1	1.2-23.0	79.2	61.5	70.4

AUC – área sob a curva ROC; OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança; Sens – sensibilidade; Esp – especificidade; Acur – acurácia

Analisando a correlação entre os 8 principais biomarcadores com os maiores valores de odds ratio acima de 20 no 2º dia de vida, encontramos que a IL-5 correlacionou-se positivamente com a IL-13 ( $r=0,75$ ), IFN- $\gamma$  ( $r=0,82$ ), IL-9 ( $r=0,38$ ), IL-4 ( $r=0,65$ ) e IL-12p70 ( $r=0,54$ ), enquanto que a IL-6 correlacionou negativamente somente com a IL-13 ( $r=-0,41$ ).

Na análise do sangue colhido no 7º dia de vida do recém-nascido, encontramos 8 biomarcadores com diferença estaticamente significativa entre os grupos (IL-1ra, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IP-10, VEGF) e da mesma forma foi realizado a curva ROC e encontrado o melhor cut-off. Na Tabela 3, estão apresentados em ordem decrescente dos valores de OR, com destaque para os VEGF, que apresentou valor de OR superior a 20.

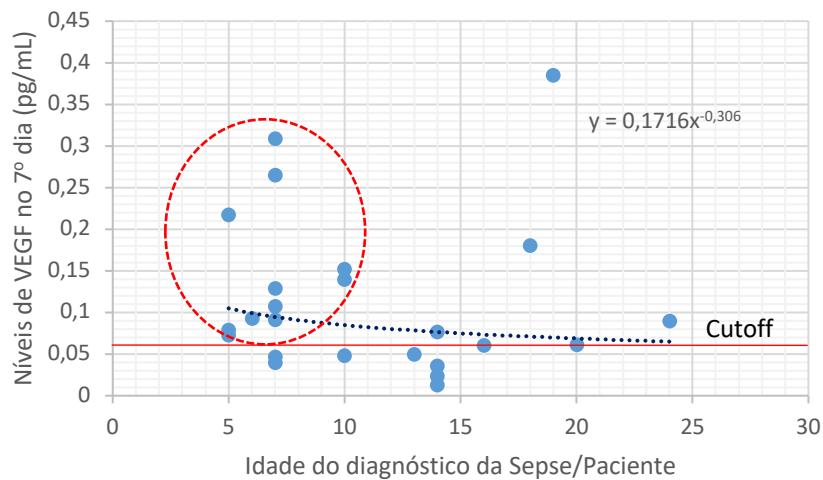
Como o VEGF foi o marcador com maior odds ratio no 7º dia, analisamos então os seus níveis em relação ao dia da ocorrência da sepse de cada recém-nascido. Os maiores níveis de VEGF ocorreram próximo ao dia da ocorrência da sepse, e verificamos que entre os 14 que apresentaram diagnóstico de sepse entre o 5º e 10º dia de vida, ou seja, 2 dias antes até 3 dias depois da coleta ocorrida no 7º dia de vida, 11 (78,6%) recém-nascidos apresentaram VEGF acima de 0,06 (cut-off) (Figura 2, círculo vermelho).

Tabela 3 – Valores da área da curva ROC, cutoff (em pg/mL), odds ratio, intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e acurácia para os biomarcadores com diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e sepse no 7º dia de vida.

7º dia	AUC	p ROC	Cutoff	OR	IC	Sens	Esp	Acur
VEGF	83.5	0.0030	> 0.06	46.2	2.4-896.5	69.6	100	84.8
IL-6	76.9	0.0068	< 10.6	11.9	2.2-54.6	82.6	71.4	77.0
IL-8	73.8	0.1840	> 38.4	9.7	1.6-49.1	61.9	85.7	73.8
IL-13	69.4	0.0561	< 276.8	9.0	1.5-48.0	91.3	46.1	68.7
IP-10	75.2	0.0127	< 403.1	8.0	1.6-31.4	76.2	71.4	73.8
IL-15	71.9	0.0261	> 818.8	7.3	1.5-28.4	66.7	78.6	72.6
IL-5	73.7	0.0161	< 11.6	6.8	1.4-25.5	79.2	64.3	71.7
IL-1ra	71.9	0.0299	> 629.8	6.0	1.1-24.3	66.7	75.0	70.8

AUC – área sob a curva ROC; OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança; Sens – sensibilidade; Esp – especificidade; Acur – acurácia.

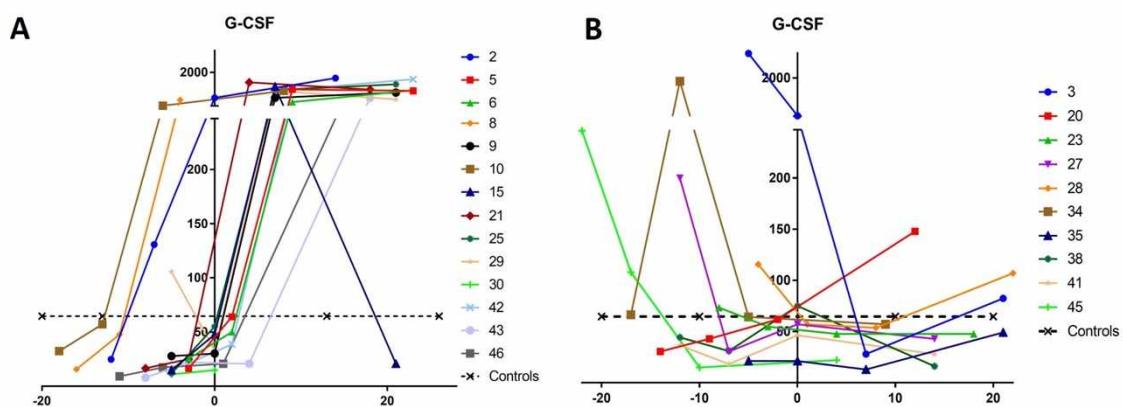
Figura 2 – Níveis de VEGF no 7º dia de vida em relação ao dia de ocorrência da sepse no grupo sepse.



Uma segunda análise foi realizada com o intuito de identificar se algum biomarcador associava-se com a idade de diagnóstico da sepse, utilizando a cinética dos marcadores durante os 28 dias com coletas nos 2º, 7º, 14º e 28º dias. Nessa análise, considerou-se o dia 0 como dia da suspeita de sepse, e os dia das coletas foram distribuídos como sendo negativos (coleta antes do dia 0 da sepse) ou positivos (coleta após o dia 0 da sepse) e foram considerados os grupos sepse clínica e sepse comprovada. Os dados obtidos com as coletas dos pacientes do grupo controle foram analisados em uma média (linha tracejada, figura 3). Os gráficos gerados evidenciaram que os marcadores comportaram-se de maneira randômica. Contudo, na tentativa

de verificar um comportamento que pudesse auxiliar na diferenciação entre os grupos de sepse clínica e sepse comprovada, verificamos que o G-CSF no grupo sepse clínica apresentou um comportamento homogêneo e crescente pós-sepse (Figura 3A), enquanto que a maior parte dos pacientes do grupo sepse comprovada apresentaram níveis de G-CSF abaixo dos valores apresentados pelo controle tanto antes quanto após a sepse (Figura 3B).

Figura 3 – Análise da cinética do G-CSF no dia da sepse clínica sem confirmação (A) e sepse comprovada (B), considerando o dia 0 como o dia da suspeita de sepse.



#### 4- DISCUSSÃO:

Nesse estudo, analisando 27 biomarcadores no 2º dia de vida, demonstramos que recém-nascidos de muito baixo peso que desenvolveram sepse tardia durante os primeiros 28 dias de vida, apresentaram maiores concentrações de IL1- $\alpha$ , IL-6, IP-10, e MCP-1 e menores concentrações de FGF basic, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, PDGF-BB e TNF- $\alpha$  do que os recém-nascidos que não tiveram sepse, sinalizando que tais recém-nascidos podem pertencer a um grupo de risco. E no 7º dia de vida, mais próximo da ocorrência da sepse (que aconteceu em média com 11,1 dias), apresentaram maiores concentrações de VEGF, IL-8, IL-15 e IL1- $\alpha$  e menores concentrações de IL-6, IL-13, IP-10 e IL-5 do que os recém-nascidos que não tiveram sepse. Na literatura os inúmeros trabalhos realizados avaliam os recém-nascidos no momento da sepse realizando a dosagem dos biomarcadores na suspeita de infecção e alguns realizam ainda dosagens sequenciais nas horas seguintes, com o intuito de ajudar no diagnóstico da sepse neonatal. O presente estudo objetivou

avaliar os recém-nascidos antes do desenvolvimento da infecção, com o intuito de investigar a possibilidade de predição do desenvolvimento da sepse neonatal e identificação de um grupo de risco.

No 2º dia de vida encontramos a IL-6 como um dos biomarcadores preditivos com maior relação com a sepse, sendo que os recém-nascidos com valores maiores que 14,8 pg/mL nesse momento tiveram uma chance 53 vezes maior de desenvolver sepse tardia. A IL-6, uma citocina pró-inflamatória (22), é, sem dúvida, a citocina mais estudada na literatura até os dias atuais, como biomarcador útil no diagnóstico da sepse com valores aumentados nos RN com sepse quando comparados com os controles (15 - 21). Os dados apresentados sugerem que ela pode ser útil não só no diagnóstico com também na predição da sepse neonatal, já no 2º dia de vida. Além da IL-6, outros marcadores (IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-4, PDGF-BB e IL-12p70) destacaram-se, por estarem diminuídos no 2º dia de vida nos RN que posteriormente desenvolveram sepse tardia, com valores expressivos de odds ratio. Na literatura, o IFN- $\gamma$  e a IL-12, ambas citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta Th1 (22) apresentaram resultados conflitantes: foram encontrados exacerbados (15, 23, 25) ou sem alteração (26) nos RN com sepse em comparação aos do grupo controle. A IL-4, IL-5 e IL-13, que são citocinas anti-inflamatórias envolvidas na resposta Th2 (22), também encontravam-se exacerbadas (23 - 25) ou sem alteração (15, 23, 24) nos RN com sepse em comparação aos do grupo controle. Já a IL-9, também uma citocina anti-inflamatória envolvida na resposta Th2 (22), ainda não foi estudada na sepse neonatal. E o PDGF-BB, um fator de crescimento derivado de plaquetas, que promove a integridade estrutural da parede do vaso e aumenta a capacidade de cicatrização da ferida (27), foi encontrado exacerbado no momento da sepse (15).

No 7º dia de vida, mais próximo do evento infeccioso, a associação dos biomarcadores foi menos expressiva, e apenas o VEGF apresentou odds ratio maior que 20. Estudado como marcador no diagnóstico da sepse neonatal o VEGF, um regulador fundamental na vasculogênese e angiogênese (28), já foi encontrado aumentado em pacientes com sepse neonatal (29). Esse aumento do VEGF no 7º dia de vida, alguns dias antes da sepse nos faz pensar que algum evento inflamatório possa já ter se iniciado levando a um dano vascular antes mesmo do aparecimento dos sintomas e diagnóstico da sepse e que poderia ser utilizado como preditor e inclusive auxiliar no diagnóstico precoce. A linha de tendência (linha azul escuro, figura 2) demonstra um comportamento de decréscimo dos níveis de VEGF, conforme distancia-se do dia da sepse. Aqueles pacientes com altos níveis de VEGF mesmo após 7 dias

da coleta podem ter tido evento mais grave ou mais prolongado, o que levou à maior exacerbação do marcador por maior tempo.

Ainda na análise do 7º dia de vida, outras citocinas encontradas como fortemente associadas ao diagnóstico de sepse tardia no 2º dia de vida (como a IL-5, IL-6 e IL-13) demonstraram menor performance como preditores de sepse tardia no 7º dia de vida. Curiosamente a IL-6 apresentou-se diminuída nos recém-nascidos do grupo sepse no 7º dia de vida. Podemos inferir que os recém-nascidos que posteriormente desenvolveram sepse tardia desencadearam precocemente a cascata inflamatória devido a algum evento crítico, chegando a haver uma tentativa do organismo de reverter ou bloquear essa inflamação, evidenciado pelos menores valores de IL-6 no 7º dia. A IL-5 e IL-13, ambas citocinas anti-inflamatórias, que juntamente com a IL-6 apresentaram os maiores valores de odds ratio no 2º dia de vida mantiveram-se diminuídas no 7º dia de vida, embora com menos expressão.

Conforme já mencionado, na literatura a ênfase é o estudo dos biomarcadores no momento da sepse neonatal, como marcador diagnóstico. Dentro do nosso limite do conhecimento apenas outros três estudos também avaliaram os biomarcadores antes do desenvolvimento da sepse e os resultados encontrados no presente estudo são concordantes em parte com eles. Há 20 anos, em um estudo clássico, realizado por Kuster et al (30), as coletas sequenciais de IL-6 e IL1-ra de 101 recém-nascidos de muito baixo peso identificaram essas duas interleucinas como bons preditores de sepse, com aumento 2 dias antes do diagnóstico de sepse tardia, que ocorreu em média com 16 dias, um pouco superior ao deste estudo, de 11,1 dias. Com um cutoff de 25,7 pg/mL a IL-6 apresentou especificidade de 92% e sensibilidade de 64%, valores próximos ao nosso. Os autores concluem que através do uso da IL-6 e IL1-ra, dois de cada três casos de sepse poderiam ter sido diagnosticados 1 a 2 dias mais cedo do que realmente foram através dos sintomas clínicos, e assim terem início precoce de antibioticoterapia. Em outro estudo realizado por Schelonka et al (31) com coletas de amostras de sangue de recém-nascidos com 1, 3, 7, 14 e 21 dias de vida, foi encontrado valores de IL-17 significativamente menores em todos os dias de coleta, valores de IL-6 aumentados no dia 21, e de IL-10 aumentados nos dias 7, 14 e 21 nos recém-nascidos que apresentaram sepse tardia em relação aos sem sepse. Os nossos dados também evidenciaram um valor menor de IL-17a no dia 2, mas já evidenciaram valores maiores de IL-6 e menores de IL-10 mais precocemente, no dia 2. No estudo citado não houve diferença dos valores de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-5 em qualquer dia de coleta entre os recém-nascidos com e sem sepse tardia diferindo do presente estudo onde todos esses marcadores estavam significativamente diminuídos no dia 2. E por fim,

no estudo mais recente conduzido por Leal et al (32), com coleta de sangue de recém-nascidos no momento da admissão na UTIN, a sepse foi associada com altos níveis de IL-6, IL-10, G-CSF e MCP-1 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ . Esses dados são concordantes com os nossos em relação aos altos níveis de IL-6 e MCP-1 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  mas diferindo da IL-10, que encontramos diminuída e do G-CSF que não encontramos relação positiva. Apenas os níveis de IL-6 geraram uma curva ROC estatisticamente diferente, que poderia prever o aparecimento de sepse, com cutoff de 44,9 pg/mL, uma sensibilidade de 50% e especificidade de 80%, menores que o presente estudo.

O feto experimenta uma constante invasão de抗ígenos estranhos, derivados principalmente da mãe, e deve regular para baixo a resposta imune para sobreviver. O feto em desenvolvimento reduz então sua resposta imune a esses抗ígenos por meio da expressão de várias citocinas imunoregulatórias Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10. Após o nascimento, entretanto, a recém-nascido é imediatamente exposto a microrganismos e o sistema imunológico deve ser ativado para conter esses microrganismos nas superfícies cutâneas e mucosas. Este processo, quando bem sucedido, envolve uma mudança no equilíbrio de células T-auxiliares de uma dominância Th2 fetal para um estado pró-inflamatório Th1 dominante no período pós-natal (33). Durante a sepse, uma resposta robusta de citocinas pró-inflamatórias como em lactentes maiores e em adultos, é essencial para a depuração imediata de patógenos, enquanto uma resposta inflamatória embotada ou desregulada observada com frequência em neonatos com muito baixo peso pode ser inadequada para erradicar a infecção (31). Os dados mostraram que os recém-nascidos do grupo sepse tiveram menores níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2) no 2º dia de vida e também menores níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17a e TNF- $\alpha$  (Th1) podendo mostrar um desbalanço da resposta inflamatória que poderia predispor a infecção. Concordando com Schelonka et al, (31), com base nos perfis alterados de citocinas, os dados apresentados sugerem que o desenvolvimento imune pode ser diferente desde muito cedo, em recém-nascidos que desenvolverão sepse. Estratégias para amadurecer a resposta imune neonatal podem incluir intervenções que direta ou indiretamente alterem os níveis de citocinas. Embora as citocinas orquestrem a resposta imune, não se pode supor que uma citocina em especial tenha um efeito direto sobre o risco de infecção. Pelo contrário, parece haver interação de múltiplas citocinas que afetam o equilíbrio geral.

Em relação a diferenciação entre os pacientes com sepse clínica daqueles com sepse comprovada observamos que o G-CSF pode ser um marcador útil provavelmente já estando associado à uma melhora clínica mais rápida de neonatos com sepse clínica. O G-CSF é um

mediador da proliferação e diferenciação de neutrófilos produzido pela medula óssea e já foi encontrado valores maiores no momento da sepse nos recém-nascidos com sepse comprovada em relação aos sem evidência de sepse, sendo considerado um marcador útil no diagnóstico precoce da sepse (34). Um modelo de associação do G-CSF com a IL-8 também foi descrito como sendo capaz de discriminar entre os recém-nascidos com sepse comprovada daqueles sem infecção (35).

O presente estudo apresenta como limitação o pequeno número de neonatos, o que permite uma inferência limitada sobre os mecanismos inflamatórios e, portanto, precisam ser interpretados com cautela. Porém, apesar do número de pacientes ter sido pequeno o número de biomarcadores avaliados foi grande e incluiu marcadores pouco estudados ou ainda não estudados anteriormente em sepse neonatal e avaliou esses biomarcadores em um momento diferente, antes da ocorrência da sepse, como preditores da sua ocorrência ou mesmo como auxílio no diagnóstico precoce. Os resultados encontrados no presente estudo indicam que esses marcadores deveriam ser melhores estudados na sepse neonatal.

## **5- CONCLUSÃO:**

A análise de 27 biomarcadores nos 2º e 7º dias de vida, evidenciou que vários deles podem ajudar a predizer a sepse tardia, em especial a IL-5 e a IL-6 no 2º dia de vida e o VEGF no 7º dia de vida, que foi o marcador associado mais próximo da ocorrência da sepse. Além disso evidenciamos marcadores ainda não estudados na literatura na sepse neonatal, como a IL-9, bem como outros muito pouco estudados, como o IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12p70, IL-13 e PDGF-BB, os quais podem também exercer esse papel de predição da sepse, merecendo atenção especial em novos estudos. Por fim, evidenciamos ainda que o G-CSF foi o único marcador capaz de auxiliar na distinção de pacientes com sepse clínica daqueles com sepse confirmada.

## **REFERÊNCIAS:**

- 1- MEMAR, M. Y. et al. Immunologic biomarkers for diagnostic of early-onset neonatal sepsis. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p. 143-153, Jan 2019. DOI: 10.1080/14767058.2017.1366984.

- 2- GREENBERG, R. G. et al. Late-onset sepsis in extremely premature infants: 2000-2011. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 36, n. 8, p. 774-779, Aug 2017. DOI: 10.1097/INF.0000000000001570.
- 3- WYNN, J. L.; LEVY, O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 307-337, June 2010. DOI: 10.1016/j.clp.2010.04.001.
- 4- SHARMA, D. et al. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Boca Raton, v. 31, n. 12, p. 1646-1659, June 2018. DOI: 10.1080/14767058.2017.1322060.
- 5- BEKHOF, J. et al. Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 172, n. 4, p. 501-508, Apr 2013. DOI: 10.1007/s00431-012-1910-6.
- 6- REINHART, K. et al. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, n. 4, p. 609-634, Oct 2012. DOI: 10.1128/CMR.00016-12.
- 7- ROSENFELD, C. R. et al. Screening and serial neutrophil counts do not contribute to the recognition or diagnosis of late-onset neonatal sepsis. **The Journal of Pediatrics**, v. S0022-3476, n. 18, p. 31295-31302, Oct 2018 (Article in Press). DOI: 10.1016/j.jpeds.2018.09.024.
- 8- SHABUJ, K. H. et al. C-reactive protein (CRP) as a single biomarker for diagnosis of neonatal sepsis: a comprehensive meta-analysis. **Mymensingh Medical Journal**, Mymensingh (Bangladesh), v. 26, n. 2, p. 364-371, Apr 2017.
- 9- RUBIN, L. G. et al. Evaluation and treatment of neonates with suspected late-onset sepsis: a survey of neonatologists' practices. **Pediatrics**, Springfield, v. 110, n. 4, p. e42, Oct 2002. DOI: 10.1542/peds.110.4.e42.
- 10- MANZONI, P. Hematologic aspects of early and late-onset sepsis in preterm infants. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 42, n. 3, p. 587-595, Sept 2015. DOI: 10.1016/j.clp.2015.04.012
- 11- TZIALLA, C. et al. Neonatal infections due to multi-resistant strains: Epidemiology, current treatment, emerging therapeutic approaches and prevention. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, n. Pt A, p. 71-77, Dec 2015. DOI: 10.1016/j.cca.2015.02.038

- 12- GILFILLAN, M.; BHANDARI, V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 105, p. 25-33, Feb 2017. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2016.12.002.
- 13- MONASTERO, R. N.; PENTYALA, S. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. **International Journal of Inflammation**, New York, v. 2017, n. ID 4309485, 11 p., 2017. DOI: 10.1155/2017/4309485.
- 14- TZIALLA, C. et al. New diagnostic possibilities for neonatal sepsis. **American Journal of Perinatology**, New York, v. 35, n. 06, p. 575-577, May 2018. DOI: 10.1055/s-0038-1639361.
- 15- SUGITHARINI, V.; PREMA, A.; BERLA THANGAM, E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. **Inflammation Research**, Basel, v. 62, n. 12, p. 1025-1034, Dec 2013. DOI: 10.1007/s00011-013-0661-9.
- 16- FATTAH, M. A. et al. Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, Mumbai, v. 8, n. 1, p. 32-39, Jan-June 2017. DOI: 10.4103/0976-9668.198362.
- 17- HE, Y. et al. Multiplex cytokine profiling identifies interleukin-27 as a novel biomarker for neonatal early onset sepsis. **Shock**, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 140-147, Feb 2017. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000753.
- 18- YE, Q. et al. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. **Pediatric Research**, Basel, v. 81, n. 4, p. 616-621, Apr 2017. DOI: 10.1038/pr.2016.267.
- 19- NAKSTAD, B. The diagnostic utility of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8, and hyaluronic acid in the Norwegian consensus definition for early-onset neonatal sepsis (EONS). **Infection and Drug Resistance**, Auckland (New Zealand), v. 11, p. 359-368, Mar 2018. DOI: 10.2147/IDR.S155965
- 20- MIRZARAHIMI, M. et al. The role of interleukin-6 in the early diagnosis of sepsis in premature infants. **Pediatric Reports**, Pavia (Italy), v. 9, n. 3, p. 7305, Oct 2017. DOI: 10.4081/pr.2017.7305.
- 21- RASHWAN, N. I. et al. Validity of biomarkers in screening for neonatal sepsis –A single center -hospital based study. **Pediatrics and Neonatology**, Singapore, v. S1875-9572, n. 17, p. 30647-30652, May 2018. DOI: 10.1016/j.pedneo.2018.05.001.

- 22- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : receptors, functions, and roles in diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 138, n. 4, p. 984-1010, Oct 2016. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.
- 23- NG, P. C. et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, London, v. 88, n. 3, p. F209-F213, May 2003. DOI: 10.1136/fn.88.3.F209.
- 24- LUSYATI, S. et al. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. **Journal of Neonatal Perinatal Medicine**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-163, 2013. DOI: 10.3233/NPM-1364112.
- 25- SEGURA-CERVANTES, E et al. Inflammatory response in preterm and very preterm newborns with sepsis. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2016, p. 674827, 2016. DOI: 10.1155/2016/6740827.
- 26- BENDER, L. et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. **Danish Medical Bulletin**, Copenhagen, v. 55, n. 4, p. 219-223, Nov 2008.
- 27- BRUECKMANN, M. et al. Prognostic value of platelet-derived growth factor in patients with severe sepsis. **Growth Factors**, Chur (Switzerland), v. 25, n. 1, p. 15-24, Feb 2007. DOI: org.10.1080/08977190701272784.
- 28- PAULUS, P.; JENNEWEIN, C.; ZACHAROWSKI, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis?. **Biomarkers**, London, v. 16, n. suppl. 1, p. S11-S21, July 2011. DOI: 10.3109/1354750X.2011.587893.
- 29- SIAVASHI, V. et al. Endothelial progenitor cell mobilization in preterm infants with Sepsis is associated with improved survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 118, n. 10, p. 3299-3307, Oct 2017. DOI: 10.1002/jcb.25981.
- 30- KÜSTER, H. et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. **The Lancet**, London, v. 352, n. 9136, p. 1271-1277, Oct 1998. DOI: org/10.1016/S0140-6736(98)08148-3.
- 31- SCHELONKA, R. L. et al. T cell cytokines and the risk of blood stream infection in extremely low birth weight infants. **Cytokine**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 249-255, Feb 2011. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.11.003.

32- LEAL, Y. A. et al. Cytokine profile as diagnostic and prognostic factor in neonatal sepsis. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Boca Raton, p. 1-7, Mar 2018. DOI: 10.1080/14767058.2018.

33- SHURIN, M R. et al. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy.

**Springer Seminars in Immunopathology**. Berlin, v. 21, n. 3, p. 339-359, 1999. DOI: org/10.1007/BF00812261.

34- KENNON, C. et al. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. **The Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 128, n. 6, p. 765-769, June 1996. DOI: org/10.1016/S0022-3476(96)70327-X.

35- FISCHER, J. E. et al. Diagnostic accuracy of G-CSF, IL-8, and IL-1ra in critically ill children with suspected infection. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 28, n. 9, p. 1324-1331, Sept 2002. DOI: org/10.1007/s00134-002-1423-2.

## 6- CONCLUSÃO

Os resultados da análise de 27 biomarcadores em amostras biológicas de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, evidenciaram que:

- O valor diminuído de MCP-1 em sangue de cordão umbilical e aumentado no sangue do RNPT aos 2 dias de vida poderia predizer a ocorrência de sepse neonatal nos primeiros 28 dias de vida;
- A IL-5 e a IL-6 no 2º dia de vida e o VEGF no 7º dia de vida em sangue periférico de recém-nascidos pré-termo de muito baixo podem ajudar a predizer a sepse tardia.
- Outros biomarcadores ainda não estudados na literatura associados à sepse neonatal, como a IL-9, bem como outros muito pouco estudados, como o IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12p70, IL-13 e PDGF-BB, podem também exercer esse papel de predição da sepse neonatal tardia, merecendo atenção especial em novos estudos.

## 7- PERSPECTIVAS

A presente tese faz parte de uma série de estudos de uma linha de pesquisa de investigação de biomarcadores no período neonatal. Já originou três trabalhos de mestrado do Programa de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia avaliando esses 27 biomarcadores em urina do RN, “Preditores urinários de sepse neonatal tardia” e “IL-1 $\beta$  urinário como biomarcador preditivo de sepse neonatal em pré-termos”, identificando vários deles (G-CSF, IL-1ra, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, IL17-A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES, TNF- $\alpha$ ) com associação positiva, e no sangue do RN “Preditores clínicos e laboratoriais para displasia broncopulmonar em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer” identificando valores aumentados de GM-CSF e diminuídos de eotaxin nos RN com displasia broncopulmonar. Ainda, está em curso novas coletas de material para análise desses biomarcadores com a hemorragia peri-intraventricular, para outra tese de doutorado, também dentro do Programa Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Por fim, estamos planejando a realização da dosagem dos biomarcadores no momento da sepse, em sangue periférico do RN (dados já colhidos) e a ampliação das coletas em uma coorte maior para validar os dados encontrados até o presente momento. A identificação dos melhores biomarcadores envolvidos na predição e no diagnóstico da sepse poderiam fornecer dados para uma escolha direcionada dos marcadores a serem incluídos em um kit de detecção de sepse neonatal.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

- ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, n. 7, p. 553-560, July 2004.
- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : receptors, functions, and roles in diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 138, n. 4, p. 984-1010, Oct 2016.
- AL-ZAHRANI, A. K. et al. Evaluation of recent methods versus conventional methods for diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **Journal of Infection in Developing Countries**, [Italy], v. 9, n. 4, p. 388-393, Mar 2015.
- ANDERSSON, N. W. et al. Influence of prenatal maternal stress on umbilical cord blood cytokine levels. **Archives of Women's Mental Health**, Wien (Austria), v. 19, n. 5, p. 761-767, Oct 2016.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 34, n. 6, p. 1080-1087, Dec 2015.
- AYAZI, P. et al. Comparison of serum IL-1beta and C reactive protein levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. **Le Infezioni in Medicina**, Roma, v. 22, n. 4, p. 296-301, Dec 2014.
- BAILIE, K. E. M. et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. **Pediatric Research**, Basel, v. 35, n. 2, p. 164-168, Feb 1994.
- BARBOSA, N. G. et al. Sepse neonatal precoce em unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital universitário terciário. **Pediatria Moderna**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 186-192, abr 2014.
- BASU, S. et al. Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. **Journal of Perinatology**, Philadelphia, v. 35, n. 10, p. 855-861, Oct 2015.
- BEERAM, M. R. et al. Utilization of umbilical cord blood for the evaluation of group B streptococcal sepsis screening. **Clinical Pediatrics**, Philadelphia, v. 51, n. 5, p. 447-453, May 2012.
- BEKHOF, J. et al. Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 172, n. 4, p. 501-508, Apr 2013.
- BENDER, L. et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. **Danish Medical Bulletin**, Copenhagen, v. 55, n. 4, p. 219-223, Nov 2008.

---

<sup>1</sup> De acordo com a ABNT NBR 6023, de agosto de 2002 (FUCHS; FRANÇA; PINHEIRO, 2013).

- BENITZ, W. E. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 421-438, June 2010.
- BERRINGTON, J. E. et al. Deaths in preterm infants: changing pathology over 2 decades. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 160, n. 1, p. 49-53, Jan 2012.
- BHANDARI, V. Effective biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-245, Sept 2014.
- BILGIN, K. et al. A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. **Pediatrics**, Springfield, v. 107, n. 1, p. 36-41, Jan 2001.
- BLENCOWE, H. et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive Health**, London, v. 10, Suppl 1, p. S2, 2013.
- BOWKER, R. M.; YAN, X.; DE PLAEN, I. G. Intestinal microcirculation and necrotizing enterocolitis: The vascular endothelial growth factor system. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p. 411-415, Dec 2018.
- BRUECKMANN, M. et al. Prognostic value of platelet-derived growth factor in patients with severe sepsis. **Growth Factors**, Chur (England), v. 25, n. 1, p. 15-24, Feb 2007.
- BUCK, C. et al. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. **Pediatrics**, Springfield, v. 93, n. 1, p. 54- 58, Jan 1994.
- CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 60, n. 2, p. 367-389, Apr. 2013.
- CAMPOS, D. P. et al. Sepse neonatal precoce: níveis de citocinas no sangue de cordão umbilical no diagnóstico e durante o tratamento. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, Porto Alegre, v. 86, n. 6, p. 509-514, Dec. 2010.
- CANCELIER, A. C. et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. **Pediatric Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 10, n. 4, p. 467-471, July 2009.
- CASTAGNOLA, E.; DUFOUR, C. Role of G-CSF GM-CSF in the management of infections in preterm newborns: an update. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 90, supp 2, p. S15-S17, Sept 2014.
- CELIK, I. H. et al. What are the cut-off levels for IL-6 and CRP in neonatal sepsis? **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 24, n. 6, p. 407-412, 2010.
- CERNADA, M. et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 101, n. 5, p. e203-e207, May 2012.
- CHAN, G. J. et al. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e1001502, Aug. 2013.

CHAUHAN, N.; TIWARI, S.; JAIN, U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: an overview. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 107, p. 234-242, June 2017.

COBO, T. et al. Umbilical cord blood IL-6 as predictor of early-onset neonatal sepsis in women with preterm prelabour rupture of membranes. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e69341, July 2013.

CORDEIRO, C. N. et al. Mathematical modeling of the biomarker milieu to characterize preterm birth and predict adverse neonatal outcomes. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 75, n. 5, p. 594-601, May 2016.

CORTESE, F. et al. Early and late infections in newborns: where do we stand? A review. **Pediatrics and Neonatology**, Singapore, v. 57, n. 4, p. 265-273, Aug 2016.

CROSS, A. S. IL-18/IL-1/IL-17A axis: a novel therapeutic target for neonatal sepsis? **Cytokine**, Philadelphia, v. 86, p. 1-3, Oct 2016.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 4, p. 742-780, Oct 1997.

DE BONT, E. S. J. M. et al. Increased plasma concentrations of interleukin-1 receptor antagonist in neonatal sepsis. **Pediatric Research**, Basel, v. 37, n. 5, p. 626-629, May 1995.

DE BONT, E. S. J. M. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. **Pediatric Research**, Basel, v. 33, n. 4 Pt 1, p. 380-383, Apr 1993.

DENNING, T. L. et al. Pathogenesis of NEC: role of the innate and adaptive immune response. **Seminars in Perinatology**. New York, v. 41, n. 1, p. 15-28, Feb 2017.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, v. 29, n. 6, p. 313-326, June 2009.

DINARELLO, C. A. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. **Seminars in Oncology**. New York, v. 24, n. 3 Suppl 9, p. S9-81-S9-93, June 1997.

DOELLNER, H. et al. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 132, n. 2, p. 295-299, Feb 1998.

DØLLNER, H.; VATTEN, L.; AUSTGULEN, R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 54, n. 12, p. 1251-1257, 2001.

FAN, Y.; YU, J. L. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. **World Journal of Pediatrics**, Hangzhou (Switzerland), v. 8, n. 2, p. 101-108, May 2012.

FATTAH, M. A. et al. Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, Mumbai, v. 8, n. 1, p. 32-39, Jan-June 2017.

- FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 77, n. 7, p. 527-543, July 1999.
- FISCHER, J. E. et al. Diagnostic accuracy of G-CSF, IL-8, and IL-1ra in critically ill children with suspected infection. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 28, n. 9, p. 1324-1331, Sept 2002.
- FRANCISCO-CRUZ, A. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. **Medical Oncology**, New York, v. 31, n. 1, p. 774, Jan 2014.
- FUCHS, A. M. S.; FRANÇA, M. N.; PINHEIRO, M. S. F. **Guia para normalização de publicações técnico-científicas**. Uberlândia: EDUFU, 2013. 286p. ISBN 978-85-778-342-4.
- GANESAN, P et al. Evaluation of IL-6, CRP and hs-CRP as early markers of neonatal sepsis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, India, v. 10, n. 5, p. DC13-DC17, May 2016.
- GEIGER, R. et al. Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels in neonates. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 155, n. 9, p. 811-814, Sept 1996.
- GILFILLAN, M.; BHANDARI, V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: clinical practice guidelines. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 105, p. 25-33, Feb 2017.
- GLASS, H. C. et al. Outcomes for extremely premature infants. **Anesthesia and Analgesia**, Cleveland, v. 120, n. 6, p. 1337-1357, June 2015.
- GOLDSTEIN, B. et al. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 6, n. 1, p. 2-8, Jan 2005.
- GONZALEZ, B. E. et al. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. **Journal of Perinatal Medicine**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2003.
- GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto (United States), v. 32, p. 659-702, 2014.
- GROLL, A. H. et al. Interleukin 6 as early mediator in neonatal sepsis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 11, n. 6, p. 496-498, June 1992.
- HALIL, H. et al. Serum interleukin-33 as a biomarker in predicting neonatal sepsis in premature infants. **Combinatorial chemistry & High Throughput Screening**, Hilversum (United Arab Emirates), v. 21, n. 7, p. 510-515, 2018.
- HARRIS, M. C. et al. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 147, n. 4, p. 462-468, Oct 2005.

HATZIDAKI, E. et al. Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome. **Acta obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 84, n. 7, p. 632-638, July 2005.

HE, Y. et al. Multiplex cytokine profiling identifies interleukin-27 as a novel biomarker for neonatal early onset sepsis. **Shock**, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 140-147, Feb 2017.

HEDEGAARD, S. S.; WISBORG, K.; HVAS, A. M. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis—a systematic review. **Infectious Diseases**, London, v. 47, n. 3, p. 117-124, Mar 2015.

HOFER, N et al. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. **Neonatology**, Basel, v. 102, n. 1, p. 25-36, 2012.

HORNIK, C. P. et al. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 31, n. 8, p. 799-802, Aug 2012.

HOTOURA, E. et al. Pre-inflammatory mediators and lymphocyte subpopulations in preterm neonates with sepsis. **Inflammation**, New York, v. 35, n. 3, p. 1094-1101, June 2012.

IROH TAM, P. Y.; BENDEL, C. M. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. **Pediatric Research**, New York, v. 82, n. 4, p. 574-583, Oct 2017.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012.

KARDATZKE, M. A.; ROSE, R. S.; ENGLE, W. A. Late preterm and early term birth: at-risk populations and targets for reducing such early births. **NeoReviews**, Elk Grove Village (United States), v. 18, n. 5, p. e277-e282, May 2017.

KAWASAKI, T. Update on pediatric sepsis: a review. **Journal of Intensive Care**, London, v. 5, n. 1, p. 47, July 2017.

KELLY, D.; COUTTS, A. G. P. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 59, n. 2, p. 177-185, May 2000.

KENNON, C. et al. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 128, n. 6, p. 765-769, June 1996.

KHAERTYNOV, K. S. et al. Comparative assessment of cytokine pattern in early and late onset of neonatal sepsis. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2017, artigo 8601063, 8 p. 2017.

KOCABAS, E. et al. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. **The Turkish Journal of Pediatrics**, Ankara (Turkey), v. 49, n. 1, p. 7-20, Jan-Mar 2007.

KUROKAWA, C. S. et al. Cord blood cytokine levels in focal early-onset neonatal infection after preterm premature rupture of membranes. **The Turkish Journal of Pediatrics**, Ankara (Turkey), v. 55, n. 6, p. 598-605, Nov-Dec 2013.

- KURT, A. et al. Serum IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2007, p. 31397, 2007.
- KÜSTER, H. et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. **Lancet**, London, v. 352, n. 9136, p. 1271-1277, Oct 1998.
- LAVOIE, P. M. et al. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 202, n. 1, p. 1754-1763, Dec 2010.
- LEAL, Y. A. et al. Cytokine profile as diagnostic and prognostic factor in neonatal sepsis. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, London, v. 21, p. 1-7, Mar 2018.
- LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 7, n. 5, p. 379-390, May 2007.
- LUSTER, A. D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 338, n. 7, p. 436-445, Feb 1998.
- LUSYATI, S. et al. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-163, 2013.
- MACHADO, J. R. et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. **Mediators of Inflammation**, Sylvania (United States), v. 2014, p. 269681, 2014.
- MATOBA, N. et al. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. **Pediatrics**, Springfield, v. 123, n. 5, p. 1320-1328, May 2009.
- MEENA, J. et al. Utility of cord blood culture in early onset neonatal sepsis. **The Australasian Medical Journal**, Sorrento (Canada), v. 8, n. 8, p. 263-267, Aug 2015.
- MEHR, S.; DOYLE, L. W. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 19, n. 9, p. 879-887, Sept 2000.
- MELGAREJO, E. et al. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 5, p. 998-1001, May 2009.
- MEMAR, M. Y. et al. Immunologic biomarkers for diagnostic of early-onset neonatal sepsis. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, London, v. 32, n. 1, p. 143-154, Jan 2019.
- MERCER, B. M., et al. The antibiotic treatment of PPROM study: systemic maternal and fetal markers and perinatal outcomes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St Louis, v. 206, n. 2, p. 145-e1-9, Feb 2012.
- MILLER, L. C. et al. Neonatal interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 117, n. 6, p. 961-965, Dec 1990.

- MIRZARAHIMI, M. et al. The role of interleukin-6 in the early diagnosis of sepsis in premature infants. **Pediatric Reports**, Pavia (Italy), v. 9, n. 3, p. 7305, Oct 2017.
- MOLLOY, E. J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have differential effects on neonatal and adult neutrophil survival and function. **Pediatric Research**, Basel, v. 57, n. 6, p. 806-812, June 2005.
- MONASTERO, R. N.; PENTYALA, S. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. **International Journal of Inflammation**, London, v. 2017, p. 4309485, 2017.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 175, n. 1, p. 5-14, July 2005.
- MOSQUERA, J. B. et al. Utilidad de un test rápido de interleuquina-6 sérico combinado con proteína C reactiva para predecir la sepsis en recién nacidos con sospecha de infección. **Anales de Pediatría**, Barcelona, v. 71, n. 6, p. 483-488, Dec 2009.
- MUSSAP, M. et al. The importance of biomarkers in neonatology. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Amsterdam, 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, Supl 1, p. S81-96, 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, Supl 1, p. S59-S68, 2005.
- NAKSTAD, B. The diagnostic utility of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8, and hyaluronic acid in the Norwegian consensus definition for early-onset neonatal sepsis (EONS). **Infection and Drug Resistance**, Auckland (New Zealand), v. 11, p. 359-368, Mar 2018.
- NAKSTAD, B.; SONERUD, T.; SOLEVÅG, A. L. Early detection of neonatal group B streptococcus sepsis and the possible diagnostic utility of IL-6, IL-8, and CD11b in a human umbilical cord blood in vitro model. **Infection and Drug Resistance**, Auckland (New Zealand), v. 9, p. 171-179, July 2016.
- NG, P. C. et al. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. **Pediatric Research**, Basel, v. 61, n. 1, p. 93-98, Jan 2007.
- NG, P. C. et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, London, v. 88, n. 3, p. F209-F213, May 2003.
- NG, P. C.; LAM, H. S. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 37, n. 3, p. 599-610, Sept 2010.
- NG, P. C.; LAM, H. S. Diagnostic markers for neonatal sepsis. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 125-131, Apr 2006.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 3, p. 3005, 2001.

PANERO, A. et al. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 16, n. 4, p. 370-375, Apr 1997.

PAULUS, P.; JENNEWEIN, C.; ZACHAROWSKI, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? **Biomarkers**, London, v. 16, suppl 1, p. S11-S21, July 2011.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J. L. Sepsis biomarkers: a review. **Critical Care**, London, v. 14, n. 1, p. R15, 2010.

PUOPOLI, K. M. Epidemiology of neonatal early-onset sepsis. **NeoReviews**, Elk Grove Village (United States), v. 9, n. 12, p. e571-e579, Dec 2008.

QUADIR, A. F.; BRITTON, P. N. Procalcitonin and C-reactive protein as biomarkers for neonatal bacterial infection. **Journal of Paediatrics and Child Health**, Melbourne, v. 54, n. 6, p. 695-699, June 2018.

RASHWAN, N. I. et al. Validity of biomarkers in screening for neonatal sepsis - A single center-hospital based study. **Pediatrics and Neonatology**, Singapore, p. 1-7, May 2018. (Article in Press). Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.05.001>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

RODWELL, R. L.; LESLIE, A. L.; TUDEHOPE, D. I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 112, n. 5, p. 761-767, May 1988.

ROMAGNOLI, C. et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 160, n. 6, p. 345-350, June 2001.

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

ROSENFIELD, C. R. et al. Screening and serial neutrophil counts do not contribute to the recognition or diagnosis of late-onset neonatal sepsis. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, Oct 2018. (Article in Press). Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.09.024>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

ROTSHENKER-OLSHINKA, K. et al. Comparison of hematologic indices and markers of infection in umbilical cord and neonatal blood. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, Boca Raton (United States), v. 27, n. 6, p. 625-628, Apr 2014.

SALGUERO, O. O. R. et al. Procalcitonina en sangre de cordón en la valoración del riesgo de sepsis neonatal precoz. **Anales de Pediatría**, Barcelona, v. 87, n. 2, p. 87-94, agosto 2017

SANTANA, C. et al. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 90, n. 10, p. 1176-1181, Oct 2001.

SCHAUB, B. et al. Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 11, p. 1438-1447, Apr 2008.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1813, n. 5, p. 878-888, May 2011.

SCHREUDER, H. et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. **Nature**, London, v. 386, n. 6621, p. 194-200, Mar 1997.

SEGURA-CERVANTES, E et al. Inflammatory response in preterm and very preterm newborns with sepsis. **Mediators of Inflammation**, Sylvania (United States), v. 2016, p. 6740827, 2016.

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

SHANE, A. L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **The Lancet**, London, v. 390, n. 10104, p. 1770-1780, Oct 2017..

SHAPIRO-MENDOZA, C. K. et al. Effect of late-preterm birth and maternal medical conditions on newborn morbidity risk. **Pediatrics**, Springfield, v. 121, n. 2, p. e223-e232, Feb 2008.

SHARMA, A. A. et al. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 145, n. 1, p. 61-68, Oct 2012.

SHARMA, D. et al. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, London, v. 31, n. 12, p. 1646-1659, June 2018.

SHERWIN, C. et al. Utility of interleukin-12 and interleukin-10 in comparison with other cytokines and acute-phase reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. **American Journal of Perinatology**, New York, v. 25, n. 10, p. 629-636, Nov 2008.

SHURIN, M R. et al. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. **Springer Seminars in Immunopathology**. Berlin, v. 21, n. 3, p. 339-359, 1999.

SIAHANIDOU, T. et al. Association of fibroblast growth factor 21 plasma levels with neonatal sepsis: preliminary results. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, Sept 2018 (Article in Press). Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0914>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

SIAVASHI, V. et al. Endothelial progenitor cell mobilization in preterm infants with Sepsis is associated with improved survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 118, n. 10, p. 3299-3307, Oct 2017.

SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for early diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 88, n. 6, p. 647-650, June 1999.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, Chicago, v. 315, n. 8, p. 801-810, Feb 2016.

STEINBERGER, E.; HOFER, N.; RESCH, B. Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants.

**Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 74, n. 5, p. 432-436, Aug 2014.

STOJEWSKA, M. et al. Evaluation of serum chemokine RANTES concentration as a biomarker in the diagnosis of early-onset severe infections in neonates. **Advances in Hygiene & Experimental Medicine**, Warsaw (Poland), v. 70, p. 272-279, Apr 2016.

STRIETER, R. M. et al. Interferon  $\gamma$ -inducible protein-10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 210, n. 1, p. 51-57, May 1995.

SU, H. et al. Inflammatory markers in cord blood or maternal serum for early detection of neonatal sepsis- a systemic review and meta-analysis. **Journal of Perinatology**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 268-274, Apr 2014.

SUGITHARINI, V. et al. TLR-mediated inflammatory response to neonatal pathogens and co-infection in neonatal immune cells. **Cytokine**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 211-217, Oct 2014.

SUGITHARINI, V.; PREMA, A.; THANGAM, E. B. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. **Inflammation Research**, Basel, v. 62, n. 12, p. 1025-1034, Dec 2013.

TAKAHASHI, N. et al. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. **Cytokine**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 331-337, Mar 2010.

TAPPERO, E.; JOHNSON, P. Laboratory evaluation of neonatal sepsis. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 209-217, 2010.

TZIALLA, C. et al. Neonatal infections due to multi-resistant strains: epidemiology, current treatment, emerging therapeutic approaches and prevention. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, n. Pt A, p. 71-77, Dec 2015.

TZIALLA, C. et al. New diagnostic possibilities for neonatal sepsis. **American Journal of Perinatology**, New York, v. 35, n. 06, p. 575-577, May 2018.

UCAR, B. et al. Serum amyloid A, procalcitonin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta levels in neonatal late-onset sepsis. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2008, p. 737141, 2008.

URAS, N. et al. Serum interleukin-6 levels in the differential diagnosis of sepsis and transient tachypnea of newborn. **Medical Journal of Trakya University**, (Turquia), v. 27, n. 3, p. 257-260, 2010.

VAN HERK, W.; STOCKER, M.; VAN ROSSUM, A. M. Recognising early onset neonatal sepsis: an essential step in appropriate antimicrobial use. **The Journal of Infection**, London, v. 72, Suppl, p. S77-S82, July 2016.

VOULOUMANOU, E. K. et al. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 747-762, May 2011.

WEEKS, J. W. et al. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 90, n. 5, p. 815-818, Nov 1997.

WHO. World Health Organization. **Born too soon: The global action report on preterm birth**. CP Howson, MV Kinney, JE Lawn (Eds.) World Health Organization. Geneva, n. 5, p. 1–126, 2012.

WU, Y. Q. et al. Interleukin-6 and interleukin-8 in diagnosing neonatal septicemia. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, Chieti (Italy), v. 30, n. 4, p. 1107-1113, Oct-Dec 2016.

WYNN, J. L. Defining neonatal sepsis. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 135-140, Apr 2016.

WYNN, J. L.; WONG, H. R. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 439-479, June 2010.

YE, Q. et al. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. **Pediatric Research**, New York, v. 81, n. 4, p. 616-621, Apr 2017.

YU, Z. et al. The accuracy of the procalcitonin test for the diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 42, n. 10, p. 723-733, Oct 2010.

ZEITOUN, A. A. H. et al. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 42, n. 4, p. 299-305, Apr 2010.

ZHENG, J. 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. **Biology of Reproduction**, Champaign (United States), v. 56, n. 5, p. 1189-1197, May 1997.

ZHOU, M. et al. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0127170, May 2015.

## 9- APÊNDICES

### Apêndice A. Termo De Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Recém-nascido**

Prezada senhora, o(a) menor, 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, Heloílio dos Reis, Aive Oliva Santos, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa, Andréia de Albuquerque Freitas, Angela Maria Oliveira e Larissa Prado Maia.

Nesta 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. 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. 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

## Apêndice B. Termo De Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - MÃE

Você está sendo convidada a participar como voluntária 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, Heloílio dos Reis, Aive Oliva Santos, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa, Andréia de Albuquerque Freitas, Angela Maria Oliveira e Larissa Prado Maia.

Nesta 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.

Você participará autorizando a utilização de uma amostra do seu sangue e do sangue de cordão umbilical que já é colhido para exames de rotina referentes aos seus cuidados médicos aos cuidados médicos do seu bebê. Esse material será utilizado na realização de alguns exames laboratoriais que possam servir para a identificação de infecção.

Em nenhum momento você será identificada. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos consistem no incômodo que você poderá sentir com a coleta do sangue, porém o seu sangue já será coletado rotineiramente para os seus cuidados durante a internação. Os benefícios que haverão com a sua participação, 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.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Sempre que você desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das

etapas do estudo.

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

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 aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecida

---

Participante da Pesquisa

## Apêndice C. Instrumento utilizado na 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  
Nome RN

Nº prontuário MÃE

Nº prontuário RN

#### DADOS MATERNOS, DE PRÉ-NATAL E PARTO

Idade Materna	Estado Civil	( ) solteira	( ) casada	( ) amasiada	( ) viúva	( ) divorciada
Escolaridade	( ) 1 a 3 anos	( ) 4 a 7 anos	( ) 8 a 11 anos	( ) 12 ou +	( ) ignorado	
Nº gestações (filhos vivos)	Nº abortos					
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	( ) sifilis	( ) 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
Hemotransfusão	( ) Não		( ) Sim	Idade:	Hemocomponente:	
Infecções	( ) diarreia	( ) meningite	( ) onfalite	( ) conjuntivite	( ) HIV	( ) infecções cutânea
	( ) sifilis	( ) 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
Quantos dias de vida,	_____ Qual?					

( ) Alta hospitalar  
Diagnósticos:

( ) Transferência

( ) Óbito

Data:

Idade:

**2 dias**

( ) Sepse Precoce      ( ) Sepse tardia  
 ( ) Não      ( ) Sepse Clínica  
 HMG (rodwell):      PCR:  
 ATB:

Data:      Idade do RN:  
 ( ) HMC +      Microorganismo:  
 LCR cultura:  
 Nº dias:      Urina:

( ) Sepse tardia      Data:  
 ( ) Não      ( ) Sepse Clínica  
 HMG (rodwell):      PCR:  
 ATB:

Idade do RN:  
 ( ) HMC +      Microorganismo:  
 LCR cultura:  
 Nº dias:      Urina:

( ) Sepse tardia      Data:  
 ( ) Não      ( ) Sepse Clínica  
 HMG (rodwell):      PCR:  
 ATB:

Idade do RN:  
 ( ) HMC +      Microorganismo:  
 LCR cultura:  
 Nº dias:

( ) Sepse tardia      Data:  
 ( ) Não      ( ) Sepse Clínica  
 HMG (rodwell):      PCR:  
 ATB:

Idade do RN:  
 ( ) HMC +      Microorganismo:  
 LCR cultura:  
 Nº dias:

( ) Sepse Precoce      ( ) Sepse tardia  
 ( ) Não      ( ) Sepse Clínica  
 HMG (rodwell):      PCR:  
 ATB:

Data:      Idade do RN:  
 ( ) HMC +      Microorganismo:  
 LCR cultura:  
 Nº dias:      Urina:

( ) Sepse tardia Data: Idade do RN:  
 ( ) Não ( ) Sepse Clínica ( ) HMC + Microorganismo:  
 HMG (rodwell) PCR: LCR cultura:  
 ATB: Nº dias: Urina:

( ) Sepse tardia Data: Idade do RN:  
 ( ) Não ( ) Sepse Clínica ( ) HMC + Microorganismo:  
 HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:  
 ATB: Nº dias: Urina:

( ) Sepse tardia Data: Idade do RN:  
 ( ) Não ( ) Sepse Clínica ( ) HMC + Microorganismo:  
 HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:  
 ATB: Nº dias: Urina:

## Apêndice D. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Titulo 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
UF:	MG
Município:	UBERLÂNDIA
Telefone:	(34)3239-4131
Fax:	(34)3239-4335
E-mail:	cep@propp.ufu.br

## 10- ANEXOS

**Anexo A - Curvas padrão dos 27 biomarcadores estudados nessa dissertação.**





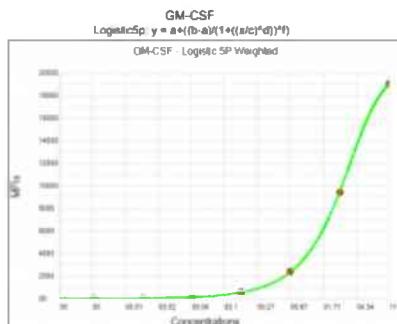
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:04AM

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: GM-CSF

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.998922575088801$ 

Sum of Residuals = 27.3024003829346

Average Residuals = 3.412800046368881

Relative Sum of Squares Absolute = 1455.81902040705

Relative Sum of Squares Relative = 0.0574200803346278

Standard Error of the Estimate = 0.13834749788985

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.997488000540089

Luminex

APONENT  
LABORATORY SOLUTIONS

Page 2 of 7

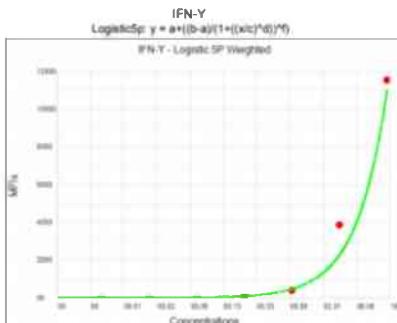
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:43:59AM

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IFN-Y

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.947752436881694$ 

Sum of Residuals = 2005.79443980467

Average Residuals = 250.724304975571

Relative Sum of Squares Absolute = 2756738.71837709

Relative Sum of Squares Relative = 1.2703457243693

Standard Error of the Estimate = 0.650729283824808

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.878089019823862

Luminex

APONENT  
LABORATORY SOLUTIONS

Page 2 of 7

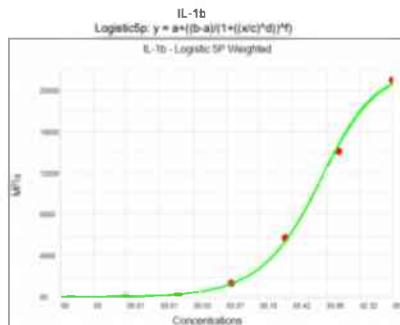
Luminex

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-1b

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:10AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.998494375158302$ 

Sum of Residuals = 166.362158237027

Average Residuals = 20.7952697796284

Relative Sum of Squares Absolute = 645047.948336759

Relative Sum of Squares Relative = 2.69672689936339

Standard Error of the Estimate = 0.948108098331161

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.991820208702706

**Luminex****XPOINENT**  
LABORATORY SERVICES

Page 2 of 7

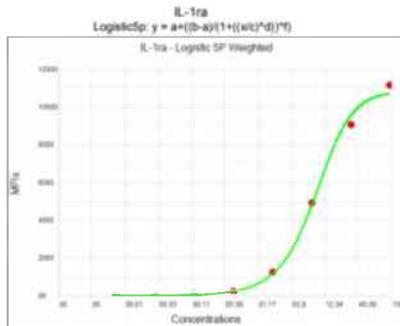
Luminex

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-1ra

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:01AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:

**Luminex****XPOINENT**  
LABORATORY SERVICES

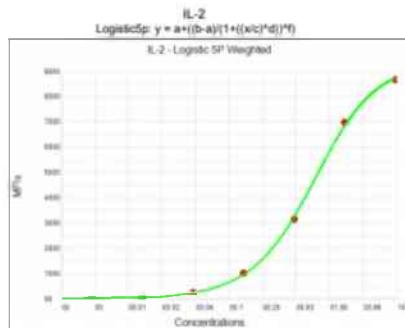
Page 2 of 7

Luminex

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepse Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** IL-2

**Serial Number:** MAGPX12174706  
**Batch Run Date:** 12/30/2011 7:48:09AM  
**Operator:**  
**Report Generated By:**



## Curve Data:

 $R^2 = 0.998980194773409$ 

Sum of Residuals = 18.0395536984528

Average Residuals = 2.2549442123066

Relative Sum of Squares Absolute = 34971.846785197

Relative Sum of Squares Relative = 0.763713849251994

Standard Error of the Estimate = 0.504650675348

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.997620454471287

Luminex

APONENT  
SOFTWARE SOLUTIONS

Page 2 of 7

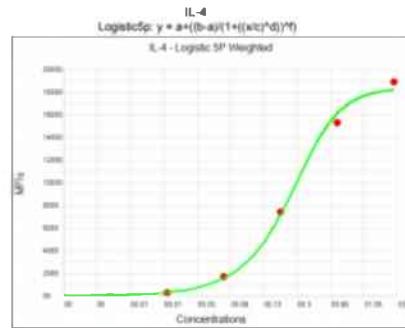
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:20AM

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepse Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** IL-4

**Serial Number:** MAGPX12174706  
**Batch Run Date:** 12/30/2011 7:48:09AM  
**Operator:**  
**Report Generated By:**



## Curve Data:

 $R^2 = 0.9926387018274$ 

Sum of Residuals = 287.727568730078

Average Residuals = 35.9859448412598

Relative Sum of Squares Absolute = 1162990.38867017

Relative Sum of Squares Relative = 1.615670988088534

Standard Error of the Estimate = 0.710790889544467

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.992823637597266

Luminex

APONENT  
SOFTWARE SOLUTIONS

Page 2 of 7

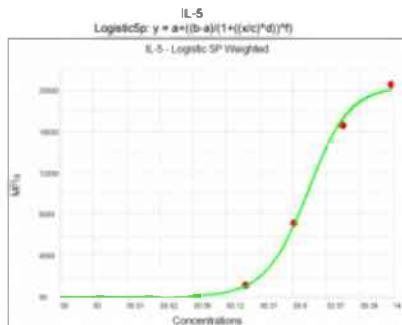
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:02AM

## Data Interpretation Report

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-5

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



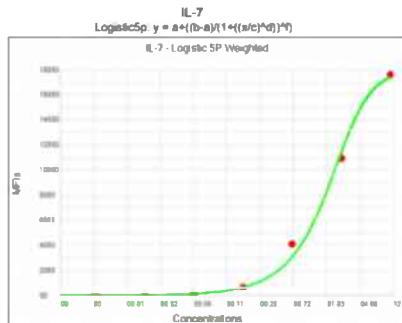
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:31AM

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-7

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.970302104299212$ 

Sum of Residuals = 742.402132831887

Average Residuals = 92.8002865789858

Relative Sum of Squares Absolute = 1308753.93750286

Relative Sum of Squares Relative = 1.55188124139881

Standard Error of the Estimate = 0.719231358557826

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.930704810031404

Luminex

APONENT  
LABORATORY SOLUTIONS

Page 2 of 7

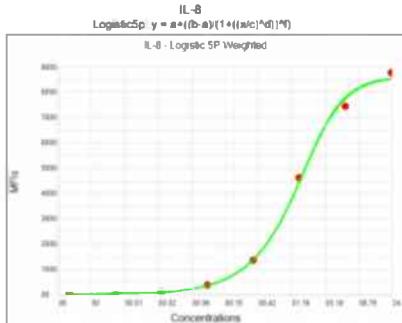
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:23AM

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-8

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.999901348869711$ 

Sum of Residuals = 69.7792607557730

Average Residuals = 8.7224075944714

Relative Sum of Squares Absolute = 192158.751787427

Relative Sum of Squares Relative = 1.87132832995462

Standard Error of the Estimate = 0.789794879852888

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.99743547563266

Luminex

APONENT  
LABORATORY SOLUTIONS

Page 2 of 7

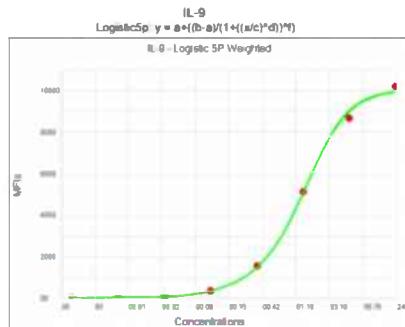
Lumines

## Data Interpretation Report

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-9

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:35AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.998087404421742$ 

Sum of Residuals = 82.6699580000383

Average Residuals = 10.3337447500048

Relative Sum of Squares Absolute = 205490.38613414

Relative Sum of Squares Relative = 1.520018182000258

Standard Error of the Estimate = 0.713600176470896

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.995537276984065

Luminex

APONENT  
Instrument Solutions

Page 2 of 7

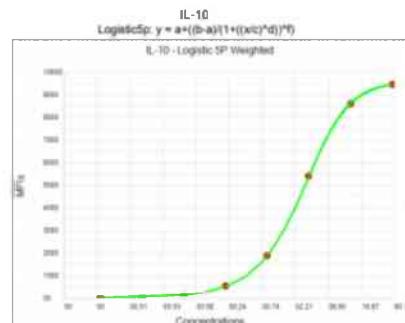
Lumines

## Data Interpretation Report

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-10

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:27AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

 $R^2 = 0.999972032317894$ 

Sum of Residuals = -1.50402233478458

Average Residuals = -0.188002791845572

Relative Sum of Squares Absolute = 565.288790162784

Relative Sum of Squares Relative = 0.0675432995996255

Standard Error of the Estimate = 0.16004810295327

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.999934742075085

Luminex

APONENT  
Instrument Solutions

Page 2 of 7

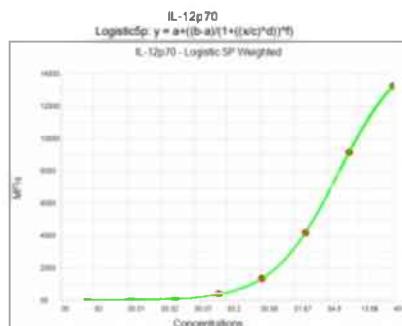
Luminex

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-12p70

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:33AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:08AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

$R^2 = 0.999967250751653$

Sum of Residuals = 0.2045422651038

Average Residuals = 0.0255677831379499

Relative Sum of Squares Absolute = 294.885435505088

Relative Sum of Squares Relative = 0.0731856121828675

Standard Error of the Estimate = 0.15818964133692

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.999923585087191

Luminex

APONENT  
SOLUTIONS

Page 2 of 7

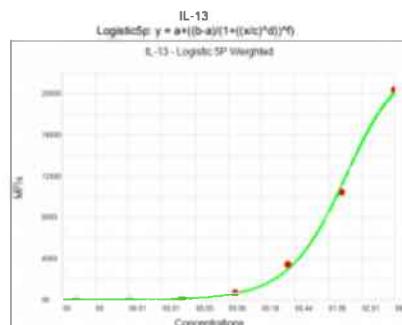
Luminex

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-13

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:19AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



## Curve Data:

$R^2 = 0.986499267912196$

Sum of Residuals = 258.634447748488

Average Residuals = 29.8543059085882

Relative Sum of Squares Absolute = 820010.889402662

Relative Sum of Squares Relative = 0.887090887173885

Standard Error of the Estimate = 0.478571021261461

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.968498338481787

Luminex

APONENT  
SOLUTIONS

Page 2 of 7

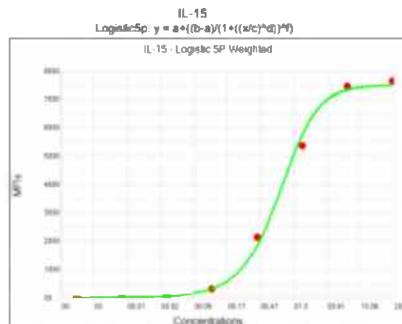
Luminex

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IL-15

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:30AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



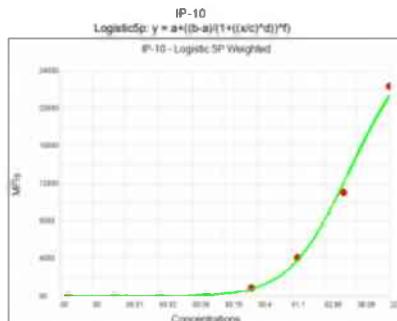
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:17AM

**Data Interpretation Report**

Batch Name: Sepse Neonatal 22.11.2016  
 Protocol Name: Grp I Panel 27-Plex  
 Protocol Version: 1  
 Test Name: IP-10

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



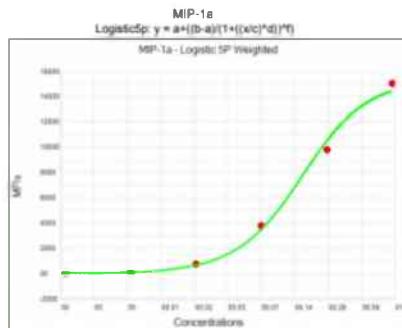
Luminex

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepse Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** MIP-1a

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:25AM

**Serial Number:** MAGPX12174706  
**Batch Run Date:** 12/30/2011 7:48:09AM  
**Operator:**  
**Report Generated By:**

**Curve Data:** $R^2 = 0.979189521973732$ 

Sum of Residuals = 232.577981946457

Average Residuals = 29.0722477433072

Relative Sum of Squares Absolute = 913713.068467778

Relative Sum of Squares Relative = 1.04248996894147

Standard Error of the Estimate = 0.589488475697778

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.951442217938708

**Luminex****APONENT**  
SOLUTIONS

Page 2 of 7

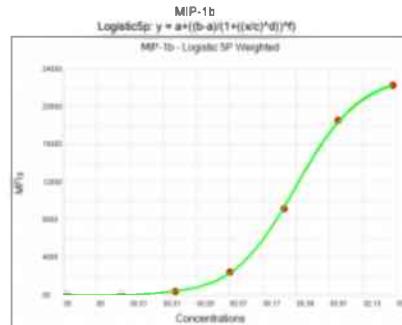
Luminex

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:43:56AM

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepse Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** MIP-1b

**Serial Number:** MAGPX12174706  
**Batch Run Date:** 12/30/2011 7:48:09AM  
**Operator:**  
**Report Generated By:**

**Curve Data:** $R^2 = 0.998784489909399$ 

Sum of Residuals = 16.1902887466721

Average Residuals = 2.02378809333401

Relative Sum of Squares Absolute = 78566.5784611802

Relative Sum of Squares Relative = 0.2435829702653207

Standard Error of the Estimate = 0.284934477996432

Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.997163009700687

**Luminex****APONENT**  
SOLUTIONS

Page 2 of 7

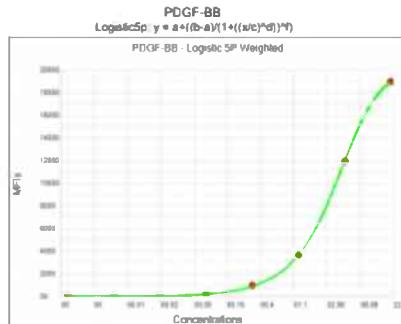
Luminex

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepsis Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** PDGF-BB

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:16AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



Curve Data:  
 $R^2 = 0.997390283291164$   
 Sum of Residuals = 19.3056457933409  
 Average Residuals = 2.41320572416762  
 Relative Sum of Squares Absolute = 2926.92846077867  
 Relative Sum of Squares Relative = 1.13082882083166  
 Standard Error of the Estimate = 0.613902496143883  
 Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.993910681012716

Luminex

APONENT  
SOFTWARE SOLUTIONS

Page 2 of 7

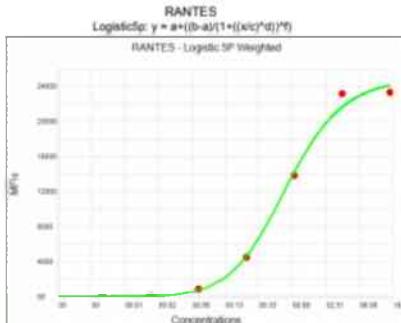
Luminex

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepsis Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** RANTES

Report Date: 12/30/2011 Report Time: 1:44:07AM

Serial Number: MAGPX12174706  
 Batch Run Date: 12/30/2011 7:48:09AM  
 Operator:  
 Report Generated By:



Curve Data:  
 $R^2 = 0.993442988678328$   
 Sum of Residuals = 330.7686524058887  
 Average Residuals = 41.34608655073600  
 Relative Sum of Squares Absolute = 3281168.46224893  
 Relative Sum of Squares Relative = 0.353204641681137  
 Standard Error of the Estimate = 0.343125118910064  
 Adjusted Coefficient of Multiple Determination = 0.984700255602787

Luminex

APONENT  
SOFTWARE SOLUTIONS

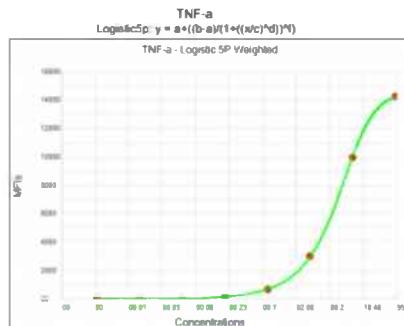
Page 2 of 7

Luminex

**Data Interpretation Report**

**Batch Name:** Sepse Neonatal 22.11.2016  
**Protocol Name:** Grp I Panel 27-Plex  
**Protocol Version:** 1  
**Test Name:** TNF-a

**Serial Number:** MAGPX12174706  
**Batch Run Date:** 12/30/2011 7:48:09AM  
**Operator:**  
**Report Generated By:**



## ANEXO B – Ata de aprovação da defesa da tese.

20/02/2019

SEI/UFU - 1009852 - Ata



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



### ATA

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO JUNTO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Defesa de Tese de Doutorado Nº 002/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Aplicações da nanobiotecnologia em doenças infecciosas, parasitárias e crônico-degenerativas.

Discente: **Lídia Mayrink de Barros** – Matrícula nº **11513CSD013**. Título do Trabalho: "**Avaliação de biomarcadores associados a sepse no período neonatal.**" Às 14:00 horas do dia 08 de fevereiro do ano de 2019, no anfiteatro do Bloco 2H – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Mário Leon Silva Vergara (UFTM), Magda Regina Silva Moura (IMEPAC), Marília Martins Prado Bonini (UFU), Yara Cristina de Paiva Maia (UFU) e Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU) orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir a candidata. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata (**X**)aprovada ( )reprovada. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:30 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Mario León Silva Vergara**, Usuário Externo, em 11/02/2019, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Yara Cristina de Paiva Maia**, Professor(a) do Magistério Superior, em 11/02/2019, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho**, Professor(a) do Magistério Superior, em 11/02/2019, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

20/02/2019

SEI/UFG - 1009852 - Ata



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Prado Boninni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/02/2019, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MAGDA REGINA SILVA MOURA, Usuário Externo**, em 13/02/2019, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1009852** e o código CRC **4A48353F**.

---

Referência: Processo nº 23117.003656/2019-91

SEI nº 1009852