



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ESCOLA DE MEDICINA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES
PRÓ-APOPTÓTICOS E ANTI- APOPTÓTICOS EM
AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO
DE RECÉM-NASCIDOS HIPOXÊMICOS**

Aluna: MONA ADALGISA SIMÕES

Orientador: PROF^a. DR^a LÚCIA DE NORONHA

**CURITIBA
2015**

MONA ADALGISA SIMÕES

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES PRÓ-
APOPTÓTICOS, ANTI-APOPTÓTICOS EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO
DE RECÉM-NASCIDOS HIPOXÊMICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Escola de Medicina da Universidade Católica do Paraná (PUCPR), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina e áreas afins, linha de Pesquisa Métodos Diagnósticos e Terapêuticos em Patologia.

Orientador (a): Lucia de Noronha

**CURITIBA
2015**



PUCPR

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Aos vinte e três dias do mês de março de 2015, realizou-se a sessão pública de defesa de tese provisório: **"AVALIAÇÃO IMUNOEXPRESSION DE MARCADORES PRÓ-APOPTÓTICOS E ANTI-APOPTÓTICOS EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO DE RECEM-NASCIDOS HIPOXÊMICOS"**, apresentado por **Mona Adalgisa Simões** para obtenção do título de doutora; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lucia de Noronha (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Dalton Precoma (PUCPR)	
Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague (PUCPR)	
Prof. Dr. Luiz Martins Collaço (UFPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lucia de Noronha (PUCPR) - Presidente Parecer: Aprovada

Prof. Dr. Dalton Precoma (PUCPR) Parecer: Aprovada

Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague (PUCPR) Parecer: Aprovada

Prof. Dr. Luiz Martins Collaço (UFPR) Parecer: Aprovada

Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião (UFPR) Parecer: Aprovada

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lucia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora
Banca

Prof. Dr. Roberto Pecoits
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que me deram a vida, ao meu marido Francisco e meus filhos Francisco e Júlia pela união, compreensão e por todos os momentos felizes que compartilhamos.

AGRADECIMENTOS

À professora doutora e orientadora **Lúcia de Noronha** por me conceder a oportunidade de ser sua aluna durante estes quatro anos de muito aprendizado e de companheirismo.

À professora doutora **Márcia Olandoski**, pelo seu auxílio e ensinamentos em bioestatística.

A **Equipe do laboratório de Patologia** da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela sua colaboração, presteza, dedicação e disponibilidade que foram imprescindíveis na realização desta pesquisa.

Aos alunos de Medicina, **Ana Karin Ehrenfried de Freitas, Renata Rolim Sakiyama, Fernando Yochiteru Rolim Sakiyama, Rafael Kayano e Patricia Watanabe**, da Universidade Federal do Paraná pelo trabalho em equipe e disponibilidade para auxiliar esta pesquisa.

Ao meu marido, **Francisco**, e aos meus filhos, **Francisco e Júlia**, razão de ser da minha vida, por simplesmente estarem ao meu lado!

Obrigada a Deus e a todos que estiveram presentes em minha vida e tornaram esse sonho possível!

ÍNDICE

1	Resumo.....	6
2	Introdução.....	7
3	Objetivo.....	12
4	Artigo.....	14
5	Referência da Introdução.....	29
6	Anexos.....	32

RESUMO

INTRODUÇÃO: Diversas condições perinatais estão envolvidas no surgimento da hipóxia, sendo que destas, uma de maior importância é a prematuridade, com consequências para diversos órgãos e sistemas. Entre os órgãos afetados o coração, na maioria das vezes, demonstra notável habilidade de se recuperar de lesões sofridas por essa razão. Quando isto não ocorre, o quadro é grave, necessitando de medidas de suporte imediato. Acredita-se que a morte celular dos cardiomiócitos nestes casos não ocorra por necrose, mas sim por apoptose, o que não levaria a sequelas tardias tais como fibrose e discinesia. **OBJETIVO:** Avaliar biomarcadores de morte celular em amostras de miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados por meio de análise da expressão imunohistoquímica de moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. **MÉTODO:** Foram selecionados 314 casos do banco de necropsias pediátricas do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR, entre os anos de 1991 a 2007. Dados clínicos e anatomopatológicos foram coletados de prontuários e de laudos de necropsia. Após isso, os blocos teciduais parafinados que continham miocárdio adequado para a análise imunohistoquímica (n=154) foram selecionados e preparados para a confecção de lâminas utilizando-se a técnica de *Tissue Microarray* (TMA). As lâminas prontas foram submetidas à técnica de imunohistoquímica usando-se os anticorpos anti-BAX, anti-Mfn2, anti-TRAP1, anti-Bcl2 e anti-GADD45 β . A leitura da imunohistoquímica foi realizada com microscopia óptica comum e análise morfométrica (Image Pro Plus®) com medida de área imunopositiva por campo de grande aumento (115.226,1 μm^2). Os resultados imunohistoquímicos foram correlacionados com os dados clínicos (gênero, peso, idade gestacional, Apgar do primeiro e quinto minuto de vida, pH do sangue arterial e sobrevida) e com dados anatomopatológicos (doença de base e causa da morte). **RESULTADOS:** A média de imunexpressão tecidual do BAX foi 29504,9 \pm 9829 μm^2 , do TRAP1 foi 9059,0 \pm 9593,2 μm^2 e o Gadd45 β foi de 1911 μm^2 . Os biomarcadores Mfn2 e Bcl2 apresentaram imunexpressão tecidual ausente ou muito baixa na maioria das amostras. Não houve correlação da média de imunexpressão tecidual dos biomarcadores BAX e TRAP1 com o tempo de sobrevida ou outro fator clínico estudado $p>0,05$. O Gadd45 β apresentou relação com o tempo de sobrevida, apresentando um pico de imunexpressão entre a quinta e a sexta hora de vida ($p=0,02$). **CONCLUSÃO:** Os biomarcadores pró-apoptótico BAX e Gadd45 β e o anti-apoptótico TRAP1, apresentaram boa imunexpressão tecidual em miocárdio humano com lesão hipóxica. Apenas o Gadd45 β apresentou um pico de expressão entre a quinta e a sexta hora de vida.

Palavras-chave: hipóxia, neonatos, cardiomiócitos, imunohistoquímica,

1. INTRODUÇÃO

O nascimento leva a uma série de adaptações dos órgãos e sistemas e quando ele ocorre de forma precoce é uma das principais causas de internação, morbidade e mortalidade de recém-nascidos. Dentre eles podemos citar problemas neurológicos, cardiovasculares e respiratórios, sendo esse último a causa mais comum de hipóxia e morte^{1,2,3}.

De todos os estresses a que o recém-nascido está sujeito, provavelmente, o mais importante e clinicamente relevante é a hipóxia. Esta pode ser definida como sendo uma inadequada oxigenação a nível celular, na maioria das vezes representada pela presença de cianose (coloração azulada da pele, língua e mucosas)^{4,5}. A hipoxemia é, portanto, uma deficiência de oxigênio no sangue arterial⁶.

O adequado aporte de oxigênio aos tecidos é de suma importância para que as células mantenham o metabolismo aeróbico e as funções vitais. Além disso, acredita-se que a morte celular nessas lesões hipoxêmicas ocorre, principalmente, por apoptose⁶.

Quando a hipóxia afeta o coração é uma situação muito grave, que requer suporte intensivo e manuseio imediato na tentativa de reverter o quadro clínico⁶.

O coração, durante o período fetal, tem aumento da massa cardíaca, principalmente pelo crescimento por hiperplasia. Após o nascimento, ocorre uma mudança progressiva dessa forma de crescimento, passando de hiperplásica para hipertrófica, e este fenômeno é acompanhado por mudanças na anatomia, fisiologia e bioquímica. Este período de transição ainda não está bem delimitado^{7,8}.

A literatura é confusa quanto à terminologia hipóxia ou asfixia. A Academia Americana de Pediatria determinou que o termo asfixia deverá ser utilizado quando houver acidemia metabólica ou mista profunda ($\text{pH} < 7$) em sangue arterial do cordão umbilical, escore de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos, manifestações neurológicas neonatais (convulsões, coma ou hipotonia) e disfunção orgânica multissistêmica⁹.

Um conceito utilizado para hipóxia é o de Buonocuore et al (2002) que utiliza os seguintes parâmetros: pH do cordão $< 7,2$, Apgar do 5º minuto de vida entre 4 e 6 e $\text{FiO}_2 \geq 0,40$ para saturar 86%. Não há uniformidade no uso destes critérios nos Serviços de Neonatologia⁹.

Estudos em animais têm demonstrado uma clara associação de ambientes adversos, como a hipóxia miocárdica, no período perinatal, e o aumento do risco de doença isquêmica cardíaca na fase adulta⁴. Essa condição de hipóxia causa déficit na contratilidade miocárdica, diminuição do débito cardíaco e insuficiência tricúspide, sendo que algumas crianças apresentam sinais de distress respiratório, insuficiência cardíaca e derrame pericárdico¹⁰. Além disso, esse quadro leva a uma variedade de respostas funcionais à hipóxia nos cardiomiócitos incluindo proliferação celular, hipertrofia e morte celular. Essas respostas ocorrem para manter a homeostase do tecido miocárdico e surgem pela expressão de alguns genes induzidos por uma variedade de cascatas de sinalização intracelular¹¹.

A apoptose, também denominada morte celular, é importante no desenvolvimento dos órgãos e para a homeostase e remodelamento dos tecidos. É mediada por várias vias de sinalização, algumas atuando para induzir a morte e outras para promover a sobrevivência da célula. Ela pode ocorrer a partir de uma série de estímulos e um dos mais importantes é o estresse oxidativo, intimamente ligado a episódios de hipóxia¹².

Estudos sobre apoptose, baseados na resposta à hipóxia, têm demonstrado um aumento de expressão em diversos genes. Um dos mais novos genes descritos é o *Gadd45β* (*Growth Arrest and DNA Damage 45 beta*), um gene da família *Gad* (*Growth Arrest and DNA*)¹².

O *Gadd45β* é uma proteína expressa juntamente com a ubiquitina em tecidos de mamíferos em resposta a estímulos que induzem danos ao DNA. Estudo em ratos recém-nascidos demonstrou que o *Gadd45β* é um importante regulador da passagem da fase G₂ para a fase M após estresse e é requerido na ativação da p38 responsável pela apoptose de cardiomiócitos induzida pela hipóxia¹².

Em outro estudo em animais, o autor demonstrou que os níveis proteicos do *Gadd45β* ficavam consideravelmente aumentados quando o cardiomiócito era submetido à processos hipoxêmicos. Além disso, comprovou que o aumento isolado do *Gadd45β* no tecido cardíaco não causa dano ao cardiomiócito sob condições de normoxemia, mas que sua presença agrava a apoptose celular quando submetido à hipoxemia, demonstrando que sua expressão pode não ser suficiente, mas é essencial para a morte celular por apoptose em resposta à hipóxia¹².

Outro estudo em animais e em vitro demonstrou que o Gadd45 β é transcrito pela ligação direta com a p53, e que esta indução requer a fosforilação da p53 que é mediada pela p 38, isto ocorre quando há isquemia / anóxia. Este estudo sugere que o Gadd45 β é um marcador de lesão isquêmica do coração.¹³

Outro marcador amplamente estudado é a proteína BAX (*Bcl2-associated X protein*), também conhecida como proteína Bcl2-like do tipo 4, é uma proteína monomérica que reside no citosol da célula sendo um membro pró-apoptótico da família da Bcl2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*). Após a indução da apoptose, ela tem sua conformação alterada e se insere na membrana externa da mitocôndria permitindo o extravasamento do citocromo c, fase em que a apoptose se torna irreversível¹⁴.

Capano e Crompton (2006) demonstraram que a translocação da BAX é um processo gradual que se inicia nos primeiros 20 minutos de um processo hipóxico e progride até cerca de 3 horas na célula cardíaca. Esse acúmulo de BAX, então, culmina na apoptose celular¹⁴.

Muitas outras vias ainda existem para a indução da apoptose, entre estas, foi identificado um poderoso inibidor endógeno da Ras (*rat sarcoma protein*), oncogene reconhecidamente relacionado à vias de proliferação celular, chamado Mfn2 (*mitofusion-2*), também chamado de gene supressor da hiperplasia devido aos seus efeitos anti-proliferativos¹⁵.

Apesar de alguns estudos em animais terem mostrado que o Mfn2 e seu homólogo se localizam na membrana externa mitocondrial e participam da fusão mitocondrial, regulando a morfologia e função da mitocôndria, outros estudos demonstraram que o Mfn2 inibe a via de sinalização Ras-ERK-MAPK (*Extracellular Signal-regulated kinase – Mitogen-Activid Protein Kinase*) e causa a supressão do crescimento celular e sua proliferação em múltiplas linhas celulares tumorais¹⁵.

Associado a seus efeitos anti-proliferativos, estudos anteriores mostraram que o Mfn2 associado a BAX, um pró-apoptótico membro da família Bcl-2, promove os estágios iniciais da apoptose, sugerindo que o Mfn2 participa da sinalização apoptótica mitocondrial¹⁵.

De todos os tipos celulares, o Mfn2 é expressado predominantemente no coração, mas sua função principal nos cardiomiócitos é pouco entendida. Sabe-se,

entretanto, que é um fator essencial na regulação da sobrevivência das células musculares cardíacas, por mecanismos ainda não conhecidos. Resultados recentes indicam que o aumento em sua expressão cardíaca é tanto necessário quanto suficiente para a apoptose induzida por estresse oxidativo, atuando, portanto, em situações de hipóxia¹⁵.

Se a hipóxia e o estresse oxidativo gerado por ela causam a morte de células, deve haver uma razão para que não haja a perda celular de todo o órgão. E o motivo para isso é que os tecidos possuem também mecanismos anti-apoptóticos que impedem a perda excessiva e é o equilíbrio entre fatores apoptóticos e não-apoptóticos que determinam a sobrevivência da célula¹⁶.

A mitocôndria é o primeiro alvo do dano hipóxico nos cardiomiócitos e a disfunção mitocondrial pode causar diretamente a morte celular. O poro transitório de permeabilidade mitocondrial (PTPM) é um poro não-específico que abre, por exemplo, em casos de extravasamento de cálcio e estresse oxidativo. Uma vez aberto, o potencial de membrana e gradiente do pH celular é dissipado e estas mudanças levam a célula à morte¹⁶.

Estudos mostram que a expressão aumentada do TRAP1 (Tumor necrosis factor receptor associated protein 1), uma chaperona mitocondrial, membro da família Hsp90 (Heat shock proteins 90), preserva o potencial de membrana da mitocôndria e sua integridade, mantém o nível de produção de ATP e viabilidade celular durante episódios de dano isquêmico^{17,18}.

As moléculas chaperonas são consideradas importantes reguladoras do controle de qualidade do dobramento das proteínas. Suas principais funções são a manutenção da estabilidade, maturação e transporte intracelular de diferentes proteínas. Estudo sugere ainda que elas também têm participação importante na homeostase celular¹⁷.

Existem diferentes classes de chaperonas da família Hsp90: as citosólicas, as do retículo endoplasmático e as mitocondriais. A molécula TRAP1 está situada na mitocôndria, predominantemente, na matriz mitocondrial, com uma fração distribuída no espaço intermembranas. Em alguns tecidos foi observada uma localização extra-mitocondrial, como nos grânulos de insulina no pâncreas, sarcômeros dos cardiomiócitos, núcleo de células pancreáticas e cardíacas e no endotélio, mas não há um claro conhecimento de sua função nesta situação¹⁹.

Segundo Altieri (2012), a TRAP1 foi identificada pela primeira vez através de estudos com leveduras híbridas, como uma proteína que se ligava ao sítio intracelular do TNFR1 (*tumor necrosis factor-1 receptor*), por isso, designado como o receptor do fator de necrose tumoral associado à proteína 1. Na mesma época, outro estudo identificou uma proteína da família Hsp90 com a capacidade de se ligar à proteína do Retinoblastoma durante a mitose. Quando comparadas, ambas as proteínas se mostraram idênticas¹⁷.

A primeira função atribuída ao TRAP1 é a de proteção contra apoptose via mitocôndria, identificada em estudos com agentes antitumorais, no qual se percebeu que quando as células tumorais eram tratadas com estes agentes, havia uma diminuição da expressão do TRAP1, associada com um aumento da apoptose via mitocôndria. Demonstrou-se que TRAP1 age interagindo com a ciclofilina D, um membro do poro transitório de permeabilidade mitocondrial, inibindo sua abertura e a liberação do citocromo C da mitocôndria¹⁷.

Matassa et al (2012) também demonstrou uma função extramitocondrial do TRAP1, localizada na interface entre mitocôndria e retículo endoplasmático. Parece haver uma função de monitoramento sobre quais proteínas irão para a mitocôndria: quando há um dano em determinada proteína, isto é detectado pelo TRAP1 e este a seqüestra para reparação. Se esta reparação falha, a proteína é encaminhada para o complexo de proteínas, proteossoma, para ser degradada¹⁸.

O papel do TRAP1 em resposta à hipóxia também foi estudado (XIANG, 2010) e demonstrou-se que a expressão aumentada do TRAP1 leva a uma proteção contra danos causados pela hipóxia em cardiomiócitos, enquanto que quando o TRAP1 está inativo, há um aumento da morte celular, diminuição da viabilidade celular e do potencial de membrana mitocondrial. Isso levou à conclusão de que a hipóxia induz um aumento na expressão de TRAP1 em cardiomiócitos e que o TRAP1 tem um importante papel de proteção celular e manutenção da função mitocondrial¹⁶.

Encontra-se também envolvido na apoptose a Bcl2 que atua para inibir a morte celular, por meio da inibição da ativação da pró-caspase, e uma das maneiras para que isto ocorra é por meio do bloqueio da ação do BAX²⁰.

A Bcl2 é uma proteína que apresenta um importante papel na regulação da função e metabolismo das mitocôndrias. Embora ela seja expressa em baixos níveis

nos cardiomiócitos este potente modulador da morte celular é um promissor agente terapêutico para distúrbios cardíacos, porque tem a capacidade de reduzir a morte celular durante a isquemia²¹.

Sua ação anti-apoptótica nos cardiomiócitos se faz através do bloqueio da p53 e do aumento da capacidade das mitocôndrias para resistir altos níveis de cálcio. Tanto a BAX como a Bcl2 pertencem a família Bcl2 e a interação entre estas duas proteínas é que vai determinar se vai haver estímulo ou bloqueio a apoptose^{20,21}.

Este estudo teve como justificativa o estudo da apoptose, por meio de imunexpressão tecidual de biomarcadores apoptóticos e anti-apoptóticos, em miocárdio de recém-nascidos que foram a óbito por hipóxia.

2. OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar biomarcadores pró e anti-apoptóticos em miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados por meio de análise da expressão imunoistoquímica e correlacioná-los com dados clínicos e anatomopatológicos.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 - Analisar a expressão tecidual de marcadores pró-apoptóticos (Gadd45 β , BAX, e Mfn2) e anti-apoptóticos (TRAP1 e Bcl2) em amostras de miocárdio de recém-nascido hipoxemiado.

2.2.2 - Correlacionar as expressão tecidual destes biomarcadores com fatores clínicos e anatomopatológicos (índice de Apgar, acidose, à idade gestacional, causa da morte, doença básica e ao tempo de vida dos pacientes).

3. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Esta tese será apresentada na forma de artigo, intitulado: **IMMUNOEXPRESSION OF GADD45 β IN THE MYOCARDIUM OF NEWBORNS EXPERIENCING PERINATAL HYPOXIA** a ser submetido na revista Cardiovascular Research (Qualis A1 – fator de impacto 5,8).

As amostras que compõem este estudo já foram anteriormente analisadas por este mesmo grupo de pesquisa, sendo objeto da pesquisa de dois outros doutorados. Os dados desta linha de pesquisa já deram origem a dois artigos disponíveis no ANEXO 1 desta tese. Abaixo segue um breve resumo dos dois artigos submetidos a publicação por este grupo.

O objetivo do primeiro artigo intitulado “**CAUSAS EVITÁVEIS DE MORTE E FATORES ASSOCIADO A SOBREVIDA DOS RECÉM-NASCIDOS**” foi avaliar dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos que caracterizassem a amostra. Além disso, os resultados de correlação entre dados clínicos e anatomopatológicos apontaram para um estado de hipóxia consistentemente presente em praticamente todos os casos do estudo, sendo ela a principal causa de morte destes recém-nascidos. Também observamos uma estreita correlação entre a presença de alguns sinais clínicos de hipóxia, tais como o pH<7,2, a presença de cianose, a baixa idade gestacional e os baixos valores de Apgar, e o tempo de sobrevivência.

Um dos objetivos do segundo artigo intitulado “**IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE BIOMARCADORES DE CRESCIMENTO, PRÓ E ANTIAPOPTÓTICOS EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO DE RECÉM-NASCIDOS COM LESÃO HIPÓXICA**” foi caracterizar a imunopressão tecidual dos biomarcadores BAX e Mfn2 (pró-apoptóticos), TRAP1 e Bcl2 (anti-apoptóticos) em amostras de miocárdio humano através de técnicas de imunistoquímica. Os biomarcadores Mfn2 e Bcl2 apresentaram imunopressão tecidual muito baixa ou negativa em quase todos os casos da amostra, enquanto o TRAP1 e o BAX apresentaram boa imunopressão tecidual em praticamente todos os casos deste estudo. Não houve correlação destes biomarcadores com os parâmetros clínicos e anatomopatológicos da amostra.

O biomarcador Gadd45 β (pró-apoptótico) demonstrou boa correlação entre seus valores de imunexpressão tecidual e tempo de sobrevivência dos recém-nascidos. Dado este que foi relatado e discutido no artigo que é objeto desta tese

IMMUNOEXPRESSION OF GADD45 β IN THE MYOCARDIUM OF NEWBORNS EXPERIENCING PERINATAL HYPOXIA

Mona Adalgisa Simões, Francisco Cesar Pabis, Ana Karyn Ehrenfried de Freitas, Marina Luise Viola de Azevedo, Lucia de Noronha.

Authors:

1) Mona Adalgisa Simões

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná

e-mail: monasimoes@uol.com.br

CV: [HTTP://lattes.cnpq.br/1992302330156051](http://lattes.cnpq.br/1992302330156051)

Telephone: +55 47 99744202

2) Francisco Cesar Pabis

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná

e-mail: franciscocpabis@uol.com.br

CV: [HTTP://lattes.cnpq.br/5571348329716379](http://lattes.cnpq.br/5571348329716379)

Telephone: +55 47 99783917

3) Ana Karyn Ehrenfried de Freitas

Faculty member of Medicine at the Federal University of Paraná

e-mail: a.ehrenfried@ufpr.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/6874578294381628>

Telephone: +55 41 99065939

4) Marina Luise Viola de Azevedo

Biologist at the Immunohistochemistry Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná

e-mail: Malu_tu@yahoo.com.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/8905195995266011>

Telephone: +55 41 32711515

5) Lucia de Noronha

PhD in Medicine by the Federal University of Paraná

Professor at the Pontifical Catholic University of Paraná

e-mail: Inno@terra.com.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/9981280495277166>

Telephone: +55 41 3077 1751

ABSTRACT

Introduction: The risks of morbidity and mortality in newborns are associated with particular maternal, fetal, and neonatal conditions, which can lead to perinatal hypoxia. Among the several organs affected by perinatal hypoxia, the heart plays a central role, with cell death caused mainly by apoptosis. One of the biomarkers most often linked to hypoxia-derived cardiomyocyte apoptosis is Gadd45 β .

Objective: To determine levels of tissue immunoexpression of the Gadd45 β biomarker in myocardium samples from the left ventricle of newborns affected by hypoxia, and to correlate these results with clinical and anatomopathologic data.

Methods: Myocardium samples from the left ventricle of newborns (both preterm and full term) were used. The samples were collected from 78 autopsies performed in neonates of both sexes, with hypoxia (Apgar score at five minutes below 6 and/or pH below 7.2 and/or autopsy with anatomopathological signs of hypoxia), who had died within the first day of life. All samples were organized in Tissue Microarray (TMA) with an average of 11 to 12 cores (2 samples of 3mm diameter per core). Immunohistochemistry analysis, using anti-Gadd45 β as the primary antibody, was performed on multi-sample histological slides.

Results: There was no correlation between Gadd45 β tissue immunoexpression and neonatal weight ($p = 0.93$), gestational age ($p = 0.16$), Apgar score at first minute ($p = 0.914$), Apgar score at five minutes ($p = 0.988$) and arterial blood pH ($p = 0.542$). There was a relation between Gadd45 β tissue immunoexpression and survival ($p = 0.02$). The maximum detected peak of Gadd45 β immunoexpression was 8.43% per wide field and was observed around six hours of life.

Conclusion: Gadd45 β could be a suitable biomarker of cardiomyocyte apoptosis in newborns experiencing hypoxia in the first day of life, as its tissue expression peaks around the first six hours after birth.

Keywords: Apoptosis. Newborn. Immunohistochemistry. Hypoxia.

1. Introduction

Hypoxia can be defined as inadequate cellular oxygenation, often associated with cyanosis, which can lead to cardiomyocyte death when affecting the heart¹. This process of cell death, known as apoptosis, as well as the strategies behind cardiomyocyte recovery from perinatal hypoxia in newborn infants, is poorly understood².

A study performed in animals showed a clear link between perinatal adverse effects and an increased risk of myocardial ischemia in adulthood³.

The study of gene expression induced by stimuli such as hypoxia has highlighted the molecular signatures of these responses. One of the genes most recently found to associate with hypoxia-induced apoptosis is *Gadd45β*, a member of the *Gadd45* family².

Our results suggest that *Gadd45β* could be used as an early biomarker of hypoxia-induced apoptosis in the myocardium of newborn infants who had experienced perinatal hypoxia.

The aim of this study was to determine the tissue immunoeexpression of the *Gadd45β* protein in samples from the myocardium (left ventricle) of newborns who had experienced hypoxic conditions and died within the first day of life; moreover, the study aimed to correlate these results with clinical and anatomopathological data.

2. Methods

2.1. Sample selection

The selected samples contained fragments of the myocardium (left ventricle) fixed in formaldehyde and embedded in paraffin and were obtained from autopsies of neonates performed at the Division of Pediatric Autopsies of the Anatomic Pathology Service (Serviço de Anatomia Patológica, SAP) of the Clinical Hospital (Hospital de Clínicas, HC) of the Federal University of Paraná (Universidade Federal do Paraná, UFPR) from 1991 to 2007.

All the neonates who had developed hypoxia were included in the study (gestational age of 24 weeks or more), both preterm and full term, of both sexes, and who had died within the first 24 hours of life. The clinical and anatomopathological criteria for hypoxia were defined as follows: a) Apgar score below 6 at five minutes, and/or b) arterial blood pH below 7.2, and/or c) anatomopathological signs of acute perinatal hypoxia detected in the autopsy (petechiae in serous membranes and mucosas, multi-organ systemic venous congestion, alveolar hyperinflation, atelectasis, hypoxic-ischemic encephalopathy, among others). The exclusion criteria consisted of damaged samples and incomplete medical records of the newborn.

2.2. Sample classification

The following data were retrieved from the medical records: sex, weight in grams, gestational age in weeks, Apgar score at the first minute and at five minutes, arterial blood pH, and survival in hours of life. The anatomopathological records revealed the cause of death and the underlying disease.

The cases were classified according to the variables described above.

2.3. Slide preparation

Slides were mounted from the original paraffin blocks containing myocardium samples (left ventricle). Seven tissue microarrays (TMA), with an average of 11 to 12 cores each, were prepared. Each core was represented by two myocardium samples 3mm in diameter each. The total myocardium area analyzed was 14mm^2 ($A = \pi.r^2 \times 2$ samples). The TMA blocks were sectioned to originate multi-sample slides that were analyzed by using immunohistochemistry.

2.4. Immunohistochemistry

The immunoperoxidase procedure was used in for immunohistochemistry, as described by Debur et al.⁴.

Each immunostaining reaction included positive controls (myocardium samples of left ventricles from adults) and negative controls (without incubation with the primary antibody). The primary antibody used was the rabbit polyclonal anti-Gadd45 β from SIGMA® (St Louis, USA), at 1:100 dilution.

2.5. Immunohistochemistry analysis

The immunostained slides were observed using an optical microscope Olympus® BX50 (Tokyo, Japan), coupled to a Dinoeye video camera, and with the use of the image analysis software Image Pro Plus™ (Maryland, USA). For each sample, eight photos were taken in wide field (CGA = 400 times), with a total area of $115226.1\mu\text{m}^2$ and with 1024×768 pixels each.

The positive control of the reaction was digitalized and one CGA photo was chosen as the "mask," which contained adequate levels of positive signal.

The mask was then superimposed to the sample photos. Based on the ideal positive signal obtained from the mask, the image analysis software Image Pro Plus™ identified the immunostained areas in the samples and is able to transform these results into immunostained area per square micron (μm^2). The area in μm^2 obtained with this method was divided by the constant $115,226.1 \mu\text{m}^2$, which is the total area of the wide field observed, thus generating a

percentage value for the immunostained area for each CGA. For each case, an average percentage of area was determined in eight CGA images.

2.6. Statistical analysis

To test the association between two qualitative variables, the exact Fisher test or the chi-square test was used. Comparison between two groups, concerning quantitative variables, was performed with the use of the Student's t-test for independent samples or the Mann-Whitney nonparametric test. Three groups were compared with the use of the one-way analysis of variance (ANOVA) model or the Kruskal-Wallis nonparametric test. For these comparisons, the analysis of covariance (ANCOVA) model was also used, where the weight at birth was considered a covariate. Values of $p < 0.05$ reflected statistical significance. The data were analyzed with the IBM SPSS Statistics v.20 software.

2.7. Approval by the research ethics committee

The Research Ethics Committee of the Federal University of Paraná under opinion number 2533.140/2011-06 approved this study.

3. Results

3.1. Analysis of the general characteristics of the samples and Gadd45 β tissue immunoexpression.

There was a slight predominance of males in the samples analyzed: 60% of the total (47 cases). Most of the cases were premature newborns (PNB),: approximately 87% of the total (68 cases). The main cause of death was perinatal hypoxia, corresponding to 98% of the total (77 cases), whereas the main underlying disease was hyaline membrane disease, corresponding to 46% of the total (36 cases). The remaining results can be found in Table 1.

Gadd45 β expression was detected in all samples (see Figure 1), with tissue immunoexpression ranging from 0.35% to 8.43%, with median value of 1.66% (Table 1).

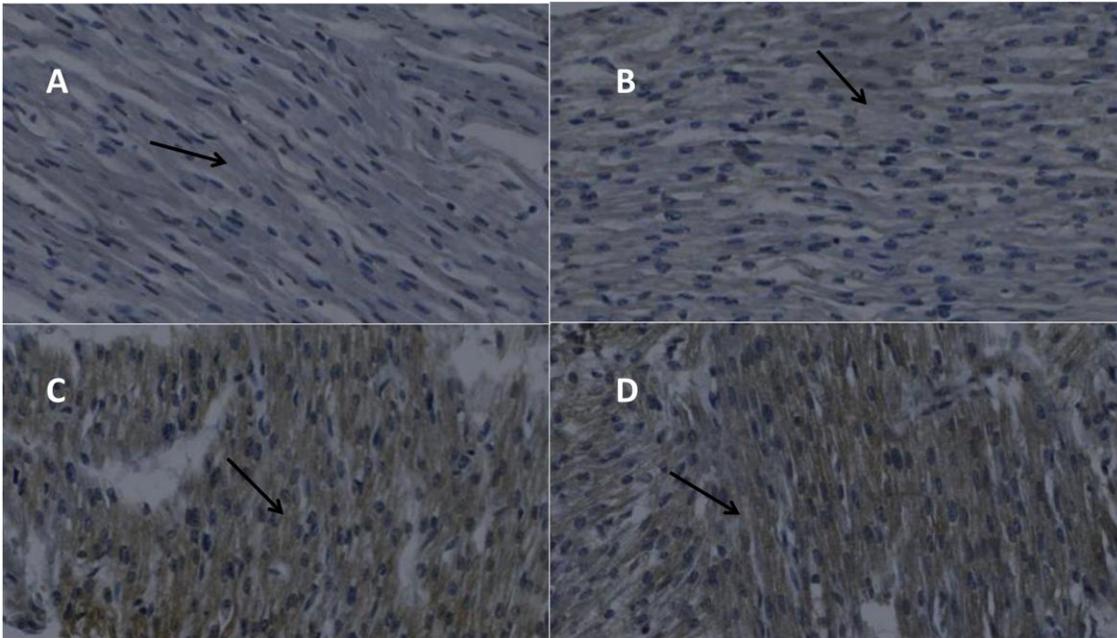


Figure 1 – Photomicrographs of histological samples from the myocardium (left ventricle) immunostained with anti-Gadd45 β ; magnification of 200 \times . A – Average of 0.35% of sample area with tissue immunoeexpression (arrow showing mildly immunostained cardiomyocyte cytoplasm). B - Average of 0.48% of sample area with tissue immunoeexpression (arrow showing mildly immunostained cardiomyocyte cytoplasm). C - Average of 5.19% of sample area with tissue immunoeexpression (arrow showing moderately immunostained cardiomyocyte cytoplasm). D - Average of 8.29% of sample area with tissue immunoeexpression (arrow showing strongly immunostained cardiomyocyte cytoplasm).

Table 1 – General characteristics of the samples, such as weight, pH, gestational age, survival and Apgar score, in addition to average and median of Gadd45 β staining in percentage per CGA.

Variable	n	Median	Average	Standard Deviation
Weight (grams)	71	1740	1707	928.9
pH	41	7.0	6.93	0.24
Gestational age (weeks)	78	33.0	32.3	4.5
Survival (hours)	78	20	14.9	9.7
Apgar 1	78	2.5	2.9	2.9
Apgar 5	78	5.0	4.6	3.1
Gadd45β	78	1.66%	2.13%	1.53%

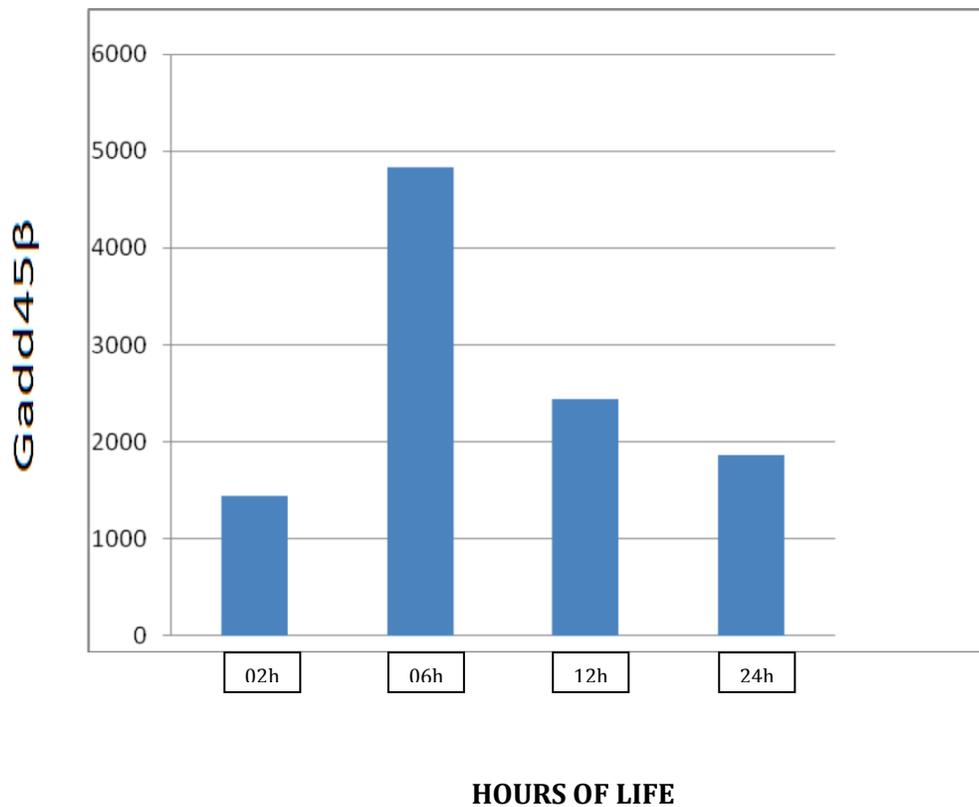
3.2. Analysis of tissue immunoexpression of Gadd45 β and link to the clinical and anatomopathological data.

Tissue immunoexpression of Gadd45 β was correlated with the variables weight, gestational age, Apgar score at first minute of life, Apgar score at five minutes of life, and arterial blood pH; there were no statistical significances (Table 2).

Table 2 – Correlation between Gadd45 β tissue immunoexpression (average percentage of stained area by CGA) and the clinical and anatomopathological data.

		n	Gadd45β	p value
weight	< 1000g	19	2.15% \pm 1.87%	0.93
	\geq 1000g	52	2.12% \pm 1.43%	
Gestational age	< 37	66	2.23% \pm 1.62%	0.16
	\geq 37	12	1.56% \pm 0.75%	
Apgar 1st minute	\leq 6	69	2.15% \pm 1.57%	0.91
	> 6	9	2.08% \pm 1.34%	
Apgar 5th minute	\leq 6	55	2.12% \pm 1.59%	0.99
	> 6	23	2.13% \pm 1.43%	
Arterial blood pH	\leq 7.2	38	2.08% \pm 1.68%	0.54
	> 7.2	3	2.84% \pm 1.81%	

Gadd45 β tissue immunoexpression was also correlated with survival, in hours within the first day of life (see Figure 1), with a peak of expression of this biomarker at the first six hours of life ($p = 0.02$).



Graphic 1- Average tissue immunoexpression (in square micron per CGA) of Gadd45 β in the first hours of life. At 2 hours, 16 cases were studied; at 6 hours, 8 cases; at 12 hours, 6 cases; and at 24 hours, 48 cases.

4. Discussion

Many respiratory disorders in the newborn are due to cardiopulmonary maladaptations to the new environment. At birth, the lungs replace the placenta as the gas exchange organ and the central respiratory activity becomes finely tuned with the metabolic needs of the organism⁵.

The fetal lung contains approximately 30 mL/kg of liquid originated from lung tissue secretions. At birth, the newborn undergoes a respiratory effort to overcome the resistance imposed by that liquid, which forces the air in. When the air enters the lung, it generates reflexive mechanisms that modulate the fetal circulation, which becomes similar to adult circulation⁵.

Hypoxia can have several causes in this stage of life. The more important causes are related with failure to naturally adapt the cardiovascular and respiratory systems and include birth apnea, transient tachypnea in the newborn, hyaline membrane disease, among others. Any

of these conditions can lead to a hypoxic state associated with severe consequences for the newborn, including risk of life⁵.

In the samples analyzed in this study, premature births predominated, and one of the main causes of death was the diffuse alveolar damage (hyaline membrane disease), which reflects deficiencies in adaptation from the preterm newborns to the extra-uterine environment due to their immature organs and systems.

The sequelae from hypoxic states depend on the severity of the hypoxia and its duration. In addition to the brain, which is the most affected organ, hypoxia has been shown to disrupt other physiological systems such as the renal, cardiovascular, pulmonary, and others⁶.

It is difficult to quantify hypoxia in newborns. One of the most frequent reasons for hypoxia is perinatal asphyxia, which is quantified with the use of several criteria according to the literature⁷.

The American Academy of Pediatrics states that asphyxia should refer to: metabolic acidosis or mixed disorder ($\text{pH} < 7$) in the arterial blood of the umbilical cord; Apgar score of 0-3 for longer than 5 minutes; neurological neonatal manifestations (seizures, coma, or hypotonia); and multisystem organ dysfunction (e.g., the cardiovascular system)⁷.

More guidelines currently in use is the one introduced by Buonocore (2002), which uses the following criteria: pH of the arterial blood of the umbilical cord < 7.2 ; Apgar score at five minutes of life between 4 and 6, and $\text{FiO}_2 \geq 0.40$ to 86% saturation; these guidelines were adapted and used for sample selection in this study⁷.

Our results were as follows: Apgar score at first minute below or equal to six and blood $\text{pH} < 7.2$ in more than 70% of the sample; and Apgar score at five minutes below or equal to six in more than 50% of the sample (Table 1).

Hypoxia induces an oxidative state in the cell that activates biochemical signaling cascades, which can ultimately lead to apoptosis. Cell death is also a physiological event operating during organ embryonic development, in homeostasis and in tissue remodeling².

If hypoxia and the oxidative stress it generates can cause cell death, a protective mechanism should be enforced so that organ function is not lost. As such, tissues have anti-apoptotic strategies that avoid excessive cell death. The equilibrium between pro-apoptotic and anti-apoptotic factors dictates cell survival².

During hypoxia, all those mechanisms are activated and the final outcome will define which cells will undergo apoptosis and which will survive and adapt, eventually undergoing proliferation and cell growth in some cases⁸.

These responses are responsible for the maintenance of myocardium homeostasis and are dependent on the activation of gene expression by intracellular signaling pathways⁸.

One of the genes that have been shown to increase its expression following hypoxia is *Gadd45β*. The Gad family consists of homologous proteins that are highly acidic. The members of this family are rapidly induced under oxidative stress⁹.

Evidence suggests that the proteins encoded by the Gad genes play a central role in the modulation of the cellular stress response in mammals following oxidative stress and may or may not depend on p53 to induce cell death⁹.

The Gadd45 proteins regulate their activities through complex interactions with other cell cycle regulators and are part of strategies involved in DNA repair, apoptosis and survival⁹. The *Gadd45β* gene is expressed in parallel with ubiquitin in mammals, as part of the cellular response to DNA damage².

The Gadd45β protein is involved in several biological processes, as widely reported. This protein seems to participate in stress responses to environmentally derived injuries and in the etiology of a series of conditions, including cancer, by acting as a tumor suppressor in the context of pituitary gland lesions^{10,11,12}.

Other studies have suggested that Gadd45β can become a therapeutic target for those cases where cognitive impairment is associated with neuronal and psychiatric development¹³. This biomarker has also been described as a mediator of the anti-proliferative and anti-inflammatory cell response, by inhibiting the c-Jun N-terminal Kinase (JNK) pathway during an insulin-mediated inflammatory process^{14,15}.

In this study, the Gadd45β protein had a considerable level of tissue immunoexpression in all tested samples, which suggests that all newborns that experienced hypoxia could have cardiomyocytes with high susceptibility to hypoxia-induced apoptosis.

Upon reviewing the levels of Gadd45β immunoexpression in relation to the clinical parameters (Apgar score and blood pH), no correlation with hypoxia was observed (Table 2).

On the contrary, Gadd45β tissue immunoexpression correlated with survival, measured in hours, of the newborns who died following hypoxia, the peak of expression of the biomarker was detected around six hours after birth, which suggests that Gadd45β can be an early biomarker of cardiomyocyte susceptibility to apoptosis.

There are laboratory markers currently used for the detection of hypoxia-induced myocardium lesions, such as troponin T and I. Troponins modulate the strength and speed of muscle contraction¹⁶.

Troponins T and I are known markers of myocardium dysfunction. Troponin T peaks at 12 hours and remains in the tissue for two weeks^{17,18}. Troponin I has a short half-life of around 90 minutes, but remains unaltered for 10 to 14 days¹⁶.

Gadd45 β can be considered an early biomarker of myocardium susceptibility to apoptosis. It should be highlighted that Gadd45 β is an important regulator of the G₂ to M phase transition following oxidative stress. Kim et al demonstrated that Gadd45 β is required for the activation of p38, which is responsible for the hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes². This activation is mediated through binding to the MTK1/MEKK4 kinase, a known activator of p38¹⁹.

A literature review by Liebermann and Hoffman (2008) has suggested that the Gadd45 family of genes has roles in stress signaling, such as in the case of hypoxia, which leads to impaired cell cycle arrest, DNA damage repair, cell survival or apoptosis. Future work focused on these hypotheses will contribute to the better understanding of the stress responses mediated by the Gadd45 family¹⁹.

Gadd45 β has a critical role in cardiomyocyte loss following ischemic heart lesions and studies performed in animals suggest that this protein is key to this type of lesion. Therefore, strategies based on Gadd45 β inhibition can prove to be beneficial for the treatment of ischemic heart disease².

Due to the fact that this is a study of immunoexpression in humans, in addition to other limitations, the development of more studies focused on this biomarker is suggested, so that the behavior of this protein in the blood can be assessed, as this molecule can be detected by using western blot in human blood. Ultimately, Gadd45 β can become an early marker of cardiomyocyte susceptibility to damage, which can lead to the development of strategies to improve the clinical state of these newborns.

5. Conclusion

From the published literature, Gadd45 β is proposed as a biomarker of hypoxia-induced lesion in cardiomyocytes, both *in vitro*, as well as in animal models. Our study suggests that this protein can be used as an early biomarker of cell damage in the cardiomyocytes of neonates, a process that can ultimately lead to apoptosis.

6. References

1. Rohan AJ, Golombek SG. Hypoxia in the term newborn: part one-cardiopulmonary physiology and assessment. MCN Am J Matern Child Nurs 2009 Mar-Apr;34(2):106-12; quiz 13-4.

2. Kim MY, Seo EJ, Lee DH, Kim EJ, Kim HS, Cho HY, et al. Gadd45 β is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovasc Res* Jul 2010;87(1):119-26.
3. Xue Q, Zhang L. Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 Aug; 330(2):624-32.
4. do Carmo Debur M, Raboni SM, Flizikowski FB, Chong DC, Persicote AP, Nogueira MB, et al. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol* 2010 Oct; 63(10):930-4.
5. Reynolds EOR. Hypoxia in the newborn infant. *J clin Pathol* 1977;30, Suppl. (Roy. Coll. Path.), 11:134-41.
6. Procianoy RS, Siveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77(supl.1):S63 - S70.
7. Cruz ACS, Ceccon MEJ. Prevalência de Asfixia Perinatal e Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica em Recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos. *Rev Bras Crescimento e Desenvolvimento Humano*. 2010; 20(2):302-16.
8. Chiu CZ, Wang BW, Chung TH, Shyu KG. Angiotensin II and the ERK pathway mediate the induction of myocardin by hypoxia in cultured rat neonatal cardiomyocytes. *Clin Sci (Lond)* Oct2010;119(7):273-82.
9. Cretu A, Sha X, Tront J, Hoffman B, Liebermann D. Stress sensor *Gadd45* genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer ther*. 2009;7 (A):268-276.
10. Takekawa M, Kubota Y, Nakamura T, Ichikawa K. Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. *Nagoya J Med Sci*. 2011 Feb; 73(1-2):1-14.
11. Liu J, Wu KC, Lu YF, Ekause E, Klaassen CD. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:305861. (DOI: 10.1155/2013/305861).

12. Michaelis KA, Knox AJ, Xu M, Kiseljak-Vassiliades K, Edwards MG, Geraci M, Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Wierman ME. Identification of growth arrest and DNA-damage inducible gene beta (Gadd45 β) as novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors. *Endocrinology* 2011 Oct; 152(10):3603-13. (DOI: 10.1210/en.2011-0109).
13. Leach PT, Poplawski SG, Kenney JW, Hoffmann B, Liebermann DA, Abel T, Gould TJ. Gadd45 β Knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus - dependent long-term memory. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012 19: 319-324.
14. Sidhu PS, Teske K, Feleke B, Yuan NY, Guthrie ML, Fernstrum GB, Vyas ND, Han L, Preston J, Bogart JW, Silvaggi NR, Cook JM, Singh Rk, Bikle DD, Arnold LA. Anticancer activity of VDR-co regulator inhibitor PS121912. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 oct; 74(4):787-98 (DOI: 10.1007/s00280-014-2549y).
15. Bortoff KD, Keeton AB, Franklin JL, Messina JL. Anti-inflammatory action of insulin via induction of Gadd45 β transcription by the m TOR signaling pathway. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 2010;2 79-85.
16. Souto ACA, Carvalho WB. Avaliação dos valores séricos da troponina I cardíaca em crianças menores de 1 ano de idade. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2008;23(3):378-382
17. Awada H, Al-Tannir m, Ziade MF, Alameh j, El Rajab M. Cardiac Troponin T: A useful Early Marker for cardiac and Respiratory Dysfunction in Neonates. *Neonatology* 2007; 92: 105 -110 (DOI:101159/000100964).
18. Trevisunato D, Picco G, Golin R, Doglioni N, Altinier S, Zaninott M, Zanardo V. *Biol Neonate* 2006; 89:190-193 (DOI: 101159/000089795) .
19. Liebermann DA and Hoffman B. Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling.* 2008,3:15 (DOI:10.1186/1750-2187-3-15).

4. CONCLUSÕES DA PESQUISA

Os biomarcadores pró-apoptótico BAX e Gadd45 β , o anti-apoptótico TRAP1, apresentaram boa imunexpressão tecidual em todas as amostras de miocárdio de recém-nascidos com lesão hipóxica.

Os biomarcadores Mfn2 e Bcl2 apresentaram imunexpressão tecidual muito baixa ou negativa na grande maioria das amostras de miocárdio de recém-nascidos com lesão hipóxica.

A imunexpressão tecidual do Gadd45 β apresentou uma boa correlação com o tempo de sobrevivência, sendo muito mais alta entre a quinta e a sexta hora de vida.

5. REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates [database on the Internet]2006 [cited march 2011].
2. Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR. Manual of Neonatal Care. 6ª edição, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
3. Reynolds EOR. Hypoxia in the newborn infant. J clin Path1977;30, Suppl. (Roy. Coll. Path.), 11:134-41.
4. Xue Q, Zhang L. Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. J Pharmacol Exp Ther 2009 Aug;330 (2):624-32.
5. Rohan AJ, Golombek SG. Hypoxia in the term newborn: part one- cardiopulmonary physiology and assessment. MCN Am J Matern Child Nurs 2009 Mar-Apr;34(2):106-12; quiz 13-4.
6. Procianoy RS, Siveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. J Pediatr (Rio J) 2001;77(supl.1):S63 - S70.
7. Bishop SP. The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. Toxicol Pathol1990;18(4 Pt 1):438-53.
8. Anversa P, Olivetti G, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. Circ Res1980 Apr;46(4):495-502.
9. Cruz ACS, Ceccon MEJ. Prevalência de Asfixia Perinatal e Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica em Recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos. Rev Bras Crescimento e Desenvolvimento Humano. 2010; 20(2):302-16.

10. Adcock LM, Stark AR, Weisman LE, Kim MS. Systemic effects of perinatal asphyxia. Disponível em: <<http://www.uptodate.com>>, acessado em abril de 2012.
11. Chiu CZ, Wang BW, Chung TH, Shyu KG. Angiotensin II and the ERK pathway mediate the induction of myocardin by hypoxia in cultured rat neonatal cardiomyocytes. *Clin Sci (Lond)* Oct2010;119(7):273-82.
12. Kim MY, Seo EJ, Lee DH, Kim EJ, Kim HS, Cho HY, et al. Gadd45 β is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovasc Res* Jul 2010;87(1):119-26.
13. Kim YA, Kim MY, Yu HY, Mishra SK, Lee JH, ChoiKS, Kim JH, Xiang YK, Jung YS. Gadd45 β is transcriptionally activated by p53 via p38 α - mediated phosphorylation during myocardial ischemic injury. *J Mol Med (Berl)* 2013 nov;91(11):103-13.doi10.1007/s00109-013-1070-9.Epub 2013 Aug 16.
- 14 Borutaite V. AMPK, MAPK and BAX in the heart: some questions answered. *Biochem J*2008 Jun 1; 412(2):e15-6.
15. Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, et al. Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem* 2007 Aug 10;282(32):23354-61.
16. Xiang F, Huang YS, Shi XH, Zhang Q. Mitochondrial chaperone tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 protects cardiomyocytes from hypoxic injury by regulating mitochondrial permeability transition pore opening. *FEBS J* 2010 Apr;277(8):1929-38.
17. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR. TRAP1, The mitochondrial Hsp 90. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(3):767-773.

18. Matassa DS, Ambroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F. New insights into TRAP1 pathway. *Am J Cancer Res* 2012; 2(2):235-248.

19. Taldone T, Patel PD, Patel M, Patel HJ, Evans CE, Rodina A, et al. Experimental and structural testing module to analyze paralogue-specificity and affinity in the Hsp90 inhibitors series. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56:6803-6818.

20. Wang Y, Liu X, Zhang D, Chen J, Liu S, Berk M .The effects of apoptosis vulnerability markers on the myocardium in depression after myocardial infarction. *BMC Medicine* 2013;11:32 .doi:10.1186/1741-7015-11:32

21. Weisleder N, Toffet GE, Capetanaki Y. Bcl2 over expression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *PNAS* 2004; 101: 769-74.

6. ANEXOS

Os anexos serão compostos pelos dois outros artigos produzidos nesta mesma linha de pesquisa, além da aprovação da pesquisa pelo comitê de ética do HC-UFPR.

ARTIGO 1

TITULO: CAUSAS EVITÁVEIS DE MORTE E FATORES ASSOCIADOS A SOBREVIDA DOS RECÉM-NASCIDOS.

Francisco Cesar Pabis, Mona Adalgisa Simões, Ana Karyn Ehrenfried de Freitas, Patrícia Watanabe, Lúcia de Noronha.

Titulo do artigo: Causas evitáveis de morte e fatores associados a sobrevida dos recém-nascidos.

Title: Preventable causes of death and Factors associated to the survival of newborns

Titulo do artigo resumido: Fatores associados à sobrevida dos recém-nascidos

Small Title: Factors associated to the survival of newborns

Descritores: recém-nascido; prematuro; causa de morte; necropsia; hipóxia

Keywords: Newborn; preterm; cause of death; autopsy; anoxia.

Gráficos: 3

Tabelas: 2

Autores:

1) Francisco Cesar Pabis

Aluno de Doutorado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

e-mail: franciscocpabis@uol.com.br

CV: [HTTP://lattes.cnpq.br/5571348329716379](http://lattes.cnpq.br/5571348329716379)

Telefone: 47 99783917

2) Mona Adalgisa Simões

Aluna de Doutorado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

e-mail: monasimoes@uol.com.br

CV: [HTTP://lattes.cnpq.br/1992302330156051](http://lattes.cnpq.br/1992302330156051)

Telefone: 47 99744202

3) Ana Karyn Ehrenfried de Freitas

Acadêmica de Medicina da Universidade Federal do Paraná

e-mail: a.ehrenfried@ufpr.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/6874578294381628>

Telefone: 41 99065939

4) Patricia Kiyori Watanabe

Acadêmica de Medicina da Universidade Federal do Paraná

e-mail: patiwatanabi@yahoo.com.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/9224131123268952>

Telefone: 41 9822-5448

5) Lucia de Noronha

Doutorado em Medicina Universidade Federal do Paraná

Professora Adjunta da UFPR e PUCPR

e-mail: lno@terra.com.br

CV: <http://lattes.cnpq.br/9981280495277166>

Telefone: 041 3077 1751

Instituições: Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR

Universidade Federal do Paraná- UFPR

Não existe fonte de financiamento externo.

O resumo desta pesquisa foi apresentado na XV Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná 2013.

Resumo

Objetivo: Observar causas de morte evitável e fatores associados ao maior risco de óbito neonatal precoce.

Métodos: Estudo descritivo e transversal de dados de recém-nascidos, que foram à óbito no período neonatal. Foram selecionados 314 casos de um banco de necropsias pediátricas e analisado: causa de morte evitável, tempo de sobrevida, gênero, peso, idade gestacional, Apgar do 1^o e do 5^o minuto, cianose, acidose, aspiração meconial, necessidade de reanimação com oxigênio, causa da morte e doença básica. Para a comparação a grupos em relação à sobrevida dos recém-nascidos foi considerado o teste t de Student para amostras independentes ou o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA). Para avaliação entre variáveis quantitativas e a sobrevida dos recém-nascidos foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson. Para descrever o tempo de sobrevida foram construídas curvas de Kaplan-Meier. A comparação entre grupos em relação ao tempo de sobrevida foi feita usando-se o teste de Log-rank.

Resultados: Observou-se que quando se utiliza apenas a causa da morte, 300 casos (95,54%) seriam de causa evitável, e quando analisado com a doença básica esta taxa diminuiu para 209 casos (66,56%) . A hipóxia foi a causa mais freqüente de morte (85%) e o Dano alveolar difuso a causa básica (52,9%) Mostrou-se associado ao tempo de sobrevida: cianose ($p=0,02$), idade gestacional ($p= 0,012$), causa do óbito($p< 0,001$), valor de APGAR <6 ($p< 0,001$) e o valor do pH ($p< 0,001$) .

Conclusões: A incidência de causa evitável de morte é provavelmente menor quando analisada concomitantemente com a doença básica. A cianose, idade gestacional, causa do óbito, Apgar abaixo de 6 , e valor do pH do sangue arterial são associados ao tempo de sobrevida de recém-nascidos.

Palavras-chave: recém-nascido; prematuro; causa de morte; necropsia; hipóxia.

INTRODUÇÃO

A redução da taxa de mortalidade infantil é uma meta em todos os países do mundo, inclusive no Brasil¹.

Segundo o Ministério da Saúde, de janeiro a junho de 2012, ocorreram 11089 óbitos no período neonatal, sendo que destes 10889 (98%) foram considerados de causa evitável^a.

A análise das características clínicas, epidemiológicas, demográficas e etiopatogênicas dos óbitos ocorridos no período neonatal e a associação destes achados aos de necropsias poderá trazer informações relevantes no auxílio à prevenção de desfechos fatais.

Este estudo teve por objetivo observar as causas evitáveis de morte, bem como fatores clínicos e laboratoriais em associação ao maior risco de óbito neonatal precoce.

^a Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de Saúde- Painel de Monitoramento de Mortalidade Infantil e Neonatal. acesso 20/12/2012 . <http://www.datasus.gov.br>

METODO

Foi realizado estudo descritivo, transversal, constando de levantamento ativo de prontuários e arquivo do Banco de Necropsias da Unidade de Patologia Perinatal e Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná entre janeiro de 1992 a dezembro de 2007. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição com o parecer nº 2533.140/2011-06.

De 1837 necropsias neonatais, analisou-se 483 (26,3%) necropsias de recém-nascidos que foram a óbito até 28 dias de vida pós-natal (neomortos). Foram incluídos

neste estudo todos os casos com necropsias completas (análise e laudo macro e microscópico) e cujos prontuários apresentavam todos os dados analisados neste estudo. Sendo assim foram selecionados 314 casos e os dados coletados para a análise, além da sobrevivência pós-natal e causa de morte evitável, foram: peso ao nascer, idade gestacional, sexo, índice de Apgar do primeiro e do quinto minuto, acidose, cianose, sinais clínicos de aspiração meconial, necessidade de reanimação com oxigênio, causa da morte e doença básica.

Foram consideradas como causas evitáveis de óbito as causas contidas na Lista de Causas Evitáveis de menores de cinco anos do Ministério da Saúde do Brasil².

Quadro 1 - Lista de Causas Evitáveis de menores de cinco anos do Ministério da Saúde do Brasil²

Lista de causas de mortes evitáveis em menores de cinco anos de idade

1. Causas evitáveis
 - 1.1 Reduzíveis por ações de imunoprevenção
 - 1.2 Reduzíveis por adequada atenção à mulher na gestação e parto e ao recém-nascido
 - 1.2.1 Reduzíveis por adequada atenção à mulher na gestação
 - 1.2.2 Reduzíveis por adequada atenção à mulher no parto
 - 1.2.3 Reduzíveis por adequada atenção ao recém-nascido
 - 1.3 Reduzíveis por ações adequadas de diagnóstico e tratamento
 - 1.4 Reduzíveis por ações adequadas de promoção à saúde, vinculadas a ações adequadas de atenção à saúde
2. Causas mal-definidas
3. Demais causas (não claramente evitáveis)

Os dados sexo, peso ao nascer, idade gestacional, índice de Apgar do primeiro e ou do quinto minuto, presença ou não de cianose, presença ou não de sinais de aspiração meconial, necessidade ou não de reanimação com oxigênio, presença ou não de acidose, causa da morte e valor do pH do sangue arterial foram correlacionadas com o tempo de sobrevivência dos neomortos a fim de analisarmos possíveis fatores de risco.

O tempo de sobrevivência pós-natal do recém-nascido (neomorto) foi determinado pela idade do mesmo no momento do óbito e foi dividido em dois grupos. No primeiro grupo foram incluídos os neomortos que sobreviveram até sete dias e no segundo grupo, aqueles cujo óbito ocorreu com mais de sete até 28 dias pós-natal.

A idade gestacional dos neomortos, determinada pela idade cronológica ou por ultrassonografia, foi dividida em três grupos. Um grupo com idade gestacional entre 24 e 33 semanas, um grupo com idade gestacional superior a 33 semanas até 36 semanas e seis dias e por último um grupo constituído por idade gestacional superior a 37 semanas.

Os dados de acidose foram divididos em dois grupos, se presente ou ausente, sendo que o critério para a presença de acidose foi o pH do sangue arterial igual ou menor a 7,2.

Para a comparação a grupos em relação à sobrevivência dos neomortos foi considerado o teste t de Student para amostras independentes ou o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA). Para avaliação entre variáveis quantitativas e a sobrevivência dos neomortos foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson. Para descrever o tempo de sobrevivência foram construídas curvas de Kaplan-Meier. A comparação entre grupos em relação ao tempo de sobrevivência foi feita usando-se o teste de Log-rank. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

RESULTADOS

Observou-se que 300 casos (95,54%) seriam de causa evitável, utilizando a Lista de Causa de Morte evitável em menores de cinco anos vista no quadro 1² como referência, porém analisando a causa morte e a doença básica, verificada pela necropsia, provavelmente 209 casos (66,56%) seriam de causa evitável. Estes dados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Causa da morte e doença de base

CAUSA DA MORTE	N	DOENÇA BÁSICA	N
HIPOXIA PERINATAL	267	DANO ALVEOLAR DIFUSO	169
		HIPOPLASIA PULMONAR	49
		MALFORMAÇÃO CEREBRAL	12
		MALFORMAÇÕES MULTIPLAS	12
		ERITROBLASTOSE FETAL	10
		MALFORMAÇÃO CARDIACA	4
		GASTROQUISE	4
		KERNICTERUS	2
		SOFRIMENTO FETAL AGUDO	1
		SOFRIMENTO FETAL CRONICO	1
		PLACENTA PREVIA	1
		CIRCULAR DE CORDAO APERTADA	1
		HIDROPSIA FETAL	1
		INFECÇÃO	31
MALFORMAÇÃO CARDIACA	6		
BRONCOASPIRAÇÃO	6		
PERITONITE	5		
MALFORMAÇÃO INTESTINAL	2		
ENTEROCOLITE NECROTIZANTE	2		
SEPSE FUNGICA	1		
GASTROQUISE	1		
ONFALOCELE	1		
ICC	11	MALFORMAÇÃO CARDIACA	11
OUTROS	5	TOCOTRAUMATISMO	1
		MORTE SUBITA DO LACTENTE	1
		CALCIFICAÇÃO IDIOPÁTICA ARTERIAL INFANTIL	1
		LACERAÇÃO EM BRONQUIO FONTE DIREITO	1
		CEFALOTORACOPAGOS	1
CAUSA EVITAVEL	300 (95,54%)		209 (66,56%)

Quanto a sobrevivência, peso ao nascer, idade gestacional, sexo, Apgar do 1^o e do 5^o minuto, presença ou ausência de acidose e cianose, sinais de aspiração meconial e necessidade de reanimação com oxigênio obtiveram-se os resultados demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 Características epidemiológicas, clínica e laboratorial.

VARIAVEL	MEDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
SOBREVIDA	4 DIAS	1 DIA	5 DIAS
PESO	1680 GRAMAS	1490 GRAMAS	919 GRAMAS
IDADE GESTACIONAL	32 SEMANAS	33 SEMANAS	4,5 SEMANAS
		n	%
SEXO	MASCULINO	171	54,45
	FEMININO	142	45,22
APGAR 1 MINUTO < 6	<6	211	73,8
	>6	75	26,2
APGAR 5 MINUTO < 6	< 6	146	51
	>6	140	49
pH	<7,1	177	71,7
	>7,1	70	28,3
CIANOSE	PRESENTE	276	92
	AUSENTE	24	8
SINAIS DE ASPIRAÇÃO MECONIAL	PRESENTE	42	14,6
	AUSENTE	246	85,4
REANIMAÇÃO COM OXIGENIO	NECESSARIO	263	87,4
	NÃO NECESSARIO	38	12,6

Não houve diferença estatisticamente significativa quando a sobrevivência dos neomortos foi comparada aos seguintes parâmetros: sexo ($p=0,488$), peso ao nascimento ($p=0,79$), presença ou não de sinais clínicos de aspiração meconial ($p=0,629$), necessidade ou não de reanimação com oxigênio ($p=0,191$) e presença ou não de acidose ($p=0,221$).

O grupo gestacional com idade superior a 37 semanas apresentou maior sobrevida (acima de sete dias de vida pós-natal) e o grupo entre 24 e 33 semanas apresentou menor sobrevida (ou até sete dias de vida pós-natal) ($p= 0,012$).

O valor do índice de Apgar < 6 no primeiro minuto e ou no quinto minuto foi outro fator significativo no tempo de vida do recém-nascido ($p < 0,001$). Gráfico 1, 2 e 3.

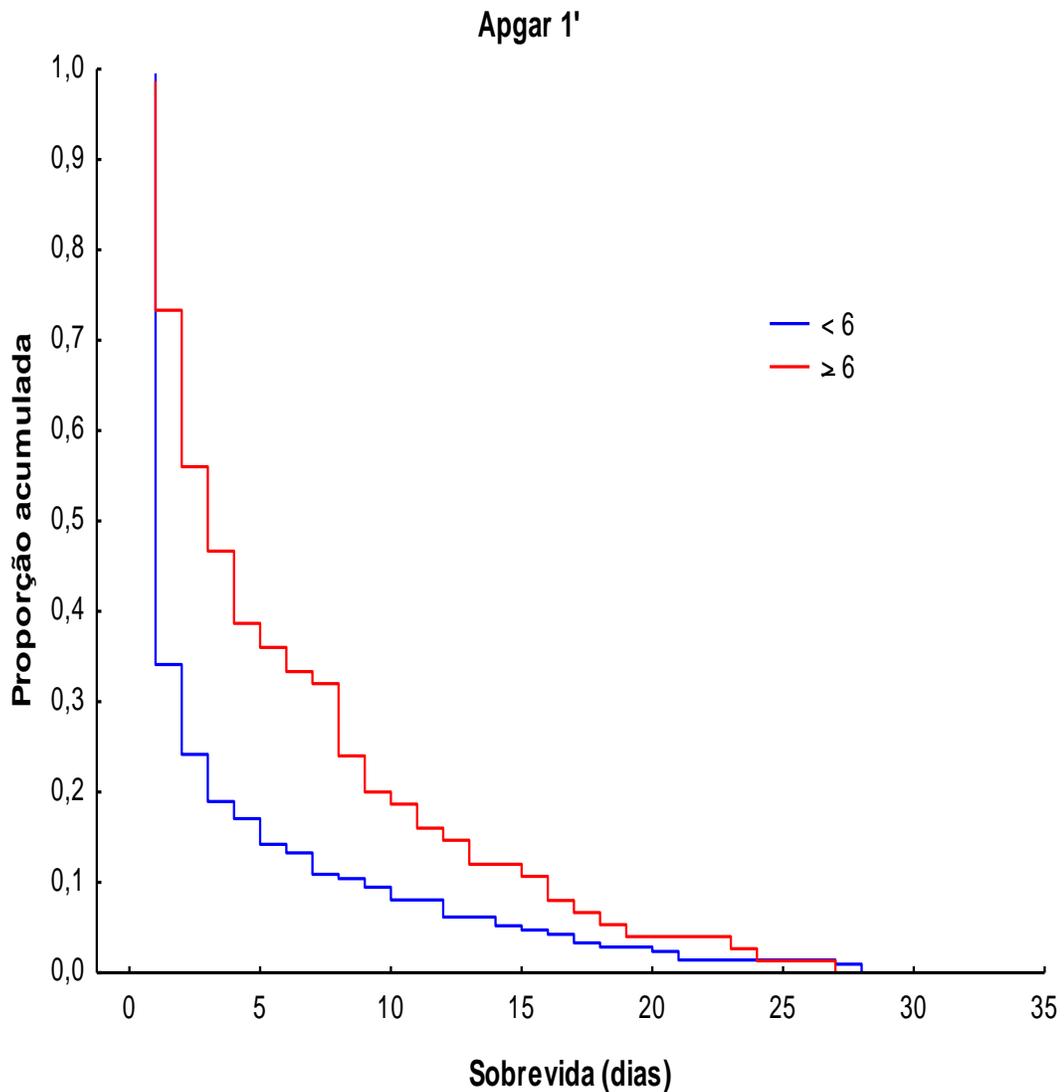


Gráfico 1 - Relação entre o Apgar do 1^o minuto < 6 e a sobrevida do recém-nascido.

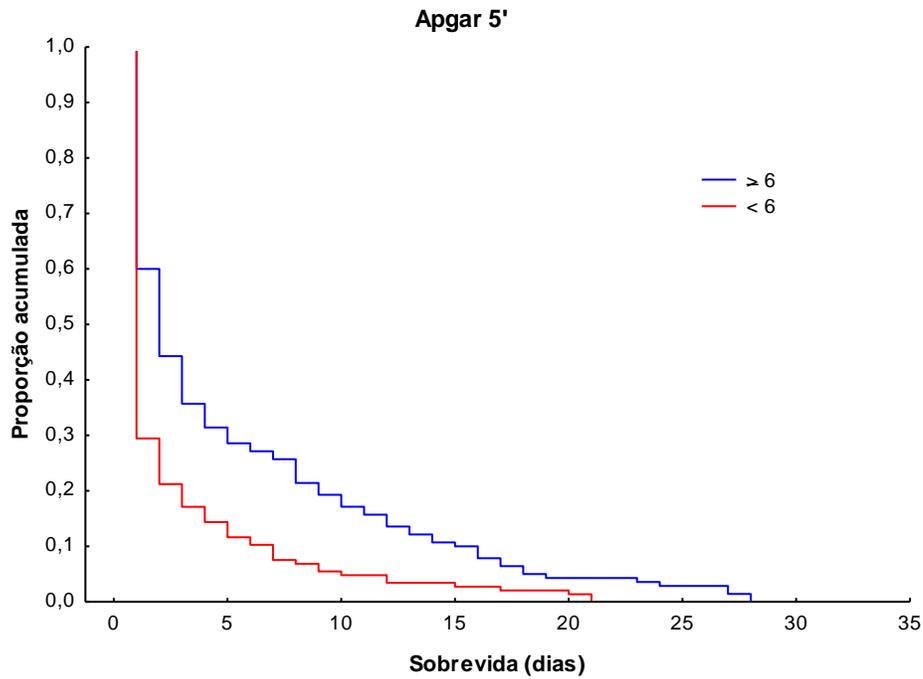


Gráfico 2- Relação entre o Apgar do 5^o minuto < 6 e a sobrevida do recém-nascido.

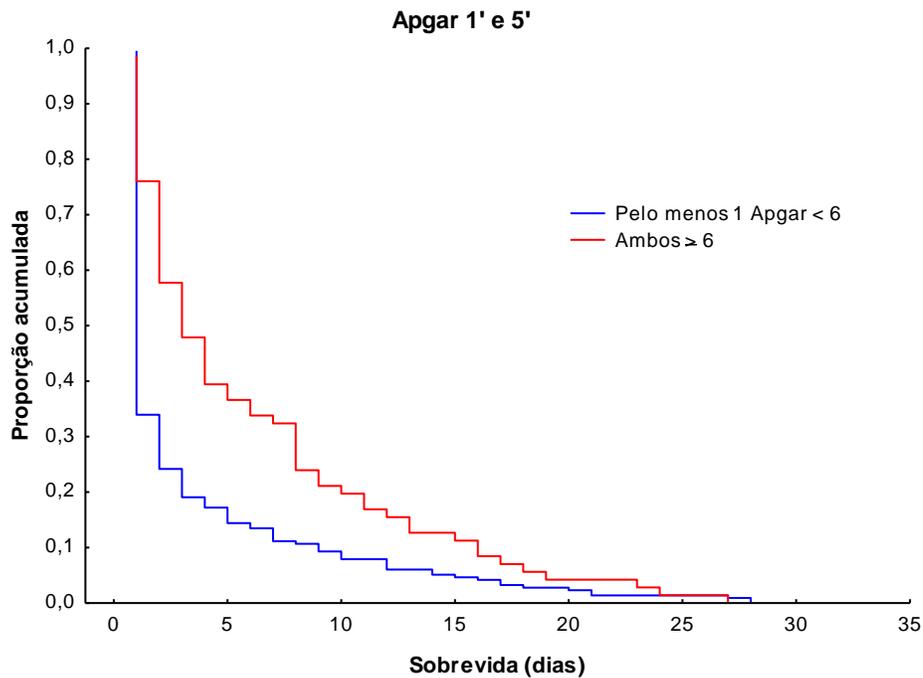


Gráfico 3 - Relação entre o Apgar do 1^o e ou do 5^o minuto < 6 e a sobrevida do recém-nascido

A presença de cianose foi estatisticamente maior no grupo de menor sobrevida, ou seja, aqueles que apresentaram menos de sete dias de vida pós-natal ($p=0,02$).

A hipóxia perinatal foi a principal causa de óbito neste estudo e se correlacionou com a sobrevida mais baixa dos neomortos ($p<0,001$).

Quando analisado a presença ou não de acidose não se encontrou relação estatística significativa, porém a análise dos valores lineares de pH para um coeficiente de Pearson estimado de 0,28 se correlacionaram com menores tempos de sobrevida ($p<0,001$).

DISCUSSÃO

A importância do exame anatomopatológico pós-morte já é bem conhecido e estudos de necropsia são importantes na identificação dos fatores causadores da morte e servem como controle da qualidade da avaliação diagnóstica e do tratamento realizado³.

Nesta pesquisa encontramos, quando considerada apenas a causa da morte, 95,54% de mortes de causa evitável, porém se considerarmos a causa da morte e a doença básica encontrada na necropsia, 66,56% poderiam ser consideradas de causa evitável.

Para interferir no processo de morte faz-se necessário conhecer os fatores que levam ao óbito neonatal e dessa forma identificar as mortes evitáveis⁴. Segundo Malta et al (2007) as causas de morte evitáveis são preveníveis parcial ou totalmente pelos serviços de saúde e dependem da tecnologia disponível naquele momento².

A realidade brasileira demonstra que a mortalidade neonatal é considerada relevante sendo que estudos sobre evitabilidade podem se tornar importantes ferramentas para melhorar a assistência e conseqüentemente redução destas mortes².

Nos nossos resultados houve predomínio dos prematuros nos achados de necropsia, representando 77,5% da amostra. A prematuridade vem sendo apontada como a principal contribuinte da mortalidade neonatal⁵.

Todo neonato é classificado ao nascer segundo sua idade gestacional, sendo que os prematuros são aqueles que completaram menos de 37 semanas intra-útero, ou menos de 259 dias contados a partir da data da última menstruação⁶.

Aproximadamente 12% de todos os nascimentos nos Estados Unidos são prematuros, e aproximadamente 2% com menos de 32 semanas de gestação⁶. Sendo a prematuridade uma das principais causas de internação, morbidade e mortalidade de recém-natos^b.

As complicações observadas em pré-termos refletem tanto a imaturidade de seus órgão e sistemas, quanto às intensivas intervenções necessárias à sua sobrevivência⁷.

Dentre elas podemos citar problemas neurológicos, cardiovasculares, hematológicos, nutricionais, metabólicos, gastrointestinais, renais, imunológicos, oftalmológicos, de regulação da temperatura e respiratórios, sendo esses últimos às causas mais comuns de hipóxia e morte em recém-nascidos^{6,8}.

Apresenta-se como resultado neste estudo, semelhante à literatura, o predomínio do dano alveolar difuso como causa básica e a hipóxia como causa de morte. Estes resultados demonstram a importância da prematuridade no desenvolvimento de lesões pulmonares, que podem ser responsáveis pela hipóxia logo ao nascimento ou à mais longo prazo.

Clinicamente, além da cianose, os critérios utilizados para se determinar hipóxia são valor de Apgar igual ou menor que 5, necessidade de ressuscitação contínua, acidose severa (pH menor que 7 ou déficit de base de 16mmol/L ou mais) e evidências de encefalopatia hipóxico-isquêmica na avaliação neurológica (letargia, torpor, coma, hipotonia ou reflexos anormais)⁹.

Em termos de achados anatomopatológicos, os principais achados microscópicos de hipóxia são congestão, edema e hemorragias petequiais em órgãos internos, sendo que os mais comuns são edema cerebral, equimoses ou hemorragias nos pulmões, coração e timo¹⁰.

De todos os estresses a que o bebê está sujeito, provavelmente o mais importante e clinicamente relevante é a hipóxia¹¹. Esta pode ser definida como sendo uma inadequada oxigenação a nível celular, na maioria das vezes representada pela presença de cianose¹².

As causas de hipóxia perinatal de maior importância são aquelas relacionadas às falhas na adaptação natural do sistema cardiovascular e respiratório. Sendo as mais comuns: a apnéia ao nascimento, taquipnéia transitória do recém-nascido e doença da membrana hialina (ou síndrome do distress respiratório) entre outras. Quaisquer dessas situações podem gerar quadro hipoxêmico que pode acarretar consequências graves ao bebê, com sério risco de vida⁸.

As seqüelas de um evento hipoxêmico dependem da gravidade do mesmo e de sua duração. Em alguns casos, o cérebro pode ser o único órgão acometido. Em uma série com 57 crianças, a encefalopatia hipóxico-isquêmica isolada ocorreu em 14 (24,5%)⁶.

Em outro estudo retrospectivo com 130 neonatos com hipóxia, os outros sistemas que apresentaram disfunção foram: renal (70%), cardiovascular (62%), pulmonar (86%) e hepático (85%)⁶.

Quantificar a hipóxia em prematuros é uma tarefa difícil, pois uma das medidas mais usadas é o índice Apgar, que pode estar baixo, sem que o recém-nascido prematuro apresente acidemia fetal¹³. Observou-se que em maior parte da nossa amostra o índice de Apgar estava abaixo de 6 tanto no primeiro minuto como no quinto minuto.

A definição de hipóxia ou asfixia é confusa, por isto, a Academia Americana de Pediatria determinou que o termo asfixia deve ser utilizado quando ocorre Acidemia metabólica ou mista profunda ($\text{pH} < 7$) em sangue arterial do cordão umbilical, score de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos, manifestações neurológicas neonatais (convulsões, coma ou hipotonia), disfunção orgânica multissistêmica (ex: sistema cardiovascular)¹⁴.

Outro conceito utilizado é o de Buonocuore et al 2002, que utiliza os seguintes parâmetros: pH do cordão $< 7,2$, Apgar do 5º minuto de vida entre 4 e 6 e $\text{FiO}_2 \geq 0,40$ para saturar 86%. Não há consenso no uso destes critérios nos Serviços de Neonatologia¹⁴.

A importância da monitorização precoce, de medidas que minimizem a hipóxia e a eleição de critérios clínicos e laboratoriais que norteiem estes cuidados são de suma importância para a sobrevivência destes pacientes.

Na nossa amostra observou-se que fatores como gênero, necessidade de reanimação e presença de mecônio e acidose não se associou ao tempo de sobrevivência dos neonatos.

E fatores como presença de cianose, idade gestacional, causa do óbito, Apgar abaixo de seis (no primeiro e ou no quinto minuto) e valores lineares do pH mostram-se correlacionados ao óbito na primeira semana de vida.

A Rede Brasileira de Pesquisa Neonatal demonstrou que fatores como idade gestacional, Apgar de 0 a 6 no quinto minuto e presença de desconforto respiratório estão associados ao óbito neonatal precoce. Refere também que a maturidade fetal tem sido a variável preditiva dominante¹⁵.

Geib et al (2010) apontou como determinantes de mortalidade neonatal o sexo masculino, a prematuridade, o baixo peso ao nascer e o índice de Apgar inferior a sete no primeiro e quinto minuto de vida¹⁶.

Em outro estudo realizado com 13399 recém-nascidos o valor do índice de Apgar no quinto minuto entre quatro e seis demonstrou que o risco de morte neonatal é 13 vezes maior e o índice de Apgar do primeiro minuto não foi considerado útil para calcular risco de morte¹⁷.

Com relação ao valor numérico do pH sanguíneo na nossa amostra, observou-se que o valor de pH tem uma fraca correlação com o tempo de sobrevivência dos neonatos. Pesquisa realizada sobre parâmetros laboratoriais demonstrou que o pH foi um fraco preditor de morte em recém-nascidos de muito baixo peso¹⁸.

O pH tem sido amplamente utilizado como complemento do índice de Apgar com vistas a melhorar a identificação da saúde fetal e como critério para a diferenciar hipóxia de asfixia¹⁹. Encontrar respostas para a morte precoce e fatores que possam ser observados no intuito de preservar a vida é de suma importância.

^b Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates [database on the Internet]2006 [cited march 2011].

CONCLUSÕES

A incidência de causa evitável de morte é provavelmente menor quando analisada concomitantemente com a doença básica. A cianose, idade gestacional, causa do óbito, Apgar abaixo de 6 , e valor do pH do sangue arterial são associados ao tempo de sobrevivência de recém-nascidos.

REFERÊNCIAS

1. Silveira M F, Santos I S, Barros A J D et al. Increase in preterm birth in Brazil: review of population-based studies. *Rev Saúde Pública*. 2008; 42(5):274-282.
2. Malta DC et al . Lista de causas de mortes evitáveis por intervenções do Sistema Único de Saúde do Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*.2007;16(4):233-244.
3. Laurenti R et al. Estatísticas de Saúde. São Paulo, DU/EDUSP,1985.
4. Noronha L et al. Mortalidade intra-uterina e perinatal: análise comparativa de 3904 necropsias do Hospital de Clínicas de Curitiba no período de 1960 a 1995. *J pediatr (Rio J)* 2000; 76(3):213-221.
5. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet* 2005; 365:891.
6. Cloherty J P, Eichenwald E C, Stark A R. Manual of Neonatal Care. 6ª edição, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
7. Mccomick M C, Litt J S, Smith V C, Zupancic J A F. Prematurity: an Overview and Public Health Implications. *Annu. Rev. Public Health*. 2011;32:367–79.
8. Reynolds EOR. Hypoxia in the newborn infant. *J clin Path* 1977; 30, Suppl. (Roy Coll Path), 11:134-41.
9. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663

10. Wigglesworth S, Singer D B. Textbook of fetal and perinatal pathology. Massachusetts: Blackwell Science, 2ª Edição, 1998.
11. Zhang L, Xue Q. Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C ϵ . *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 330(2):624-32.
12. Rohan A J, Golombek S G. Hypoxia in the term newborn – part one: cardiopulmonary physiology and assessment. *The American Journal of Maternal/Child Nursing*. 2009; 34(3):144-52.
13. Procianoy RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77(supl.1):S63 - S70.
14. Cruz ACS, Ceccon MEJ. Prevalência de Asfixia Perinatal e Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica em Recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos. *Rev Bras Crescimento e Desenvolvimento Humano* 2010; 20(2):302-316.
15. Almeida MF et al . Fatores perinatais associados ao óbito precoce em prematuros nascidos nos centros da Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84(4):300-307
16. Geib LTC, Freu CM, Brandão M, Nunes ML. Determinantes sociais e biológicos da mortalidade infantil em coorte de base populacional em Passo Fundo, Rio Grande do Sul. *Ciência & Saúde Coletiva* 2010;15(2):363-370.
17. Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. The continuing value of the Apgar Score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med* 2001; 344:467-471.
18. Huseman D, Metzger B, Walch E, Bührer C. Laboratory markers of perinatal acidosis are poor predictors of neurodevelopmental impairment in very low birth weight infants. *Early Human development* 2011; 87(10):677-681.
19. Zorzy PM et al. Fatores perinatais associados a recém-nascidos à termo com pH < 7,1 na artéria umbilical e índice de Apgar < 7 no 5^o minuto. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012; 34(8):381-5.

Prezado(a) Senhor(a) Mona Adalgisa Simões,

Acusamos o recebimento do artigo Causas evitáveis de morte e fatores associados a sobrevida dos recém-nascidos., enviado para análise na Revista de Saúde Pública, com vista a possível publicação. O artigo está registrado sob o protocolo nº 5070. Para acompanhar o processo de avaliação, acesse o endereço www.rsp.fsp.usp.br

Atenciosamente,

Secretaria RSP

ARTIGO 2

IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE BIOMARCADORES DE CRESCIMENTO, PRÓ E ANTI-APOPTÓTICOS EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO DE RECEM-NASCIDOS COM LESÃO HIPÓXICA.

Mona Adalgisa Simões, Francisco Cesar Pabis, Renata Rolim Sakiyama, Fernando Yuchiteru Rolim Sakiyama, Seigo Nagashima, Lucia de Noronha.

Autores:

1) Mona Adalgisa Simões

Aluna de Doutorado em Ciências da Saúde
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
e-mail: monasimoes@uol.com.br
CV: <http://lattes.cnpq.br/1992302330156051>
Telefone: 47 99744202

2) Francisco Cesar Pabis

Aluno de Doutorado em Ciências da Saúde
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
e-mail: franciscopabis@uol.com.br
CV: <http://lattes.cnpq.br/5571348329716379>

3) Renata Rolim Sakiyama

Acadêmica de Medicina da Universidade Federal do Paraná
e-mail: re_sakiyama@hotmail.com
CV: <http://lattes.cnpq.br/3520994111776438>.

4) Fernando Yuchiteru Rolim Sakiyama

Acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Paraná
e-mail: yorasaki@gmail.com
CV: <http://lattes.cnpq.br/2951212690741319>

5) Seigo Nagashima

Biólogo da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
e-mail: seigo_nagashima@hotmail.com
CV: <http://lattes.cnpq.br/1058586792143216>

6) Lucia de Noronha

Doutorado em Medicina Universidade Federal do Paraná
Professora Titular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
e-mail: lno@terra.com.br
CV: <http://lattes.cnpq.br/9981280495277166>

Instituições: Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR
Universidade Federal do Paraná- UFPR

Não existe fonte de financiamento externo.

Resumo:

Fundamento: Apesar da importância que as doenças cardiovasculares representam para a saúde da população, existe pouco conhecimento de como a hipóxia neonatal, relacionada ou não a prematuridade, pode causar lesão celular dos cardiomiócitos no período perinatal e quais seriam as conseqüências para a vida adulta.

Objetivo: Analisar a imunexpressão tecidual de biomarcadores envolvidos no processo de morte e crescimento celular (pró-apoptóticos, anti-apoptóticos e de crescimento celular), em miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados.

Método: Foram utilizadas amostras de miocárdio humano (ventrículo esquerdo) provenientes de necropsias de neonatos hipoxemiados (Apgar do quinto minuto < 6 e/ou pH < 7,2 e/ou exame anatomopatológico com sinais de hipóxia perinatal), que foram organizadas em blocos multiamostrais e submetidas a reações imunoistoquímicas pela técnica de imunoperoxidase. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-BAX, anti-Mfn2, anti-TRAP1, anti Bcl2, anti-angiotensina II, anti-Akt1, anti-Akt2 e anti-Akt3. Os dados de imunexpressão tecidual foram correlacionados com os dados clínicos (gênero, peso, idade gestacional, índice de Apgar do primeiro e quinto minuto, pH do sangue arterial e sobrevivência) e anatomopatológicos (causa da morte e doença de base) dos casos .

Resultados: A média de imunexpressão tecidual do BAX foi 25,61%, do TRAP1 foi 7,86%, da angiotensina II foi 1,24%, do Akt2 foi 16,35% e do Akt3 foi 20,61%. Os biomarcadores Akt1, Mfn2 e Bcl2 apresentaram imunexpressão tecidual muito baixa ou ausente na maioria dos casos deste estudo. Não houve correlação da média de imunexpressão tecidual dos biomarcadores com o tempo de sobrevivência ou outro fator clínico ou anatomopatológico estudado.

Conclusão: Estes dados parecem fortalecer a ação coordenada de biomarcadores pró e anti-apoptóticos e de crescimento celular em miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados a fim de determinar o grau de lesão ou morte celular e a capacidade de recuperação tecidual.

Palavras- chave: Recém-nascido. Imunoistoquímica. Hipertrofia. Apoptose. Proliferação celular.

1. INTRODUÇÃO

O aumento de riscos de morbimortalidade aos recém-nascidos está associado às condições maternas, fetais e neonatais sendo que uma das mais importantes é a prematuridade¹.

A prematuridade pode acarretar inúmeros problemas ao recém-nascido, devido à dificuldade de adaptação extra-uterina dos mesmos, causada pela imaturidade de seus órgãos e sistemas. Como, por exemplo, problemas respiratórios e cardiovasculares relevantes no processo de hipóxia e morte^{1,2}.

Embora seja de conhecimento geral a importância que as doenças cardiovasculares representam para a saúde da população e para sua expectativa de vida, existe pouco conhecimento de como as condições adversas experimentadas pelo recém-nascido, tais como a hipóxia perinatal, poderiam causar lesão celular dos cardiomiócitos e como isto poderia interferir em sua vida adulta^{3,4}.

Visando entender os fenômenos relacionados com a hipóxia perinatal e morte de cardiomiócitos, a proposta deste estudo é avaliar, em amostras de miocárdio de recém-nascidos, a imunexpressão tecidual de alguns biomarcadores de crescimento e morte celular e correlacioná-la com variáveis clínicas e anatomopatológicas (causa da morte e doença de base).

2. MÉTODO

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas amostras de necropsias de miocárdio humano (ventrículo esquerdo), retiradas do Setor de Necropsias Pediátricas do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), entre os anos de 1991 e 2007. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sob o número 2533.140/2011-06.

Foram incluídas necropsias de neonatos (0 a 28 dias de vida) viáveis (24 semanas ou mais de idade gestacional) com hipóxia perinatal, prematuros ou não, de ambos os sexos. Os critérios clínicos e anatomopatológicos de hipóxia perinatal foram assim definidos: a - Apgar do quinto minuto <6 e/ou b - pH<7,2 e/ou c - exame de necropsia com sinais de hipóxia perinatal tais como petéquias em serosas e mucosas, congestão polivisceral sistêmica, dano alveolar difuso e hemorragias da matriz germinativa. Foram excluídos os recém-nascidos que tiveram amostras inadequadas ou prontuários considerados incompletos.

As variáveis clínicas coletadas no prontuário foram gênero, peso (em gramas), idade gestacional (em semanas), índice de Apgar do primeiro e quinto minuto, pH do sangue arterial, sobrevivida (em horas ou dias de vida). As variáveis anatomopatológicas coletadas no laudo de necropsias foram a causa da morte e a doença de base.

Os blocos parafinados contendo 154 amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo foram utilizados para a confecção de 13 *Tissue Microarrays* (TMA) com cerca de 12 casos cada um. Cada caso foi representado por duas amostras, sendo que cada amostra media 3mm em diâmetro. Sendo a área total analisada de 14mm² ($A = \pi.r^2 \times 2$ amostras).

Os blocos em TMA foram cortados em lâminas multiamostrais para realização de técnicas de imunohistoquímica.

Foram selecionados os seguintes biomarcadores BAX (*Bcl2-associated X protein*), Mfn2 (*Mitofusin-2*) que são proteínas pró-apoptóticas, TRAP1 (*Tumor necrosis factor receptor associated protein 1*) e Bcl2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) que são proteínas anti-apoptóticas e angiotensina II e Akt (*serina treonina*) 1, 2 e 3 que estão envolvidas com o crescimento celular.

A técnica utilizada para as reações de imunohistoquímica foi a de imunoperoxidase que foi a descrita por Debur e colaboradores⁵. Os controles positivos e negativos foram corados junto com todas as reações deste estudo.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-BAX da DAKO®, policlonal de coelho (Glostrup, Denmark), na diluição 1:50, anti- Mfn2 da ABCAM®, monoclonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1:100, anti-TRAP1 da ABCAM®, monoclonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1:400, anti-Bcl2 da DAKO®, monoclonal de camundongo (Glostrup, Denmark), na diluição 1:200, anti-angiotensina II da ABCAM®, policlonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1:400, anti-Akt1 da ABCAM®, policlonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1:200, anti-Akt2 da ABCAM®, policlonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1:200, anti-Akt3 da ABCAM®, policlonal de coelho (Cambridge, USA), na diluição de 1 :400.

Controles positivos (amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de adultos) e negativos (por omissão de anticorpo primário) foram imunocorados para cada reação.

As lâminas foram lidas utilizando se microscópio óptico Olympus® BX50 (Tóquio, Japão), acoplado a camera de vídeo Dinoeye e a computador com software de análise de imagem Image Pro Plus^(TM) (Maryland, USA). Foram capturadas oito imagens em campo de grande aumento (CGA = 400 vezes) para cada caso do estudo em cada um dos biomarcadores estudados. A área de cada uma destas imagens é de 115.226,1µm² com resolução de 1024x 768 pixels.

O controle positivo de cada reação foi digitalizado e uma imagem em CGA foi escolhida como “máscara”, contendo a positividade adequada para cada biomarcador escolhido.

A máscara foi então sobreposta as imagens digitais de todos os casos. Baseado na imunopositividade ideal da máscara, o software de análise Image Pro Plus^(TM) encontra as áreas imunopositivas nas amostras do estudo e transforma este dado em área imunopositiva por micrômetro quadrado (μm^2). A área em μm^2 gerada por este método foi então dividida pela constante 115.226,1 μm^2 que é a área total do campo avaliado, gerando uma porcentagem de área imunopositiva por CGA. Uma porcentagem média de área em 8 CGA foi calculada para cada caso.

A análise estatística foi realizada por meio de avaliação da associação entre duas variáveis qualitativas sendo considerado o teste exato de Fisher ou o teste de Qui-quadrado. A comparação entre dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

3. RESULTADOS

Com relação ao gênero, houve um discreto predomínio do gênero masculino com 87 casos (56,5%); os prematuros apresentaram maior frequência, com 78,6% dos casos (121 casos).

Os sinais de hipóxia perinatal no exame anatomopatológico foram relatados como a causa de morte em 86,4% ($n = 133$) dos casos, sendo que os demais casos ($n = 21$ ou 13,6% da amostra) apresentavam critérios clínicos de hipóxia perinatal. A doença da membrana hialina foi a doença de base mais comum neste estudo com 47,1% ($n = 72$) da amostra.

Os parâmetros clínicos como peso, idade gestacional (IG), Apgar do primeiro e quinto minuto, pH do sangue arterial e sobrevida bem como a porcentagem média de imunoexpressão do BAX, TRAP1, angiotensina II, Akt2 e Akt3 por CGA estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros clínicos e anatomopatológicos da amostra, além da imunoposição tecidual dos biomarcadores escolhidos em porcentagem de área imunopositiva por CGA.

Variável	N	Mediana	Média	Desvio padrão
Peso (gramas)	139	1480,0	1647	911,7
Idade gestacional (semanas)	154	33,0	32,5	4,6
Apgar 1	144	2,5	3,5	2,9
Apgar 5	144	5,0	5,3	3,1
pH	93	7,1	7,0	0,2
Sobrevida (dias)	154	1,0	4,2	6,0
BAX	149	24,57%	25,61%	8,53%
TRAP1	141	3,54%	7,86%	8,33%
Angiotensina II	151	0,89%	1,24%	1,21%
Akt2	147	16,12%	16,35%	10,57%
Akt3	151	19,94%	20,61%	7,58%

Legenda: Os valores de imunopositividade para Bcl2, Mfn2 e Akt1 não foram relatados aqui porque sua imunoposição tecidual foi muito baixa ou ausente na maioria dos casos.

O Bcl2 apresentou imunopositividade tecidual em apenas um caso, o Mfn2 apresentou fraca imunopositividade em apenas 24 casos e o Akt1 não apresentou imunoposição tecidual em nenhum dos casos deste estudo .

A associação entre o tempo de sobrevivida e os biomarcadores não foi significativa. (vide tabela 2)

Tabela 2 – Relação entre o tempo de sobrevivida (dias ou horas) e imunoposição tecidual dos biomarcadores do estudo em porcentagem de área imunopositiva por CGA.

Marcador	Sobrevida	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p^*
BAX	≤ 24 horas	87	24,76%	22,04%	8,70%	0,263
	> 1 e ≤ 7 dias	32	25,96%	25,74%	7,39%	
	> 7 dias	30	27,68%	26,51%	9,05%	
TRAP1	≤ 24 horas	85	7,64%	2,90%	8,07%	0,584
	> 1 e ≤ 7 dias	30	7,23%	0,83%	8,57%	
	> 7 dias	26	9,30%	8,59%	9,05%	
Angiotensina	≤ 24 horas	88	1,08%	0,97%	0,83%	0,152
	> 1 e ≤ 7 dias	33	1,49%	1,00%	1,57%	
	> 7 dias	30	1,43%	0,76%	1,62%	
Akt2	≤ 24 horas	85	15,30%	15,48%	10,14%	0,222
	> 1 e ≤ 7 dias	33	16,32%	13,61%	11,49%	
	> 7 dias	29	19,30%	18,42%	10,56%	
Akt3	≤ 24 horas	88	20,59%	20,08%	10,56%	0,940
	> 1 e ≤ 7 dias	33	20,95%	21,59%	8,72%	
	> 7 dias	30	20,27%	18,91%	8,42%	

Legenda:*ANOVA com um fator, $p < 0,05$ ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. Os valores das áreas imunoposição dos biomarcadores Bcl2, Mfn2 e Akt1 não foram relatados aqui porque sua imunopositividade foi muito baixa ou ausente na maioria dos casos do estudo.

Quando correlacionados a mediana de imunoposição tecidual do BAX, angiotensina II, Akt2, Akt3 e TRAP1 com peso, idade gestacional, Apgar de 1 minuto e Apgar de 5 minutos, pH e causa da morte não foram encontrados valores estatísticos significativos.

Não foram encontradas correlações estatísticas significativas quando os biomarcadores foram comparados dois a dois.

Os aspectos imunoistoquímicos encontrados neste estudo estão representados na figura 1. Os anticorpos anti-Akt1, anti-Bcl2 e anti-Mfn apresentaram reação positiva muito fraca ou até negativa na maioria dos casos deste estudo. Apenas 24 casos foram fracamente positivos para o Mfn2, sendo os demais casos totalmente negativos. Com relação ao Bcl2, apenas um caso foi fracamente positivo, sendo os demais totalmente negativos. O anticorpo anti-Akt1 foi totalmente negativo em todos os casos. Os anticorpos anti-Akt2 e anti-Akt3 apresentaram imunopositividade citoplasmática e nuclear moderada na grande maioria dos cardiomiócitos de todas as amostras deste estudo. Os anticorpos anti-angiotensina II e anti-TRAP apresentaram imunopositividade leve no citoplasma da grande maioria dos cardiomiócitos de todos os casos do estudo. O anticorpo anti-BAX apresentou imunopositividade citoplasmática moderada na grande maioria dos cardiomiócitos deste estudo.

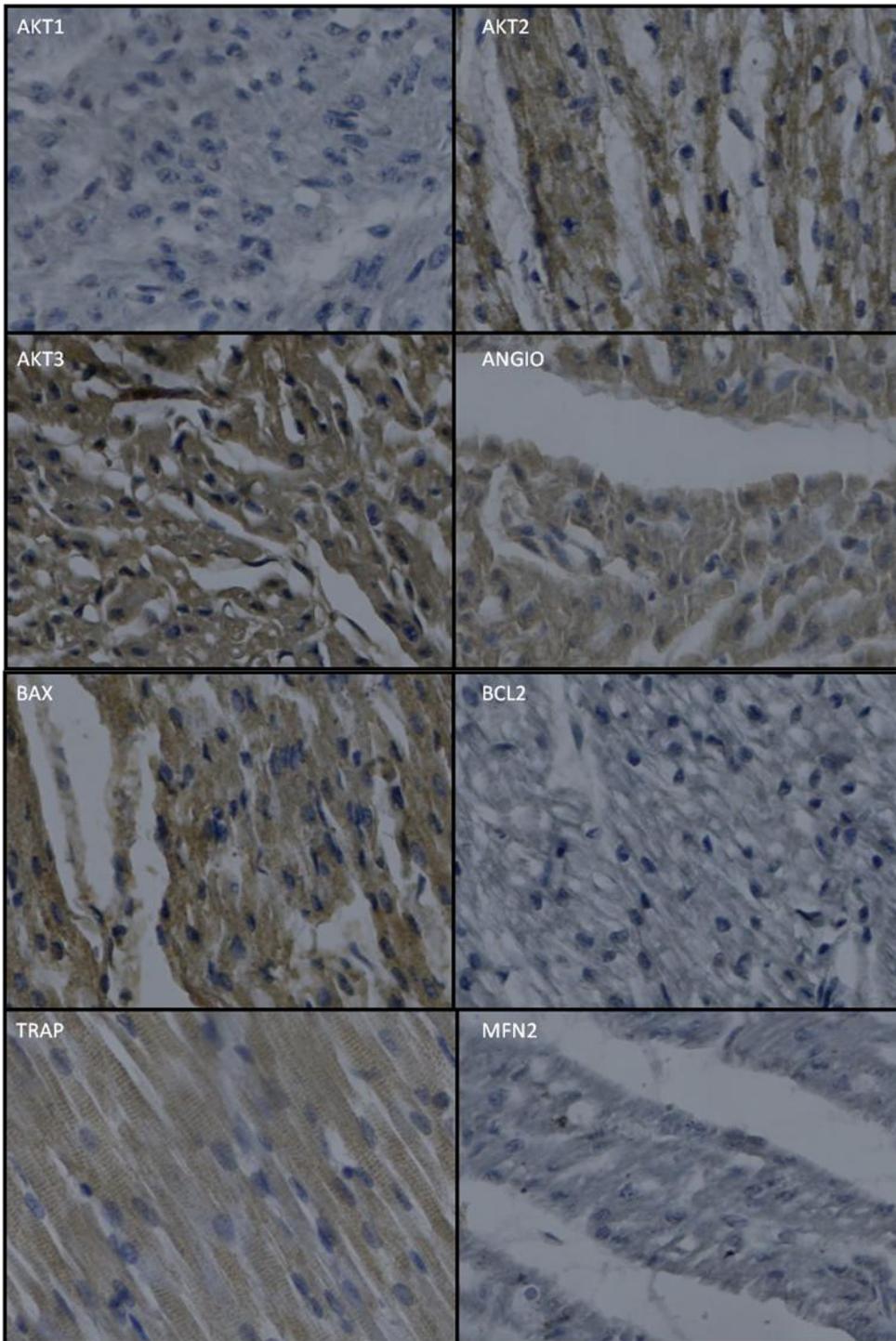


Figura 1- Demonstra cortes histológicos imunocorados com os anticorpos anti-BAX, Bcl2, TRAP1 ,Mfn2, Akt1, Akt2, Akt3 e angiotensina II.

4. DISCUSSÃO

Ao nascimento, os pulmões do recém-nascido substituem a placenta como órgão de troca gasosa e a atividade do centro respiratório se torna finamente ajustada às necessidades metabólicas do organismo. Algumas desordens respiratórias surgem devido à falha na adaptação normal cardiopulmonar ao novo ambiente¹.

Muitas circunstâncias estão envolvidas no surgimento da hipóxia tais como a apnéia ao nascimento, a taquipnéia transitória do recém-nascido, a doença da membrana hialina e a persistência da circulação fetal, além de outras doenças congênitas ou adquiridas. Qualquer uma dessas situações pode gerar um quadro hipoxêmico que pode acarretar conseqüências graves ao recém-nascido, com sério risco de vida^{1,6}. Na nossa amostra, as evidências anatomopatológicas de hipóxia perinatal foram a principal causa de morte, sendo que a principal doença básica como causa de hipóxia perinatal foi o dano alveolar difuso relacionado à prematuridade.

Xue et al (2009) demonstrou a associação entre os eventos adversos no período perinatal e o aumento do risco de doença isquêmica na vida adulta. Outro estudo mostrou que o coração responde a diferentes sinais de estresse, incluindo a hipóxia, o que provoca uma variedade de respostas funcionais nos cardiomiócitos, como morte por apoptose e crescimento celular^{2,7}.

A morte celular, também denominada como apoptose, é um importante mecanismo no desenvolvimento de órgãos e na homeostase e remodelamento dos tecidos. Ela pode ocorrer a partir de uma série de estímulos e um dos mais importantes é o estresse oxidativo, intimamente ligado a episódios de hipóxia⁴.

Um biomarcador de apoptose amplamente estudado é a proteína BAX que é um membro pró-apoptótico da família Bcl2. Em células saudáveis ela reside no citosol na forma monomérica. Entretanto, após a indução da apoptose ela tem sua conformação alterada e é translocada para o interior da mitocôndria, onde forma um poro na membrana, permitindo o extravasamento do citocromo c, fase em que a apoptose se torna irreversível⁴. Capano e Crompton demonstraram que a translocação da BAX para a mitocôndria é um processo gradual que se inicia nos primeiros 20 minutos de um evento hipóxico e progride até cerca de 3 horas na célula cardíaca. Esse acúmulo de BAX, então, culmina na apoptose⁴.

Sabe-se que a Bcl2 pode atuar impedindo a apoptose por inibição da capacidade da BAX de liberar citocromo C das mitocôndrias⁸. A proteína Bcl2 encontra-se também envolvida na diminuição dos eventos apoptóticos, pois atua inibindo a ativação da pró-caspase, por meio do bloqueio da ação do BAX⁹. A Bcl2 é uma proteína que apresenta um importante papel na

regulação da função e metabolismo das mitocôndrias. Embora ela seja expressa em baixos níveis nos cardiomiócitos, este potente modulador da morte celular é um promissor agente terapêutico para distúrbios cardíacos, porque tem a capacidade de reduzir a morte celular durante a isquemia¹⁰. Sua ação anti-apoptótica nos cardiomiócitos se faz através do bloqueio da p53 e do aumento da capacidade das mitocôndrias para resistir altos níveis de cálcio. A interação entre estas duas proteínas, BAX e Bcl2, é que vai determinar se vai haver estímulo ou bloqueio a apoptose^{9,10}.

Nossos resultados sugerem o envolvimento da proteínas BAX e Bcl2 no processo de apoptose por hipóxia dos cardiomiócitos desta amostra, visto que observamos uma expressão tecidual da proteína anti-apoptótica Bcl2 diminuída e um relativo da proteína pró-apoptótica BAX.

Outro biomarcador anti-proliferativo e pró-apoptótico que foi utilizado em nosso estudo chama-se Mfn2 (mitofusion-2), também denominado de supressor da hiperplasia, devido aos seus efeitos anti-proliferativos, sendo este também um inibidor endógeno da Ras (*Rat sarcoma vírus*), oncogene reconhecidamente relacionado às vias de proliferação celular¹¹. Estudos mostram que a proteína Mfn2 se localiza na membrana externa das mitocôndrias, participa da fusão mitocondrial, e que também causa a supressão do crescimento celular inibindo a via de sinalização Ras-ERK-MAPK (*Extracellular Signal-regulated kinase – Mitogen-Activid Protein Kinase*)¹¹. A ausência ou diminuição da expressão da proteína Mfn2, e de sua função anti-proliferativa, promove o aumento da proliferação celular, contribuindo para o desenvolvimento de várias desordens proliferativas vasculares. Além disso, quando altas taxas do Mfn2 estão associadas à presença da proteína BAX, observamos a promoção de estágios iniciais da apoptose¹¹. Sabe-se que a proteína Mfn2 é um fator essencial na regulação da sobrevivência das células musculares cardíacas por mecanismos ainda não conhecidos, sendo que resultados indicam que o aumento de sua expressão em cardiomiócitos está relacionada a apoptose induzida por estresse oxidativo, atuando portanto, em situações de hipóxia¹¹.

No nosso estudo, o Mfn2 apresentou baixa imunoexpressão tecidual. Este fato pode sugerir que esta proteína não participe dos processos de apoptose mediados pela hipóxia em neonatos. Além disso, a correlação positiva na expressão de BAX e Mfn2 não foi observada neste estudo. Este fato poderia sugerir que talvez esta associação não ocorra no miocárdio de recém-nascidos hipóxicos.

Os tecidos possuem também mecanismos anti-apoptóticos que impedem a perda excessiva de células. Em um evento hipóxico, todos esses mecanismos entram em ação e o resultado final desses fatores definirá quais células sofrerão apoptose e quais estão aptas a se adaptar, com ou sem proliferação celular¹².

A mitocôndria é o primeiro alvo do dano hipóxico nos cardiomiócitos. Muitos fatores, incluindo extravasamento de cálcio, aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROS) e diminuição de adenina contribuem para o dano mitocondrial durante a hipóxia. A disfunção mitocondrial pode causar diretamente a morte celular após um evento hipóxico¹². Isto ocorre devido a permeabilidade do poro transitório mitocondrial (PTPM), que é um poro não específico que se abre em situações de extravasamento de cálcio, estresse oxidativo, depleção de adenina ou elevação dos níveis de fosfato. Uma vez aberto, o potencial de membrana e gradiente do pH celular é dissipado e estas mudanças podem levar a célula a morte¹².

Em nossa pesquisa analisamos a expressão tecidual da proteína anti-apoptótica TRAP1 (*Tumor necrosis factor receptor associated protein 1*), sendo que estudos mostram que a expressão aumentada de TRAP1, uma chaperona mitocondrial, membro da família Hsp90 (Heat shock proteins 90), atua na integridade do potencial de membrana da mitocôndria, mantém o nível de produção de ATP e preserva viabilidade celular durante episódios de dano isquêmico^{13,14}. A molécula TRAP1 está situada na matriz mitocondrial, com uma fração distribuída no espaço intermembranas. Em alguns tecidos foi observada uma localização extra-mitocondrial, como nos grânulos de insulina no pâncreas, sarcômeros dos cardiomiócitos, núcleo de células pancreáticas e cardíacas e no endotélio, mas não há um claro conhecimento de sua função nesta situação¹⁵. A primeira função atribuída ao TRAP1 é a de proteção contra apoptose via mitocôndria, identificada em estudos com agentes antitumorais, no qual se percebeu que quando as células tumorais eram tratadas com estes agentes, havia uma diminuição da expressão do TRAP1, associada com um aumento da apoptose via mitocôndria¹³. O papel do TRAP1 em resposta à hipóxia também foi estudado (XIANG, 2010) e demonstrou-se que a expressão aumentada do TRAP1 leva a uma proteção contra danos causados pela hipóxia em cardiomiócitos, enquanto que quando o TRAP1 está inativo, há um aumento da morte celular, diminuição da viabilidade celular e do potencial de membrana mitocondrial. Isso levou à conclusão de que a hipóxia induz um aumento na expressão de TRAP1 em cardiomiócitos e que o TRAP1 tem um importante papel de proteção celular e manutenção da função mitocondrial¹².

Nosso estudo demonstrou boa imunoexpressão tecidual da TRAP1 sugerindo que ele poderia ser um dos responsáveis pela proteção dos cardiomiócitos aos danos causados pela hipóxia.

Estudos indicam que a hipóxia perinatal em cardiomiócitos pode resultar também em crescimento celular, na forma de hiperplasia, hipertrofia e remodelamento cardíaco como uma resposta imediata ao dano, fato que parece se prolongar na vida adulta como uma resposta tardia⁷. Dentre os marcadores de estímulo a hipertrofia de cardiomiócitos estudamos a

angiotensina II, que eleva a expressão da miocardina ou induz hipertrofia cardíaca diretamente⁷. As últimas descobertas demonstraram que a hipóxia em cardiomiócitos de neonatos aumenta a expressão da miocardina, aparentemente mediada pela elevada expressão de proteínas da via da angiotensina II e da ERK, sendo que todos esses fatores estão diretamente relacionados a hipertrofia miocárdica, mesmo na vida adulta⁷. Os resultados aqui apresentados, revelaram boa imunoexpressão tecidual da angiotensina II, sugerindo sua participação no processo de hipertrofia como resposta imediata ao dano em miocárdio de recém-nascido hipóxico. O crescimento pós-natal do miocárdio é resultante da ação combinada de ações de hiperplasia e hipertrofia, sendo que a hiperplasia diminui sobremaneira no coração adulto¹⁶.

Um outro importante sinalizador tanto de hipertrofia quanto de hiperplasia de cardiomiócitos, utilizado em nossa pesquisa, é a Akt, uma serina/treonina quinase com potentes ações anti-apoptóticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ela está associada a promoção da proliferação celular (hiperplasia) em muitos tipos celulares não cardíacos, incluindo a transformação oncogênica¹⁶. Alguns estudos têm demonstrado que a Akt é responsável por promover a proliferação celular no coração pós-natal. Isso porque o acúmulo nuclear de Akt expande a população de cardiomiócitos ciclando, bem como o número de células progenitoras miocárdicas¹⁶. A imunoexpressão tecidual ausente da proteína Akt1, no presente estudo, sugere que ela não participa do processo de estímulo a hiperplasia miocárdica em resposta ao dano, ao menos na população estudada de recém-nascidos hipóxicos. Por outro lado, foram observadas altas expressões teciduais de Akt2 e Akt3, sugerindo que estas duas proteínas poderiam participar no estímulo ao processo de hiperplasia em miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados.

5. CONCLUSÃO

Os biomarcadores BAX, TRAP1, angiotensina II, Akt2 e Akt3 apresentaram boa imunoexpressão tecidual em amostras de miocárdio de recém-nascidos hipoxemiados.

Os biomarcadores Akt1, Mfn2 e Bcl2 apresentaram expressão tecidual baixa ou ausente nas amostras de recém-nascidos hipoxemiados.

Não houve correlação entre a imunoexpressão tecidual dos biomarcadores e os dados clínicos e anatomopatológicos da amostra.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Reynolds EO. Hypoxia in the newborn infant. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1977;11:134-41
2. Xue Q, Zhang L. Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 Aug; 330(2):624-32.
3. Kim MY, Seo EJ, Lee DH, Kim EJ, Kim HS, Cho HY, et al. Gadd45beta is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovasc Res* Jul 2010;87(1):119-26.
4. Borutaite V. AMPK, MAPK and BAX in the heart: some questions answered. *Biochem J* 2008 Jun 1;412(2):e15-6.
5. do Carmo Debur M, Raboni SM, Flizikowski FB, Chong DC, Persicote AP, Nogueira MB, et al. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol* 2010 Oct;63(10):930-4.
6. Rohan AJ, Golombek SG. Hypoxia in the term newborn: part one-cardiopulmonary physiology and assessment. *MCN Am J Matern Child Nurs* 2009 Mar-Apr;34(2):106-12; quiz 13-4.
7. Chiu CZ, Wang BW, Chung TH, Shyu KG. Angiotensin II and the ERK pathway mediate the induction of myocardin by hypoxia in cultured rat neonatal cardiomyocytes. *Clin Sci (Lond)* 2010 Oct;119(7):273-82.
8. Wang Y, Liu X, Zhang D, Chen J, Liu S, Berk M. The effects of apoptosis vulnerability markers on the myocardium in depression after myocardial infarction. *BMC Med* 2013;11:32.
9. Moore JM, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An Alternative Splicing Network Links Cell Control to Apoptosis. *Cell* 2010 August 20;142(4):625-636. doi:10.1016/j.cell.2010.07.019.

10. Weisleder N, Toffet GE, Capetanaki Y. Bcl2 over expression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. PNAS 2004;101:769-774.
11. Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, et al. Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. J Biol Chem 2007 Aug 10;282(32):23354-61.
12. Xiang F, Huang YS, Shi XH, Zhang Q. Mitochondrial chaperone tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 protects cardiomyocytes from hypoxic injury by regulating mitochondrial permeability transition pore opening. FEBS J 2010 Apr;277(8):1929-38.
13. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR. TRAP1, The mitochondrial Hsp 90. Biochim Biophys Acta 2012;1823(3):767-773.
14. Matassa DS, Ambroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F. New insights into TRAP1 pathway. Am J Cancer Res 2012; 2(2): 235-248.
15. Taldone T, Patel PD, Patel M, Patel HJ, Evans CE, Rodina A, et al. Experimental and structural testing module to analyze paralogue-specificity and affinity in the Hsp90 inhibitors series. Journal of Medicinal Chemistry 2013;56:6803-6818. Doi 10.1021/jm400619b.
16. Gude N, Muraski J, Rubio M, Kajstura J, Schaefer E, Anversa P, et al. Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. Circ Res 2006 Aug 18;99(4):381-388.

Curitiba, 04 de julho de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Mona Adalgisa Simões
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: "ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES PRÓ-APOPTÓTICOS, ANTI-APOPTÓTICOS E DE COLÁGENO EM AMOSTRAS DE MIOCARDIO DE PREMATUROS HIPOXEMIADOS", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 28 de junho de 2011.

O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0140.0.208.000-11
Registro CEP: 2533.140/2011-06

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: janeiro de 2012.

Atenciosamente,

