



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

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE
BIOMARCADORES DE HIPERPLASIA E
HIPERTROFIA CELULAR EM AMOSTRAS DE
MIOCÁRDIO
DE RECÉM-NASCIDOS HIPOXÊMICOS**

Aluno: FRANCISCO CESAR PABIS

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

**CURITIBA
2015**

FRANCISCO CESAR PABIS

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES DE
HIPERPLASIA E HIPERTROFIA CELULAR 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): Lúcia de Noronha

**CURITIBA
2015**

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Mona Adalgisa Simões por sua amável presença e
colaboração nestes anos de estudos.

Aos meus filhos, Francisco Simões Pabis e Julia Simões Pabis por
saberem que devemos continuar
estudando e o fazem com méritos.

AGRADECIMENTOS

À professora doutora e orientadora **Lúcia de Noronha** por me conceder a oportunidade de ser seu orientado 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 estudantes de medicina da Universidade Federal do Paraná, **Ana Karin Ehrenfried de Freitas, Renata Rolim Sakiyama, Fernando Yochiteru Rolim Sakiyama, Rafael Kayano e Patricia Watanabe**, pelo trabalho em equipe e disponibilidade para auxiliar esta pesquisa.

A minha esposa, **Mona**, 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 esta etapa possível!

ÍNDICE

1	Introdução.....	10
2	Objetivos.....	14
3	Desenvolvimento da Pesquisa.....	15
4	Artigos	16
5	Conclusões da Pesquisa.....	55
6	Referências Bibliográficas da Introdução.....	56
7	Anexos.....	58

RESUMO DA PESQUISA

INTRODUÇÃO: O coração fetal inicia seu funcionamento com quatro semanas de gestação. O coração de recém-nascido responde de maneiras diferentes a estímulos adversos. Alguns estudos sugerem que a hipóxia tanto pode estimular como diminuir a proliferação de cardiomiócitos. Há suposição de que os recém-nascidos submetidos à hipóxia apresentam maior suscetibilidade a doenças cardíacas na idade adulta.

OBJETIVO: avaliar biomarcadores de crescimento celular em amostras de miocárdio de recém-nascidos hipoxêmicos por meio de análise da expressão imunoistoquímica. **MÉTODO:** foram selecionados 314 casos do banco de necropsias pediátricas do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFP, entre os anos de 1991 a 2007. Os dados clínicos e anatomopatológicos foram coletados de prontuários e dos laudos de necropsia. Após isso, os blocos teciduais parafinados que continham miocárdio adequado para a análise imunoistoquímica (n=154) foram selecionados e preparados para a confecção de lâminas utilizando-se a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais. As lâminas prontas foram submetidas à técnica de imunoistoquímica usando-se os anticorpos anti-Akt1, anti-Akt2, anti-Akt3, anti-TWEAK e anti-angiotensina II. A leitura da marcação imunoistoquímica foi realizada por 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 imunoistoquímicos foram correlacionados com os dados clínicos (gênero, peso, idade gestacional, índices de Apgar do primeiro e do quinto minuto de vida, pH do sangue arterial e sobrevivência) e com dados anatomopatológicos (doença de base e causa da morte). **RESULTADOS:** A média de imunoexpressão tecidual do Akt2 foi de 18839 μm^2 , do Akt3 foi de 23745,1 μm^2 , do TWEAK foi de 7076 μm^2 e da angiotensina II foi de 14124,9 μm^2 . O biomarcador Akt1 não apresentou imunoexpressão tecidual nas amostras. Não houve significância estatística da média de imunoexpressão tecidual dos biomarcadores Akt2, Akt3 e angiotensina II com os fatores clínicos estudados, $p > 0,05$. A imunoexpressão tecidual do TWEAK apresentou relação com a doença básica, $p < 0,05$. **CONCLUSÃO:** Os biomarcadores de hiperplasia Akt2 e Akt3 e de hipertrofia angiotensina II não apresentaram boa imunoexpressão tecidual em miocárdio humano com lesão hipóxica. O biomarcador TWEAK apresentou relação significativa com a doença básica, cardiopatia congênita.

Palavras-chave: hipóxia, neonatos, cardiomiócitos, imunoistoquímica.

RESEARCH SUMMARY

INTRODUCTION: The fetal heart begins to function at four weeks of gestation. The newborn heart respond in different ways to adverse stimuli. Some studies suggest that the hypoxia can both stimulate or decrease the cardiomyocytes proliferation. There is assumption that the newborns submitted to hypoxia may present higher susceptibility to cardiac diseases in the adult life.

OBJECTIVE: Evaluate cell growth biomarkers in samples of myocardium of hypoxemic newborns through analysis of the immunohistochemistry expression.

METHOD: There were selected 314 cases of the pediatric necropsies database of the Service of Pathologic Anatomy of the HC-UFPr, between 1991 and 2007. The clinical and pathological data were collected from medical records and autopsy reports. After that, the paraffin tissue blocks containing suitable myocardium for immunohistochemistry (n=154) were selected and prepared for manufacturing laminas using the technique of matrix arrangement of tissue samples. The finished laminas were subjected to the technique of immunohistochemistry using the antibodies anti-Akt1, anti-Akt2, anti-Akt3, anti-TWEAK e anti-angiotensin II. The reading of the immunohistochemical staining was performed by ordinary light microscopy and morphometric analysis (Image Pro Plus®) with immuno positive area measured by high-power field (115.226,1 μ m²). The immunohistochemical results were related to clinical data (gender, weight, gestational age, first and fifth minute APGAR, blood pH and survival) and with pathological data (base disease and death cause).

RESULTS: The average tissue immunostaining of the Akt2 was 18839 μ m², Akt3 was 23745,1 μ m², TWEAK was 7076 μ m² and the angiotensin II was 14124,9 μ m². The Akt1 biomarker showed no tissue immunoreactivity in the samples. There was no statistically significant average of tissue immunostaining of biomarkers Akt2, Akt3 e angiotensin II with the clinical factors studied, p>0,05. The tissue immunoexpression of TWEAK is correlated with the base disease, p=<0,05.

CONCLUSION: The biomarkers of hyperplasia Akt2 and Akt3 and of hypertrophy angiotensin II did not presented good tissue immunoexpression in the human myocardium with hypoxic damage. The biomarker TWEAK showed a significant relationship with the base disease, congenital heart disease.

Key words: hypoxia, newborn, cardiomyocytes, immunohistochemistry

Lista de Abreviações

Akt: serina/treonina quinase

Akt1/2/3: isoformas da Akt

ATP: trifosfato de adenosina

BAX: proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2: linfoma de células B 2

BNP: peptídeo natriurético B

CGA: campo de grande aumento

DNA: ácido desoxirribonucleico

DR3: receptor 3 de morte

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

EROS: espécies reativas de oxigênio

Fn 14: fator indutor de crescimento do fibroblasto – molecular 14

GSK-3 β : quinase-3 β sintase do glicogênio

Hsp90: *heat shock proteins 90*

IG: idade gestacional

MAPK: *mitogen-activated protein Kinase*

Mfn-2: mitofusin-2

NF- κ B: fator nuclear Kappa-B

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PTPM: permeabilidade do poro transitório mitocondrial

PI3: fosfatidilinositol 3-quinase

RAS: vírus do sarcoma de rato

sTWEAK: *soluble tumor necrosis fator – like weak inducer of poptosis*

TRAP1: proteína 1 associada ao receptor do fator de necrose tumoral

TWEAK: *tumor necrosis fator – like weak inducer of apoptosis*

1. INTRODUÇÃO

“O sistema cardiovascular inicia o seu desenvolvimento no final da terceira semana de gestação e o coração começa a bater no início da quarta semana”.⁽¹⁾

Durante a embriogênese a taxa de proliferação celular diminui gradualmente, sendo considerado que os cardiomiócitos adultos perdem a capacidade de divisão.⁽²⁾ Estudo experimental em mamíferos demonstrou altas taxas de divisão dos cardiomiócitos em fetos de ratos e ratos neonatos, porém não revelou marcação com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em células musculares cardíacas de ratos adultos.⁽³⁾ Destes achados surge a suposição de que os cardiomiócitos adultos não reentram no ciclo celular, mas esta observação tem sido questionada. Alguns estudos têm demonstrado baixos índices de proliferação de cardiomiócitos, mesmo em animais jovens, adultos e em humanos adultos, especialmente quando são submetidos a eventos adversos como o infarto do miocárdio.^{(2), (4)}

Eventos adversos como o infarto do miocárdio na faixa pediátrica em crianças, são raros. Porém, durante o desenvolvimento intraterino e na vida perinatal, situações patológicas que cursam com diminuição do aporte de oxigênio - hipóxia - ao coração podem afetar o seu desempenho. Há indícios experimentais que estes eventos de hipóxia/asfixia, dependendo da intensidade, podem desencadear estímulos proliferativos nos cardiomiócitos de carneiro.^{(5), (6)}

Em estudo em ratos expostos a retardo de crescimento intrauterino foi observado que houve diminuição do número de cardiomiócitos e ainda observaram que nos animais submetidos à hipóxia em fase precoce da gestação houve maior diminuição do peso do coração que a redução do peso corporal e a parede ventricular estava menos espessa.⁽⁸⁾ Este fato pode levar a hipertrofia pós-natal inadequada e predispor este coração a insuficiência cardíaca mais facilmente quando submetido a exigências de carga.⁽⁹⁾ Porém Bishop, 1990 relata o aumento de número de cardiomiócitos quando ratos foram expostos a monóxido de carbono durante o crescimento hiperplásico e Morrison et al 2007 estudando carneiros encontraram cardiomiócitos maiores para manter o tamanho do coração.^{(6), (10)}

No recém-nascido o ventrículo direito é mais propenso a sofrer lesão isquêmica devido ao aumento da pressão pulmonar nas situações que levam a hipóxia. ⁽⁷⁾

Para auxiliar no diagnóstico de Asfixia, a Academia Americana de Pediatria definiu os critérios para a utilização do termo asfixia para pacientes que apresentaram:

- 1- Acidose metabólica ou mista (pH<7,0) em sangue arterial de cordão umbilical;
- 2- Índice de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos;
- 3- Manifestações neurológicas neonatais (ex.: convulsões, coma ou hipotonia);
- 4- Disfunção orgânica multissistêmica (ex.: sistemas cardiovascular, gastrointestinal, hematológico, pulmonar ou renal). ⁽⁷⁾

O modo como os corações de recém-natos reagem quando expostos a hipóxia ainda não está bem esclarecido. Este estudo propõe a pesquisar se há imunoexpressão tecidual de biomarcadores hiperplasia e/ou hipertrofia de cardiomiócitos em recém-natos que foram expostos a hipóxia, em amostras de miocárdio ventriculares.

1.1 MARCADORES DE HIPERTROFIA

O coração responde a diferentes sinais de estresse, incluindo estresse biomecânico, dano tecidual, estresse oxidativo e ativação neuro-humoral. A hipóxia pode provocar uma variedade de respostas funcionais nos cardiomiócitos, incluindo proliferação celular, hipertrofia, morte celular e apoptose. O crescimento hipertrófico é a primeira resposta adaptativa que é demonstrada pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos, pelo aumento do seu conteúdo protéico, reorganização do citoesqueleto e expressão de genes fetais cardíacos. ⁽¹²⁾

Para a pesquisa de ocorrência de hipertrofia neste estudo foi utilizada a angiotensina II como biomarcador. A angiotensina II é formada por clivagem da angiotensina I e está continuamente presente na circulação. Sua principal função é manter o tônus vascular e a contratilidade miocárdica adequada às condições

hemodinâmicas instantâneas. Apresenta ainda outras ações como remodelamento cardíaco em condições patológicas. ⁽¹¹⁾

A angiotensina II tem com sua expressão aumentada em condições de hipóxia semelhante a outras causas de sobrecarga. ⁽¹²⁾ Portanto, não há um único fator que tenha sido encontrado ser suficiente para ativar os genes de expressão do músculo cardíaco ou músculo liso.

Em culturas de cardiomiócitos de ratos demonstrou-se que a hipóxia e, potencialmente, outros estressores biomecânicos, induzem a expressão da angiotensina II. A angiotensina II e a via ERK medeiam à indução de expressão de miocardina, o que leva à hipertrofia por aumento da atividade transcricional. A hipertrofia após a hipóxia pode ser identificada pela expressão do peptídeo natriurético B (BNP) e aumento da síntese proteica

Também em ratos recém-nascidos foi observado que a angiotensina II infundida por cinco dias desencadeou hipertrofia nos cardiomiócitos e eventos do ciclo celular bem como apoptose. Porém não foi observada diferença na proliferação em animais entre 21 a 45 dias de idade que receberam angiotensina II na primeira semana e os controles. ⁽¹³⁾

No estudo de Sandgren et al 2015 em fetos de carneiros usando a infusão de angiotensina II em um grupo e angiotensina associada com nitroprussiato em outro foi observado que houve maior hipertrofia miocárdica no grupo que recebeu a infusão de angiotensina II isolada. Neste estudo foi demonstrado ainda que ocorreu menos crescimento cardíaco por hiperplasia. Então os efeitos de hipertrofia parecem ser dependentes da carga e os de hiperplasia são carga-independentes. ⁽¹⁴⁾

1.2. MARCADORES DE HIPERPLASIA

O crescimento pós-natal do miocárdio resulta da ação combinada de ações de proliferação celular e hipertrofia. Ambos os processos estão diminuídos no coração adulto. Um importante sinalizador tanto de hipertrofia quanto de hiperplasia de cardiomiócitos é uma serina/treonina quinase (Akt), com potentes ações anti-apoptóticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A Akt é ativada por múltiplos estímulos

cardioprotetores. Ela está associada à promoção da proliferação celular em muitos tipos celulares não cardíacos, incluindo a transformação oncogênica. 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 quinase expande a população de cardiomiócitos progredindo no ciclo celular, bem como o número de células progenitoras expressando marcadores da linhagem miocárdica. Esses efeitos distintos sustentam o fato de que a Akt quinase atua facilitando a proliferação de células progenitoras cardíacas e de cardiomiócitos jovens no coração. ⁽¹⁵⁾

Outro marcador que tem sido relacionado com a hiperplasia é o fator de necrose tumoral – relacionado à fraca indução de apoptose (TWEAK). O TWEAK tem sido demonstrado como um regulador de proliferação de vários tipos celulares, incluindo células ovais hepáticas, células epiteliais salivares, mioblastos de músculo esquelético, células mesangiais renais, podócitos e células tubulares dos rins. O TWEAK é um membro da família de fatores de crescimento relacionado ao fator de necrose tumoral α (TNF- α). Possui diversas funções biológicas em processos como inflamação, angiogênese e sobrevivência celular. ⁽¹⁶⁾

Descoberta recente demonstrou que o TWEAK é um regulador positivo da proliferação de cardiomiócitos atuando via seu *receptor fibroblast growth factor-inducible molecule 14* (Fn14). A estimulação gerada por ele nos cardiomiócitos ativa a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3) e inibe a quinase - 3beta sintase do glicogênio (GSK-3beta) permitindo a proliferação. Ao contrário do que ocorre em cardiomiócitos de neonatos, a estimulação do TWEAK não induz a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) em cardiomiócitos adultos, o que pode ser justificado pela diminuição da expressão de Fn14 depois do nascimento. ⁽¹⁶⁾ Então, a expressão aumentada do TWEAK pode sinalizar a proliferação celular de cardiomiócitos e futuramente ser um marcador da vitalidade miocárdica precoce uma vez que as doenças cardiovasculares tem importante impacto na saúde da população e na expectativa de vida. Porém, existe pouco conhecimento como as condições de hipóxia experimentadas pelo neonato podem interferir em seu prognóstico em curto prazo e na sua vida adulta.

Este estudo visa avaliar a expressão dos biomarcadores de hiperplasia e hipertrofia de cardiomiócitos e correlacioná-los com variáveis clínicas. Estes mecanismos desencadeados pela hipóxia precisam ser melhores conhecidos na

busca de ferramentas diagnósticas e terapêuticas para diminuir os efeitos deletérios da hipóxia bem como melhorar a qualidade de vida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão imunoistoquímica de biomarcadores de hipertrofia e de hiperplasia em lâminas de miocárdio humano, provenientes de necropsias de recém-nascidos que sofreram hipóxia.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Analisar a expressão imunoistoquímica de biomarcadores de hipertrofia (angiotensina II) em amostras de miocárdio de recém-nascidos que sofreram hipóxia.

2.2.2 Analisar a expressão imunoistoquímica de biomarcadores hiperplasia (Akt1, Akt2, Akt3 e TWEAK), em amostras de miocárdio de recém-nascidos que sofreram hipóxia.

2.2.3 Correlacionar os dados de imunoexpressão dos biomarcadores com os dados clinicopatológicos (gênero, peso ao nascer, idade gestacional, índice de Apgar no primeiro minuto, índice de Apgar no quinto minuto, tempo de vida, pH do sangue arterial do cordão umbilical, doença de base e a causa do óbito).

3. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Esta tese será apresentada na forma de dois artigos. O primeiro intitulado **“IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE BIOMARCADORES DE CRESCIMENTO, PRÓ E ANTI-APOPTÓTICOS EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO DE RECÉM-NASCIDOS COM LESÃO HIPÓXICA.”** E o segundo intitulado: **“AUMENTO DA IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE TWEAK EM MIOCÁRDIO DE NEONATOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA.”**

As amostras que compõem este estudo já foram anteriormente analisadas por este mesmo grupo de pesquisa, sendo objeto da pesquisa de duas teses de doutorado. Os dados desta linha de pesquisa já deram origem, também, a um terceiro artigo, disponível no ANEXO desta tese, intitulado **“CAUSAS EVITÁVEIS DE MORTE E FATORES ASSOCIADOS À SOBREVIVÊNCIA DOS RECÉM-NASCIDOS.”**

ARTIGOS

4.1. Artigo 1

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

Mona Adalgisa Simões, Francisco Cesar Pabis, Renata Rolim Sakiyama, Fernando Yuchiteru Rolim Sakiyama, Patrícia Watanabe, 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: franciscocpabis@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

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 consequências 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 hipoxêmicos.

Método: Foram utilizadas amostras de miocárdio humano (ventrículo esquerdo) provenientes de necropsias de neonatos hipoxêmicos (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 imunistoquímicas 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 sobrevida) 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 sobrevida ou outro fator clínico ou anatomopatológico estudado.

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

Palavras- chave: Recém-nascido. Imunistoquímica. 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 prematuridade. ⁽¹⁾

A prematuridade pode acarretar inúmeros problemas ao recém-nascido, devido à dificuldade de adaptação a vida 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 imunoexpressão 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 de 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 2534.141/2011-06.

Foram incluídas amostras provenientes de 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 gêneros. Os critérios clínicos e anatomopatológicos de hipóxia perinatal foram assim definidos: a – índice de Apgar do quinto minuto <6 e/ou b – pH de sangue arterial de cordão umbilical <7,2 e/ou c - exame de necropsia com sinais de hipóxia perinatal tais como petéquias em

serosas, 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, sobrevivência (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 arranjos em matriz de amostras teciduais 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 14mm^2 ($A = \pi \cdot r^2 \times 2$ amostras).

Os blocos em arranjos em matriz de amostras teciduais foram cortados em lâminas multiamostrais para realização de técnicas de imunohistoquímica.

Foram selecionados os seguintes biomarcadores *Bcl2-associated X protein* (BAX), *Mitofusin-2* (Mfn2) que são proteínas pró-apoptóticas, *Tumor necrosis factor receptor associated protein 1* (TRAP1) e *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl2) que são proteínas anti-apoptóticas e a angiotensina II e a Akt 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 do Carmo, Debur e colaboradores.⁽⁵⁾ 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 115.226,1 μm^2 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) com idade média de 32,6+ -4,6 dias.

Havia sinais de hipóxia perinatal ao exame anatomopatológico aos quais foram atribuídas 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, mínima e máxima da imunoposição 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	Mínimo	Mediana	Máximo	Média	Desvio padrão
Peso (gramas)	139	400	1480,0	5700	1647	911,7
Idade gestacional (semanas)	154	24	33,0	42	32,5	4,6
Apgar 1	144	0	2,5	10	3,5	2,9
Apgar 5	144	0	5,0	10	5,3	3,1
pH	93	6,2	7,1	7,59	7,0	0,2
Sobrevida (dias)	154	0,0125	1,0	28	4,2	6,0
BAX	149	2,16%	24,57%	47,55%	25,61%	8,53%
TRAP1	141	0,03%	3,54%	33,56%	7,86%	8,33%
Angiotensina II	151	0,005%	0,89%	8,03%	1,24%	1,21%
Akt2	147	0,15%	16,12%	39,73%	16,35%	10,57%
Akt3	151	2,78%	19,94%	46,07%	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. Os valores dos biomarcadores BAX, TRAP1, Angiotensina II, Akt2 e Akt3 são expressos em valores percentuais de imunoposição positiva.

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 sobrevida 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 II	≤ 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-Mfn2 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-TRAP1 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.

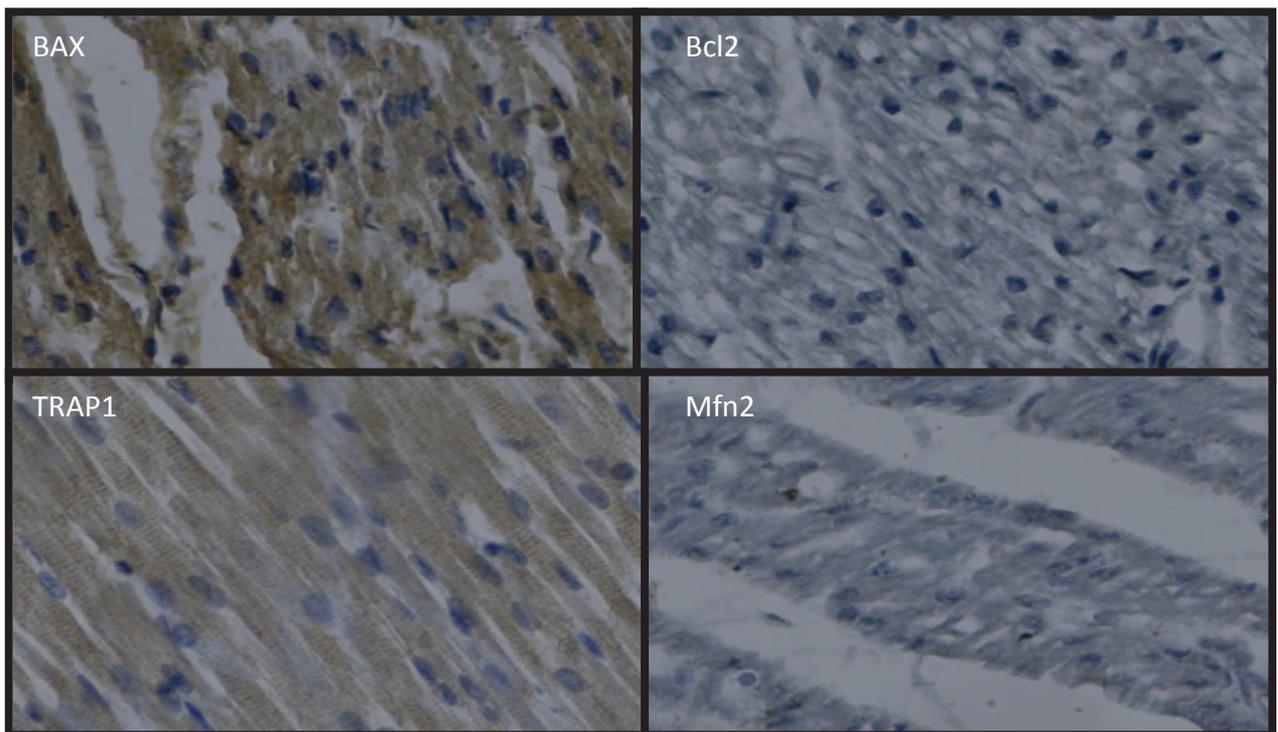
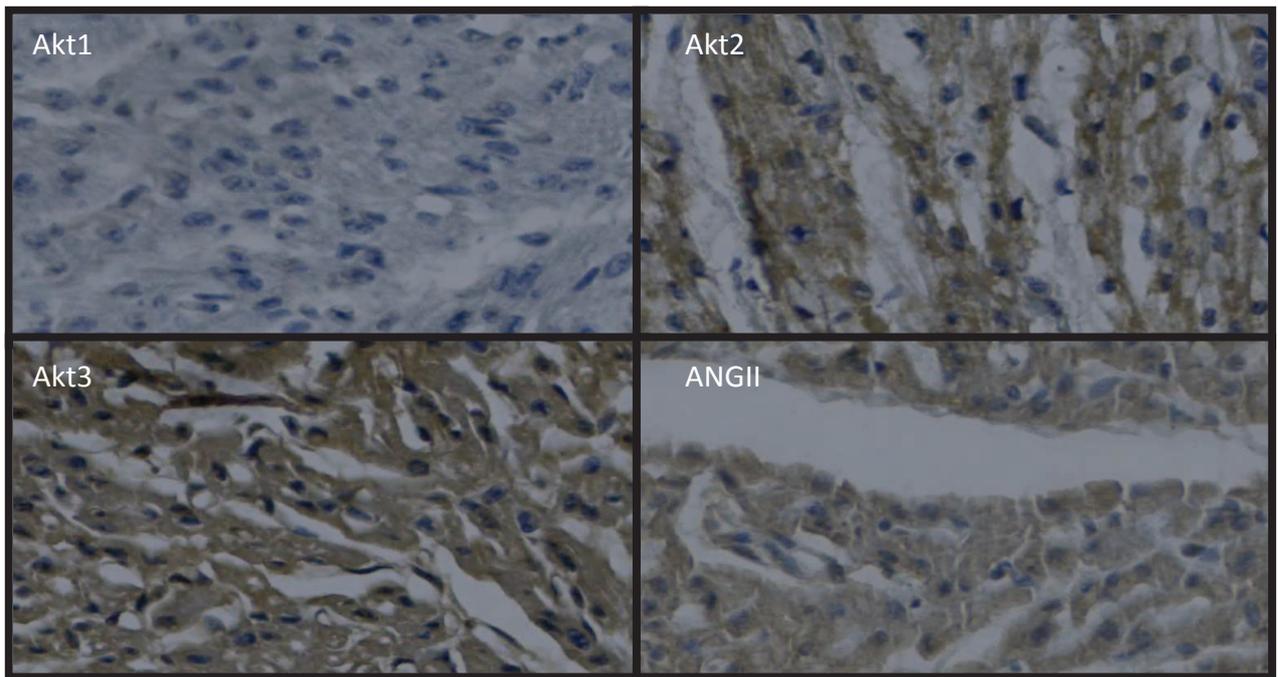


Figura 1- Demonstra cortes histológicos imunocorados com os anticorpos anti-BAX, anti-Bcl2, anti-TRAP1, anti-Mfn2, anti-Akt1, anti-Akt2, anti-Akt3 e anti-angiotensina II.

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 ambiente. ⁽¹⁾

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. Todas estas situações são potencialmente capazes de gerar quadro hipoxêmico que podem acarretar consequências graves ao recém-nascido, inclusive com sério risco de vida. ^{(1),(6)} Nesta 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 demonstraram 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 por apoptose é um importante mecanismo no desenvolvimento de órgãos, na homeostase e no 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 hipóxia. ⁽⁴⁾

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 irreversível. ⁽⁴⁾ 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 apoptose. ⁽⁴⁾

Sabe-se que a Bcl2 pode atuar impedindo a apoptose por inibição da capacidade da BAX de liberar citocromo C das mitocôndrias. ⁽⁸⁾ 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 BAX. ⁽⁹⁾ 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 isquemia. ⁽¹⁰⁾ 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)}

Os resultados desta pesquisa sugerem o envolvimento das proteínas BAX e Bcl2 no processo de apoptose por hipóxia dos cardiomiócitos na amostra analisada. Foi observado que a expressão tecidual da proteína anti-apoptótica Bcl2 estava diminuída e apresentava um relativo aumento da proteína pró-apoptótica BAX.

Outro biomarcador anti-proliferativo e pró-apoptótico que foi utilizado em nosso estudo chama-se Mfn2, também denominado de supressor da hiperplasia, devido aos seus efeitos anti-proliferativos, sendo este também um inibidor endógeno da *Rat sarcoma vírus* (Ras), oncogene reconhecidamente relacionado às vias de proliferação celular. ⁽¹¹⁾ 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 *Rat sarcoma vírus Extracellular Signal-regulated kinase – Mitogen-Activid Protein Kinase* (Ras-ERK-MAPK). ⁽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 de apoptose. ⁽¹¹⁾ 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 hipóxia.⁽¹¹⁾

Neste 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 celular.⁽¹²⁾

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 hipóxico.⁽¹²⁾ Isto ocorre devido à 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 morte.⁽¹²⁾

Nesta pesquisa analisamos a imunoexpressão tecidual da proteína anti-apoptótica TRAP1, sendo que estudos mostram que a expressão aumentada de TRAP1, uma chaperona mitocondrial, membro da família *Heat shock proteins 90* (Hsp90), atua na integridade do potencial de membrana da mitocôndria, mantém o nível de produção de adenosina trifosfato (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 situação.⁽¹⁵⁾ 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. ⁽¹³⁾ O papel do TRAP1 em resposta à hipóxia também foi estudado 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 mitocondrial. ⁽¹²⁾

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

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 tardia. ⁽⁷⁾ Dentre os marcadores de estímulo a hipertrofia de cardiomiócitos estudamos a angiotensina II, que eleva a expressão da miocardina ou induz hipertrofia cardíaca diretamente. ⁽⁷⁾ 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 adulta. ⁽⁷⁾ Os resultados aqui apresentados revelaram 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 adulto. ⁽¹⁶⁾

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 oncogênica. ⁽¹⁶⁾ Há demonstração em estudo 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 miocárdico. ⁽¹⁶⁾ 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 hipoxêmicos. 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 hipoxêmicos.

5. CONCLUSÕES

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

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

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

3.2 Artigo 2

AUMENTO DA IMUNOEXPRESSIONE TECIDUAL DE TWEAK EM MIOCÁRDIO DE NEONATOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA

Francisco Cesar Pabis, Mona Adalgisa Simões, Rafael Martins Kayano, Ana Paula Camargo Martins, Lucia de Noronha.

Authors:

1) Francisco Cesar Pabis

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná
Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: franciscocpabis@uol.com.br

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

Telephone: +55 47 99783917

2) Mona Adalgisa Simões

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná
Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: monasimoes@uol.com.br

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

Telephone: +55 47 99744202

3) Rafael Martins Kayano

Medical Student of Medicine at the Federal University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: rafael.kayano@hotmail.com

CV: <http://lattes.cnpq.br/3350098855311023>

Telephone: +55 41 95324468

4) Ana Paula Camargo Martins

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

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: anapaulacamargo@hotmail.com

CV: <http://lattes.cnpq.br/0805397342913769>

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

Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná.

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: lnno@terra.com.br

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

Telephone: +55 41 3077 1751

Number of words: 3.546

Key Words: Congenital heart diseases. Newborn. Immunohistochemistry. Hypoxia. TWEAK.

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose

The authors confirm safeguards to meet ethical standards

Contributors

Francisco Cesar Pabis: Dr. Pabis designed the study, drafted the initial manuscript, carried out the initial analyses, reviewed and revised the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

Mona Adalgisa Simões: Dr. Simões designed the data collection, reviewed and revised the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

Rafael Martins Kayano: coordinated and supervised data collection and approved the final manuscript as submitted.

Ana Paula Camargo Martins: coordinated and supervised data collection and approved the final manuscript as submitted.

Lucia de Noronha: Dr Noronha carried out final analyses, critically reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

2.2 Artigo

AUMENTO DA IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE TWEAK EM MIOCÁRDIO DE NEONATOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA

Francisco Cesar Pabis, Mona Adalgisa Simões, Rafael Martins Kayano, Ana Paula Camargo Martins, Lucia de Noronha.

Authors:

1) Francisco Cesar Pabis

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná
Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: franciscocpabis@uol.com.br

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

Telephone: +55 47 99783917

2) Mona Adalgisa Simões

PhD student of Health Sciences at the Pontifical Catholic University of Paraná
Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: monasimoes@uol.com.br

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

Telephone: +55 47 99744202

3) Rafael Martins Kayano

Medical Student of Medicine at the Federal University of Paraná

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: rafael.kayano@hotmail.com

CV: <http://lattes.cnpq.br/3350098855311023>

Telephone: +55 41 95324468

4) Ana Paula Camargo Martins

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

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: anapaulacamargo@hotmail.com

CV: <http://lattes.cnpq.br/0805397342913769>

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

Division of Experimental Pathology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Paraná.

Address: Rua Imaculada Conceição, 1155- Bloco CCBS- Prado Velho - Curitiba/Pr. CEP: 80215-901

e-mail: lno@terra.com.br

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

Telephone: +55 41 3077 1751

Number of words: 3.546

Key Words: Congenital heart diseases. Newborn. Immunohistochemistry. Hypoxia. TWEAK.

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose

The authors confirm safeguards to meet ethical standards

Contributors

Francisco Cesar Pabis: Dr. Pabis designed the study, drafted the initial manuscript, carried out the initial analyses, reviewed and revised the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

Mona Adalgisa Simões: Dr. Simões designed the data collection, reviewed and revised the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

Rafael Martins Kayano: coordinated and supervised data collection and approved the final manuscript as submitted.

Ana Paula Camargo Martins: coordinated and supervised data collection and approved the final manuscript as submitted.

Lucia de Noronha: Dr Noronha carried out final analyses, critically reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted.

Resumo

Introdução: durante o desenvolvimento fetal muitos fatores podem contribuir para o surgimento de cardiopatia estrutural. Ainda o feto pode ser exposto a eventos adversos como a hipóxia e esta ser a causa de óbito neonatal.

Objetivo: avaliar a imunexpressão tecidual de TWEAK (*tumor necrosis factor–related weak inducer of apoptosis*) em recém-nascidos com cardiopatia congênita e comparar com recém-nascidos com outras malformações congênitas não cardíacas e recém-nascidos sem malformações.

Método: foram estudados 154 corações, sendo 15 corações de recém-nascidos com cardiopatia congênita (grupo 1), 54 sem cardiopatia congênita, mas com outras malformações (grupo 2) e 85 corações de recém-nascidos sem quaisquer malformações congênitas (grupo 3). As amostras foram submetidas a análise imunoistoquímica com o anticorpo anti-TWEAK. As lâminas de imunoistoquímica foram submetidas à leitura com microscópio óptico Olympus™ BX50 (Tóquio, Japão), acoplado à câmera de vídeo Dinoeye e ao computador com software de análise de imagem *Image Pro Plus™*. Foram analisados a causa de morte, a doença de base, o peso ao nascimento, o pH ao nascimento, a idade gestacional, o índice de Apgar no primeiro e quinto minutos e o tempo de vida, sendo comparados com a expressão tecidual do TWEAK.

Resultados: os recém-nascidos portadores de cardiopatias congênitas apresentaram maior peso ao nascimento, maior idade gestacional e maior sobrevivência. Os dados de causa de morte, doença de base, pH ao nascimento, tempo de vida e índice de Apgar no primeiro e quinto minutos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando o grupo de cardiopatas (grupo 1) foi comparado aos outros dois grupos (grupos 2 e 3). Os portadores de cardiopatia congênita (grupo 1) apresentaram maior expressão tecidual do marcador TWEAK em relação aos outros dois grupos (grupos 2 e 3) com $p = 0,028$.

Conclusão: Os recém-nascidos portadores de cardiopatia apresentaram maior imunexpressão tecidual do biomarcador TWEAK. Este aumento provavelmente ocorreu por exposição crônica a distúrbios funcionais.

Abstract

Introduction: During fetal development many factors may contribute for the appearance of structural congenital heart disease. Moreover the fetus may be exposed to adverse events like hypoxia and this one be the cause of neonatal death.

Objective: Evaluate the tissue immunoexpression of TWEAK in newborns with congenital heart disease and to compare with other non-cardiac congenital malformations and newborns without malformations.

Method: There were studied 154 hearts, being 15 of newborns with congenital heart disease (group 1), 54 without congenital heart disease but with others malformations (group 2) and 85 hearts of newborns without any congenital malformations (groups 3). The samples were submitted to immunohistochemistry analysis with the antibody anti-TWEAK. The laminas of immunohistochemistry were submitted to reading with an optical microscope Olympus™ BX50 (Tokyo, Japan), linked to a Dinoeye video camera and to a computer with the software of image analysis *Image Pro Plus*™. There were analyzed the cause of death, the basic disease, birth weight, birth pH, the gestational age, first and fifth minute APGAR and lifetime, being compared with tissue expression of TWEAK.

Results: The newborns with congenital heart disease presented higher birth weight, higher gestational age and survival. The data of the death cause, base disease, birth pH, lifetime and first and fifth minute APGAR did not show statistic significant difference when the group of cardiopathys (group 1) was compared to the other groups (groups 2 and 3). The newborns with congenital heart disease have higher tissue expression of the marker TWEAK than the other 2 groups (groups 2 and 3) with $p = 0,028$.

Conclusion: The newborns that have congenital heart disease presented higher tissue immunoexpression of the TWEAK biomarker. This increase probably occurred due to cronic exposure to functional disturbs.

Introdução

Durante a embriogênese a taxa de proliferação celular cardíaca diminui gradualmente, sendo considerado por Ottaviani et al 1999 que os cardiomiócitos adultos perdem a capacidade de divisão celular.⁽¹⁾ Este estudo, contudo, demonstra baixos índices de proliferação de cardiomiócitos em animais jovens, animais adultos e em humanos adultos, especialmente quando são submetidos a eventos patológicos como o infarto do miocárdio.^{(1),(2)} Em estudo experimental em mamíferos foi demonstrada alta taxa de divisão dos cardiomiócitos em fetos de ratos e ratos neonatos.⁽³⁾

Os efeitos dos eventos adversos que cursam com hipóxia podem afetar o desempenho do coração do recém-nascido. Há indícios que estes eventos de hipóxia/asfixia, dependendo da intensidade, podem desencadear estímulos proliferativos nos cardiomiócitos de carneiro.^{(4),(5)} Os achados são conflitantes: foi observado em um estudo em ratos expostos a retardo de crescimento intrauterino que houve diminuição do número de cardiomiócitos.⁽⁶⁾ Morrison et al 2007 observaram que a restrição placentária aguda diminuiu a proliferação de cardiomiócitos e Bishop 1990 relatou que houve aumento de número de cardiomiócitos e ratos foram expostos a monóxido de carbono durante a fase hiperplásica de crescimento fetal.^{(5),(7)}

Sabe-se que a hipóxia provoca uma variedade de respostas funcionais nos cardiomiócitos, incluindo proliferação celular, hipertrofia e morte celular.⁽⁸⁾ As malformações cardíacas têm gênese multifatorial e existem suposições de que a hipóxia crônica em fases precoces da gestação possa estar relacionada com gênese das cardiopatias congênitas dentre outras malformações.⁽⁹⁾ A maneira como os corações de recém-nascidos cardiopatas reagem quando expostos a hipóxia ainda não está bem esclarecido.

Um marcador que tem sido relacionado com a hiperplasia nas células cardíacas é o TWEAK (*tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis*). O TWEAK é um membro da família fator de necrose tumoral alfa (TNF α). O TWEAK tem sido demonstrado como um regulador de proliferação em vários tipos celulares, incluindo células ovais hepáticas, células epiteliais salivares, mioblastos de músculo esquelético, células mesangiais renais, podócitos e células tubulares dos rins.

Possui diversas funções biológicas em processos como inflamação, angiogênese e sobrevivência celular, apoptose, proliferação e migração.^{(10), (11)} Ainda não existem evidências na literatura de como o TWEAK estaria envolvido nas malformações cardíacas.

Sendo assim, esta pesquisa tem por objetivo estudar a imunexpressão tecidual do TWEAK em corações de recém-nascidos com cardiopatias congênitas e comparar com a imunexpressão tecidual do TWEAK nos corações de recém-nascidos malformados não cardiopatas e com corações de recém-nascidos não malformados. Os três grupos apresentaram um desfecho comum, sendo a hipóxia a causa final de morte.

Método

Os casos selecionados são compostos por amostras parafinadas de miocárdio de recém-nascidos autopsiados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba (Universidade Federal do Paraná) entre os anos de 1991 e 2007.

Foram selecionadas amostras de 154 corações sendo 15 corações de recém-nascidos com cardiopatia congênita (grupo 1), 54 corações de recém-nascidos sem cardiopatia congênita, mas com outras malformações (grupo 2) e 85 corações de recém-nascidos sem nenhuma malformação (grupo 3).

Dos prontuários foram coletadas as variáveis peso ao nascimento, pH do sangue arterial do cordão umbilical, idade gestacional, tempo de vida e índice de Apgar no primeiro e no quinto minuto. Dos laudos de necropsia foram coletadas a causa de morte e a doença de base. Posteriormente foi incluída a análise da imunexpressão tecidual do TWEAK.

Foram incluídas as necropsias de recém-nascidos hipóxicos viáveis (idade gestacional superior a 24 semanas), de ambos os gêneros. Os critérios clínicos e anatomopatológicos de hipóxia foram assim definidos: índice de Apgar no primeiro e/ou quinto minuto < 6; e/ou pH ao nascimento < 7,2 (em amostra de sangue arterial do cordão umbilical); e/ou sinais anatomopatológicos de hipóxia (petéquias em serosas, congestão visceral sistêmica, hiperinsuflação, hemorragias de sistema

nervoso central entre outras). Foram excluídos recém-nascidos que tiveram amostras inadequadas ou prontuários incompletos.

A partir dos blocos parafinados originais contendo amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo, foram construídos 26 blocos em arranjos em matriz de amostras teciduais contendo seis casos cada um, com um total de 10 a 12 amostras cilíndricas de 3mm de diâmetro em cada arranjo em matriz de amostras teciduais, sendo 2 amostras cilíndricas para cada caso. Os blocos de arranjos em matriz de amostras teciduais foram cortados em lâminas multi-amostrais para a realização de técnica de imunistoquímica.

Foi selecionado o biomarcador TWEAK e a técnica para as reações de imunistoquímica foi a da imunoperoxidase conforme protocolo descrito por do Carmo-Debur e colaboradores. ⁽¹²⁾ Controles positivos (amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes adultos com cardiopatia isquêmica) e negativos (por omissão do primário) foram imunocorados para cada reação. O anticorpo primário utilizado foi o anti-TWEAK da ABCAM® (Cambridge, USA) na diluição de 1:100.

As lâminas de arranjos em matriz de amostras teciduais imunocoradas foram submetidas à leitura por microscópio óptico Olympus BX50 (Tóquio, Japão) acoplado à câmera de vídeo Dinoeye e ao computador com *software* de análise de imagem Image Pro Plus™ (Média Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram capturadas oito imagens em campo de grande aumento (CGA=400x) para cada caso do estudo. O controle positivo contendo imunopositividade ideal foi fotografado e uma imagem em CGA foi escolhida como “máscara”. As áreas imunocoradas que estavam representadas por coloração castanha no citoplasma das células miocárdicas foram identificadas pelo *software* Image Pro Plus™. Esta máscara foi sobreposta às oito imagens digitais em CGA de cada caso, sendo que o *software* Image Pro Plus™ identificou as áreas imunocoradas de cada caso baseado na imagem sobreposta da máscara (miocárdio com reação controle). Sendo assim, quantificou-se a área de imunexpressão do TWEAK, de onde se extraiu um valor médio de área imunopositiva por CGA em cada caso, em micrômetros quadrados (μ^2).

Para a avaliação da associação entre duas variáveis qualitativas foi 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. Três grupos foram comparados usando-se o modelo de análise da variância com um fator (ANOVA) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Nessas comparações foi usado ainda o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo-se o peso ao nascer como covariável. Os dados relativos à variável TWEAK foram submetidos a transformação por raiz quadrada. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição com o parecer nº 2534.141/2011-06.

Resultados

A idade gestacional deste estudo variou de 27 a 39 semanas com média de 36,06 (+-4,1) semanas. Havia cinco crianças prematuras (idade gestacional abaixo de 37 semanas) e o restante da amostra foi de recém-nascidos a termo (idade gestacional acima de 37 semanas). O peso das crianças variou desde 1260g a 5700g com média de 2956g (+-1277g). O pH no sangue arterial de cordão umbilical variou de 6,7 a 7,4 com média de 6,99 (+-0,25). A média do índice de Apgar no primeiro minuto foi de 4 (+-3,6) com variação de 0 a 8 e no quinto minuto a média foi de 5,7 (+-3,4) com variação de 0 a 9. (vide tabela 1)

O tempo de vida variou de um a 28 dias com média de 8,7 dias. A principal doença de base nos grupos 1 e 2 foram as malformações e no grupo 3 as doenças relacionadas a prematuridade. A principal causa de morte dos casos deste estudo foi a hipóxia perinatal.

Tabela 1: Dados clínicos da amostra (peso ao nascer em gramas, pH do sangue arterial do cordão umbilical, idade gestacional em semanas, Apgar do primeiro e do quinto minuto) são comparados entre os três grupos (1 – recém-nascidos com cardiopatia congênita, 2 – recém-nascidos com outras malformações não cardíacas e 3 – recém-nascidos sem qualquer malformação)

	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Peso ao nascer	Cardiopatia	11	2585	2640	600	5700	1277	<0,001
	Malformações	52	1768	1805	400	3475	766	
	Outras	76	1429	1180	495	3615	852	
PH	Cardiopatia	9	6,99	6,90	6,70	7,40	0,25	0,580
	Malformações	25	7,02	7,00	6,60	7,30	0,20	
	Outras	59	7,06	7,10	6,20	7,59	0,24	
IG em semanas	Cardiopatia	15	36,1	38,0	27,0	39,0	4,1	<0,001
	Malformações	54	33,3	33,0	24,0	42,0	4,0	
	Outras	85	31,3	30,0	24,0	41,0	4,7	
APGAR1	Cardiopatia	9	4,0	2,0	0,0	8,0	3,6	0,180
	Malformações	54	2,8	2,0	0,0	9,0	2,3	
	Outras	81	4,0	3,0	0,0	10,0	3,1	
APGAR 5	Cardiopatia	9	5,7	5,0	0,0	9,0	3,4	0,014
	Malformações	54	4,3	4,5	0,0	10,0	2,7	
	Outras	81	5,9	6,0	0,0	10,0	3,1	

Legenda: Peso ao nascer em gramas; IG: idade gestacional em semanas; APGAR 1: Apgar no primeiro minuto; APGAR 2: Apgar no segundo minuto; * Nessas comparações foi usado o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo-se o peso ao nascer como covariável.

Tabela 2: Comparação do peso ao nascer, idade gestacional e Apgar do quinto minuto nos três grupos do estudo (1 – recém-nascidos com cardiopatia congênita, 2 – recém-nascidos com outras malformações não cardíacas e 3 – recém-nascidos sem qualquer malformação).

Grupos	Valor de p ^{**}		
	Peso ao nascer (gramas)	IG (semanas)	APGAR 5
Malformações cardíacas x outras malformações	0,005	0,029	0,197
Malformações cardíacas x não malformados	<0,001	<0,001	0,881
Outras malformações x não malformados	0,030	0,012	0,004

Legenda: APGAR 5 = Apgar do quinto minuto de vida; IG idade gestacional. ^{**}ANCOVA ajustada para o peso ao nascer (covariável), p<0,05

Quando comparamos o grupo de recém-nascidos com cardiopatias congênicas (grupo 1) com os outros dois grupos (grupo 2 e 3), observou-se diferença significativa no que se refere ao peso e idade gestacional. Não foi encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de recém-nascidos cardiopatas (grupo 1) quando comparados aos grupo 2 e 3, no que se refere ao pH sanguíneo ao nascimento, e índice de Apgar do primeiro e quinto minuto, causa de morte e doença de base (tabelas 1 e 2).

Tabela 3: Comparação da imunoexpressão tecidual do TWEAK nos três grupos do estudo (1 – recém-nascidos com cardiopatia congênita, 2 – recém-nascidos com outras malformações não cardíacas e 3 – recém-nascidos sem qualquer malformação).

Grupos	TWEAK*						Valor de p ^{**}
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Malformações cardíacas	14	8,94%	6,39%	1,46%	26,98%	7,56%	
Outras malformações	53	4,76%	3,16%	0,57%	26,57%	4,75%	
Não malformados	84	6,54%	4,81%	0,07%	30,32%	6,25%	0,028

*Os dados de TWEAK foram submetidos a uma transformação por raiz quadrada

^{**}ANCOVA ajustada para o peso ao nascer (covariável), p<0,05

Ao comparar-se a média de imunexpressão tecidual TWEAK entre os três grupos, encontrou-se maior expressão deste biomarcador no grupo 1 quando comparado aos demais, como demonstra a tabela 3. A figura 1 demonstra a imunexpressão tecidual do biomarcador anti-TWEAK.

Observou-se ainda que os recém-nascidos cardiopatas (grupo 1) têm tempo de sobrevivência maior, quando comparado aos grupos 2 e 3 ($p = 0,004$).

As características do grupo de recém-nascidos com cardiopatias congênitas estão demonstradas na tabela 4.

Tabela 4: Características do grupo (1) de recém-nascidos com cardiopatias congênitas.

PACIENTE	SEXO	PESO	pH	IG	APGAR 1	APGAR 5	TIPO DE MALFORMAÇÃO CARDÍACA
1	M	2930		38			TGA, DSA, SHCE
2	M	5700	6,8	38	8	9	TGA
3	M			39			PCA
4	F	2580	7	39	8	9	SHCE
5	F		6,9	38			TAU, SHCE, HVD
6	M	1260	6,9	27	1	3	DSV
7	M	3090		39	7	9	PCA, CoAo
8	M	2640	6,9	38			VU tipo direito, DSA, Hao, PCA
9	F	2050	6,9	36	2	3	CoAo
10	M	2700	6,7	38			DSA, AT, Hipo. VD
11	F	2750	7,4	38			DSA
12	F	600	7,4	27	1	4	DSA, PCA
13	F	2140		36	0	0	AT, EP
14	M			32	1	5	ET, EP
15	F			38	8	9	Ag de Ao; PCA; DSA

Legenda: Peso ao nascer em gramas IG: idade gestacional em semanas; APGAR 1: Apgar no primeiro minuto; APGAR 2: Apgar no segundo minuto; TGA: transposição das grandes artérias; DSA: defeito do septo atrial; SHCE: síndrome do coração esquerdo hipoplásico; PCA: persistência do canal arterial; TAU: tronco arterial único; HVD: hipertrofia de ventrículo direito; DSV: defeito do septo ventricular; CoAo: coarctação de aorta; VU: ventrículo único; Hao: hipoplasia de aorta; AT: atresia tricúspide; Hipo VD: hipoplasia coração direito; ET: estenose tricúspide; EP: estenose pulmonar; Ag de Ao: agenesia de aorta.

Figura 1 - Fotomicrografia de amostra histológica de miocárdio de ventrículo esquerdo imunocorada com anti-TWEAK demonstrando forte coloração castanha citoplasmática, característica de imunopositividade, aumento de 200x.



Discussão

A hipóxia pode ser definida como inadequada oxigenação tecidual em nível celular. De todos os estresses a que o feto e o recém-nascido estão sujeitos, o mais relevante e clinicamente importante é a hipóxia. ⁽¹³⁾ Como os cardiomiócitos do coração fetal e neonatal reagiriam a esta privação de oxigênio ainda está por ser respondido. Há relato que a resposta à privação de oxigênio varia com as espécies e com o tempo de vida em animais. ⁽¹⁴⁾ As doenças cardiovasculares têm importante impacto na saúde da população e na expectativa de vida. Existe pouco conhecimento de como a hipóxia que o recém-nascido sofreu no período perinatal poderia interferir em seu prognóstico em curto prazo e na sua vida adulta.

A hipóxia pode estar envolvida na gênese das malformações cardíacas congênitas. A literatura demonstrou alterações na formação do trofoblasto podem impedir adequada oferta de oxigênio ao feto nas fases iniciais de desenvolvimento, resultando em cardiopatias. Além disso, outros estímulos capazes de reduzir o fluxo sanguíneo placentário também podem estar envolvidos na gênese das cardiopatias

congenitas. ⁽⁹⁾ Estes fatos também foram demonstrados por Gaber Naila et al 2013 em seu estudo com casos de hipoplasia do coração esquerdo, onde foi observado que o feto que sofre hipóxia em períodos iniciais da embriogênese pode apresentar reprogramação genética e parada do crescimento de vasos sanguíneos e da replicação de cardiomiócitos. ⁽¹⁵⁾

Uma pesquisa realizada no Reino Unido detectou que a causa de morte por malformações congênitas foi de 21% em 1909 e de 19% em 2009. Neste período houve diminuição de aproximadamente 20 vezes a mortalidade geral por outras causas, já a taxa de mortalidade neonatal por malformações congênitas permaneceu estável. Nesta mesma pesquisa, em 1909 houve 5% de óbito por malformação cardíaca e 10% em 2009, mas este aumento parece estar relacionado ao fato de que no século passado não se conheciam doenças como as cardiomiopatias e sua incidência na população. ⁽¹⁶⁾

As cardiopatias congênitas ocorrem esporadicamente na população com taxa aproximada de 0,08%. Quando um dos pais é afetado, especialmente a mãe, esta probabilidade pode chegar a 5%. As causas das cardiopatias congênitas são multifatoriais e a sua prevalência difícil de quantificar, mas quando associadas a síndromes genéticas, a incidência podem chegar a 98%, como na síndrome de Edwards. ⁽¹⁷⁾

O TWEAK é uma citocina pró-inflamatória pertencente à família do TNF α que controla diversas funções nos cardiomiócitos, como estimulação da proliferação celular, migração, diferenciação, angiogênese e processo inflamatório. ^{(8), (18)} Age se ligando ao receptor transmembrana *fibroblast growth factor-inducible molecule 14* (Fn14) ou ao receptor *Death Receptor-3* (DR3). Descobertas recentes demonstraram que o TWEAK é um regulador positivo da proliferação de cardiomiócitos atuando via seu receptor Fn14. A estimulação gerada por ele em cardiomiócitos ativa *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) e *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3) e inibe a *glycogen synthase kinase-3 beta* (GSK-3beta), permitindo a proliferação. A via de ativação através do receptor Fn14 é a canônica ou via clássica. Esta via preferencialmente conduz para sobrevivência, diferenciação e ativação celular. ^{(10), (19), (20)} Ao contrário do que ocorre em cardiomiócitos de recém-nascidos, a estimulação do TWEAK não induz a síntese do DNA em cardiomiócitos adultos, o que pode ser justificado pela diminuição da expressão de

Fn14 depois do nascimento. ⁽¹⁰⁾ Sendo assim, a expressão aumentada do TWEAK pode sinalizar a proliferação celular de cardiomiócitos. Estudos demonstram que o TWEAK pode ter diversas funções como regulação do crescimento microvascular, remodelamento com estímulos de sobrevivência celular e diferenciação/ativação celular dependendo do contexto angiogênico. ⁽²⁰⁾ No estudo de Chen Hui-Na et al 2012 em ratos, foi encontrado que o TWEAK/Fn14 pode promover a proliferação e a síntese de colágeno pelos fibroblastos cardíacos pelo aumento de metaloproteinase 9. Sendo assim, o TWEAK/Fn14 estaria envolvido na fibrose miocárdica. ⁽¹⁸⁾

A ligação do TWEAK com o receptor transmembrana DR3 estimula a via das caspases, também conhecida como via não canônica, e que tem como efeito final a apoptose celular. A estimulação do receptor DR3 pode utilizar a via do *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) e *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) tanto na via canônica como na não canônica. ^{(19), (20)} A ação pelo receptor DR3 parece ficar atuante em situações que o receptor Fn14 não existe.

Nesta pesquisa o biomarcador TWEAK apresentou imunoexpressão mais elevada no grupo de recém-nascidos com cardiopatia congênita, independente da gravidade das cardiopatias, que variaram de simples defeito do septo atrial ou coarctação de aorta até cardiopatias complexas como atresia tricúspide, síndrome de hipoplasia do coração esquerdo e transposição das grandes artérias. Cabe salientar que nesta pesquisa todos os recém-nascidos apresentavam em comum a hipóxia, independente de serem portadores de cardiopatia congênita ou não.

Dados preliminares dão conta de que os genes TWEAK e Fn14 são expressos em baixos níveis em muitos tecidos, mas estão com expressão aumentada em tecidos lesados. O Fn14 é induzido por fatores de crescimento e se encontra alto em tecidos lesados como, por exemplo, tecidos com isquemia. ^{(21), (22)} Outros estudos têm descrito níveis sanguíneos elevados de TWEAK em pacientes com eventos circulatórios agudos como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Porém, em doenças cardiovasculares onde existe processo inflamatório e diminuição de fluxo sanguíneo como na doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca sistólica, doença arterial periférica e aneurisma da aorta abdominal, o TWEAK está diminuído. ⁽²³⁾ No estudo de Jain et al 2009, o TWEAK circulante apareceu superregulado em pacientes com cardiomiopatia dilatada quando comparado com pacientes com insuficiência cardíaca de causa conhecida e os controles. ⁽²⁴⁾ Por outro lado, no estudo de Pachel et al 2013 realizado em ratos, a

administração de uma variante recombinante de TWEAK solúvel (sTWEAK) em infarto não reperfundido resultou em mortalidade mais alta e aumento da incidência de ruptura.⁽²⁵⁾ Richter et al 2010 observaram que a baixa concentração de TWEAK está associada a pior prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca de origem não isquêmica. Isto nos leva a especular que o TWEAK aumentado nos casos de recém-nascidos cardiopatas pode ser consequência de um miocárdio lesado e com grave disfunção devido à própria malformação. Ou ainda, este aumento de TWEAK pode estar representando um grau de hipóxia miocárdica adicional nestes casos com malformação cardíaca, devido ao distúrbio funcional que a cardiopatia congênita acarreta, mesmo que os nossos resultados referentes aos parâmetros de hipóxia sistêmica clínica (pH e Apgar) não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativos entre os grupos.⁽²⁶⁾

Outra observação interessante é que em gestantes com diabetes gestacional foi observada diminuição da concentração de TWEAK circulante em comparação com gestantes sem diabetes. A concentração de TWEAK pode ser o principal determinante da alta resistência à insulina na gestação.⁽²⁷⁾ Isto nos leva a especular sobre influência do diabetes na gênese das cardiopatias e sua relação com os níveis de TWEAK, uma vez que está estabelecido na literatura que os filhos de mães diabéticas têm maior incidência de cardiopatias congênitas (28) sendo que em nosso estudo observamos um aumento da imunexpressão tecidual de TWEAK em recém-nascidos com cardiopatia congênita. A alta expressão de TWEAK poderia, neste caso, ser a causa da malformação cardíaca, e não consequência dela. Esta hipótese é pouco provável visto que a formação do coração é muito precoce na vida intrauterina e que este aumento de TWEAK foi encontrado em corações de recém-nascidos com idades gestacionais variando entre 27 a 39 semanas. Além disso, não encontramos diminuição do TWEAK como visto em mães diabéticas, e sim aumento do mesmo.

Esta pesquisa apresenta limitações ao demonstrar que a imunexpressão tecidual do TWEAK está aumentada em recém-nascidos portadores de cardiopatias congênitas, já que não foi possível isolar este resultado de um fator comum entre os recém-nascidos deste grupo 1, que é o distúrbio hemodinâmico e funcional do coração relacionado com o defeito cardíaco. Desta maneira não podemos afirmar se o TWEAK está aumentado nos portadores de cardiopatia devido à malformação cardíaca em si, isto é, se é a causa da malformação observada, ou se o TWEAK

apresentou maior aumento neste grupo por ser cronicamente exposto a distúrbios funcionais, sendo assim, sua maior imunoexpressão, a consequência do defeito cardíaco. Nesta última hipótese, a qual seria a mais provável, a via de ativação do TWEAK seria a canônica (Fn14), a fim de desencadear proliferação e diferenciação celular, gerando hipertrofia na adaptação miocárdica frente ao distúrbio funcional.⁽²⁹⁾

Não foram encontrados na literatura médica pesquisada estudos que pudessem auxiliar na elucidação dos questionamentos de como o TWEAK age e qual seria a sua função no coração de recém-nascidos que sofreram hipóxia, com ou sem defeitos congênitos.

Conclusão:

O grupo de recém-nascidos hipoxêmicos portadores de cardiopatia congênita apresentou maior imunoexpressão tecidual do biomarcador TWEAK. Este aumento provavelmente ocorreu por exposição crônica a distúrbios funcionais.

Referências Bibliográficas

1. Ottaviani G, Lavezzi AM, Rossi L, Matturri L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis in hyperacute and acute myocardial infarction. *Eur J Histochem*1999;43(1):7-14.
2. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*1998 Jul 13;83(1):1-14.
3. Marino TA, Haldar S, Williamson EC, Beaverson K, Walter RA, Marino DR, et al. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. *Circ Res*1991 Nov;69(5):1353-60.
4. Reich JD, Campbell R. Myocardial infarction in children. *Am J Emerg Med*1998 May;16(3):296-303.
5. Morrison JL, Botting KJ, Dyer JL, Williams SJ, Thornburg KL, McMillen IC. Restriction of placental function alters heart development in the sheep fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*2007 Jul;293(1):R306-13.
6. Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*2005 Jun;57(6):796-800.
7. Bishop SP. The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. *Toxicol Pathol*1990;18(4 Pt 1):438-53.
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)*2010 Oct;119(7):273-82.
9. Webster WS, Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*2007 Sep;81(3):215-28.
10. Novoyatleva T, Diehl F, van Amerongen MJ, Patra C, Ferrazzi F, Bellazzi R, et al. TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*2010 Mar 1;85(4):681-90.
11. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*2003 Jun-Aug;14(3-4):241-9.
12. 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.
13. Reynolds EO. Hypoxia in the newborn infant. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*1977;11:134-41.

14. Ost'adal B, Ost'adalova I, Skarka L, Kolar F, Kopecky J. Ischemic injury of the developing heart. *Exp Clin Cardiol*2002 Fall;7(2-3):93-8.
15. Gaber N, Gagliardi M, Patel P, Kinnear C, Zhang C, Chitayat D, et al. Fetal reprogramming and senescence in hypoplastic left heart syndrome and in human pluripotent stem cells during cardiac differentiation. *Am J Pathol*2013 Sep;183(3):720-34.
16. Pryce JW, Weber MA, Ashworth MT, Roberts S, Malone M, Sebire NJ. Changing patterns of infant death over the last 100 years: autopsy experience from a specialist children's hospital. *J R Soc Med*2011 Mar;105(3):123-30.
17. Drose JA. Mapeamento: indicações e técnica. *Ecocardiografia Fetal*. Rio de Janeiro2001.
18. Chen HN, Wang DJ, Ren MY, Wang QL, Sui SJ. TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF-small ka, CyrillicB pathway. *Mol Biol Rep*2012 Aug;39(8):8231-41.
19. Mustonen E, Sakkinen H, Tokola H, Isopoussu E, Aro J, Leskinen H, et al. Tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and its receptor Fn14 during cardiac remodelling in rats. *Acta Physiol (Oxf)*2010 May;199(1):11-22.
20. <http://qiagen.com/br/products%20and%20pathways>, maio/2015.
21. Fick A, Lang I, Schafer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, et al. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem*2011 Jan 2;287(1):484-95.
22. Cheng E, Armstrong CL, Galisteo R, Winkles JA. TWEAK/Fn14 Axis-Targeted Therapeutics: Moving Basic Science Discoveries to the Clinic. *Front Immunol*2013;4:473.
23. Blanco-Colio LM. TWEAK/Fn14 Axis: A Promising Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front Immunol*2014;5:3.
24. Jain M, Jakubowski A, Cui L, Shi J, Su L, Bauer M, et al. A novel role for tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in the development of cardiac dysfunction and failure. *Circulation*2009 Apr 21;119(15):2058-68.
25. Pachel C, Mathes D, Bayer B, Dienesch C, Wangorsch G, Heitzmann W, et al. Exogenous administration of a recombinant variant of TWEAK impairs healing after myocardial infarction by aggravation of inflammation. *PLoS One*2013;8(11):e78938.
26. Richter B, Rychli K, Hohensinner PJ, Berger R, Mortl D, Neuhold S, et al. Differences in the predictive value of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in advanced ischemic and non-ischemic heart failure. *Atherosclerosis*2010 Dec;213(2):545-8.

27. Simon-Muela I, Llaurodo G, Chacon MR, Olona M, Naf S, Maymo-Masip E, et al. Reduced circulating levels of TWEAK are associated with gestational diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2015 Jan;45(1):27-35.
28. Abu-Sulaiman RM, Subaih B. Congenital heart disease in infants of diabetic mothers: echocardiographic study. *Pediatr Cardiol* 2004 Mar-Apr;25(2):137-40.
29. Ren MY, Sui SJ. The role of TWEAK/Fn14 in cardiac remodeling. *Mol Biol Rep* 2012 Nov;39(11):9971-7.

5. CONCLUSÕES DA PESQUISA

Os biomarcadores angiotensina II, Akt2 e Akt3 apresentaram imunexpressão tecidual em amostras de miocárdio de recém-nascidos hipoxêmicos.

O biomarcador Akt1 apresentou expressão tecidual baixa ou ausente nas amostras de recém-nascidos hipoxêmicos.

Não houve correlação entre a imunexpressão tecidual dos biomarcadores acima e os dados clínicos e anamopatológicos da amostra.

O grupo de recém-nascidos hipoxêmicos portadores de cardiopatia congênita apresentou maior imunexpressão tecidual do biomarcador TWEAK. Este aumento provavelmente ocorreu por exposição crônica a distúrbios funcionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

1. Moore KT. Sistema Cardiovascular. Embriologia Clínica. Rio de Janeiro 2008. p. 290-338.
2. Ottaviani G, Lavezzi AM, Rossi L, Matturri L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis in hyperacute and acute myocardial infarction. Eur J Histochem1999;43(1):7-14.
3. Marino TA, Haldar S, Williamson EC, Beaverson K, Walter RA, Marino DR, et al. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. Circ Res1991 Nov;69(5):1353-60.
4. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. Circ Res1998 Jul 13;83(1):1-14.
5. Reich JD, Campbell R. Myocardial infarction in children. Am J Emerg Med1998 May;16(3):296-303.
6. Morrison JL, Botting KJ, Dyer JL, Williams SJ, Thornburg KL, McMillen IC. Restriction of placental function alters heart development in the sheep fetus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol2007 Jul;293(1):R306-13.
7. Procianoy RS, Silveira RC. Hypoxic-ischemic syndrome. J Pediatr (Rio J)2001 Jul;77 Suppl 1:S63-70.
8. Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol2008 Aug;295(2):R583-95.
9. Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. Pediatr Res2005 Jun;57(6):796-800.
10. Bishop SP. The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. Toxicol Pathol1990;18(4 Pt 1):438-53.
11. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol2007 Jan;292(1):C82-97.
12. 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) Oct;119(7):273-82.
13. Mel'nikova NP, Timoshin SS, Jivotova EY, Pelliniemi LJ, Jokinen E, Abdelwahid E. Angiotensin-II activates apoptosis, proliferation and protein synthesis

in the left heart ventricle of newborn albino rats. *Int J Cardiol* 2006 Sep 20;112(2):219-22.

14. Sandgren J, Scholz TD, Segar JL. Angiotensin II Modulation of Cardiac Growth and Remodeling in Immature Fetal Sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* Mar 25;ajpregu 00034 2015.

15. 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):381-8.

16. Novoyatleva T, Diehl F, van Amerongen MJ, Patra C, Ferrazzi F, Bellazzi R, et al. TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res* Mar 1;85(4):681-90.

7. ANEXOS

7.1 ARTIGO 3

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 sobrevivida dos recém-nascidos.

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

Titulo do artigo resumido: Fatores associados à sobrevivida 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) Lúcia 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 em 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 a óbito no período neonatal. Foram selecionados 314 casos de um banco de necropsias pediátricas e analisadas as causas de mortes evitáveis, o tempo de sobrevida, o gênero, o peso, a idade gestacional, a índice de Apgar do 1^o e do 5^o minuto, a cianose, a acidose, a aspiração meconial, a necessidade de reanimação com oxigênio, as causas da morte e doença básica. Para a comparação dos 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 os grupos em relação ao tempo de sobrevida foi feita através do teste de Log-rank.

Resultados: Observou-se que quando se utiliza apenas a causa da morte, 300 casos (95,54%) seriam de causas evitáveis, porém quando se analisa a doença básica o número de casos diminuiu para 209 (66,56%). A hipóxia foi a causa mais frequente de morte (85%) e o dano alveolar difuso a causa básica (52,9%). Houve associação positiva 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.

1. INTRODUÇÃO

A redução da taxa de mortalidade infantil é uma meta em todos os países do mundo, inclusive no Brasil. ⁽¹⁾

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.

2. MÉTODO

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 de 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.

Das 1837 necropsias neonatais, analisou-se 483 (26,3%) necropsias de recém-nascidos que foram a óbito até 28 dias de vida pós-natal (“neo-mortos”). Foram incluídos neste estudo todos os casos com necropsias completas (análise, laudo macroscópico e laudo microscópico), cujos prontuários apresentavam todos os dados analisados neste estudo. Sendo assim foram selecionados 314 casos para a análise dos quais foram coletados o peso ao nascer, a idade gestacional, o gênero, o índice de Apgar do primeiro, o índice de Apgar do quinto minuto, a presença ou não de acidose, a presença ou não de cianose, sinais clínicos de aspiração meconial, a necessidade de reanimação com oxigênio, a causa da morte e a doença básica.

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

Foram consideradas como causas evitáveis de óbito as causas contidas na Lista de Causas Evitáveis do Ministério da Saúde do Brasil ² para crianças menores de cinco anos de idade.

Quadro 1 - Lista de causas de mortes evitáveis em menores de cinco anos de idade do Ministério da Saúde do Brasil ²

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 gênero, peso ao nascer, idade gestacional, índice de Apgar do primeiro minuto, índice de Apgar 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 no período neonatal a fim de analisarmos possíveis fatores de risco. Os dados de acidose

foram divididos em dois grupos, se presente ou ausente. A presença de acidose foi considerada quando o pH do sangue arterial era igual ou menor a 7,2.

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

A idade gestacional dos recém-nascidos 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 outro grupo constituído por idade gestacional superior a 37 semanas.

Para a comparação entre os grupos em relação à sobrevivência 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 sobrevivência dos recém-nascidos foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson. Para descrever o tempo de sobrevivência foram construídas curvas de Kaplan-Meier. A comparação entre os 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.

3. RESULTADOS

Observou-se que 300 casos (95,54%) seriam de causas evitáveis. Foi utilizada a Lista de Causas Evitáveis de Mortes em menores de cinco anos observadas no quadro 1² como referência. Porém, analisando-se a causa morte e a doença básica verificada pela necropsia, provavelmente 209 casos (66,56%) seriam de causas evitáveis. Estes dados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Causas da morte e doenças de base

CAUSA DA MORTE	N	DOENÇA BASICA	N
HIPOXIA PERINATAL	267	DANO ALVEOLAR DIFUSO	169
		HIPOPLASIA PULMONAR	49
		MALFORMAÇÃO CEREBRAL	12
		MALFORMAÇÕES MULTIPLAS	12
		ERITROBLASTOSE FETAL	10
		MALFORMAÇÃO CARDIACA	4
		GASTROSQUISE	4
		KERNICTERUS	2
		SOFRIMENTO FETAL AGUDO	1
		SOFRIMENTO FETAL CRONICO	1
		PLACENTA PREVIA	1
		CIRCULAR DE CORDAO APERTADA	1
		HIDROPSIA FETAL	1
INFECÇÃO	31	BRONCOPNEUMONIA	7
		MALFORMAÇÃO CARDIACA	6
		BRONCOASPIRAÇÃO	6
		PERITONITE	5
		MALFORMAÇÃO INTESTINAL	2
		ENTEROCOLITE NECROTIZANTE	2
		SEPSE FUNGICA	1
		GASTROSQUISE	1
		ONFALOCELE	1
		ICC	11
OUTROS	5	TOCOTRAUMATISMO	1
		MORTE SUBITA DO LACTENTE	1
		CALCIFICAÇÃO IDIOPATICA ARTERIAL	1
		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, gênero, índice de Apgar do 1^o e do 5^o minuto, presença ou ausência de acidose, presença ou ausência de cianose, presença ou ausência de sinais de aspiração meconial e necessidade de reanimação com oxigênio obtiveram-se os resultados demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 Características epidemiológicas, clínicas 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	PRESENTE	42	14,6
MECONIAL	AUSENTE	246	85,4
REANIMAÇÃO COM	NECESSARIO	263	87,4
OXIGENIO	NÃO NECESSARIO	38	12,6

Não houve diferença estatisticamente significativa quando a sobrevida dos recém-nascidos foi comparada ao gênero ($p=0,488$), 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 (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 dos recém-nascidos ($p< 0,001$) e está demonstrado nos gráficos 1, 2 e 3.

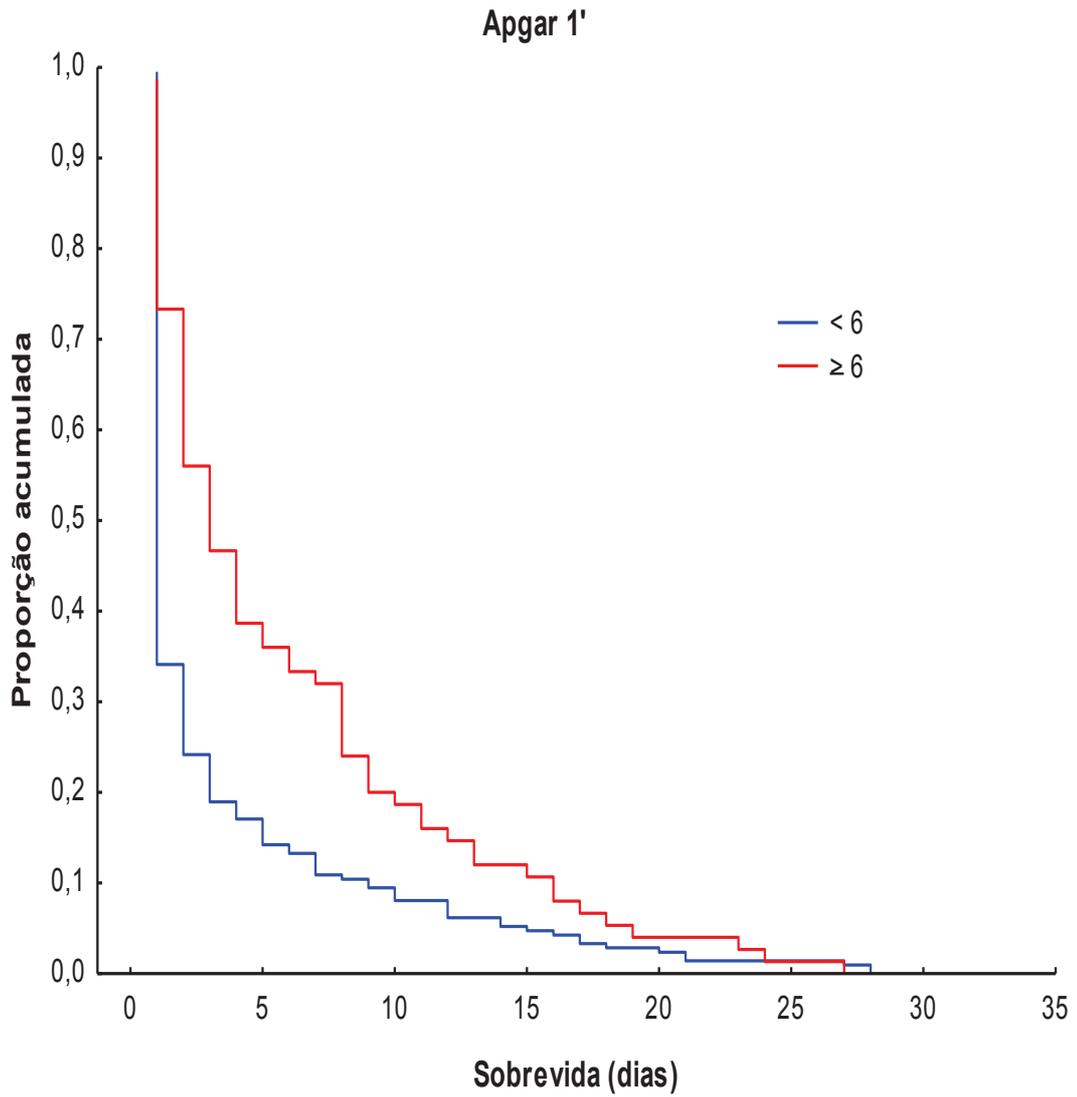


Gráfico 1 - Relação entre o índice de Apgar do 1^o minuto <6 e a sobrevida dos recém-nascidos.

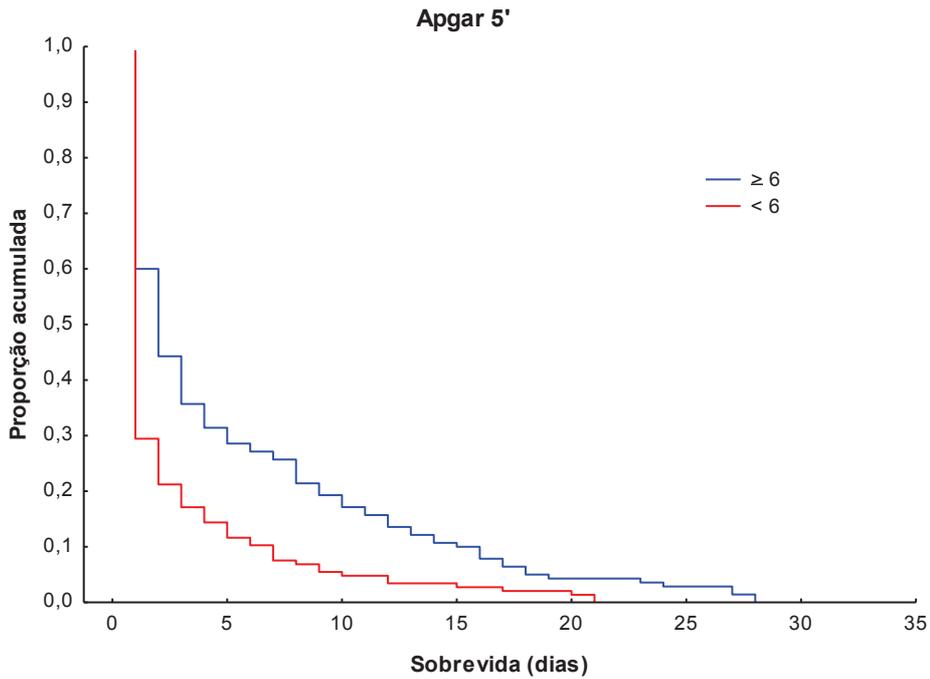


Gráfico 2- Relação entre o índice de Apgar do 5^o minuto <6 e a sobrevida dos recém-nascidos.

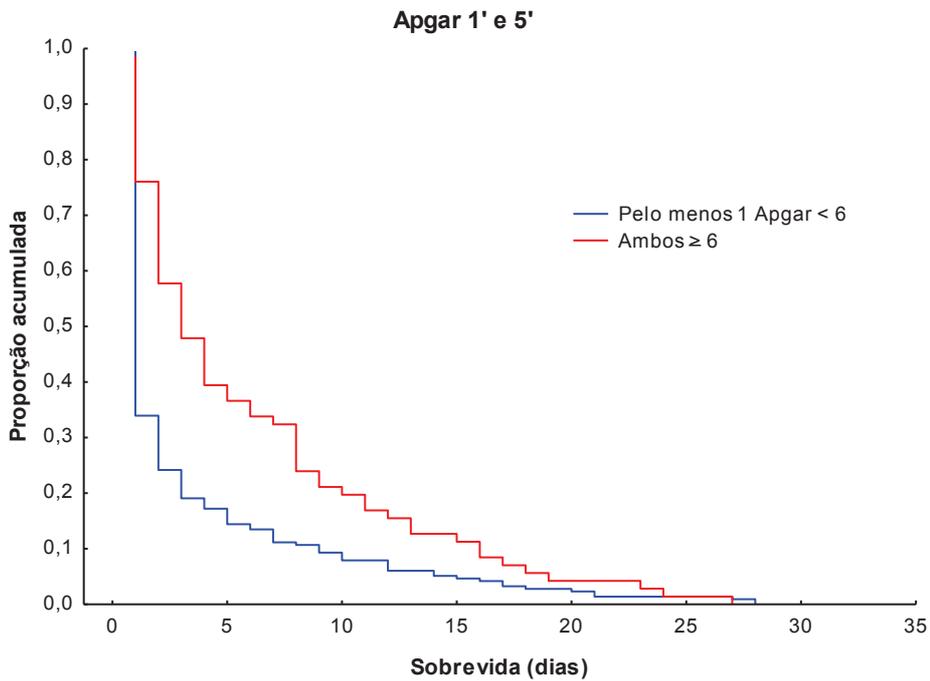


Gráfico 3 - Relação entre os índice de Apgar do 1^o e/ou do 5^o minuto <6 e a sobrevida dos recém-nascidos

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 recém-nascidos ($p<0,001$).

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

4. DISCUSSÃO

A importância do exame anatomopatológico pós-morte já é bem conhecido. Estudos de necropsia são importantes na identificação dos fatores causadores da morte e servem como controle da qualidade da avaliação diagnóstica e do tratamento realizado. ⁽³⁾

Nesta pesquisa foi encontrado que, quando considerada apenas a causa da morte, 95,54% de mortes eram de causas evitáveis, porém se considerarmos a causa da morte e a doença básica encontrada na necropsia, 66,56% poderiam ser considerados de causas evitáveis.

Para interferir no processo de morte faz-se necessário conhecer os fatores que levam ao óbito neonatal e dessa forma identificar as mortes evitáveis. ⁽⁴⁾ 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 momento. ⁽²⁾

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 consequentemente redução destas mortes. ⁽²⁾

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

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 neonatal. ⁽⁵⁾

Os recém-nascidos são classificados segundo a sua idade gestacional. São classificados como prematuros aqueles que completaram menos de 37 semanas de idade gestacional ou menos de 259 dias contados a partir da data da última menstruação. ⁽⁶⁾ Os estudos demonstram que os recém-nascidos apresentam maior susceptibilidade a eventos adversos. As consequências da prematuridade refletem tanto a imaturidade de seus órgãos e sistemas, quanto às intensivas intervenções necessárias à sua sobrevivência. ⁽⁷⁾

Aproximadamente 12% de todos os nascimentos nos Estados Unidos são prematuros, e aproximadamente 2% com menos de 32 semanas de gestação. ⁽⁶⁾ A prematuridade é uma das principais causas de internação hospitalar, morbidade e mortalidade de recém-natos. ^b 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 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 profunda (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⁾

No estudo anatomopatológico 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 timo. ⁽¹⁰⁾

De todos os estresses a que o bebê está sujeito, provavelmente o mais importante e clinicamente relevante é a hipóxia. ⁽¹¹⁾ Esta pode ser definida como

sendo uma inadequada oxigenação em nível celular, na maioria das vezes representada pela presença de cianose. ⁽¹²⁾

As causas de hipóxia perinatal de maior importância são aquelas relacionadas às falhas na adaptação natural do sistema cardiovascular e respiratório. As mais comuns são: 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 vida. ⁽⁸⁾

As sequelas de um evento hipoxêmico dependem da intensidade 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. O índice de Apgar é um dos parâmetros mais usados e que pode estar baixo sem que o recém-nascido prematuro tenha apresentado acidose fetal. ⁽¹³⁾ 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 devesse ser utilizado quando ocorre acidemia metabólica ou mista profunda ($\text{pH} < 7$) em sangue arterial do cordão umbilical, índice de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos, manifestações neurológicas neonatais (convulsões, coma ou hipotonia) e disfunção orgânica multissistêmica (ex: sistema cardiovascular). ⁽¹⁴⁾

Outro conceito para definição de asfixia utilizado é o de Buonocore et al 2002, que utiliza os seguintes parâmetros: pH do cordão $< 7,2$, índice de 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 Neonatologia. ⁽¹⁴⁾

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, presença de mecônio e acidose não se associaram ao tempo de

sobrevida dos recém-nascidos. 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 mostraram-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 dominante. ⁽¹⁵⁾

Geib et al (2010) apontou como determinantes de mortalidade neonatal o gênero masculino, a prematuridade, o baixo peso ao nascer e o índice de Apgar inferior a sete no primeiro e quinto minuto de vida. ⁽¹⁶⁾

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. O índice de Apgar do primeiro minuto não foi considerado útil como preditor do risco de morte. ⁽¹⁷⁾

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 sobrevida dos recém-nascidos. Em pesquisa realizada sobre parâmetros laboratoriais demonstrou-se que o pH foi um fraco preditor de morte em recém-nascidos de muito baixo peso. ⁽¹⁸⁾

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 asfixia. ⁽¹⁹⁾

Encontrar respostas para a morte precoce e fatores que possam ser observados no intuito de preservar a vida é de suma importância.

5. CONCLUSÕES

A incidência de causas evitáveis de morte é provavelmente menor quando analisada concomitantemente com a doença básica.

A cianose, idade gestacional, causa do óbito, índice de Apgar abaixo de 6 e valor do pH do sangue arterial estão associados ao tempo de sobrevivência de recém-nascidos da amostra estudada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, Metze B, Walch E, Buhner 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.

7.2 COMPROVANTE DE ENVIO PARA PUBLICAÇÃO



RSP Revista de
Saúde Pública

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

7.3 CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



CEP/HC/UFPR

Curitiba, 04 de julho de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Francisco Cesar Pabis
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: "AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES DE CRESCIMENTO CELULAR 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.

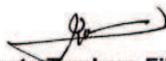
O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0139.0.208.000-11
Registro CEP: 2534.141/2011-06

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,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR