

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE
DE NEUTRÓFILOS EM RECÉM-
NASCIDOS ICTÉRICOS ANTES E APÓS A
FOTOTERAPIA

TESE DE DOUTORADO

FABRÍZIA RENNÓ SODERO FAULHABER

PORTO ALEGRE, BRASIL, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE
EXPRESSÃO DE MARCADORES DE
SUPERFÍCIE DE NEUTRÓFILOS EM RECÉM-
NASCIDOS ICTÉRICOS ANTES E APÓS A
FOTOTERAPIA

FABRÍZIA RENNÓ SODERO FAULHABER

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia dos Santos Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Soibermann Procianoy

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

PORTO ALEGRE, BRASIL, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Faulhaber, Fabrícia Rennó Sodero

Expressão de Marcadores de Superfície de neutrófilos em recém-Nascidos Ictéricos Antes e Após a Fototerapia / Fabrícia Rennó Sodero Faulhaber. -- 2017.

181 f.

Orientadora: Rita de Cássia dos Santos Silveira.

Coorientadora: Renato Soibermann Procianoy.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Neutrófilos. 2. recém-nascido. 3. Icterícia. 4. CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64, CD99acde. I. Silveira, Rita de Cássia dos Santos, orient. II. Procianoy, Renato Soibermann, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

20/12/2017

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Lauro José Gregianin

Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Andréa Lúcia Corso

Departamento de Pediatria e Puericultura

Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Dra. Luciana Teixeira Fonseca

Grupo Hospitalar Conceição

DEDICATÓRIA

À minha filha Julia e ao meu marido Gustavo por darem sentido e felicidade à minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Professora Dra. Rita de Cássia Silveira. Obrigada pela paciência, disponibilidade, dedicação, incentivo, apoio e ensinamentos proporcionados a mim deste os tempos de residência. Sempre para mim um exemplo de profissionalismo, sucesso e determinação.

Ao meu marido, Gustavo, pelo seu amor, apoio, incentivo e exemplo. Obrigada por todo o estímulo, sendo meu marido, amigo e psiquiatra, e principalmente muito obrigada por todo carinho, dedicação e cuidado com a Julia enquanto escrevia esta tese.

À minha filha Julia, pela paciência enquanto escrevia esta tese, ao carinho, incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Aída, exemplos de responsabilidade, caráter, honestidade e integridade, pela dedicação, incentivo e amor proporcionados a mim desde a infância.

À minha querida sogra Denize Faulhaber que me acolheu tão maravilhosa em sua família, me tratando como filha, pelo incentivo e carinho constantes.

Ao meu querido sogro Marcelo Faulhaber pelo apoio e incentivo.

Às minhas irmãs Ana Carolina e Daniela, pelo amor, apoio e incentivo.

Aos meus amigos Ana Maria e Eduardo, pela constante amizade e apoio.

Ao Professor Dr. Renato Soibelman Procianoy, pela co-orientação da tese, pelo exemplo e pela confiança que depositou no meu trabalho.

À Nathalia, por todo carinho e competência no processamento e análise das citometrias.

À Rosane Blanguer, por todo apoio, disponibilidade e carinho.

Aos funcionários laboratório de hematologia do HNSC.

Aos médicos contratados Serviço de Neonatologia do HNSC, pela ajuda na captação dos pacientes, especialmente à Dra. Thelma Arnt.

À Nathalia Marcondes, por todo carinho e competência no processamento e análise das citometrias.

À Vania Naomi Hirakata e ao Gustavo Faulhaber pela ajuda e orientação na análise estatística.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela imprescindível participação neste estu

1. RESUMO

A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos a termo. O tratamento, quando necessário, é realizado através da fototerapia. Não existem estudos na literatura avaliando os efeitos da fototerapia na função dos neutrófilos de recém-nascidos. O melhor entendimento da função dos neutrófilos nos recém-nascidos antes e após a fototerapia seria importante para avaliar as possíveis repercussões na expressão dos neutrófilos desencadeadas pelo tratamento fototerápico. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a função dos neutrófilos, através da mensuração pela citometria de fluxo da expressão dos principais marcadores de superfície em recém-nascidos ictericos, antes e após 24 horas de fototerapia.

Metodologia: Foram incluídos recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g, que possuíam critérios da Academia Americana de Pediatria para tratamento fototerápico. Os critérios de exclusão foram: mal-formações congênitas, síndromes com alterações cromossômicas, erro inato do metabolismo, infecções do grupo STORCH, asfixia neonatal, sepse ou suspeita de sepse, exsanguineotransfusão, transfusão de hemocomponentes e uso de imunoglobulina. Foi realizada a avaliação de expressão da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, antes do início e após 24 horas do início da fototerapia. Foram utilizados o teste T de Student para análise dos dados.

Resultados: Foram incluídos 25 recém-nascidos no estudo, com idade mediana de 53 (27.5-75.5) horas de vida e bilirrubina média de 13.6 ± 2.85 mg/dL. Não houve diferença estatística na expressão de CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 e percentual de neutrófilos antes e após 24 horas de fototerapia. Ocorreu aumento da expressão de CD10

($p=0.038$) e CD16 ($p=0.017$) e redução da expressão de CD11c ($p=0.023$) e CD66acde ($p=0.004$) após 24 horas de fototerapia.

Conclusão: Os recém-nascidos submetidos ao tratamento fototerápico apresentaram aumento da expressão de CD10 e de CD16 e diminuição da expressão de CD11c e de CD66acde após 24 horas de exposição, que pode estar relacionado a um efeito anti-inflamatório da fototerapia nos recém-nascidos expostos a este tratamento.

Resumo: 325 palavras.

Descritores: neutrófilos; recém-nascido; icterícia; hiperbilirrubinemia; CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66acde.

2. ABSTRACT

Jaundice due to indirect hyperbilirubinemia affects more than 60% of term neonates. The treatment when necessary is carried out using phototherapy. There are no studies in the literature evaluating the effect of phototherapy on the function of neonates' neutrophils. A better understanding of the function of neutrophils in neonates before and after phototherapy would be important in order to assess potential effects on the expression of neutrophils triggered by the phototherapy treatment. The aim of this study was to assess and compare the function of neutrophils by measuring the expression of the main surface markers in icteric neonates, using flow cytometry, before and after 24 hours of phototherapy.

Methodology: Neonates at a gestational age ≥ 35 weeks and at a birth weight ≥ 2000 g who met the criteria of the American Academy of Pediatrics for phototherapy were included. The exclusion criteria were: congenital malformations, syndromes with chromosomal alterations, inborn errors of metabolism, infections of the STORCH group, neonatal asphyxia, sepsis or suspicion of sepsis, exchange transfusion, transfusion of blood components, and use of immunoglobulin. The evaluation of the MFI expression of CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66 was performed before and 24 hours after the initiation of phototherapy. The chi-square and Student T tests were used for data analysis.

Results: Twenty-five neonates were included in the study at the mean age of 53 (27.5-75.5) hours of life and with a mean bilirubin level of 13.6 ± 2.85 mg/dL. There was no statistical difference in the expression of CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 and percentage of neutrophils before and after 24 hours of phototherapy. There was an increase in the expression of CD10 ($p=0.038$) and CD16 ($p=0.017$) and a reduction in

the expression of CD11c ($p=0.023$) and CD66acde ($p=0.004$) after 24 hours of phototherapy.

Conclusion: The newborns submitted to phototherapy had increased expression of CD10 and CD16 and decreased expression of CD11c and CD66acde after 24 hours of exposure, which may be related to an anti-inflammatory effect of phototherapy on the neonates exposed to this treatment.

Abstract: 337 words.

Keywords: neutrophils; neonate; jaundice; hyperbilirubinemia; CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66acde.

3. LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA TESE

Quadro 1:

Nomograma de Bhutani para recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas.....23

Quadro 2:

Painéis de citometria de fluxo usados no estudo.....58

4. LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS

ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

Figura 1:

Análise da expressão dos marcadores com diferença significativamente estatística....99

Figura 2:

Análise de expressão dos marcadores.....100

ARTIGO 1 EM INGLÊS

Figure 1:

Analysis of the expression of the markers with statistically significant difference.....119

Figure 2:

Analysis of Marker Expression.....120

5. LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

Tabela 1:

Painéis de citometria de fluxo usado no estudo96

ARTIGO 1 EM INGLÊS

Table 1:

Flow cytometry panels used in the study.....116

Table 2:

Maternal and neonatal characteristics - demographic data117

Table 3:

Markers before and after phototherapy.....118

6. LISTA DE QUADROS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

Quadro 1:

Características maternas e neonatais – dados demográficos.....96

Quadro 2:

Marcadores pré e pós fototerapia98

7. LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AIG	Adequado para a idade gestacional
APC	Aloficocianina
CALLA	Antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
EXT	Exsanguíneotransusão
FITC	Fluoroscéina
GIG	Grande para a idade gestacional
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLDA	Human Leukocyte Differentiation Antigens
HNSC	Hospital Nossa Senhora Conceição
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IGO	Idade gestacional obstétrica
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Intereucina-6
IMF	Intensidade média de fluorescência
LAC	Líquido amniótico claro
LAM	Líquido amniótico meconial
LED	Diodo emissor de luz
MME	Metaloendopeptidase de membrana
NEP	Endopeptidase neutra
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adesão celular plaquetária
PerCP	Proteína clorofila peridina

PIG	Pequeno para a idade gestacional
PN	Peso de nascimento
RN	Recém-nascido
SPSS 18.0	<i>Statistical Package for the Social Sciences software version 18.0</i>
TBR	Tempo de bolsa rota
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UGT1A1	Enzima UDP-glicuronil-transferase
UTIN	Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal
VCAM	Molécula de adesão celular

*Algumas siglas foram mantidas na sua versão original em inglês, por serem assim internacionalmente referidas.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	7
2. ABSTRACT.....	9
3. LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA TESE.....	11
4. LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS.....	12
5. LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS.....	13
6. LISTA DE QUADROS DOS ARTIGOS.....	14
7. LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....	15
8. INTRODUÇÃO.....	20
9. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
9.1. Icterícia neonatal	22
9.1.1. Definição de icterícia.....	22
9.1.2. Metabolismo da bilirrubina	23
9.1.3. Icterícia neonatal não patológica (fisiológica)	24
9.1.4. Variação das etnias na conjugação da bilirrubina e níveis de bilirrubina.....	25
9.1.5. Causas patológicas de hiperbilirrubinemia	26
9.1.5.1. Aumento da produção	27
9.1.5.2. Diminuição do clearance	28
9.1.5.3. Aumento da circulação entero-hepática	28
9.1.6. Tratamento da Icterícia neonatal	30
9.1.7. Avaliação da gravidade do risco	31
9.1.7.1. RN a termo (≥ 38 semanas) sem fatores de risco.....	31
9.1.7.2. RN a termo com fatores de risco ou RN 35S a 37 6/7 sem fatores de risco.....	32
9.1.7.3 RN 35S a 37 6/7 com fator de risco	32
9.1.7.4 Pacientes sintomáticos	33

9.1.7.5 RN > uma semana de vida com aumento agudo da bilirrubina	33
9.1.8 Fototerapia	33
9.1.8.1 Mecanismos de fototerapia	35
9.1.8.2 Técnicas de fototerapia	35
9.1.8.3 Tipos de aparelhos de fototerapia	36
9.1.8.4 Efeitos colaterais da fototerapia	37
9.2 O Processo Inflamatório	40
9.2.1 Os neutrófilos	40
9.2.2 Fisiologia do processo inflamatório	41
9.3 Citometria de Fluxo	43
9.3.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	43
9.3.3 Fluorocromos	44
9.3.4 Marcadores analisados	45
9.3.4.1.CD10	46
9.3.4.2.CD11b	47
9.3.4.3.CD11c	47
9.3.4.4.CD15	48
9.3.4.5.CD16	48
9.3.4.6.CD18	49
9.3.4.7.CD62L	50
9.3.4.8.CD64	51
9.3.4.9.CD66acde	51
10. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	53
11. OBJETIVOS.....	54
12. METODOLOGIA.....	55

12.1. População em Estudo.....	55
12.2. População da Pesquisa.....	55
12.3. Critérios de Inclusão	55
12.4. Critérios de Exclusão.....	55
12.5. Delineamento.....	56
12.6. Logística	56
12.7. Análise Laboratorial	57
12.8. Considerações Éticas	58
12.9. Variáveis Estudadas	59
12.10. Cálculo do Tamanho da Amostra	60
12.11. Análise Estatística	60
13. REFERÊNCIAS	62
14. ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS.....	79
15. ARTIGO 1 EM INGLÊS	101
16. ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS	122
17. ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	145
18. CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
Anexos	168

8. INTRODUÇÃO:

Os cuidados intensivos oferecidos aos recém-nascidos têm sido cada vez mais eficazes na redução da morbidade e mortalidade neonatal. Isto se deve ao maior conhecimento das patologias que afetam estes pacientes, a maior disponibilidade tecnológica e medicamentosa, e a disposição de uma equipe profissional especializada no tratamento destes pacientes (SCHANNEIDARI *et al*, 2012). A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos (SILVA *et al*, 2001; BHUTANI *et al*, 2010). Uma grande parcela das causas de hiperbilirrubinemia em recém-nascidos a termo é benigna e reversível. A mais temida toxicidade potencialmente irreversível secundária a hiperbilirrubinemia é a encefalopatia pela bilirrubina, denominada Kernicterus (SILVA *et al*, 2001; BHUTANI *et al*, 2010; BHUTANI *et al*, 2004; AAP, 2004).

O principal tratamento da icterícia é realizado através da fototerapia, seguindo os critérios recomendados pela academia americana de pediatria (AAP, 2004). Desde a década de 1950 a fototerapia tem sido a terapia de escolha para os recém-nascidos com hiperbilirrubinemia indireta. Ela diminui os níveis de bilirrubina não conjugada no plasma, prevenindo o kernicterus e diminuindo a necessidade de exsanguineotransfusão (SILVA *et al*, 2001; BHUTANI *et al*, 2010; BHUTANI *et al*, 2004; AAP, 2004).

Os efeitos colaterais podem ser a curto ou a longo prazo (XIONG *et al*, 2011). Entre os efeitos a curto prazo poderíamos citar a interferência na relação materno-infantil, desbalanço térmico e hidroeletrólítico, lesões de pele, síndrome do bebê bronzeado, alterações hematológicas, íleo paralítico, ducto arterioso patente, efeitos oculares e desordens do ciclo circadiano (4). Entre os efeitos colaterais a longo prazo, são relatadas

neoplasias, lesões cutâneas tipo nevo e manchas café com leite e doenças alérgicas como asma, rinite e conjutivite.

Nas últimas décadas, diversos estudos surgiram avaliando a influência da fototerapia na resposta alérgico-imune-inflamatória, mostrando evidências que a fototerapia pode afetar diretamente a expressão e função de receptores de superfície das células, incluindo moléculas de adesão, citocinas e receptores de fator de crescimento (PROCIANOY *et al*, 2010; KURT *et al*, 2009; JAHANSHAHIFARD *et al*, 2012; LEIPE *et al*, 1988; RUBALTELLI *et al*, 1977). Há também estudos demonstrando aumento da contagem de eosinófilos nos pacientes que recebem fototerapia e risco de desenvolvimento de asma (ASPBERG *et al*, 2007; AYDIN *et al* 2014; ASPBERG *et al*, 2010). Estudos também demonstram o aumento do dano ao DNA em leucócitos em neonatos com hiperbilirrubinemia que foram submetidos à fototerapia (GÓMEZ-MEDA *et al*, 2014; AYCICEKV *et al*, 2008; EL-ABDIN *et al*, 20012). EYADA *et al* (2017) estudaram os efeitos da fototerapia em linfócitos B e T em recém-nascidos ictericos em fototerapia. Não há relato na literatura de estudos avaliando os efeitos da fototerapia na função dos neutrófilos de recém-nascidos. A mensuração da função dos neutrófilos pode ser realizada pela avaliação da expressão dos marcadores de superfície, através de anticorpos monoclonais CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, que possuem papéis específicos na regulação da movimentação, adesão e ativação leucocitária (GENEL *et al*, 2012; LAYSECA *et al*, 2002; LEWIS *et al*, 2015; MAZZONE & RICEVUTI, 1995; MORSY *et al*, 2008; SHIPP *et al*, 1991; STOCKS *et al*, 1996; STOCKS *et al*, 1995; VOLTZ A, 1993).

A proposta deste estudo foi avaliar qualitativamente a função dos neutrófilos em recém-nascidos ictericos antes e após o tratamento fototerápico, através da dosagem dos principais marcadores da função neutrofílica por citometria de fluxo.

9. REVISÃO DA LITERATURA:

9.1. Icterícia neonatal

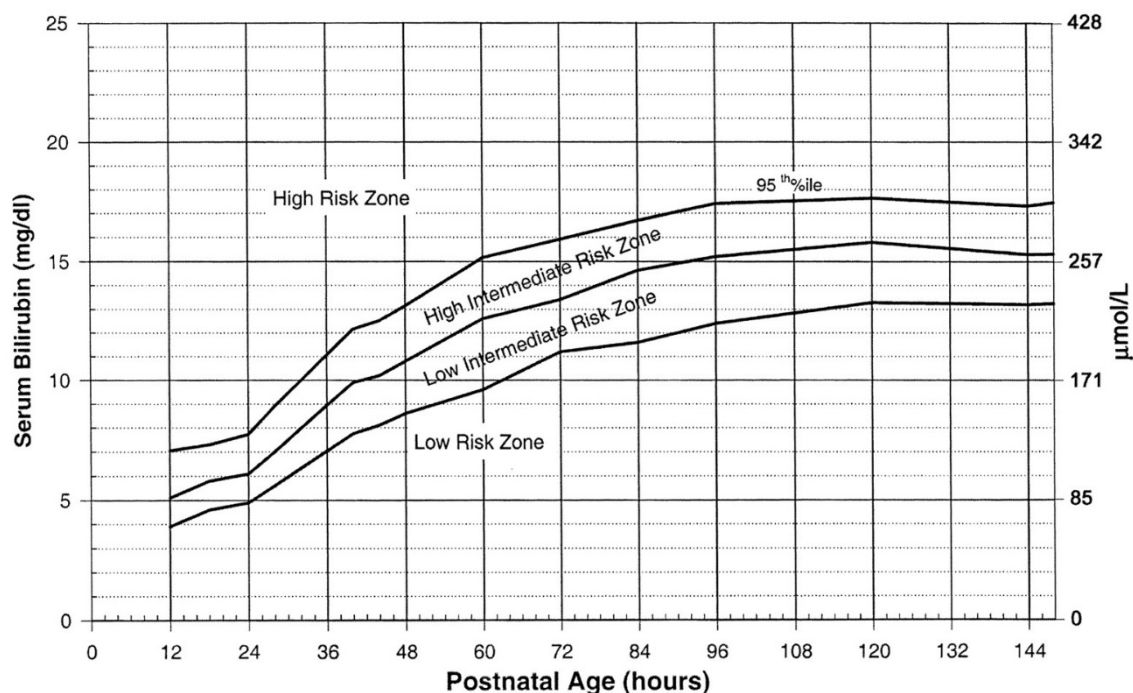
9.1.1. Definição de Icterícia:

A coloração amarelada da pele e/ou conjuntiva do recém-nascido é ocasionada pelo depósito da bilirrubina (DENNERY *et al*, 2001).

A icterícia neonatal, em recém-nascidos com idade gestacional maior ou igual a 35 semanas, pode ser caracterizada como o aumento dos níveis de bilirrubinas (hiperbilirrubinemia) acima do percentil 95 do nomograma de Bhutani (AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004). Este nomograma avalia a zona de risco e níveis para indicação de fototerapia, baseado no nível da bilirrubina e horas pós natais (FIGURA 1).

A hiperbilirrubinemia severa é definida como a dosagem de bilirrubina total maior que 25 mg/dL (AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004). Está associada ao aumento do risco da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina, que ocorre quando a bilirrubina atravessa a barreira hemato-encefálica e deposita-se no tecido cerebral. A encefalopatia bilirrubínica aguda é usualmente descrita como uma manifestação aguda da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina e o Kernicterus é usualmente descrito como a seqüela crônica e permanente da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina (MAISELS *et al*, 2001; AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004).

Quadro 1- Nomograma de Bhutani para recém-nascidos com idade gestacional maior ou igual a 35 semanas.



9.1.2. Metabolismo da bilirrubina:

O conhecimento do metabolismo da bilirrubina é importante para o entendimento da patogênese da hiperbilirrubinemia neonatal.

A bilirrubina é um produto do catabolismo do heme. Oitenta a 90% da bilirrubina é produzida da quebra da hemoglobina e da eritropoiese inefetiva (ERLINGER *et al*, 2014). Dez a 20% é derivada da quebra de outras proteínas que contem o heme, como os citocromos e a catalase (BERK *et al*, 1969).

A bilirrubina é formada em dois passos. Primeiro, a enzima heme-oxigenase (HO), localizada no fígado e em todas as células nucleadas, cataliza a quebra do heme,

resultando na formação de quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO) e biliverdina. Após isto, a biliverdina é convertida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (DRUMMOND *et al*, 1996).

A bilirrubina circulante, que está ligada a albumina, é transportada até o fígado, onde dissocia-se da albumina e é absorvida pelos hepatócitos e depois é processada para a excreção. No retículo endoplásmico liso do hepatócito, a enzima UDP-glicuronil-transferase (UGT1A1) catalisa a conjugação da bilirrubina com o ácido glucurônico, produzindo o monoglicuronato e depois o diglicuronato de bilirrubina, que é a forma predominante (HARB & THOMAS, 2007, BOSNA *et al*, 1994). A quantidade insuficiente desta enzima no recém-nascido causa a icterícia fisiológica do 2^o ao 5^o dia após o nascimento.

A bilirrubina conjugada, que é mais solúvel em água que a bilirrubina não conjugada, é excretada na bile (ARIAS *et al*, 1993). A secreção da bilirrubina conjugada na bile é um processo de transporte ativo com consumo energético. Ocorre a nível da membrana do hepatócito que constitui a parede dos canalículos biliares. No íleo e intestino grosso, os glicuronatos são removidos por enzimas bacterianas (b-glicuronidases), resultando os urobilinogênios, que são incolores. Estes são oxidados a compostos corados, as urobilinas ou estercolilinas, que dão a cor às fezes. Parte da urobilina reabsorvida nos intestinos (ciclo enterohepático) é excretada na urina, dando-lhe a cor amarela.

9.1.3. Icterícia neonatal não patológica (Fisiológica)

A icterícia neonatal não patológica é causada por variações no metabolismo da

bilirrubina do recém-nascido, resultando em aumento da produção de bilirrubina, diminuição do seu clearance e aumento da circulação enterohepática (DENNERY *et al*, 2001).

Nos recém-nascidos a termo, a produção da bilirrubina é de 2 a 3 vezes maior que no adulto, devido ao maior número de hemácias (hematócrito entre 50-60%) e estas possuírem menor tempo de circulação (em média 85 dias), produzindo mais bilirrubina.

O clearance de bilirrubina é diminuído nos recém-nascidos, principalmente devido a deficiência da enzima UGT1A1. A atividade desta enzima em RN a termo, no sétimo dia de vida, é aproximadamente 1% do adulto. (KAWADE & ONISHI, 1981; MAISELS M, 2001).

Há um aumento da circulação enterohepática da bilirrubina, levando a uma maior carga de bilirrubina no recém-nascido.

Estas variações no metabolismo da bilirrubina no recém-nascido, resultam no aumento da bilirrubina indireta (icterícia fisiológica), que ocorre em quase todos os recém-nascidos.

A icterícia neonatal fisiológica resolve-se entre 1 a 2 semanas após o nascimento, dependendo da maturação dos sistemas de clearance de bilirrubina. A persistência da hiperbilirrubinemia por mais de 2 semanas, requer investigação (FAWAZ *et al*, 2017).

9.1.4. Variação das etnias na conjugação da bilirrubina e níveis de bilirrubina

Diferenças entre os níveis de bilirrubina entre as raças podem decorrer de variações genéticas específicas na conjugação da bilirrubina. Polimorfismo no gene UGT1A1, variam entre indivíduos asiáticos, africano e com ancestral caucasiano (BEUTLER *et al*, 1998). Estes polimorfismos estão correlacionados a diminuição da atividade da enzima UGT1A1 resultando no aumento dos níveis de bilirrubina. Outra causa de variação racial no desenvolvimento da icterícia neonatal resulta da mutação no gene UGT1A1 na Gly71Arg que ocorre nos asiáticos, esta mutação ocasiona o aumento da incidência de hiperbilirrubinemia severa em 20% nos asiáticos (AKABA *et al*, 1998; LONG *et al*, 2011)..

Nos recém-nascidos a termo, brancos e negros americanos, o pico de bilirrubina sérica ocorre dentre 48 a 96 horas de vida e varia de 7 a 9 mg/dL. O percentil 95 varia entre 13 a 18 mg/dL. Já em recém-nascidos asiáticos, o pico varia de 10 a 14 mg/dL e ocorre mais tarde, entre 72 a 120 horas de vida. Em recém-nascidos de 35 a 37 semanas, o pico de aumento de bilirrubina usualmente é no quinto dia para recém-nascidos americanos e 10^o dia nos asiáticos (KAPLAN *et al*, 2011; BEUTLER *et al*, 1998)..

9.1.5. Causas patológicas de hiperbilirrubinemia

A hiperbilirrubinemia pode ser causada por condições patológicas ou pelo aumento dos mecanismos responsáveis pela icterícia fisiológica. A identificação da causa da hiperbilirrubinemia neonatal é importante para determinar o tempo e quais as intervenções terapêuticas para prevenir a hiperbilirrubinemia severa (DENNERY *et al*, 2001; HUANG *et al*; 2004).

Algumas características clínicas e laboratoriais são sugestivas de hiperbilirrubinemia severa (MAISELS MJ, 2001):

- Início da icterícia nas primeiras 24 horas de vida pós natal, sendo a hemólise a casusa mais frequente de icterícia precoce e é considerada uma emergência médica.

- Aumento nos níveis da bilirrubina maior que 0,2 mg/dL por hora.

- Nível de bilirrubina maior que o percentil 95 do nomograma de Bhutani.

- Icterícia em recém-nascido a termo com mais de 2 semanas de vida.

- Bilirrubina direta > 1g/dL, se a bilirrubina total é menor que 5 mg/dL. Ou bilirrubina direta maior que 20%, se a bilirrubina total é maior que 5 mg/dL. O aumento da bilirrubina direta é sugestiva de colestase (FAWAZ *et al*, 2017).

9.1.5.1. Aumento da produção:

A causa mais comum de icterícia patológica é o aumento da produção da bilirrubina devido a hemólise (KAPLAN *et al*, 2011; JOHNSON *et al*, 1986, WATCHKO *et al*, 2009).

A hemólise pode ocorrer devido a quatro mais relevantes causas:

- Incompatibilidade ABO ou Rh (KAPLAN *et al*, 2014).

- Defeitos da membrana das hemácias, como a esferocitose e a eliptocitose hereditárias (CHRISTENSEN *et al*, 2014).

- Defeitos enzimáticos dos eritrócitos, como a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, a deficiência de piruvatoquinase e a porfiria eritropoietica congênita (RISKIN *et al*, 2012).

- Sepses. Na fisiopatologia da icterícia neonatal devido a sepses, sugere-se que o aumento do estresse oxidativo ocasione os danos às hemácias, ocasionando a hemólise (KAPLAN *et al*, 2011).

Outras causas de aumento da produção de bilirrubina, devido ao aumento da destruição das hemácias, seriam a policitemia e o cefalohematoma (NEWMAN *et al*, 2000).

Os recém-nascidos de mães diabéticas e grandes para idade gestacional também possuem aumento da produção da bilirrubina, devido a policitemia e eritropoiese inefetiva (BERK *et al*, 1989; PEEVY *et al*, 1980).

9.1.5.2. Diminuição do clearance

A principal causa de diminuição do clearance de bilirrubina levando a hiperbilirrubinemia seria devido a defeitos inatos do gene que codifica a UGT1A1, diminuindo a conjugação da bilirrubina (SKIERKA *et al*, 2013). Estes defeitos estão presentes nas síndromes de Crigler-Najjar tipo I e II e na Síndrome de Gilbert (BANCROFT *et al*, 1998).

Outras causas de diminuição no clearance de bilirrubina incluem: diabetes materna, hipotireoidismo congênito e galactosemia (STEVENSON *et al*, 1981).

9.1.5.3. Aumento da circulação enterohepática

As principais causas do aumento da circulação enterohepática de bilirrubina seriam a icterícia do leite materno, o prejuízo na motilidade intestinal causado por obstrução anatômica ou funcional e a icterícia por falha na amamentação.

Icterícia do leite materno:

A icterícia do leite materno pode ser definida como a persistência da icterícia fisiológica após a primeira semana de vida. Inicia após o 3-4^o dia de vida, com pico dentro de duas semanas após o nascimento e com diminuição progressiva em 3 a 12 semanas.

Na maioria das vezes a icterícia é leve a moderada e não necessita de intervenção, mas o recém-nascido deve ser monitorado e acompanhado (GRUNEBAUM *et al*, 1991; MAISELS *et al*, 2014; PREER & PHILIPP, 2011). Se o nível de bilirrubina começa a aumentar ou há um aumento significativo de bilirrubina direta, a avaliação de outras causas de hiperbilirrubinemia deve ser iniciada, incluindo colestase neonatal. O aleitamento materno pode e deve ser continuado.

Na patogênese da icterícia do leite materno, é suposto que haja um fator no leite humano, que até o momento não foi identificado, que promoveria o aumento da absorção intestinal da bilirrubina. A beta-glucuronidase seria uma substância proposta, pois desconjugaria a bilirrubina intestinal, aumentando a sua capacidade de ser absorvida. (GOURLEY & AREND, 1986). Aproximadamente 20 a 40% das mulheres tem níveis altos de beta-glucuronidase no leite materno. Bloqueando a desconjugação da bilirrubina através da inibição da beta-glucuronidase poderia ser um mecanismo para reduzir a absorção intestinal de bilirrubina em recém-nascidos amamentados (GOURLET *et al*, 2005). Embora alguns estudos tenham achado elevados níveis fecais de beta-glucuronidase em recém-nascidos com hiperbilirrubinemia amamentados, isto não foi um achado consistente.

Outro mecanismo proposto seria a mutação polimórfica no gene UGT1A1. MARUO *et al* (2014) realizaram um estudo com 170 neonatos japoneses com icterícia do leite materno, e metade deles se mostraram homozigotos para o genótipo UGT1A1*6 e tinham níveis maiores de bilirrubinas que outros genótipos.

Prejuízo na motilidade intestinal causado por obstrução anatômica ou funcional:

Os níveis de bilirrubina são frequentemente mais altos em pacientes com alterações da motilidade e obstrução intestinal devido ao aumento da circulação enterohepática da bilirrubina.

Icterícia por falha na amamentação:

A icterícia por falha na amamentação tipicamente ocorre na primeira semana de vida, quando diminuição da ingesta pelo recém-nascido gera uma significativa perda de peso e de fluidos, resultando em hipovolemia e causando hiperbilirrubinemia e também em alguns casos hipernatremia. A diminuição da ingesta também gera a eliminação mais lenta da bilirrubina e o aumento da circulação enterohepática contribuindo para o aumento dos níveis de bilirrubina e aumentando o risco de desenvolvimento de kernicterus (JOHNSON *et al*, 2002; MAISELS *et al* 1986; GOURLEY *et al*, 1992).

A falha na amamentação pode ocorrer por vários motivos, dentre eles a instrução inadequada de pediatras e consultores de amamentação, a não mensuração adequada de quanto o recém-nascido mamou, complicações maternas (fissuras de mamilo, engurgitação mamária, mastite e fadiga materna) e fatores neonatais como sucção inefetiva por alterações na coordenação oro-bucal, alterações na pega e fadiga do recém-nascido. (JOHNSON *et al*, 2009; AAP & ACOG, 2012).

9.1.6. Tratamento da icterícia neonatal:

Visando a prevenção de casos de kernicterus, o tratamento da icterícia neonatal tem foco em dois elementos (AAP SUBCOMMITTEES ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004; BHUTANI *et al*, 1999):

- Prevenção da hiperbilirrubinemia pela identificação de recém-nascidos de risco e início de intervenções terapêuticas preventivas quando necessário.

- Redução dos níveis de bilirrubina em recém-nascidos com hiperbilirrubinemia usando as seguintes intervenções: fototerapia e exsanguíneo transfusão (EXT).

9.1.7. Avaliação da gravidade do risco:

A decisão de quando iniciar o tratamento e de qual intervenção será escolhida, está baseada na probabilidade do desenvolvimento da hiperbilirrubinemia severa, definida como bilirrubina total > 25 mg/dL. Para isto se usa o valor da bilirrubina na hora específica, a idade gestacional e a presença ou ausência de fatores de risco que aumentam o dano cerebral. Estes fatores incluem a doença hemolítica isoimune, a deficiência de G6PD, asfixia, letargia, instabilidade na temperatura, sepse, acidose e albumina < 3 g/dL (BHUTANI et al, 1999; AAP SUBCOMMITTEES ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004).

9.1.7.1. RN a termo (≥ 38 semanas) sem fatores de risco:

A fototerapia é iniciada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 12 mg/dL
- 48 horas de vida: > 15 mg/dL
- 72 hras de vida: > 18 mg/dL

A EXT é indicada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 19 mg/dL
- 48 horas de vida: > 22 mg/dL
- 72 hras de vida: > 24 mg/dL
- > 72 horas de vida: ≥ 25 mg/dL

Em adição, a EXT é considerada quando a relação bilirrubina total (mg/dL)/albumina (g/dL) é maior que 8, em conjunção com os níveis de bilirrubina.

9.1.7.2. RN a termo com fatores de risco ou RN 35S a 37 6/7 sem fatores de risco:

A fototerapia é iniciada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 10 mg/dL
- 48 horas de vida: > 13 mg/dL
- 72 hras de vida: > 15mg/dL

A EXT é indicada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 16,5 mg/dL
- 48 horas de vida: > 19 mg/dL
- > 72 horas de vida: > 21 mg/dL

Em adição, a EXT é considerada quando a relação bilirrubina total (mg/dL)/albumina (g/dL) é maior que 6, em conjunção com os níveis de bilirrubina.

9.1.7.3. RN 35S a 37 6/7 com fator de risco:

A fototerapia é iniciada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 8 mg/dL
- 48 horas de vida: > 11 mg/dL
- 72 hras de vida: > 13,5 mg/dL

A EXT é indicada seguindo os seguintes valores de bilirrubinas baseada nas horas de vida do paciente:

- 24 horas de vida: > 15 mg/dL
- 48 horas de vida: > 17 mg/dL
- > 72 horas de vida: > 18,5 mg/dL

Em adição, a EXT é considerada quando a relação bilirrubina total (mg/dL)/albumina (g/dL) é maior que 5,8, em conjunção com os níveis de bilirrubina.

9.1.7.4. Pacientes sintomáticos:

A EXT é indicada em recém-nascidos com sinais de encefalopatia bilirrubínica aguda, tais como significante letargia, hipotonia, sucção débil, choro agudo, independente do nível da bilirrubina.

9.1.7.5. RN > uma semana de vida com aumento agudo da bilirrubina:

Recém-nascidos com taxa de aumento de bilirrubina > 0,2 mg/dL/h que possuem níveis maiores com 1 semana de vida, tipicamente possuem deficiência de G6PD causando hemólise ou outra doença hemolítica intrínseca. Devem ser tratados com intervenções urgentes e agressivas e também monitorados quanto a sinais neurológicos (JOHNSON & BUTANI, 2011).

9.1.8. Fototerapia:

A fototerapia é a intervenção mais usada para tratar e prevenir a hiperbilirrubinemia severa. Há aproximadamente seis décadas é amplamente utilizada para reduzir os níveis de bilirrubina, a necessidade de EXT e conseqüentemente a incidência de kernicterus. É considerada uma intervenção segura, baseada no seu uso extensivo em milhões de recém-nascidos e existem poucos relatos de toxicidade significativa (AAP SUBCOMMITTEES ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004).

Entretanto, atualmente há um aumento da preocupação de seu extenso uso e a possibilidade de haver riscos adversos a longo prazo (NEWMAN *et al*, 2016; WINTERMEIR *et al*, 2016; EYADA *et al*, 2017).

A fototerapia é a intervenção inicial para reduzir os níveis de bilirrubina. Recém-nascidos que tiveram alta hospitalar e reinternam com valores de bilirrubina que indiquem exsanguineotransfusão são inicialmente tratados com fototerapia e monitorados para sinais de disfunção neurológica, e se após 6 horas de fototerapia os níveis continuam indicativos de EXT, então esta modalidade de tratamento é indicada. Assim, a EXT é tipicamente reservada para recém-nascidos sintomáticos e com hiperbilirrubinemia severa, e para recém-nascidos com hiperbilirrubinemia severa que não respondem adequadamente a fototerapia (GARLAND *et al*, 1994; AHLFORS, 1994).

A fototerapia intensiva reduz os níveis de bilirrubina de 2 a 3 mg/dL dentro de 4 a 6 horas. Em 24 horas pode haver diminuição de 30 a 40% da bilirrubina (MAISELS & KRING, 2002). Já a fototerapia convencional reduz a bilirrubina em 6 a 20% nas primeiras 18 a 24 horas (HOLTROP *et al*, 1992; TAN, 1994). A taxa de declínio da bilirrubina durante a fototerapia depende de inúmeros fatores, como: grau de irradiância, superfície corporal exposta, dosagem inicial de bilirrubina (quanto mais alta, mais rápida a taxa de declínio). A efetividade do tratamento também depende da patologia do recém-nascido, sendo menos efetiva em recém-nascidos com colestase e naqueles com doença hemolítica com coombs direto positivo (AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004)

9.1.8.1. Mecanismos da fototerapia:

A fototerapia expõe a pele do recém-nascido à luz de um comprimento de onda específico, que reduz o níveis de bilirrubina por três mecanismos (ENNEVER *et al*, 1987):

1) Isomerização estrutural para lumirrubina: A fototerapia converte a bilirrubina em lumirrubina via isomerização estrutural que não é reversível. A lumirrubina é uma substância mais solúvel que a bilirrubina, sendo excretada sem conjugação na bile e urina. Este é provavelmente o principal mecanismo da redução da concentração de bilirrubina plasmática pela fototerapia.

2) Fotoisomerização para um isômero de bilirrubina menos tóxico: A fototerapia converte o isômero bilirrubina 4Z,15Z para o isômero 4Z,15E, que é mais polar e menos tóxico. Como a lumirrubina, o isômero 4Z,15E é excretado na bile sem conjugação, mas a fotoisomerização é reversível e o seu clearance é baixo. Portanto esta via pode ter um pequeno efeito na redução dos valores de bilirrubina, mas reduz 15% da bilirrubina tóxica em forma não tóxica.

3) Foto-oxidação a moléculas polares: As reações de foto-oxidação convertem a bilirrubina em um componente polar, sem cor, que é excretado primariamente na urina. É um processo lento e acontece numa pequena proporção na eliminação da bilirrubina.

9.1.8.2. Técnicas da fototerapia:

Durante a fototerapia, a área coberta pela fralda deve ser minimizada. Os olhos devem ser protegidos com viseiras opacas deixando o nariz livre. Aparelhos com luzes fluorescentes devem ser usados preferencialmente em berços abertos. O material branco aumenta a superfície de exposição e a eficácia da fototerapia (EGGERT *et al*, 1984;

MAISELS, 1996). O uso de cortinas refletoras em volta do aparelho de fototerapia também aumenta sua eficiência (DJOKOMULJANTO *et al*, 2006).

Com níveis de bilirrubina > 20 mg/dL, a fototerapia deve ser administrada de forma contínua, sem interrupções. Quando o valor é < 20 mg/dL, a fototerapia pode ser interrompida para amamentação e visitas dos pais.

A dose da fototerapia, denominada irradiância, determina a sua eficácia. A medida é realizada em $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ da superfície corporal da área exposta/nm do comprimento de onda). A irradiância depende do tipo de luz utilizada, da distância entre a luz e o paciente e área de pele exposta. Na fototerapia convencional, a irradiância varia de 6-12 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Já na fototerapia intensiva, a irradiância é maior que $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ (VREMAN *et al*, 2004).

Para uma fototerapia intensiva e efetiva, os níveis de irradiância devem atingir a maior área possível de superfície do RN e deve-se colocar a luz numa distância de 10 a 30 cm do paciente, dependendo da recomendação do fabricante e da combinação de fibra óptica, LED ou luz azul especial (BHUTANI, 2011).

9.1.8.3. Tipos de aparelhos de fototerapia:

A bilirrubina absorve a luz mais fortemente na região azul, no espectro próximo a 460 nm. Existem vários tipos de aparelhos para fototerapia, com variáveis tipos de luz, diferentes comprimentos de onda e diferentes graus de irradiância (VREMAN *et al*, 2004; KUMAR *et al*, 2011; TRIDENTE & DE LUCA, 2012).

- Tubos fluorescentes: Os tubos F20T12/BB e TL52/20W possuem luz azul especial e se mostram efetivos em níveis de bilirrubina baixos porque possuem espectro de luz azul-

verde que penetra bem na pele e é bem absorvido. Não deve ser confundido com luz azul regular ou LED azul.

- Luz branca de halogênio: Lâmpadas brancas de halogênio são quentes e podem causar queimadura. Devem ser colocadas na distância do paciente recomendada pelo fabricante.
- Aparelhos de fibraóptica: Geram pouco calor e podem ser colocadas perto do recém-nascido, levando maior irradiância que as luzes fluorescentes. São pequenas e raramente cobrem uma superfície suficiente para ser efetiva
- LEDs azuis: Geram luz de alta intensidade na absorção do espectro da bilirrubina, sendo tão efetiva quanto a luz fluorescente convencional azul.

A fototerapia intensiva implica no uso de altos níveis de irradiância (430 a 490 nm ou 30 microW/cm²/nm) (BHUTANI VK, 20011).

Embora não seja necessário medir o espectro de irradiância antes do uso de cada fototerapia, é importante periódicas checagens dos aparelhos para aferir se a adequada irradiância está sendo utilizada (AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004).

9.1.8.4. Efeitos colaterais da fototerapia

Os efeitos colaterais da fototerapia podem ser imediatos ou ocorrer a longo prazo (XIONG *et al*, 2011). Dentre os efeitos a curto prazo poderíamos citar a interferência na relação materno-infantil, desbalanço térmico e hidroeletrólítico, lesões de pele, síndrome do bebê bronzeado, alterações hematológicas, íleo paralítico, ducto arterioso patente, efeitos oculares e desordens do ciclo circadiano (AAP SUBCOMMITTEE ON HYPERBILIRUBINEMIA, 2004). Entre os efeitos colaterais a longo prazo, são relatadas neoplasias, lesões cutâneas tipo nevo e manchas café com leite e doenças alérgicas como asma, rinite e conjutivite.

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram publicados tentando correlacionar a fototerapia com danos ao recém-nascido, tanto a nível laboratorial, avaliando a resposta imune-alergo-inflamatória, através da análise da expressão e função de receptores de superfície das células, incluindo moléculas de adesão, citocinas e receptores de fator de crescimento e danos ao DNA, quanto pesquisas clínicas associando o uso de fototerapia à doenças na infância.

YAHIA *et al* (2015) demonstraram que a fototerapia causa danos ao DNA e induz apoptose nos linfócitos de recém-nascidos à termo. YCICEK *et al* (2008) demonstraram danos ao DNA dos leucócitos mononucleares endógenos em recém-nascidos a termo icteéricos submetido a fototerapia. EL-ABDIN *et al* (2012); KARAKUKCU *et al* (2009) e TATLI *et al* (2008) também demonstraram os efeitos genotóxicos da fototerapia.

WINTERMEIR *et al* (2014) não acharam influência significativa no desenvolvimento de nevo melanocítico em pré-escolares submetidos a fototerapia devido a hiperbilirrubinemia quando recém-nascidos, mas demonstraram um aumento de máculas café-com-leite. LAI *et al* (2016) realizaram uma revisão sistemática não encontrando também evidências de aumento do número de nevo melanocítico em RN submetidos a fototerapia. MAHE *et al* (2009) não encontraram aumento na contagem de nevos em crianças de 9 anos pós fototerapia neonatal com luz azul.

Alguns estudos tem demonstrado a associação entre fototerapia neonatal e doenças alérgicas na infância:

- Asma (ASPBERG *et al*, 2010; KUZNIEWICZ *et al*, 2013).
- Asma e rinite alérgica (DAS & NAIK, 2015).
- Aumento dos níveis de eosinófilos sanguíneos (AYDIN *et al*, 2014; BEKEN *et al*, 2014)).

Dois grandes estudos de coorte realizados na Califórnia (NEWMAN *et al*, 2016; WICKREMASINGHE *et al*, 2016) associaram a fototerapia a um aumento do risco de câncer infantil, particularmente leucemia mielóide aguda (LMA). CNATTINGIUS *et al* (1995) também demonstraram associação entre fototerapia e LMA em crianças. Embora o aumento do risco absoluto seja pequeno, é suficiente para se avaliar com prudência a escolha do início do tratamento fototerápico. Estudos correlacionando fototerapia e melanoma não demonstraram evidência de risco estatisticamente significativa (BREWSTER *et al*, 2010; BERG & LINDELOF, 1997).

Alguns estudos demonstraram a influência da fototerapia na concentração de citocinas nos recém-nascidos, tentando correlacionar estes achados a efeitos anti-inflamatórios (diminuição dos níveis de IL-6 pós 24 horas de fototerapia, PROCIANOY *et al*, 2010) e a efeitos na função do sistema imune (aumento de IL-2 e IL-10, SIROTA *et al*, 1999). ZARKESH *et al* (2016) encontraram aumento nos níveis de IL-6 e contagem de leucócitos no RN após fototerapia, também sugerindo alterações na função do sistema imune neonatal.

RASHEDY *et al* (2015) estudaram o efeito da fototerapia nos níveis de CD4, CD8 e linfócitos NK, após 72 horas de fototerapia, não encontrando alteração significativa em relação aos controles. EYADA *et al* (2017) também não encontraram correlação entre níveis de CD19, CD4 e CD8 em linfócitos de RN pós 72 horas de fototerapia e nem a ocorrência de infecções após 6 meses de acompanhamento.

ELFEKY *et al* (2012) encontraram níveis de CD3 e CD19 menores após 72 horas de fototerapia e acompanhou os pacientes por 6 meses. Pacientes com maior declínio de CD3 tiveram um aumento no número de visitas hospitalares.

Em relação a contagem de leucócitos, ZARKESH *et al* (2016) e JAHANSHAHIFARD *et al* (2012) demonstraram aumento de leucócitos circulantes após

fototerapia, assim como MRKAIC *et al* (1994) demonstraram aumento do número total de polimorfonucleares, linfócitos e monócitos, mas estes achados foram temporários.

O impacto da fototerapia nos níveis de mediadores vasoativos nos recém-nascidos também foi estudado. TURAN *et al* (2004) não demonstraram elevação nos níveis de óxido nítrico e VEGF, mas perceberam que a fototerapia causou aumento da temperatura corporal, frequência cardíaca e alterações nos níveis pressóricos dos RN. WEISSMAN *et al* (2009) e UHRIKOVA *et al* (2015) demonstraram diminuição da variabilidade da frequência cardíaca durante a fototerapia, sugerindo que a fototerapia pode ter efeitos envolvendo a ativação de mecanismos de controle autonômico.

ASI *et al* (2016) mensurou a excreção de cálcio antes e após 48 horas de fototerapia e como resultado encontrou aumento na excreção urinária de cálcio, embora sem evidência de hipocalcemia.

9.2. O Processo Inflamatório

9.2.1. Os Neutrófilos

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares são fundamentais no processo de inflamação aguda, independente da etiologia da inflamação. São as células circulantes mais abundantes do sistema imune, correspondendo de 60 a 70% da contagem de leucócitos totais no sangue periférico. Estão envolvidos diretamente na defesa do organismo contra infecções bacterianas e fúngicas.

O entendimento dos mecanismos de migração, ativação e adesão leucocitárias aumentou muito nas últimas décadas, dando um grande salto no entendimento na fisiopatologia de diversas patologias.

O ciclo de vida do neutrófilo pode ser dividido em 3 fases: medular, sanguínea e tecidual.

A vida média dos neutrófilos na circulação sanguínea é de 6 a 10 horas, porém após sua ativação e migração para o tecido, a sua vida média passa a ser de 2 a 6 dias.

9.2.2. Fisiologia do Processo Inflamatório

As infecções e a injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria (BILATE, 2007).

O mecanismo de inflamação é caracterizado histologicamente pelo acúmulo de leucócitos no sítio inflamado. A migração acontece através do contato entre os leucócitos e o endotélio vascular inflamado. As bases moleculares e fatores determinantes do movimento leucocitário para o sítio de inflamação tem sido amplamente estudadas nas últimas décadas (LIU & KUBES, 2003; BILATE, 2007).

Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo e em fases mais tardias os monócitos e linfócitos também migram para o local amplificando o processo inflamatório.

Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória:

- As quimiocinas realizam a quimiotaxia de leucócitos.
- As enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a

permeabilidade vascular.

- A plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilotoxinas que induzem degranulação de mastócitos e conseqüentemente liberação de histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microorganismos, facilitando a fagocitose.

- Os mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

- As citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda (BILATE, 2007).

O mecanismo de inflamação é composto por quatro etapas principais:

1. Marginação leucocitária
2. Rolamento leucocitário
3. Ativação e adesão leucocitária
4. Migração transendotelial celular.

No rolamento leucocitário as principais moléculas envolvidas são as selectinas (plaquetárias, endoteliais e leucocitárias).

Na ativação leucocitária, as quimiocinas inflamatórias CXC.

Na adesão leucocitária e na migração transendotelial celular, as integrinas, as selectinas e a superfamília de imunoglobulinas (ICAM, VCAM, PECAM).

A mensuração da função dos neutrófilos pode ser realizada pela avaliação da expressão dos marcadores de superfície, através de anticorpos monoclonais CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, que possuem papéis específicos na regulação da movimentação, adesão e ativação leucocitária (GENEL *et al*, 2012; LAYSECA *et al*, 2002; LEWIS *et al*, 2015; MAZZONE & RICEVUTI, 1995; MORSY *et al*, 2008; SHIPP *et al*, 1991; STOCKS *et al*, 1996; STOCKS *et al*, 1995; VOLTZ A, 1993). Estes marcadores podem ser medidos através da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo, como será descrito a seguir.

9.3. Citometria de fluxo

9.3.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A análise imunofenotípica por citometria de fluxo é uma poderosa técnica, rápida e custo-efetiva. Consiste na injeção de uma suspensão de partículas através de um tubo capilar numa velocidade constante. O fluido serve para manter as partículas no centro do fluxo que será iluminado por um laser. A dispersão da luz coletada pelos detectores posicionados em diversos ângulos diferentes fornece informações sobre o tamanho e a granularidade de cada partícula analisada. Além disso, a adição de fluorocromos permite uma análise multiparamétrica de cada partícula individualmente de acordo com a quantidade de fluorocromos utilizados (ZERBINI *et al*, 2001)

O citômetro de fluxo pode ser equipado com apenas um laser, permitindo análises mais simples e objetivas, mas também permitir análise simultânea de inúmeros marcadores, se adicionados lasers com capacidades de excitação em diferentes comprimentos de onda. O laser mais comum e usado em todos os citômetros é o laser iônico de argônio, que produz uma luz de 488nm, esse comprimento de onda permite a

excitação da maioria dos fluorocromos utilizados rotineiramente (MCPHERSON *et al*, 2001).

Os dados gerados pelo citômetro são apresentados na forma de histogramas e/ou dot plot. O gráfico dot plot é uma extensão bidimensional do histograma em que cada localização corresponde a um sinal medido em um fotosensor versus o sinal medido em um segundo fotosensor. A análise é realizada graficamente definindo-se as regiões de interesse. Adicionalmente, esquemas de análise em “gates” subsequentes podem ser usados para restringir somente a determinadas populações, ou seja, com intensidades de fluorescência, tamanho e complexidade distintas (MCPHERSON *et al*, 2001).

9.3.3. Fluorocromos

Os fluorocromos são compostos fluorescentes que absorvem energia luminosa em um determinado comprimento de onda e emitem luz num comprimento de onda maior. Esses dois processos são chamados de excitação e emissão, respectivamente. O fluorocromo é conjugado a um anticorpo monoclonal e este se ligará a uma molécula celular de interesse, emitindo uma determinada fluorescência quando excitado pelo laser. Entre os fluorocromos utilizados na citometria de fluxo, destacam-se a fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE), a proteína clorofila peridinina (PerCP), a aloficocianina (APC), entre outros (SALES *et al*, 2013).

COONS *et al* descreveram pela primeira vez, em 1941, a ligação de anticorpos marcados com fluorocromos à moléculas da superfície celular, e desde então tem exercido um importante papel no estudo do sistema imune. E principalmente nas últimas décadas, técnicas antígeno-anticorpo têm sido aprimoradas para uso na citometria de fluxo (MCPHERSON *et al*, 2001).

A utilização de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos altamente específicos contra epítomos celulares tem permitido, além de realizar a separação celular através da complexidade e tamanho, a identificação de subconjuntos celulares utilizando um portfólio de centenas de anticorpos contra diferentes antígenos. Normalmente os anticorpos marcados se ligam a receptores na superfície celular identificados através da nomenclatura “*cluster of differentiation*” proposta e estabelecida pelo International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA). (ZERBINI *et al*, 2001). O cluster de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*, geralmente abreviado como CD) é um conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular usado para diferenciar variados tipos de células. Moléculas CD podem agir de diferentes modos, geralmente como receptoras ou como ligantes (moléculas que ativam um receptor). Uma cascata de sinalização normalmente é iniciada, alterando o comportamento da célula. Algumas proteínas CD não têm papel na sinalização, desempenhando outras funções, como a **adesão** celular. Existem aproximadamente 250 tipos de proteínas CD (ZOLA *et al*, 2007).

9.2.3.4. Marcadores analisados:

A mensuração da função dos neutrófilos pode ser realizada pela avaliação da expressão dos marcadores de superfície, através de anticorpos monoclonais CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, que possuem papéis específicos na regulação da movimentação, adesão e ativação leucocitária (GENEL *et al*, 2012; LAYSECA *et al*, 2002; LEWIS *et al*, 2015; MAZZONE & RICEVUTI, 1995; MORSY *et al*, 2008; SHIPP *et al*, 1991; STOCKS *et al*, 1996; STOCKS *et al*, 1995; VOLTZ A, 1993).

9.3.4.1. CD10

O antígeno CD10, também denominado endopeptidase neutra (NEP) ou antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA) ou metaloendopeptidase de membrana (MME) ou neprilisina, é uma metaloprotease dependente do zinco, de 100-kDa, que cliva peptídeos ligados a regiões N-terminais de aminiácidos hidrofóbicos e inativa múltiplos peptídeos fisiologicamente ativos, como o glucagon, as encefalinas, a substancia P, a ocitocina e a bradisinina. É codificada pelo gene MME (GALY *et al*, 1995; SHIPP *et al*, 1991).

O CD10 é expresso em várias células normais, incluindo precursores de células linfóides, linfócitos B centro-germinais e em algumas células epiteliais. Seu nível de expressão serve como marcador para diagnóstico de muitos carcinomas. É um importante marcador de superfície da leucemia linfoblástica aguda, (LLA) estando presente nas células leucêmicas de fenótipo pré-B, que representa 85% dos casos de LLA (SUZUKI *et al*, 2002).

O CD10 também é um antígeno de diferenciação para progenitores linfoides B precoces na via da diferenciação da célula B e possui papel fundamental na regulação do crescimento, na diferenciação e na transdução de sinal de muitos sistemas celulares (SHIPP *et al*, 1990).

MARTENS *et al* (1999) realizaram um estudo comparando a expressão de CD10 em pacientes sépticos, saudáveis e com mononucleose, demonstrando que a capacidade do neutrófilo em expressar CD10 é diminuída em pacientes com choque séptico.

DEMARET *et al* (2015) demonstraram diminuição da expressão de CD10 e CD16 em granulócitos de pacientes com sepse, sugerindo alteração da função dos neutrófilos nestes pacientes.

GUÉRIN et al (2014) avaliaram pacientes admitidos com sepse em emergência e unidade de terapia intensiva e também demonstraram diminuição dos níveis de expressão de CD10 e CD16 nos granulócitos dos pacientes com sepse que possuíram piora clínica em 48 horas.

9.3.4.2. CD11b

O antígeno CD11b, também conhecido como integrina alfa M, é uma glicoproteína transmembrana tipo I pertencente a família das integrinas, de 165-170 kDa, que está associada por ligação não covalente a subunidade de integrina beta2 (CD18), formando a molécula heterodimérica integrina alfa M beta 2, conhecida como Mac-1 ou CR-3. A expressão do CD11b na superfície celular depende da presença do antígeno CD18. A integrina CD11b/CD18 está altamente expressa nas células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos (MAZZONE & RICEVUTI, 1995). Regula a adesão e migração dos leucócitos na resposta inflamatória. Tem sido implicada em variados processos imunes como a fagocitose, quimiotaxia, a citotoxicidade mediada por células e a ativação celular (SOLOVJOV *et al*, 2005; HENTZEN *et al*, 2000).

A expressão de CD11b está aumentada em recém-nascidos com sepse, como demonstram os estudos de ADIB *et al*, 2007; NUPPOEN *et al*, 2001; WEIRICH *et al*, 1996 e WEIRICH *et al* 1998.

9.3.4.3. CD11c

O antígeno CD11c (p150, subunidade da integrina alfa X) forma um complexo com o CD18 (subunidade da integrina beta 2) e é expresso principalmente em macrófagos

e células dendríticas. O CD11c se liga para complementar o fragmento iC3b, o fibrinogênio, o VCAM-1 e o ICAM-2. Como outras integrinas beta 2, o complexo CD11c/CD18 possui papel na migração celular e fagocitose. A interação com o plasminogênio regula as atividades da plasmina e a interação com a heparina, neutraliza a ligação do iC3b (VORUP-JENSEN *et al*, 2007).

A expressão do antígeno CD11c nos neutrófilos de pacientes com sepse foi demonstrado no estudo de LEWIS *et al* (2015), podendo ser considerado um potencial biomarcador para sepse.

9.3.4.4. CD15

O antígeno CD15, também denominado de Lewis X e SSEA-1 (*stage-specific embryonic antigen-1*), é uma molécula de adesão de carboidrato (*3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine*) expresso em glicolipídeos, em glicoproteínas e em proteoglicanos de várias células, como leucócitos, células da mucosa gástrica, do SNC e de vários tipos de tumores. Nos leucócitos, o CD15 está expresso preferencialmente nos monócitos, neutrófilos maduros e em todas as células mielóides a partir dos promielócitos, tornando-se um marcador celular de superfície muito útil. O CD15 atua mediando a fagocitose, a quimiotaxia, a interação célula-célula, estimulando a degranulação e o stress oxidativo, embora sua função exata não esteja bem clara (HAKOMORI, 1992; KERR & STOKS, 1992). Está expresso em pacientes com Doença de Hodgkin, em algumas LLC de células B, nas leucemias linfoblásticas agudas e na maioria das leucemias não linfocíticas agudas.

9.3.4.5. CD16

O antígeno CD16 (ou FcγRIII) é uma glicoproteína de 50-65 kDa, Fc

receptora, expressa de duas formas: FcgammaRIII-A (CD16a) e FcgammaRIII-B (CD16b). Estes receptores se ligam a porção Fc dos anticorpos IgG e ativam as células NK por citotoxicidade mediada por célula anticorpo dependente. (JANEWAY C, 2001).

FcgammaRIII-A é uma proteína transmembrana de monócitos, macrófagos, células NK e algumas células T. FcgammaRIII-B é expressa em neutrófilos e está envolvida com sua ativação e indução de adesão (SCHLOSSMAN *et al*, 1995).

A falta de CD16 numa população de neutrófilos e um desvio à esquerda numa leucocitose neutrofílica, pode ser induzida por necrose tumoral ou infecção bacteriana (VIDRANSKI *et al*, 2015).

9.3.4.6. CD18

O antígeno CD18 é uma subunidade da integrina beta2, que forma heterodímeros com 4 tipos de moléculas CD11 para constituir a integrina beta-2 leucocitária: alphaLbeta2 (CD11a/CD18, LFA-1 ou antígeno associado a função leucocitária-1), alphaMbeta2 (CD11b/CD18, Mac-1, CR3 ou antígeno macrofágico-1), alphaXbeta2 (CD11c/CD18, p150,95 ou proteína 150,95) e alphaDbeta2 (Cd11d/Cd18). As integrinas são essenciais para a migração dos leucócitos, mediando contatos intercelulares. São proteínas de superfície leucocitária e participam da adesão dos leucócitos às células endoteliais e na ligação dos linfócitos T às células apresentadoras de antígeno ou células alvo (VOLTZ A, 1993; KIM CH, 2005).

A ausência de CD18 ocasiona a deficiência de adesão leucocitária tipo 1 (LAD), uma rara imunodeficiência autossômica recessiva, caracterizada por infecções bacterianas e fúngicas recorrentes e retardo de cicatrização de feridas (ERRANTE *et al*, 2011). Uma

redução severa na expressão de CD18 está envolvida na fisiopatogênese da psoríase cutânea (PETERS *et al*, 2006).

9.3.4.7. CD62L

O antígeno CD62-L ou L-selectina, é uma glicoproteína de adesão que está expressa na superfície celular dos leucócitos, incluindo os granulócitos, os monócitos e a maioria dos linfócitos. Possui papel importante na interação endotélio-leucócito (VON ADRIAN *et al*, 1993). O CD-62L recruta e orienta os leucócitos para o sítio inflamatório e para os linfonodos. Também está envolvido na ativação e agregação leucocitária.

A L-selectina adere os leucócitos ao endotélio vascular na cascata de eventos que levam ao processo de inflamação. É necessária para a migração dos leucócitos, sendo o passo inicial da sequência de eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos nos sítios de injúria. A interação da selectina com seus ligantes resulta num declínio dramático da velocidade dos neutrófilos, o que permite que as proteínas conhecidas como integrinas promovam ligamentos firmes dos neutrófilos com o endotélio (ROBBINS *et al*, 1998).

Podemos encontrar um aumento dos níveis de CD62L em várias patologias. KOURTIS *et al* (2003) encontraram grande aumento nos níveis de CD62L em recém-nascidos com infecção neonatal, sugerindo poder ser um possível marcador no diagnóstico de sepse neonatal. GARCIA-CARRASCO *et al* (2000) encontraram altas concentrações de CD62L em pacientes com síndrome de Sjogren que possuíam fenômeno de Raynaud, tireoidite autoimune e fator reumatóide.

A L-selectina também está expressa no embrião na fase pré-implantação uterina, possuindo uma similar função que exerce nos linfócitos, agindo como um facilitador de

adesão do embrião na superfície do endotélio do endométrio uterino (FUKUDA & SUGIHARA, 2008).

9.3.4.8. CD64

O antígeno CD64 (Fc-gamma-receptor 1) é uma glicoproteína receptora de superfície celular, que liga-se a anticorpos IgG com alta afinidade (HULETT & HOGART, 1988). É achado constitucionalmente em macrófagos e monócitos, mas a exposição de leucócitos polimorfonucleares à citocinas como interferon gama e G-CSF, pode induzir a expressão de CD64 nestas células (REPP *et al*, 1991). Após ligar-se à IgG, o CD64 interage com a cadeia acessória gama e gera a ativação celular.

LAYSECA-ESPINOSA *et al* (2002) demonstrou aumento de expressão de CD64 em recém-nascidos com sepse neonatal. MORSY *et al* (2008) também demonstrou, em estudo com recém-nascidos, que a expressão de CD64 pode ser útil para o diagnóstico de de sepse neonatal.

9.3.4.9. CD66acde

O antígeno CD66 é uma glicoproteína de 180-200 kDa da família do antígeno carcinoembrionário (SKUBITZ *et al*, 1996, STOKS *et al*, 1996).

O CD66a (BGP1, CEACAM1), o CD66d (CGM1, CEACAM3), CEACAM5 e CEACAM2 e 4, são proteínas transmembranas, enquanto o CD66c (CEAL, NCA, CEACAM6), CD66e (CEA, CEACAM5), CEACAM7 e 8, estão ancoradas a membrana plasmática pela unidade lipídica C-terminal GPI (*glycosylphosphatidylinositol*).

O CD66 a está expresso em uma variedade de células (epiteliais, melanoma,

linfócitos ativados).

A expressão do CD66c no sistema hematopoético é limitada aos granulócitos e seus precursores e também está presente no epitélio de vários órgãos. Sua super expressão é encontrada em vários tipos de cancer como: pulmão, mama, coloretal e carcinoma hepatocelular.

O CD66d possui um papel importante no clearance dos patógenos no sistema imune inato. Já o CD66e possui papel importante na adesão e sinalização celular. Está super expresso na maioria dos carcinomas, incluindo os do trato gastro-intestinal, respiratório, genitourinário e cancer de mama.

10. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO:

A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos. O tratamento, quando necessário, é realizado através da fototerapia.

Diversos estudos avaliam a influência da fototerapia na resposta alérgico-imune-inflamatória, mas não há relatos na literatura de estudos avaliando os efeitos da fototerapia na função dos neutrófilos.

O melhor conhecimento da expressão dos neutrófilos nos recém-nascidos antes e após a fototerapia seria importante para avaliar as possíveis repercussões na função dos neutrófilos desencadeadas pelo tratamento fototerápico.

11. OBJETIVOS:

11.1. Geral:

Avaliar e comparar a função dos neutrófilos, através da mensuração pela citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície em recém-nascidos ictericos antes e após 24 horas de fototerapia.

11.2. Específicos:

- 11.2.1. Avaliar a expressão do antígeno CD10 antes e após a fototerapia.
- 11.2.2. Avaliar a expressão do antígeno CD11b antes e após a fototerapia.
- 11.2.3 Avaliar a expressão do antígeno CD11c antes e após a fototerapia.
- 11.2.4. Avaliar a expressão do anticorpo CD15 antes e após a fototerapia.
- 11.2.5. Avaliar a expressão do anticorpo CD16 antes e após a fototerapia.
- 11.2.6. Avaliar a expressão do anticorpo CD18 antes e após a fototerapia.
- 11.2.7. Avaliar a expressão do anticorpo CD62L antes e após a fototerapia.
- 11.2.8. Avaliar a expressão do anticorpo CD64 antes e após a fototerapia.
- 11.2.9. Avaliar a expressão do anticorpo CD66 antes e após a fototerapia.

12. METODOLOGIA:

12.1. População em Estudo:

Recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g na primeira semana de vida, com necessidade de fototerapia.

12.2. População da Pesquisa:

A população efetivamente pesquisada foram os recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g, na primeira semana de vida, em tratamento fototerápico segundo critério da Academia Americana de Pediatria, internados no Serviço de Neonatologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição, no período de dezembro de 2015 a setembro de 2017.

12.3. Critérios de Inclusão:

Recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g na primeira semana de vida, que internem no Serviço de Neonatologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição e tenham critério de tratamento fototerápico.

12.4. Critérios de Exclusão:

Recém-nascidos que apresentavam mal-formações congênitas, síndromes com alterações cromossômicas, erro inato do metabolismo, infecção congênita do grupo

STORCH, asfixia neonatal, sepse ou suspeita de sepse, incompatibilidade Rh que necessitasse de exsanguineotransfusão ou uso de imunoglobulina, transfusão de hemocomponentes. Foram também excluídos do estudo os pacientes sem o consentimento dos pais/responsáveis e aqueles com ausência de requisição de exames pela equipe assistencial.

12.5. Delineamento:

A pesquisa foi desenvolvida sob a forma de um estudo de coorte. O fator em estudo foi a quantificação da expressão dos neutrófilos nos recém-nascidos submetidos à fototerapia (antes e após 24 horas de fototerapia), através de anticorpos monoclonais CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66.

12.6. Logística:

As mães dos recém-nascidos foram convidadas a participar do estudo quando os pacientes tiveram a indicação de início do tratamento com fototerapia no Serviço de Neonatologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição, sendo realizado a leitura e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1), retirando as dúvidas que pudessem surgir.

Os recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g, na primeira semana de vida, com indicação de tratamento fototerápico segundo critério da Academia Americana de Pediatria, tiveram a análise dos marcadores por citometria de fluxo, utilizando material de descarte, proveniente da amostra de sangue

requisitada pela equipe médica assistencial.

Os dados de prontuário obstétrico foram revisados para preenchimento da ficha de informações. Os recém-nascidos foram acompanhados durante a internação. Os dados de identificação dos recém-nascidos foram substituídos por código personalizado de conhecimento único e exclusivo do pesquisador, com numeração de 1 a 25, visando sigilo e confidencialidade.

A avaliação da expressão dos marcadores de superfície através dos anticorpos monoclonais por citometria de fluxo foi realizada no mesmo dia da coleta, no Laboratório de Hematologia Zanol.

Os recém-nascidos receberam fototerapia através do Bilispot® ou Bilitron®, com irradiância variando entre 25-35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$.

12.7. Análise Laboratorial:

Os procedimentos de imunofenotipagem de citometria de fluxo foram realizados como relatados por ARLINDO *et al*, 2017. Em resumo, 50 μL de amostras de sangue total anticoaguladas com EDTA foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluoroquromo (MoAbs) durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Os painéis de citometria de fluxo são descritos no quadro 2. Os glóbulos vermelhos foram lisados por incubação com Excelyse I, seguido de incubação com água destilada. As amostras foram lavadas e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Todos os reagentes foram adquiridos da EXBIO (Praha, CZ) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram processadas dentro de 48 horas de coleta (Davis, 2013).

Quadro 2. Painéis de citometria de fluxo usado no estudo

Fluorocromos		FITC	PE	PerCP
Tubo 1	Anticorpo	CD18	CD62L	CD11c
	Clone	MEM-48	LT-TD180	BU15
Tubo 2	Anticorpo	CD64	CD11b	CD10
	Clone	10.1	MEM-174	MEM-78
Tubo 3	Anticorpo	CD15	CD66acde	CD16
	Clone	MEM-158	CLB-gran/10	3G8

Imediatamente após a preparação, as amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACSCalibur, usando o software CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Diego, EUA). Cerca de 50.000 eventos por amostra foram obtidos. A reprodutibilidade das intensidades de fluorescência foi preservada pela calibração e pelos procedimentos diários de controle de qualidade. A análise de dados foi realizada com o software CytoPaint Classic 1.1 (Leukobyte, Pleasanton, CA, EUA). Para a estratégia de gating, os detritos foram removidos e os neutrófilos foram fechados com base na distribuição de dispersão para a frente (FSC) e dispersão lateral (SSC). Foram registrados percentuais de neutrófilos e intensidades médias de fluorescência (IMFs) dos marcadores em estudo.

12.8. Considerações Éticas:

O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição. Os participantes deste estudo foram convidados a participarem da pesquisa, sendo utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

seguindo as normas da resolução 466/12 do CNS/MS, que preconiza normas a serem seguidas em pesquisas com o envolvimento de seres humanos. Este foi lido e todos os itens explicados através de uma linguagem clara e minuciosa, assinado em duas vias, pelo pesquisador e participante. Uma via foi fornecida para o entrevistado e a outra foi guardada pelo pesquisador em um local seguro por cinco anos e após, será incinerado (Anexo 2). Antes disso, aos participantes deste processo foi esclarecido o tema, objetivos, a relevância deste estudo, assim como, lhes será assegurado à liberdade de participarem ou não da pesquisa, bem como de retirar-se a qualquer momento, sem prejuízos, se assim desejarem. Os dados coletados e analisados serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa. Os dados de identificação do sujeito da pesquisa na ferramenta de coleta de dados foi substituído por código personalizado de conhecimento único e exclusivo do pesquisador, visando sigilo e confiabilidade.

Toda pesquisa em seres humanos visa o mínimo de intervenções possível. Com essa preocupação, os recém-nascidos não foram submetidos a procedimentos ou coleta de sangue exclusivamente para a pesquisa. As amostras de sangue foram amostras de descarte: quando uma amostra de sangue em tubo EDTA era requisitada pela equipe médica assistencial, a amostra de descarte era utilizada para análise dos marcadores. Nenhuma amostra de sangue, punção venosa ou artéria foi realizada exclusivamente para fins da pesquisa.

12.9. Variáveis Estudadas:

As variáveis estudadas foram obtidas a partir das informações contidas na ficha obstétrica, no prontuário hospitalar do recém-nascido e através das amostras de sangue periférico do recém-nascido.

As variáveis obstétricas foram: número de consultas pré-natal, número de gestações, idade materna, tipo de parto, tempo de bolsa rota, característica do líquido amniótico.

As variáveis dos prontuários dos recém-nascidos foram: sexo, apgar, peso de nascimento, idade gestacional, classificação AIG/GIG/PIG, incompatibilidade ABO, incompatibilidade Rh, perda de peso por dificuldade de amamentação, tempo de vida no início da fototerapia,

As variáveis laboratoriais estudadas foram: os anticorpos monoclonais CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64, CD66acde, a hemoglobina e as bilirrubinas totais e frações.

5.10. Cálculo do Tamanho da Amostra:

O tamanho da amostra foi calculado a partir de dados da literatura de icterícia, fototerapia e alterações no sistema imune (JAHANSHAHIFARD *et al*, 2012; KURT *et al* 2009; PROCIANOY *et al*, 2010; SIROTA *et al*, 1999).

Foram empregadas proporções para o cálculo do tamanho da amostra.

O $n=25$ permite encontrar a diferença de 30% no IMF, um poder 80% e um nível de significância de 5%

5.11 Análise Estatística:

Foram calculadas as médias e desvio padrão para cada IMF dos anticorpos monoclonais.

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (p25-p75) e as categóricas como número e porcentagem. As diferenças das médias da expressão dos marcadores pré e pós fototerapia foram comparadas pelo teste t de Student. O nível de significância para todas as diferenças foi estabelecido em $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences software version 18.0* (SPSS 18.0).

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADIB M, *et al.* Evaluation of CD11b expression on peripheral blood neutrophils for early detection on neonatal sepsis. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 6, n. 2, p. 93-96, 2007.
2. AHLFORS CE. Criteria for exchange transfusion in jaundiced newborns. **Pediatrics**, v. 93, p. 488, 1994.
3. AKABA K, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucoronosyltransferase gene. A comun missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese. **Biochem Mol Biol int**, v. 46, p. 21, 1998.
4. ALEXANDRA VOLZ. Regulation of CD18 expression in human neutrophis as related to shape changes. **Journal of Cell Science**, v.106, p. 493-502, 1993.
5. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 114, p. 297-316, 2004.
6. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTIS. Neonatal complications and manegement oh high-risk infants. In: Guidelines for Perinatal Care, 7th ed, Riley LE, Stark AR (Eds). American Academy of pediatrics, Elk Grove Village, 2012.
7. ARIAS IM, *et al.* The biology of the bile canaliculus. 1993. **Hepatology**, v. 17, p. 318, 1993.

8. ARLINDO EM, *et al.* Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 3, p. 252-258, 2017.
9. ASI AS, *et al.* The effect of phototherapy on urinary calcium excretion in term neonates. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 27, p/ 486-492, 2016.
10. ASPBERG S, *et al.* Is neonatal phototherapy associated with an increased risk for hospitalized childhood bronchial asthma? **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 18, n. 4, p. 313-9, 2007.
11. ASPBERG S, *et al.* Confirmed association between neonatal phototherapy or neonatal icterus and risk of childhood asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 21, p. 733-9, 2010.
12. AYDIN B, *et al.* Blood Eosinophil Levels in Newborns with Severe Indirect Hyperbilirubinemia Treated with Phototherapy. **Iranian Journal of Pediatrics**, vol. 24, n. 3 ,p. 267-272, 2014.
13. AYCICEK A, *et al.* Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 2, p.141-6, 2008.
14. BANCROFT JD, *et al.* Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. **J Pediatr**, v. 132, p. 656, 1998.
15. BEKEN S, *et al.* The effects of phototherapy on eosinophil and eosinophilic cationic protein in newborns with hyperbilirubinemia. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 33, n. 3, p. 151-156, 2014.

16. BERG P, LINDELOF B. Is the phototherapy in neonates a risk factor for malignant melanoma development? **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 151, n. 12, p. 1185-1187, 1997.
17. BERK PD, *et al.* Studies of bilirubin kinetics in normal adults. **J Clin Invest**, v. 48, p. 2176, 1969.
18. BERK MA, *et al.* Macrosomia in infants of insulin-dependent diabetic mothers. **Pediatrics**, v. 83, p.1029-1034, 1989.
19. BEUTLER E, *et al.* Racial variability in the UDP-glucosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 8170, 1998.
20. BILATE AMB. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, p. 86-90, 2007.
21. BHUTANI VK, *et al.* Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonate: for a safer first week. **Pediatr Clin North Am**, vol, 51, p. 843-61, 2004.
22. BHUTANI VK, *et al.* Universal bilirubin screening for severe neonatal hyperbilirubinemia. **Journal of Perinatology**, v. 30, p. S6–S15, 2010.
23. BHUTANI VK, *et al.* Predictive ability of a pre-discharge hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns. **Pediatrics**, v. 103, p. 6, 1999.
24. BHUTANI VK, COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Phototherapy to prevent severe neonatal

- hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestational. **Pediatrics**, v. 128, p. e1046, 2011.
25. BOSMA PJ, *et al.* Bilirubin UDP-glucosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. **J Biol Chem**, v. 269, p. 17960, 1994.
 26. BOSNA PJ, *et al.*. The genetic basis of the reduced expression of UDP-glucosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. **N Engl Med**, v. 333, p. 1171, 1995.
 27. BREWSTER DH, *et al.* Risk of skin cancer after neonatal phototherapy: retrospective cohort study. **Arch Dis Child**, v. 95, n. 10, p. 826-831.
 28. CHRISTENSEN RD, *et al.* **Journal of Perinatology**, v. 34, p. 616-619, 2014.
 29. COONS AH, *et al.* Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc Soc exp Biol Med**, v. 47, p. 200-202, 1941.
 30. DAS RR, NAIK SS. Neonatal hyperbilirubinemia and childhood allergic diseases: a systematic review. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 26, n. 1, p. 2-11, 2015.
 31. DAVIS BH, *et al.* Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 84, n. 5, p. 286-290, 2013.
 32. DEMARET J, *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. 6, p. 1081-1090, 2015.
 33. DENNERY PA, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia. **N Engl J Med**, v. 344, p. 581, 2001.

34. DRUMMOND GS, *et al.* Control of bilirubin production by synthetic heme analogs: pharmacologic and toxicologic considerations. **J Perinatol**, v. 16, p. 72, 1996.
35. DJOKOMULJANTO S, *et al.* Efficacy of phototherapy for neonatal jaundice is increased by the use of low-cost white reflecting curtains. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 91, F439, 2006.
36. EGGERT P, *et al.* On the distribution of irradiation intensity in phototherapy. Measurements of effective irradiance in an incubator. **Eur J Pediatr**, v. 142, p. 25, 1984.
37. EL-ABDIN MYZ, *et al.* Phototherapy and DNA changes in full neonates with hyperbilirubinemia. **The Egyptian Journal of Medical Huan Genetics**. v. 13, p. 29-35, 2012.
38. ELFEKY RAA, *et al.* The effect of phototherapy on lymphocyte subsets in newborn infants. **J Allergy Immunol**, AB12, 2012.
39. ENNEVER JF, *et al.* Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy. **J Clin Invest**, v. 79, p. 1674, 1987.
40. ERRANTE PR, *et al.* Deficiência da adesão leucocitária tipo I. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**, v. 34, n. 6, p. 225-233, 2011.
41. ERLINGER S, *et al.* Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. **Gastroenterology**, v. 146, p. 1625, 2014.
42. EYADA IK, *et al.* Effect of phototherapy on B and T lymphocytes in Egyptian

- infants suffering from neonatal jaundice. **Allergol Immunopathol (Madr)**, vol. 45, n. 3, p. 290-296, 2017.
43. FAWAZ R, *et al.* Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society of pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 64, p. 154, 2017.
44. FUKUDA MN, SUGIHARA K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. **J Obster Gynaecol Res**, v. 34, n. 2, p.129-36, 2008.
45. GALY A, *et al.* Human T, B, natural killer, and Dendritic Cells Arise from a Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset. **Immunity**, v. 3, p. 459-473, 1995.
46. GARCIA-CARRASCO M, *et al.* P. Circulating concentrations of soluble L-selectin (CD62L) in patients with primary Sjogren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 59, n. 4, p. 297-299, 2000.
47. GARLAND JS, *et al.* Treatment of infants with indirect hyperbilirubinemia. Readmission to birth hospital vs nonbirth hospital. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 148, p. 1317, 1994.
48. GUÉRIN E, *et al.* Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration. **Crit Care Med**, v. 42, n. 9, p. 2007-2018, 2014.
49. GENEL F, *et al.* Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b, and CD62L in

- neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. **World J Pediatr**, vol. 8, n. 1, p. 72-5, 2012.
50. GÓMEZ-MEDA BC, *et al.* Effects of blue light phototherapy on DNA integrity in preterm newborns. **J Photochem Photobiol B**, 2014, vol.141, p. 283-7, 2014.
51. GOURLEY GR, *et al.* The effect of diet on feces and jaundice during the first 3 weeks of life. **Gastroenterology**, v. 103, p. 660, 1992.
52. GOURLEY GR, *et al.* A controlled, randomized, double-blind trial of prophylaxis against jaundice among breastfed newborns. **Pediatrics**, v. 116, p. 385, 2005.
53. GRUNEBAUM E, *et al.* Breast mild jaundice: natural history, familial incidence and late neurodevelopmental outcome of the infant. **Eur J Pediatr**, v. 150, p. 267, 1991.
54. HAKOMORI S. LE(X) AND RELATED STRUCTURES AS ADHESION MOLECULES. **HISTOCHEM J**, V. 24, N. 11, P. 771-776, 1992.
55. HARB R, THOMAS DW. Conjugated Hyperbilirubinemia. **Pediatrics in Review**, v. 3, 2007.
56. HENTZEN ER, *et al.* Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. **Blood**, v. 95, n.3, p. 911-920, 2000.
57. HOLTROP PC, *et al.* A clinical trial of fiberoptic phototherapy vs conventional phototherapy. **Am J Dis Child**, v. 146, p. 235, 1992.
58. HUANG MJ, *et al.* Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates.

- Pediatr Res**, v. 56, p. 682, 2004.
59. HULLET M, HOGARTH P. The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. **Mol Immunol**, v. 35, p. 989-996, 1998.
60. JAHANSHAHIFARD S, *et al.* Effects of Phototherapy on Cytokines Levels and White Blood Cells in Term Neonate with Hiperbilirubinemia. **J Clin Neonatol**, vol.1, n. 3, p. 139-142, 2012.
61. JOHNSON JD, *et al.* Exaggerated jaundice in Navajo neonates. The role of bilirubin production. **Am J Dis Child**, v. 140, p. 889, 1986.
62. JOHNSON LH, *et al.* System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. **J Pediatr**, v. 140, p. 396, 2002.
63. JOHNSON L, *et al.* Clinical report from the pilot USA Kernicterus Registry (1992 to 2004). **J Perinatol**, v. 29, Suppl. 1, p. S25, 2009.
64. JOHNSON L, BHUTANI VK. The clinical syndrome of bilirubin-induced neurologic dysfunction. **Semin Perinatal**, v. 35, p. 101, 2011.
65. JANEWAY, C. Appendix II. CD antigens. **Immunobiology** (5a ed), 2001.
66. KAPLAN M, *et al.* Neonatal jaundice and liver disease. In: Neonatal-perinatal medicine: Diseases of the fetus and Infant, 9th ed, Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC (Eds), Elsevier Mosby, St. Louis, v. 2, p. 1443, 2011.
67. KARAKUKCU C, *et al.* Assessment of DNA damage and plasma catalase activity in healthy term hyperbilirubinemic infants receiving phototherapy. **Mutat Res**, v.

- 690, p. 12-16, 2009.
68. KAWADE N, ONISHI S. The prenatal e postnatal development of UDP-glucoronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. **Biochem J**, v. 196, p. 257, 1981.
69. KERR MA, STOCKS SC. The role of CD15-(Le(X)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. **Histochem J**, v. 24, n. 11, p. 811-826, 1992.
70. KIM CH. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. **Curr Opin Hematol**, v. 12, p. 298-304, 2005.
71. KOURTIS AP, *et al.* Soluble L-selectin, a marker of immune activation, inneonatal infection. **Clin immunol**, v. 109, n. 2, p. 224-228, 2003.
72. KUMAR P, *et al.* Light-emitting diode phototherapy for unconjugated hyperbilirubinaemia in neonates. **Cochrane Database Syst Rev** 2011; CD007969.
73. KURT A, *et al.* Use of Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia Affects Cytokine Production and Lymphocyt Subsets. **Neonatology**, v. 95, p. 262-266, 2009.
74. KUZNIEWICZ MW, *et al.* Invited commentary: does neonatal hyperbilirubinemia cause asthma? **Am J Epidemiol**, v. 178, n. 12, p. 1698-1701, 2013.
75. LAI YC, YEW YW. Neonatal Blue Light Phototherapy and Melanocytic Nevus Count in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Pediatr Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 62-68, 2016.

76. LAYSECA EE, *et al.* Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 13, n.5, p. 319-27, 2002.
77. LEIPE S, *et al.* Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes in neonatal hyperbilirubinemia before and following phototherapy. **Pediatr Grenzgeb**, v. 27, n. 5, p. 347-58, 1988.
78. LIU L, KUBES P. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. **Thromb Haemost**, v. 89, p. 213-220., 2003.
79. LEWIS SM, *et al.* Expression of CD11c and EMR2 in neutrophils: potential diagnostic biomarkers for sepsis and systemic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p.184-194, 2015.
80. LONG J, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia and Gly71Arg mutation of UGT1A1 gene: a Chinese case-control study followed by systematic review of existing evidence. **Acta Paediatr**, v. 100, p. 966, 2011.
81. MAHÉ E, *et al.* Neonatal blue-light phototherapy does not increase nevus count in 9-year-old children. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p.896-900, 2009.
82. MAISELS MJ, GIFFORD K. Normal serum bilirubin levels in the newborn and the effect of breast-feeding. **Pediatrics**, v. 78, p. 837, 1986.
83. MAISELS MJ. Neonatal hyperbilirubinemia. In: Care of the High-Risk neonate, 5th ed, Klaus MH, Fanaroff AA (Eds), WB Saunders, Philadelphia, p. 324, 2001.
84. MAISELS MJ, KRING E. Rebound in serum bilirubin level following intensive phototherapy. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 156, p. 669, 2002.

85. MAISELS MJ, *et al.* The natural history of jaundice in predominately breastfed infants. **Pediatrics**, v. 134, e340, 2014.
86. MARTENS A, *et al.* Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v. 27, n.3, p. 549-553, 1999.
87. MARUO Y, *et al.* Bilirubin uridine diphosphate-glucosyltransferase variation is a genetic basis of breast milk jaundice. **J Pediatr**, v. 165, p. 36, 2014.
88. MAZZONE A, RICEVUTI G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: Biological and clinical relevance. **Hematologica**, v. 80, p. 161-175, 1995.
89. MCPHERSON R.A., P.M., HENRY J.B. **Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods**. Ed. Philadelphia, PA, v. 22. Elsevier/Saunders, 2011.
90. MESSNER KH, *et al.* Phototoxicity of the newborn primate retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 17, p. 178, 1978.
91. MORSY AA, *et al.* CD64 cell surface expression on neutrophils for diagnosis of neonatal sepsis. **Egypt J Immunol**, v. 15, n. 2, p. 53-61, 2008.
92. MRKAIC LJ, *et al.* Neonatal immune system changes caused by phototherapy. **Srp Arh Celok Lek**, v. 122, p. 36-37, 1994.
93. NEWMAN TB, *et al.* Prediction and prevention of extreme neonatal hyperbilirubinemia in mature health maintenance organization. **Arch Pediatr Adolesc med**, v. 108, p. 31-39, 2000.
94. NEWMAN TB, *et al.* Retrospective Cohort Study of Phototherapy and

- Childhood Cancer in Northern California. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
95. NUPPONEN I, *et al.* Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnosis markers for early-onset nonatal sepsis. **Pediatrics**, v. 108, n. 1, E. 12, 2001.
96. OLÁH J, *et al.* Long-term hazards of neonatal blue-light phototherapy. **Br J Dermatol**, v. 169, p. 243, 2013.
97. PEEVY KJ, *et al.* Hyperbilirubinemia in infants of diabetic mothers. **Pediatrics**, v. 66, p. 417-419, 1980.
98. PETERS T, *et al.* CD18 in monogenic and polygenic inflammatory processes of the skin. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 2006.
99. PREER GL, PHILIPP BL. Understanding and managing breast milk jaundice. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 96, F461, 2011.
100. PROCIANOY RS, *et al.* The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. **Amer J Perinatol**, v. 27, n. 5, p. 375-379, 2010.
101. RASHEDY FH, *et al.* Effect oh Phototherapy on CD4, CD8 and natural Killer Cells of Full Term Neonates with Indirect Hyperbilirubinemia. **Egypt J immunol**, v. 22, n. 2, p. 23-29, 2015.
102. REPP R, *et al.* Neutrophils express the hidh affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo applocation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 78, n.4, p. 885-889, 1991.

103. RISKIN A, *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and borderline deficiency: association with neonatal hyperbilirubinemia. **J Pediatr**, v. 162, p. 191, 2012.
104. ROBBINS SL, *et al.* Robbins Patologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1998.
105. RUBALTELLI FF, *et al.* Immune competence assessment in hyperbilirubinemic newborns before and after phototherapy. **Helv Paediatr Acta**, v. 32, n. 2, p. 129-33, 1977.
106. SALES MM, V.D. Citometria de Fluxo Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. 2013.
107. SCHLOSSMAN S ET AL (EDS). Leukocyte Typing V. **Oxford University Press**, 1995.
108. SHANNEIDARI M, HOMER C. Impact of design of neonatal of neonatal intensive care units neonates, staff, and families: a systematic literature review. **J Perinat Neonatal Nurs**, v. 26, n. 3, p. 260-6, 2012.
109. SHIPP MASTEFANO GB, *et al.* Down-regulation of enkephalin mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase. **Nature**, v. 347, p. 394, 1990.
110. SHIPP MA, *et al.* CD10 (CALLA)/Neutral Endopeptidase 24.11 Modulates Inflammatory peptide-Induced Changes in Neutrophil Morphology, Migration, and Adhesion proteins and Itself regulated by Neutrophil Activation. **Blood**, v. 78, n. 7, p. 1834-1841, 1991.

111. SKIERKA JM, *et al.* UGT1A1 genetic analysis as a diagnosis aid for individuals with unconjugated hyperbilirubinemia. **J Pediatr**, v. 162, p. 1146, 2013.
112. SILVA I, LUCO M, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 5, p. 455-458, 2009.
113. SIROTA L, *et al.* Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 11, p. 910-913, 1999.
114. SKUBITZ KM, *et al.* CD66a, CD66b, CD66cm and CD66d each independently stimulate neutrophil. **J Leukoc Biol**, v. 60, n. 1, p. 106-117, 1996.
115. SOLOVJOV D, *et al.* Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. **J Biol Chem**, v. 280, n. 2, p. 1336-1345, 2005).
116. STEVENSON DK, *et al.* Pulmonary excretion of carbon monoxide as an index of bilirubin production. Iia. Evidence for possible delayed clearance of bilirubin in infants of diabetic mother. **J Pediatr**, v. 98, p. 822, 1981.
117. STOCKS SC, *et al.* CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biol**, v. 58, n. 1, p. 40-48, 1995.
118. STOCKS SC, *et al.* CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 12, p. 2924-2932, 1996.
119. TAN KL. Comparison of the efficacy of fiberoptic and conventional

- phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. **J Pediatr**, v. 125, p. 607, 1994.
120. TATLI MM, *et al.* Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. **Mutat Res**, v. 654, n. 1, p. 93-95, 2008.
121. TRIDENT A, DE LUCA D. Efficacy of light-emitting diode versus other light sources for treatment of neonatal hyperbilirubinemia: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 101, p. 458, 2012.
122. TURAN O, *et al.* Impact of phototherapy on vasoactive mediators: NO and VEGF in the newborn. **J Perinat Med**, v. 32, n. 4, p. 359-364, 2004.
123. UHRIKOVA Z, *et al.* Hyperbilirubinemia and phototherapy in newborns: Effects on cardiac autonomic control. **Early Hum Dev**, v. 91, n. 6, p. 351-356, 2015.
124. VREMAN HJ, *et al.* Phototherapy: current methods and future directions. **Semin Perinatol**, v. 28, p. 326, 2004.
125. VIDRANSKI V, *et al.* Platelet satellitism in infection disease? **Biochem Med**, v. 25, p. 285-294.
126. VON ADRIAN UH, *et al.* L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through silyl LewisX-dependent and independent recognition pathways. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 182-191, 1993.
127. VORUP-JENSEN T, *et al.* Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, . p. 30869-77, 2007.
128. XIONG T, *et al.* The side effects of phototherapy for neonatal jaundice:

- what do we know? What should we do? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1247-5125, 2011.
129. XIONG T, *et al.* Side effects of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v. 14, n. 5, p. 396-400, 2012.
130. ZARKESH M, *et al.* The Effect of neonatal Phototherapy on Seru, Level of Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. **J Clin Neonatol**, v. 5, p. 189-192, 2016.
131. ZERBINI MCN, S.F., *et al.* Classification of haematopoietic and lymphoid tumors. WHO, standardization of nomenclature in Portuguese. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 6, p. 643-648, 2011.
132. ZOLA H, *et al.* CD molecules 2006--human cell differentiation molecules **J Immunol Methods**, v. 318, p. 1-5, 2007.
133. WHATCHKO JF, *et al.* Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. **Pediatrics**, v. 124, p. e868, 2009.
134. WEIRICH E, *et al.* CD11b expression on granulocytes as a diagnostic marker for neonatal sepsis. **Pediatric research**, v. 39, p. 303, 1996.
135. WEIRICH E, RABIN RL, *et al.* Neutrophil CD11b expression as a diagnosis marker for early-onset neonatal infection. **J Pediatr**, v. 132, p. 445-451, 1998.
136. WEISSMAN A, *et al.* Effect of phototherapy on neonatal heart variability and complexity. **Neonatology**, v. 95, n. 1, p. 41-46, 2009.

137. WICKREMASINGHE AC, *et al.* Neonatal Phototherapy and Infantile Cancer. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
138. WINTERMEIER K, *et al.* Neonatal blue light phototherapy increases café-au-lait macules in preschool children. **Eur J Pediatr**, v. 173, p. 1519, 2014.
139. YAHIA S, *et al.* Influence of hyperbilirubinemia and phototherapy on markers of genotoxicity and apoptosis in full-term infants. **Eu J Pediatr**, v. 174, n. 4, p. 459-469, 2015.

14. ARTIGO 1 ORIGINAL EM PORTUGUÊS

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE NEUTRÓFILOS EM
RECÉM-NASCIDOS ICTÉRICOS ANTES E APÓS A FOTOTERAPIA

Fabrizia R. S. Faulhaber, MD

Renato S. Procianoy, MD, PhD

Rita de Cássia Silveira, MD, PhD

Gustavo Adolpho M. Faulhaber, MD, PhD

Nathalia A. Marcondes, PhD

Instituições às quais o trabalho está vinculado:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-Graduação em Saúde da
Criança e do Adolescente

Serviço de Neonatologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição

Financiamento: FIPE/HCPA

Autor responsável pela correspondência: Fabrizia R. S. Faulhaber - Rua Tobias da
Silva, 66/201. Fone (51) 8408-8737

E-mail: fabriziaf@me.com

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE NEUTRÓFILOS EM RECÉM-NASCIDOS ICTÉRICOS ANTES E APÓS A FOTOTERAPIA

RESUMO

A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos. O tratamento das formas graves é realizado através da fototerapia. Não existem estudos na literatura avaliando os efeitos da fototerapia na função dos neutrófilos de recém-nascidos. O melhor entendimento da função dos neutrófilos nos recém-nascidos antes e após a fototerapia seria importante para avaliar as possíveis repercussões na expressão dos neutrófilos desencadeadas pelo tratamento fototerápico. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a função dos neutrófilos, através da mensuração pela citometria de fluxo da expressão dos principais marcadores de superfície em recém-nascidos ictericos, antes e após 24 horas de fototerapia.

Metodologia: Foram incluídos recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g, que possuíam critérios da Academia Americana de Pediatria para tratamento fototerápico. Os critérios de exclusão foram: malformações congênitas, síndromes com alterações cromossômicas, erro inato do metabolismo, infecções do grupo STORCH, asfixia neonatal, sepse ou suspeita de sepse, exsanguineotransfusão, transfusão de hemocomponentes e uso de imunoglobulina. Foi realizada a avaliação de expressão da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, antes do início e após 24 horas do início da fototerapia. Foram utilizados os testes qui-quadrado e T de Student para análise dos dados.

Resultados: Foram incluídos 25 recém-nascidos no estudo, com idade média de 53 (27.5-75.5) horas de vida e bilirrubina média de 13.6 ± 2.85 mg/dL. Não houve diferença estatística na expressão de CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 e percentual de neutrófilos antes e após 24 horas de fototerapia. Ocorreu aumento da expressão de CD10 ($p=0.038$) e CD16 ($p=0.017$) e redução da expressão de CD11c ($p=0.023$) e CD66acde ($p=0.004$) após 24 horas de fototerapia.

Conclusão: Os recém-nascidos submetidos ao tratamento fototerápico apresentaram aumento da expressão de CD10 e de CD16 e diminuição da expressão de CD11c e de CD66acde após 24 horas de exposição, que pode estar relacionado a um efeito anti-inflamatório da fototerapia nos recém-nascidos expostos a este tratamento.

Resumo: 321 palavras.

Descritores: neutrófilos; recém-nascido; icterícia; hiperbilirrubinemia; CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66acde.

Introdução:

A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos (1,2). Uma grande parcela das causas de hiperbilirrubinemia em recém-nascidos a termo é benigna e reversível. A mais temida toxicidade potencialmente irreversível secundária à hiperbilirrubinemia é a encefalopatia pela bilirrubina, denominada Kernicterus (3,4).

O principal tratamento da icterícia é realizado através da fototerapia, seguindo os critérios recomendados pela academia americana de pediatria (4). Desde a década de 1950 a fototerapia tem sido a terapia de escolha para os recém-nascidos com hiperbilirrubinemia indireta. Ela diminui os níveis de bilirrubina não conjugada no plasma, prevenindo o kernicterus e diminuindo a necessidade de exsanguineotransfusão (1-4).

Os efeitos adversos podem ocorrer a curto ou a longo prazo (5). Nas últimas décadas, diversos estudos surgiram avaliando a influência da fototerapia na resposta alérgico-imuno-inflamatória, mostrando evidências que a fototerapia pode afetar diretamente a expressão e função de receptores de superfície das células, incluindo moléculas de adesão, citocinas e receptores de fator de crescimento (6-10). Há também estudos demonstrando aumento da contagem de eosinófilos nos pacientes que recebem fototerapia e risco de desenvolvimento de asma (11-13). Estudos também demonstram o aumento do dano ao DNA em leucócitos em neonatos com hiperbilirrubinemia que foram submetidos à fototerapia (14-16). Eyada *et al* estudaram os efeitos da fototerapia em linfócitos B e T em recém-nascidos ictericos em fototerapia (17). Não foram encontrados estudos na literatura avaliando os efeitos da fototerapia na função dos neutrófilos de recém-nascidos. A mensuração da função dos neutrófilos pode ser realizada pela avaliação da expressão dos marcadores de superfície, através da avaliação do MFI dos anticorpos monoclonais

CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 e CD66, que possuem papéis específicos na regulação da movimentação, adesão e ativação leucocitária (18-26).

O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente a função dos neutrófilos em recém-nascidos icterícos antes e após o tratamento fototerápico, através da avaliação da expressão dos principais marcadores da função neutrofílica por citometria de fluxo. O melhor conhecimento da função dos neutrófilos nos recém-nascidos antes e após a fototerapia seria importante para avaliar as possíveis repercussões na expressão dos neutrófilos desencadeadas pelo tratamento fototerápico.

Metodologia:

População em Estudo:

Estudo de coorte prospectivo de recém-nascidos com idade gestacional ≥ 35 semanas e peso de nascimento ≥ 2000 g, na primeira semana de vida, em tratamento fototerápico segundo critério da Academia Americana de Pediatria, internados no Serviço de Neonatologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição, no período de dezembro de 2015 a setembro de 2017. Os critérios de exclusão foram: presença de mal-formações congênitas, síndromes com alterações cromossômicas, erro inato do metabolismo, infecção congênita do grupo STORCH, asfixia neonatal, disfunção respiratória, sepse ou suspeita de sepse, incompatibilidade Rh que necessitasse de exsanguineotransusão ou uso de imunoglobulina., exsanguineotransusão, transfusão de hemocomponentes. Foram também excluídos do estudo os pacientes sem o consentimento dos pais/responsáveis e aqueles com ausência de requisição de exames pela equipe assistencial. Os recém-nascidos receberam fototerapia através do Bilispot® ou Bilitron®, com irradiância

variando entre 25-35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$.

Cosiderações Éticas:

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição (CAAE:48027015.8.0000.5530), e para todos os pacientes incluídos foi obtido consentimento informado do pai, mãe ou responsável. Quando uma amostra de sangue em tubo EDTA era requisitada pela equipe médica assistencial, a amostra de descarte era utilizada para análise dos marcadores. Nenhuma amostra de sangue, punção venosa ou artéria foi realizada exclusivamente para fins da pesquisa. A ausência de um grupo controle foi justificada pela dificuldade de obter-se um grupo de recém-nascidos sadios sem realização de punção venosa com finalidade exclusiva para pesquisa. A presença de infecção congênita do grupo STORCH, asfixia neonatal, disfunção respiratória, sepse ou suspeita de sepse foram fatores de exclusão do estudo por poder interferir nos resultados da expressão dos marcadores.

Variáveis e Definições:

As seguintes variáveis foram coletadas prospectivamente: Peso de nascimento, idade gestacional, tipo de parto, escore de Apgar, dados obstétricos e intercorrências maternas (idade materna, número de gestações, característica do líquido amniótico, tempo de bolsa rota), indicação de fototerapia pelos critérios da Academia Americana de Pediatria, incompatibilidade Rh, incompatibilidade ABO, dificuldade de mamar e perda de peso.

As variáveis estudadas nos neutrófilos foram as expressões dos marcadores CD10,

CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64, CD66.

Análise Laboratorial:

Os procedimentos de imunofenotipagem de citometria de fluxo foram realizados seguindo o seguinte protocolo: 50 µL de amostra de sangue total anticoaguladas com EDTA foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (MoAbs) durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Os painéis de citometria de fluxo são descritos na tabela 1. Os glóbulos vermelhos foram lisados por incubação com Exellyse I, seguido de incubação com água destilada. As amostras foram lavadas e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Todos os reagentes foram adquiridos da EXBIO® (Praha, CZ) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram processadas dentro de 48 horas de coleta (27,28).

Imediatamente após a preparação, as amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACSCalibur, usando o software CellQuest™ Pro® (BD Biosciences, San Diego, EUA). Cerca de 50.000 eventos por amostra foram obtidos. A reprodutibilidade das intensidades de fluorescência foi preservada pela calibração e pelos procedimentos diários de controle de qualidade. A análise de dados foi realizada com o software CytoPaint Classic 1.1 (Leukocyte, Pleasanton, CA, EUA). Para a estratégia de gating, os detritos foram removidos e os neutrófilos foram fechados com base na distribuição de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC). Foram registrados percentuais de neutrófilos e intensidades médias de fluorescência (IMFs) dos marcadores em estudo.

Análise Estatística:

O tamanho da amostra foi calculado a partir de dados da literatura de icterícia,

fototerapia e alterações no sistema imune (6,7,8,29), sendo empregadas proporções para o cálculo do tamanho da amostra. O $n=25$ permite encontrar a diferença de 30% no MFI, um poder 80% e um nível de significância de 5%

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (p25-p75) e as variáveis categóricas como número e porcentagem. As diferenças das médias da expressão dos marcadores pré e pós fototerapia foram comparadas pelo teste t de Student. O nível de significância para todas as diferenças foi estabelecido em $p<0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences software version 18.0* (SPSS 18.0).

Resultados:

Durante o período do estudo, 25 recém-nascidos icterícos que iniciaram o tratamento fototerápico preencheram os critérios de inclusão.

As características dos pacientes estão expressas no quadro 1.

Não houve diferença estatística na expressão de CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 e percentual de neutrófilos antes e após 24 horas de fototerapia .

Ocorreu significativo aumento no MFI de CD10 e CD16 ($p=0.038$ e $p=0.017$, respectivamente) e redução do MFI de CD11c e CD66acde ($p=0.023$ e $p=0.004$, respectivamente) após 24 horas de fototerapia. (Quadro 2 e Figura 1).

Todos os recém-nascidos tiveram a análise da expressão dos marcadores obtidos no início e após 24 horas de fototerapia (Figura 2).

Discussão:

O antígeno CD10 é uma glicoproteína de superfície que está expressa nos neutrófilos, nos progenitores linfóides normais, além de também estar expressa em

células tumorais, principalmente da leucemia linfoblástica aguda. Induz a migração e agregação dos neutrófilos, possuindo função como mediador da resposta inflamatória dos neutrófilos ao hidrolisar uma variedade de peptídeos biologicamente ativos, como a substância P, o glucagon, as encefalinas, a ocitocina, a bradicinina e o tripeptídeo f-met-leu-phe (f-MLP) (23, 30-31). O aumento da atividade do antígeno CD10 diminui a concentração destes peptídeos e conseqüentemente o processo inflamatório. Alguns estudos sobre a expressão de CD10 em processos infecciosos demonstram a diminuição de sua expressão em pacientes sépticos (32-35). Algumas doenças inflamatórias crônicas reumatológicas e cutâneas, assim como processos inflamatórias periodontais, possuem tratamentos anti-inflamatórios através da fototerapia que estão bem estabelecidos. A maioria dos estudos da fototerapia no tratamento destas doenças, com objetivo de efeito anti-inflamatório, demonstram a diminuição dos níveis de marcadores inflamatórios com o tratamento, principalmente nos níveis de citocinas, não havendo estudos na expressão de CD10 nestes pacientes (36,37). No nosso estudo houve aumento da expressão do antígeno CD10, parecendo ser compatível com um efeito anti-inflamatório da fototerapia.

O antígeno CD16 (ou FcγRIII) é um glicoproteína de 50-65 kDa servindo como um receptor de IgG de baixa afinidade. Está expresso de duas formas: FcγRIII-A (CD16a) e FcγRIII-B (CD16b), nas células NK, nos neutrófilos e nos macrófagos (38). Quando os neutrófilos sofrem apoptose, eles perdem a expressão de CD16. Os níveis de expressão de CD16 são bons indicadores de neutrófilos apoptóticos e não apoptóticos. A redução da expressão do CD16 nos neutrófilos tem sido considerada como um biomarcador para diminuição de sua função. No nosso estudo achamos um aumento da expressão do CD16 após a fototerapia, sendo que o significado deste achado não está bem estabelecido na literatura.

O antígeno CD11c é expresso principalmente em macrófagos e células

dendríticas. Possui importante função na migração celular e na fagocitose (41). Elevados níveis de neutrófilos expressando CD11c pode gerar um aumento no sequestro e na infiltração microvascular no sítio inflamatório. Ligantes do CD11c incluem o fibrinogênio e produtos da quebra do C3bi, ambos induzindo ativação celular. A ligação dos neutrófilos ao fibrinogênio, via CD11c, aumenta a estimulação de citocinas (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 e IL-8) e quimioatraentes como o C5a. Estudos demonstram o aumento da expressão de CD11c em pacientes com sepse e SIRS (42). No nosso estudo, a expressão de CD11c diminuiu após 24 horas de exposição dos recém-nascidos a fototerapia, o que sugere um efeito anti-inflamatório nos neutrófilos.

O antígeno CD66acde é uma glicoproteína de 180-200 kDa da família do antígeno carcinoembrionário (43, 44). O CD66a (BGP1, CEACAM1), o CD66d (CGM1, CEACAM3), CEACAM5 e CEACAM2 e 4, são proteínas transmembranas, enquanto o CD66c (CEAL, NCA, CEACAM6), CD66e (CEA, CEACAM5), CEACAM7 e 8, estão ancoradas a membrana plasmática pela unidade lipídica C-terminal GPI (*glycosylphosphatidylinositol*). O CD66a está expresso em uma variedade de células. A expressão do CD66c no sistema hematopoético é limitado aos granulócitos e seus precursores e também está presente no epitélio de vários órgãos. O CD66d possui um papel importante no clearance dos patógenos no sistema imune inato. O CD66e possui papel importante na adesão e sinalização celular. Todos são expressos nos neutrófilos e sua expressão aumenta significativamente após sua ativação. No nosso estudo demonstramos haver uma diminuição da expressão de CD66acde, mais uma vez podendo explicar uma possível atividade anti-inflamatória do tratamento fototerápico no recém-nascidos.

Os resultados de diferentes estudos avaliando a função imune-inflamatória nos recém-nascidos antes e após a fototerapia possuem resultados conflitantes. Há estudos

demonstrando aumento dos níveis de citocinas, outros diminuição e ainda outros não demonstrando alterações. Sirotta *et al* (29) demonstraram diminuição dos níveis de IL-beta e aumento de IL-2, IL-10 e TNF após fototerapia, sendo que os níveis de IL-3 e IL-6 não alteraram significativamente. Zarkesh *et al* (45) demonstraram aumento nos níveis de IL-6 e na contagem de leucócitos. Procianoy *et al* (6) demonstraram diminuição de IL-6 e não encontraram diferença nas concentrações de IL-8, IL-10, IL-1beta e TNF-alpha. Saber *et al* (46) demonstraram aumento no TNF alpha e não encontraram significância estatística na diferença da contagem de leucócitos. Kurt *et al* (7) demonstraram aumento de IL-8, IL-beta e TNF-alpha e diminuição na percentagem de linfócito CD3+. Rashedy *et al* (47) não encontraram alteração significativa nos níveis de linfócitos CD4+, CD8+ e NK após a fototerapia, assim como no estudo de Eyeda *et al* (17), que não encontraram diferença significativa na percentagem de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19 antes e após a fototerapia. Jahanshahifard *et al* (8) não demonstraram significância estatística na dosagem de TNF-alpha, IL-1, IL-6 após fototerapia e encontraram aumento na contagem de leucócitos. Chaudhari *et al* (48) demonstraram aumento do de TNF-alfa, IL-1 e IL-6 em recém-nascidos com anemia falciforme expostos a fototerapia, mas um estudo limitado por uma amostra de apenas dois pacientes. Há necessidade de mais estudos, com número maior de pacientes, para determinar os efeitos da fototerapia no sistema imune-inflamatório nos recém-nascidos submetidos à fototerapia.

O presente estudo possui limitações: a ausência de grupo controle não permite concluir se as alterações encontradas possam ser normais nessa fase da vida. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar a fisiologia destes marcadores na idade neonatal. O tempo de duração da fototerapia e o tamanho da amostra são outras limitações do estudo.

Nosso grupo publicou em 2009 um estudo demonstrando níveis diminuídos de IL-6 em recém-nascidos submetidos a fototerapia, discutindo a possibilidade do efeito anti-inflamatório da fototerapia neonatal (6). Nosso estudo atual vem corroborar este possível efeito anti-inflamatório da fototerapia nos recém-nascidos, através do aumento da expressão de CD10 e CD16 e diminuição da expressão de CD11c e CD66acde, demonstrando atividade anti-inflamatória nos recém-nascidos submetidos ao tratamento fototerápico.

Bibliografia:

1. SILVA I, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85. n. 5, p. 455-458, 2009.
2. BHUTANI VK, *et al.* Universal bilirubin screening for severe neonatal hyperbilirubinemia. **Journal of Perinatology**, v. 30, p. S6–S15, 2010.
3. BHUTANI VK, *et al.* Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonat: for a safer first week. **Pediatr Clin North Am**, vol, 51, p. 843-61, 2004
4. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 114, p. 297-316, 2004.
5. XIONG T, *et al.* The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we

- know? What should we do? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1247-5125, 2011.
6. PROCIANOY RS, *et al.* The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. **Amer J Perinatol**, v. 27, n. 5, p. 375-379, 2010.
 7. KURT A, *et al.* Use of Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia Affects Cytokine Production and Lymphocyte Subsets. **Neonatology**, v. 95, p. 262-266, 2009.
 8. JAHANSHAHIFARD S, *et al.* Effects of Phototherapy on Cytokines Levels and White Blood Cells in Term Neonate with Hiperbilirubinemia. **J Clin Neonatol**, vol.1, n. 3, p. 139-142, 2012.
 9. LEIPE S, *et al.* Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes in neonatal hyperbilirubinemia before and following phototherapy. **Peadiatr Grenzgeb**, v. 27, n. 5, p. 347-58, 1988.
 10. RUBALTELLI FF, *et al.* Immune competence assessment in hyperbilirubinemic newborns before and after phototherapy. **Helv Paediatr Acta**, v. 32, n. 2, p. 129-33, 1977.
 11. ASPBERG S, *et al.* Is neonatal phototherapy associated with an increased risk for hospitalized childhood bronchial asthma? **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 18, n. 4, p. 313-9, 2007.
 12. AYDIN B, *et al.* Blood Eosinophil Levels in Newborns with Severe Indirect Hyperbilirubinemia Treated with Phototherapy. **Iranian Journal of Pediatrics**, vol. 24, n. 3 ,p. 267-272, 2014.
 13. ASPBERG S, *et al.* Confirmed association between neonatal phototherapy or neonatal icterus and risk of childhood asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 21, p.

- 733-9, 2010.
14. GÓMEZ-MEDA BC, *et al.* Effects of blue light phototherapy on DNA integrity in preterm newborns. **J Photochem Photobiol B**, 2014, vol.141, p. 283-7, 2014.
 15. AYCICEK A, *et al.* Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 2, p.141-6, 2008.
 16. EL-ABDIN MYZ, *et al.* Phototherapy and DNA changes in full neonates with hyperbilirubinemia. **The Egyptian Journal of Medical Huan Gentic.** v. 13, p. 29-35, 2012.
 17. EYADA IK, *et al.* Effect of phototherapy on B and T lymphocytes in Egyptian infants suffering from neonatal jaundice. **Allergol Immunopathol (Madr)**, vol. 45, n. 3, p. 290-296, 2017.
 18. GENEL F, *et al.* Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b, and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. **World J Pediatr**, vol.8, n. 1, p. 72-5, 2012.
 19. LAYSECA EE, *et al.* Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 13, n.5, p. 319-27, 2002.
 20. LEWIS SM, *et al.* Expression of CD11c and EMR2 in neutrophils: potential diagnostic biomarkers for sepsis and systemic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p.184-194, 2015.
 21. MAZZONE A, RICEVUTI G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: Biological and clinical relevance. **Hematologica**, v. 80, p. 161-175, 1995.

22. MORSY AA, *et al.*. CD64 cell surface expression on neutrophils for diagnosis of neonatal sepsis. **Egypt J Immunol**, v. 15, n. 2, p. 53-61, 2008.
23. SHIPP MA, *et al.*. CD10 (CALLA)/Neutral Endopeptidase 24.11 Modulates Inflammatory peptide-Induced Changes in Neutrophil Morphology, Migration, and Adhesion proteins and Itself regulated by Neutrophil Activation. **Blood**, v. 78, n. 7, p. 1834-1841, 1991.
24. STOCKS SC, *et al.*. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biolo**, v. 58, n. 1, p. 40-48, 1995.
25. STOCKS SC, *et al.*. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 12, p. 2924-2932, 1996.
26. VON ADRIAN UH, *et al.*. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through silyl LewisX-dependent and independent recognition pathways. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 182-191, 1993.
27. DAVIS BH, *et al.*. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 84, n. 5, p. 286-290, 2013.
28. ARLINDO EM, *et al.*. Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 3, p. 252-258, 2017.
29. SIROTA L, *et al.*. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 11, p.

- 910-913, 1999.
30. GALY A, *et al.* Human T, B, natural killer, and Dendritic Cells Arise from a Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset. **Immunity**, v. 3, p. 459-473, 1995.
 31. SHIPP MASTEFANO GB, *et al.* Down-regulation of enkephalin mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase. **Nature**, v. 347, p. 394, 1990.
 32. MARTENS A, *et al.* Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v. 27, n.3, p. 549-553, 1999.
 33. DEMARET J, *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. 6, p. 1081-1090, 2015.
 34. GUÉRIN E, *et al.* Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration. **Crit Care Med**, v. 42, n. 9, p. 2007-2018, 2014.
 35. KANEKO T, *et al.* Reduced neutrophil Cd10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with E. coli or lipopolysaccharide. **Shock**, v. 20, n. 2, p. 130-137, 2003.
 36. CARVALHO CM, *et al.* Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ induced by carrageenan. **Photomed Laser Surg**, v. 9, n. 4, p. 245-254, 2011.
 37. RÁCZ E, PRENS EP. Phototherapy of psoriasis, a Chronic Inflammatory Skin Disease. **Adv Exp Med Biolo**, v. 996, p. 287-294, 2017.
 38. JANEWAY, CHARLES. Appendix II. Cd antigens. Immunobiology (5 ed). New

York: Garland, 2001.

39. MOULDING DA, *et al.* Regulation of neutrophil FCgammaRIIIb (Cd16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate, *J Leukoc Biolo*, v.65, n.6, p.875-882, 1999.
40. DRANSFIELD L, *et al.* Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol*, v. 153, n.3, p. 1254-1263, 1994.
41. VORUP-JENSEN T, *et al.* Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin. *J Biol Chem*, v. 282, n. 42, . p. 30869-77, 2007.
42. LEWIS SM, *et al.* Expression of CD11c and EMR2 in neutrophils: potential diagnostic biomarkers for sepsis and systemic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p.184-194, 2015.
43. SKUBITZ KM, *et al.* CD66a, CD66b, CD66c and CD66d each independently stimulate neutrophil. *J Leukoc Biol*, v. 60, n. 1, p. 106-117, 1996.
44. STOCKS SC, *et al.* CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 12, p. 2924-2932, 1996.
45. ZARKESH M, *et al.* The Effect of neonatal Phototherapy on Serum Level of Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. *J Clin Neonatol*, v. 5, p. 189-192, 2016.
46. SABER MA, *et al.* The influence of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia on tumor necrosis factor-alpha. *Menoufia Medical Journal*, v. 27, p. 44-49, 2014.
47. ZARKESH M, *et al.* The Effect of Neonatal Phototherapy on Serum Level of Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. *J Clin Neonatol*, v. 5, p. 189-192, 2016.

48. CHAUDHARI H, *et al.* Neonates with sickle cell disease are vulnerable to blue light phototherapy-induced oxidative stress and proinflammatory cytokine elevations. *Medical Hypotheses*, v. 96, p.78-82, 2016.

Tabela 1. Painéis de citometria de fluxo usado no estudo

Fluorocromos		FITC	PE	PerCP
Tubo 1	Anticorpo	CD18	CD62L	CD11c
	Clone	MEM-48	LT-TD180	BU15
Tubo 2	Anticorpo	CD64	CD11b	CD10
	Clone	10.1	MEM-174	MEM-78
Tubo 3	Anticorpo	CD15	CD66acde	CD16
	Clone	MEM-158	CLB-gran/10	3G8

Quadro 1 – Características maternas e neonatais – dados demográficos

Número de pacientes (n)	25
Sexo	Masculino = 52%
Numero de consultas pré-natal	7 (6-10)
Número de gestações	2 (1-5)

Idade materna	27 ± 6
Tipo de parto	Vaginal = 48%
Tempo de bolsa rota (horas)	8.72 ± 11,6
Característica Líquido Amniótico	LAC = 92% LAM= 8%
Apgar 1'	8 (8-9)
Apgar 5'	9 (9-9)
Peso nascimento (gramas)	3230 ± 561
Idade gestacional (semanas)	38 ± 1
Classificação AIG/GIG/ PIG	AIG 64% GIG 32% PIG 4%
Incompatibilidade Rh	4%
Incompatibilidade ABO	68%
Coombs direto positivo	15%
Perda de peso pouca amamentação	12%
Tempo de vida (horas) início fototerapia	53 (27.5-75.5)
Bilirrubina pré-fototerapia (mg/dL)	13.69 ± 2.85
Bilirrubina pós-fototerapia (mg/dL)	12.38 ± 1.69

Hemoglobina pré-fototerapia (g/dL)	17.05 ± 1.86
Hemoglobina pós-fototerapia (g/dL)	16.72 ± 1.82

As variáveis contínuas foram expressas como média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (p25-p75) ou como número e porcentagem.

Quadro 2 – Marcadores pré e pós fototerapia.

	n	Pré-fototerapia	Pós-fototerapia	p
CD10	25	9.44 ± 3.79	10.85 ± 3.39	0.038
CD11b	25	439.65 ± 146.91	406.10 ± 116.93	0.330
CD11c	25	32.50 ± 11.72	27.91 ± 10.59	0.023
CD15	25	159.92 ± 82.75	172.86 ± 79	0.180
CD16	25	627.11 ± 232.35	775.84 ± 270.55	0.017
CD18	25	190,82 ± 61,67	164.45 ± 60.28	0.068
CD62L	25	424.99 ± 365.04	664.19 ± 418.119	0.066
CD64	25	77.98 ± 41.61	68.73 ± 38.67	0.271
CD66acde	25	784.40 ± 268.93	618.62 ± 181.66	0.004
Neutrófilos%	25	49.13 ± 14.46	45.90 ± 12.77	0.213

O nível de significância para todas as diferenças foi estabelecido em $p < 0.05$

Figura 1 – Análise da expressão dos marcadores com diferença significativamente estatística.

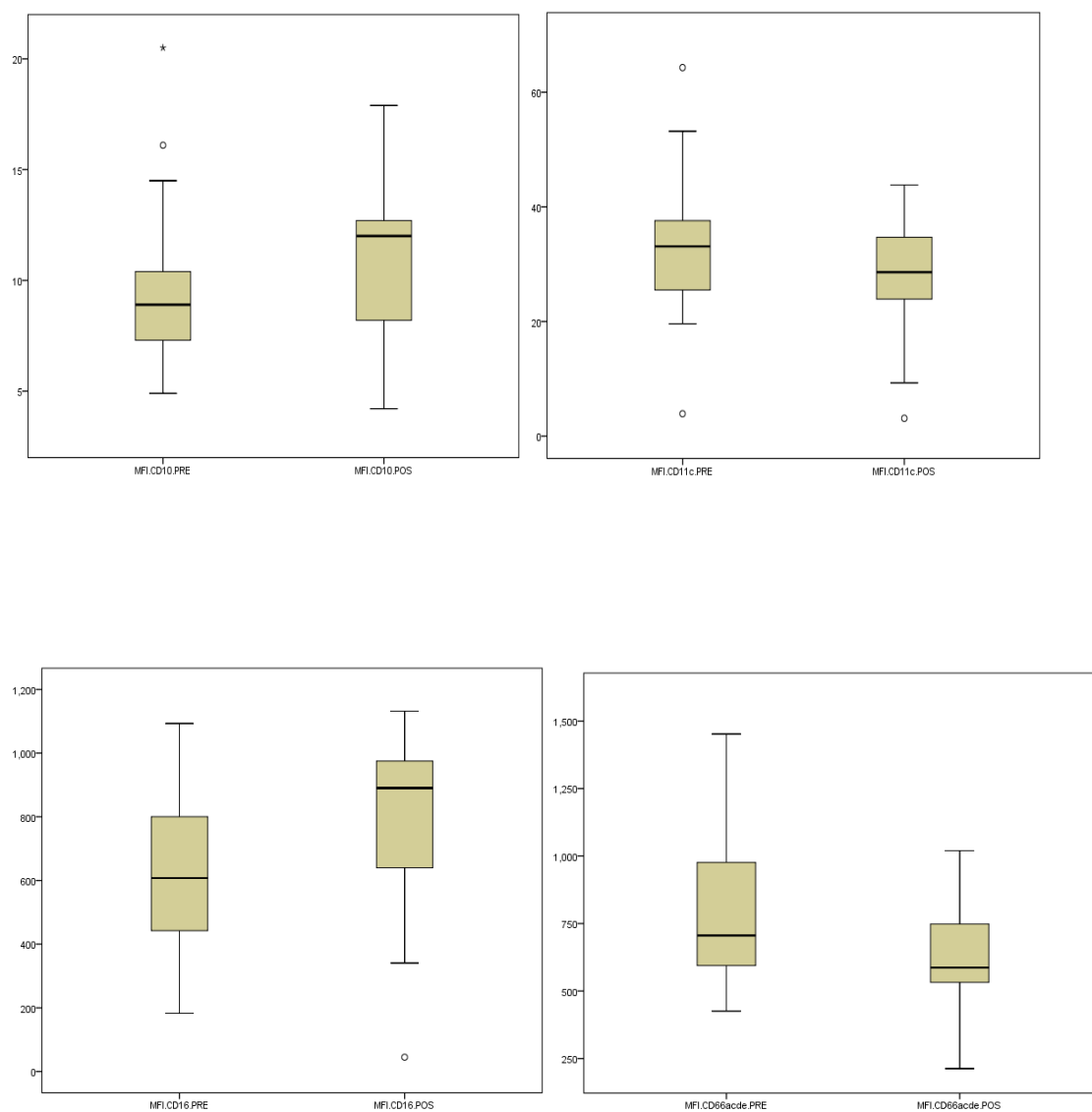
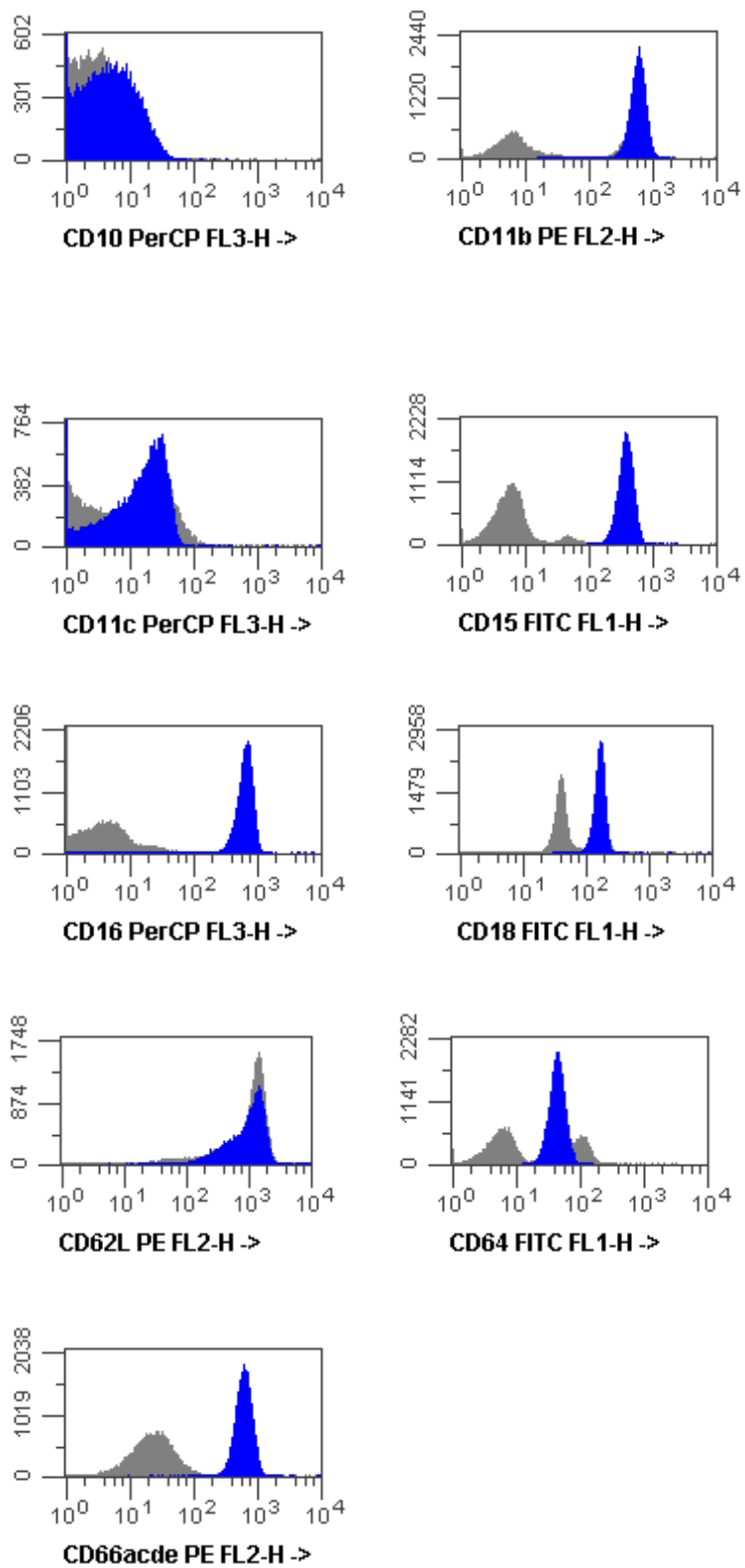


Figura 2 – Análise de expressão dos Marcadores



15. ARTIGO 1 EM INGLÊS

PHOTOTHERAPY NEONATAL EFFECTS ON EXPRESSION OF NEUTROPHIL SURFACE MARKERS IN ICTERIC NEONATES

ABSTRACT

Jaundice due to indirect hyperbilirubinemia affects more than 60% of neonates. The treatment of severe types is carried out using phototherapy. There are no studies in the literature evaluating the effect of phototherapy on the function of neonates' neutrophils. A better understanding of the function of neutrophils in neonates before and after phototherapy would be important in order to assess potential effects on the expression of neutrophils triggered by the phototherapy treatment. The aim of this study was to assess and compare the function of neutrophils by measuring the expression of the main surface markers in icteric neonates, using flow cytometry, before and after 24 hours of phototherapy.

Methodology: Neonates at a gestational age ≥ 35 weeks and at a birth weight ≥ 2000 g who met the criteria of the American Academy of Pediatrics for phototherapy were included. The exclusion criteria were: congenital malformations, syndromes with chromosomal alterations, inborn errors of metabolism, infections of the STORCH group, neonatal asphyxia, sepsis or suspicion of sepsis, exchange transfusion, transfusion of blood components, and use of immunoglobulin. The evaluation of the MFI expression of CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66 was performed before and 24 hours after the initiation of phototherapy. The chi-square and Student T tests were used for data analysis.

Results: Twenty-five neonates were included in the study at the mean age of 53 (27.5-75.5) hours of life and with a mean bilirubin level of 13.6 ± 2.85 mg/dL. There was no statistical difference in the expression of CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 and percentage of neutrophils before and after 24 hours of phototherapy. There was an increase in the expression of CD10 ($p=0.038$) and CD16 ($p=0.017$) and a reduction in the expression of CD11c ($p=0.023$) and CD66acde ($p=0.004$) after 24 hours of phototherapy.

Conclusion: The newborns submitted to phototherapy had increased expression of CD10 and CD16 and decreased expression of CD11c and CD66acde after 24 hours of exposure, which may be related to an anti-inflammatory effect of phototherapy on the neonates exposed to this treatment.

Abstract: 337 words.

Keywords: neutrophils; neonate; jaundice; hyperbilirubinemia; CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66acde.

Introduction:

Jaundice due to indirect hyperbilirubinemia affects more than 60% of neonates (1,2). A large number of the causes of hyperbilirubinemia in full-term neonates are benign and reversible. The most feared toxic effect, potentially irreversible and secondary to hyperbilirubinemia, is bilirubin encephalopathy, also known as kernicterus (3,4).

The main treatment for jaundice is carried out using phototherapy, following the criteria recommended by the American Academy of Pediatrics (4). Since the 1950's, phototherapy has been the therapy of choice for neonates suffering from indirect

hyperbilirubinemia. It reduces the plasma levels of unconjugated bilirubin, preventing kernicterus and decreasing the need for exchange transfusion.

Side effects may occur in the short or long run (5). Over the last decades, several studies have emerged evaluating the influence of phototherapy on the allergic, immune and inflammatory response and showing evidence that phototherapy can directly affect the expression and function of cell surface receptors, including adhesion molecules, cytokines, and growth factor receptors (6-10). There are also studies demonstrating an increase in eosinophil count in patients receiving phototherapy and a risk of asthma development (11-13). Studies also demonstrate increased DNA damage in leukocytes of hyperbilirubinemic neonates who were submitted to phototherapy (14-16). Eyada et al. studied the effects of phototherapy on B and T lymphocytes in icteric neonates under phototherapy (17). No studies were found in the literature evaluating the effects of phototherapy on the function of neutrophils in neonates. Neutrophil function can be measured by assessing the expression of surface markers via the MFI of the monoclonal antibodies CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66, which have specific roles in the regulation of leukocyte movement, adhesion and activation (18-26).

The aim of this study was to qualitatively assess the function of neutrophils in icteric neonates before and after phototherapy by evaluating the expression of the major markers of neutrophil function through flow cytometry. A better understanding of the function of neutrophils in neonates before and after phototherapy would be important in order to assess potential effects on the expression of neutrophils triggered by the phototherapy treatment.

Methodology:**Study Population:**

A prospective cohort study of newborns at a gestational age ≥ 35 weeks and birth weight ≥ 2000 g in the first week of life, undergoing phototherapy according to the criteria of the American Academy of Pediatrics, admitted to the Neonatology Service, at Nossa Senhora da Conceição Hospital, from December 2015 to September 2017. The exclusion criteria were: presence of congenital malformations, syndromes with chromosomal alterations, inborn errors of metabolism, congenital TORCH infection, neonatal asphyxia, sepsis or suspicion of sepsis, Rh incompatibility requiring exchange transfusion or use of immunoglobulin, exchange transfusion, and transfusion of blood components. Patients without parental or guardian consent and without examination request by the staff were also excluded from the study.. The neonates received phototherapy through Bilispot® or Bilitron®, with irradiance ranging from 25 to 35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$.

Ethical Considerations:

The study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the institution (CAAE: 48027015.8.0000.5530), and informed consent was obtained from the father, mother or guardian for all patients included. When a blood sample in an EDTA tube was requested by the medical staff, the waste sample was used for marker analysis. No blood sample, venipuncture or arterial puncture was performed exclusively for the study. The absence of a control group was justified by the difficulty of obtaining a group of healthy newborns without venipuncture with exclusive purpose for research. The presence of congenital TORCH infection, neonatal asphyxia, respiratory dysfunction, sepsis or suspicion of sepsis were exclusion factors of the study because they could

interfere in the results of the expression of the markers.

Variables and Definitions:

The following variables were collected prospectively: Birth weight, gestational age, type of delivery, Apgar score, obstetric data and maternal intercurrents (maternal age, number of pregnancies, characteristics of the amniotic fluid, time from membrane rupture to delivery), phototherapy indication according to the criteria of the American Academy of Pediatrics, Rh incompatibility, ABO incompatibility, difficulty in suckling, and weight loss.

The neutrophil-related variables studied were the expression of the CD10, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD18, CD62L, CD64 and CD66 markers.

Laboratory Analysis:

Flow cytometry immunophenotyping procedures were performed according to the protocol below: A 50- μ l EDTA-anticoagulated whole blood sample was incubated with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) for 20 minutes in the dark at room temperature. The flow cytometry panels are described in Table 1. Red blood cells were lysed by incubation with Excelyse I, followed by incubation with distilled water. The samples were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). All reagents were purchased from EXBIO® (Praha, CZ) and used in accordance with the manufacturer's instructions. All samples were processed within 48 hours of collection (27,28).

Shortly after preparation, the samples were obtained on a FACSCalibur flow cytometer using the CellQuest™ Pro® software (BD Biosciences, San Diego, USA).

Nearly 50,000 events per sample were obtained. The reproducibility of fluorescence intensities was preserved by calibration and daily quality control procedures. Data analysis was carried out using the CytoPaint Classic 1.1 software (Leukocyte, Pleasanton, CA, USA). For the gating strategy, the debris was removed and the neutrophils were gated based on the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) distribution. The percentages of neutrophils and the mean fluorescence intensities (MFI) of the markers under study were recorded.

Statistical Analysis:

The sample size was calculated using literature data on jaundice, phototherapy and immune system alterations (6,7,8,29), with proportions being used to calculate the sample size. N= 25 allows found the MFI percentage difference in 30%, with a power of 80% and significance level of 5%.

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation or median and interquartile range (p25-p75) or as number and percentage. The differences in the means of marker expression before and after phototherapy were compared using the Student t test. The level of significance for all differences was set at $p < 0.05$. The statistical analysis was performed using the *Statistical Package for the Social Sciences software, version 18.0* (SPSS 18.0).

Results:

During the study period, 25 icteric neonates who had started phototherapy met the inclusion criteria.

The characteristics of the patients are shown in Table 2.

There was no statistical difference in the expression of CD11b, CD15, CD18, CD62L, CD64 and percentage of neutrophils before and after 24 hours of phototherapy.

There was a significant increase in the MFI of CD10 and CD16 ($p=0.038$ and $p=0.017$, respectively), while the MFI of CD11c and CD66acde decreased ($p=0.023$ and $p=0.004$, respectively) after 24 hours of phototherapy. (Table 3 and Figure 1).

All neonates underwent an analysis of biomarkers at the initiation and after 24 hours of phototherapy (Figure 2).

Discussion:

The CD10 antigen is a surface glycoprotein that is expressed on neutrophils and normal lymphoid progenitors, in addition to tumor cells, mainly in acute lymphoblastic leukemia. It induces the migration and aggregation of neutrophils, acting as a mediator of the inflammatory response of neutrophils by hydrolyzing a variety of biologically active peptides, such as substance P, glucagon, enkephalins, oxytocin, bradykinin, and fmet-leu-phe tripeptide (FMLP) (23, 30-31). The increase in the activity of the CD10 antigen reduces the concentration of these peptides and, consequently, the inflammatory process. Some studies on CD10 expression in infectious processes demonstrate a decline in its expression in septic patients (32-35). A number of chronic rheumatologic and cutaneous inflammatory diseases, as well as periodontal inflammatory processes, have well-established anti-inflammatory treatments through phototherapy. Most studies of phototherapy as an anti-inflammatory effect demonstrate a reduction in the levels of inflammatory markers with treatment, especially in cytokine levels, and there are no studies on the expression of CD10 in these patients (36,37). In our study, there was an increase in the expression of the CD10 antigen, which seems be compatible with an anti-inflammatory effect of phototherapy.

The CD16 antigen (FcγRIII) is a 50-65 kDa glycoprotein serving as a low affinity IgG receptor. Human FcγRIII is expressed in two forms: FcγRIII-A (CD16a) and FcγRIII-B (CD16b), in NK cells, neutrophils and macrophages (38). When neutrophils undergo apoptosis, they lose expression of surface receptor CD16. Thus levels of CD16 are good indicators of apoptotic and non-apoptotic neutrophils. The reduction of CD16 expression in neutrophils can be considered as a biomarker for its decreased function (39,40). In our study we found an increase in CD16 expression following phototherapy, but the meaning of this finding is not well established in the literature.

The CD11c antigen is mainly expressed by macrophages and dendritic cells. It has an important role in cell migration and phagocytosis (41). Elevated levels of neutrophils expressing CD11c may lead to increased sequestration and microvascular infiltration at the inflammatory site. The ligands of CD11c include fibrinogen and breakdown products of C3bi; both induce cell activation. The binding of neutrophils to fibrinogen via CD11c increases the stimulation of cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-8) and chemoattractants such as C5a. Studies have shown an increase in CD11c expression in patients with sepsis and SIRS (42). In our study, CD11c expression decreased after 24 hours of neonatal exposure to phototherapy, which suggests an anti-inflammatory effect on neutrophils.

The CD66 antigen is a 180-200 kDa glycoprotein of the carcinoembryonic antigen family (43, 44). CD66a (BGP1, CEACAM1), CD66d (CGM1, CEACAM3), CEACAM5 and CEACAM2 and 4 are transmembrane proteins. CD66c (CEAL, NCA, CEACAM6), CD66e (CEA, CEACAM5), CEACAM7 and 8, are anchored to the plasma membrane by C-terminal GPI (glycosylphosphatidylinositol) lipid moiety. The CD66c expression in the hematopoietic system is limited to granulocytes and their precursors.

The CD16 is also present in the epithelium of several organs. The CD66d plays an important role in the clearance of pathogens in the innate immune system and the CD66e plays an important role in cell adhesion and signaling. All are expressed in neutrophils and their expression increases significantly after their activation. We demonstrated a decrease in CD66acde expression after phototherapy, once again explaining a possible anti-inflammatory activity of phototherapy treatment on newborns.

The results of several studies evaluating the immune and inflammatory response in neonates before and after phototherapy have conflicting results. There are studies showing increased levels of cytokines, other decreased, and still others showing no changes. Sirota et al. (29) demonstrated a decreased in IL-beta levels and an increased in IL-2, IL-10 and TNF after phototherapy. IL-3 and IL-6 levels no changed significantly. Zarkesh et al. (45) demonstrated an increased in IL-6 levels and in leukocyte counts. Procianoy et al. (6) demonstrated a decreased in IL-6 and found no difference in concentrations of IL-8, IL-10, IL-1beta and TNF-alpha. Saber et al. (46) found a increased in TNF alpha levels and did not find difference in leukocyte counts. Kurt et al. (7) observed a increased in IL-8, TNF-alpha and TNF-alpha levels and a decreased in the percentage of CD3+ lymphocytes. Rashedyet et al. (47) observed no significant changes in CD4+, CD8 + and NK lymphocytes after phototherapy, as well as in the study by Eyeda et al (17), who did not find significant difference in the percentage of CD4 +, CD8 + and CD19 lymphocytes before and after phototherapy. Jahanshahifardet al (8) demonstrated no statistically significance difference in the dosage of TNF-alpha, IL-1, IL-6 after phototherapy and found an increase in leukocyte count. Chaudhariat et al. (48) demonstrated increased TNF-alpha, IL-1 and IL-6 in newborns with sickle cell disease exposed to phototherapy, but a study limited by a sample of only two patients. There is a need for more studies, with a larger number of patients, to determine the effects of

phototherapy on the immune and inflammatory system in newborns submitted to phototherapy.

The present study has limitations: the absence of a control group does not allow us to conclude that the alterations found at this stage of life may be normal. Further studies should be conducted to assess the physiology of these markers in the neonatal period. The duration of phototherapy and the size of the sample are other limitations of the study.

Our group published, in 2009, a study showing decreased levels of IL-6 in neonates submitted to phototherapy and discussing the possibility of an anti-inflammatory effect of neonatal phototherapy (6). Our current study corroborates this possible anti-inflammatory effect of phototherapy on newborns, demonstrating a increased in CD10 and CD16 expression and decreased expression of CD11c and CD66acde, showing an anti-inflammatory activity in neonates undergoing phototherapy.

Bibliography:

1. SILVA I, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85. n. 5, p. 455-458, 2009.
2. BHUTANI VK, *et al.* Universal bilirubin screening for severe neonatal hyperbilirubinemia. **Journal of Perinatology**, v. 30, p. S6–S15, 2010.
3. BHUTANI VK, *et al.* Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonat: for a safer first week. **Pediatr Clin North Am**, vol, 51, p. 843-61, 2004
4. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Subcommittee on

- Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 114, p. 297-316, 2004.
5. XIONG T, *et al.* The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1247-5125, 2011.
 6. PROCIANOY RS, *et al.* The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. **Amer J Perinatol**, v. 27, n. 5, p. 375-379, 2010.
 7. KURT A, *et al.* Use of Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia Affects Cytokine Production and Lymphocyt Subsets. **Neonatology**, v. 95, p. 262-266, 2009.
 8. JAHANSHAHIFARD S, *et al.* Effects of Phototherapy on Cytokines Levels and White Blood Cells in Term Neonate with Hiperbilirrubinemia. **J Clin Neonatol**, vol.1, n. 3, p. 139-142, 2012.
 9. LEIPE S, *et al.* Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes in neonatal hyperbilirubinemia before and following phototherapy. **Peadiatr Grenzgeb**, v. 27, n. 5, p. 347-58, 1988.
 10. RUBALTELLI FF, *et al.* Immune competence assessment in hyperbilirubinemic newborns before and after phototherapy. **Helv Paediatr Acta**, v. 32, n. 2, p. 129-33, 1977.
 11. ASPBERG S, *et al.* Is neonatal phototherapy associated with an increased risk for hospitalized childhood bronchial asthma? **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 18, n. 4, p. 313-9, 2007.

12. AYDIN B, *et al.* Blood Eosinophil Levels in Newborns with Severe Indirect Hyperbilirubinemia Treated with Phototherapy. **Iranian Journal of Pediatrics**, vol. 24, n. 3 ,p. 267-272, 2014.
13. ASPBERG S, *et al.* Confirmed association between neonatal phototherapy or neonatal icterus and risk of childhood asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 21, p. 733-9, 2010.
14. GÓMEZ-MEDA BC, *et al.* Effects of blue light phototherapy on DNA integrity in preterm newborns. **J Photochem Photobiol B**, 2014, vol.141, p. 283-7, 2014.
15. AYCICEK A, *et al.* Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 2, p.141-6, 2008.
16. EL-ABDIN MYZ, *et al.* Phototherapy and DNA changes in full neonates with hyperbilirubinemia. **The Egyptian Journal of Medical Huan Genetics**. v. 13, p. 29-35, 2012.
17. EYADA IK, *et al.* Effect of phototherapy on B and T lymphocytes in Egyptian infants suffering from neonatal jaundice. **Allergol Immunopathol (Madr)**, vol. 45, n. 3, p. 290-296, 2017.
18. GENEL F, *et al.* Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b, and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. **World J Pediatr**, vol.8, n. 1, p. 72-5, 2012.
19. LAYSECA EE, *et al.* Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 13, n.5, p. 319-27, 2002.
20. LEWIS SM, *et al.* Expression of CD11c and EMR2 in neutrophis: potential

- diagnostic biomarkers for sepsis and systemic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p.184-194, 2015.
21. MAZZONE A, RICEVUTI G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: Biological and clinical relevance. **Hematologica**, v. 80, p. 161-175, 1995.
22. MORSY AA, *et al.*. CD64 cell surface expression on neutrophils for diagnosis of neonatal sepsis. **Egypt J Immunol**, v. 15, n. 2, p. 53-61, 2008.
23. SHIPP MA, *et al.* CD10 (CALLA)/Neutral Endopeptidase 24.11 Modulates Inflammatory peptide-Induced Changes in Neutrophil Morphology, Migration, and Adhesion proteins and Itself regulated by Neutrophil Activation. **Blood**, v. 78, n. 7, p. 1834-1841, 1991.
24. STOCKS SC, *et al.* CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biolo**, v. 58, n. 1, p. 40-48, 1995.
25. STOCKS SC, *et al.* CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 12, p. 2924-2932, 1996.
26. VON ADRIAN UH, *et al.* L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through silyl LewisX-dependent and independent recognition pathways. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 182-191, 1993.
27. DAVIS BH, *et al.* Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 84, n. 5, p. 286-290, 2013.
28. ARLINDO EM, *et al.* Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123,

- CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 3, p. 252-258, 2017.
29. SIROTA L, *et al.* Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 11, p. 910-913, 1999.
30. GALY A, *et al.* Human T, B, natural killer, and Dendritic Cells Arise from a Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset. **Immunity**, v. 3, p. 459-473, 1995.
31. SHIPP MASTEFANO GB, *et al.* Down-regulation of enkephalin mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase. **Nature**, v. 347, p. 394, 1990.
32. MARTENS A, *et al.* Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v. 27, n.3, p. 549-553, 1999.
33. DEMARET J, *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. 6, p. 1081-1090, 2015.
34. GUÉRIN E, *et al.* Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration. **Crit Care Med**, v. 42, n. 9, p. 2007-2018, 2014.
35. KANEKO T, *et al.* Reduced neutrophil Cd10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with E. coli or lipopolysaccharide. **Shock**, v. 20, n. 2, p. 130-137, 2003.
36. CARVALHO CM, *et al.* Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory

- process of the rat's TMJ induced by carrageenan. **Photomed Laser Surg**, v. 9, n. 4, p. 245-254, 2011.
37. RÁCZ E, PRENS EP. Phototherapy of psoriasis, a Chronic Inflammatory Skin Disease. **Adv Exp Med Biolo**, v. 996, p. 287-294, 2017.
38. JANEWAY, CHARLES. Appendix II. Cd antigens. Immunobiology (5 ed). New York: Garland, 2001.
39. MOULDING DA, *et al.* Regulation of neutrophil FCgammaRIIIb (Cd16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate, **J Leukoc Biolo**, v.65, n.6, p.875-882, 1999.
40. DRANSFIELD L, *et al.* Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. **J Immunol**, v. 153, n.3, p. 1254-1263, 1994.
41. VORUP-JENSEN T, *et al.* Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, . p. 30869-77, 2007.
42. LEWIS SM, *et al.* Expression of CD11c and EMR2 in neutrophils: potential diagnostic biomarkers for sepsis and systemic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p.184-194, 2015.
43. SKUBITZ KM, *et al.* CD66a, CD66b, CD66c and CD66d each independently stimulate neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 60, n. 1, p. 106-117, 1996.
44. STOCKS SC, *et al.* CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 12, p. 2924-2932, 1996.
45. ZARKESH M, *et al.* The Effect of neonatal Phototherapy on Serum Level of

- Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. **J Clin Neonatol**, v. 5, p. 189-192, 2016.
46. SABER MA, *et al.* The influence of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia on tumor necrosis factor-alpha. *Menoufia Medical Journal*, v. 27, p. 44-49, 2014.
47. ZARKESH M, *et al.* The Effect of Neonatal Phototherapy on Serum Level of Interlukin-6 and White Blood Cell's Count. *J Clin Neonatal*, v. 5, p. 189-192, 2016.
48. CHAUDHARI H, *et al.* Neonates with sickle cell disease are vulmerable to blue light phototherapy-induced oxidative stress and proinflammatory cytokine elevations. *Medical Hypotheses*, v. 96, p.78-82, 2016.

Table 1. Flow cytometry panels used in the study

Fluorochromes		FITC	PE	PerCP
Tube 1	Antibody	CD18	CD62L	CD11c
	Clone	MEM-48	LT-TD180	BU15
Tube 2	Antibody	CD64	CD11b	CD10
	Clone	10.1	MEM-174	MEM-78
Tube 3	Antibody	CD15	CD66acde	CD16
	Clone	MEM-158	CLB-gran/10	3G8

Table 2 - Maternal and neonatal characteristics - demographic data

Number of patients (n)	25
Sex	Male = 52%
Number of prenatal visits	7(6-10)
Number of pregnancies	2(1-5)
Maternal age (years)	27 ± 6
Type of delivery	Vaginal = 48%
Time from rupture of membranes to delivery (hours)	8.72 ± 11.6
Amniotic fluid characteristic	Clear = 92% Meconium-stained = 8%
Apgar 1'	8(8-9)
Apgar 5'	9(9-9)
Birth weight (grams)	3230 ± 561
Gestational age (weeks)	38 ± 1
AGA/LGA/SGA Classification	AGA 64% LGA 32% SGA 4%
Rh Incompatibility	4%
ABO Incompatibility	68%

Positive direct Coombs test	15%
Weight loss / poor breastfeeding	12%
Time of life (hours) initiation phototherapy	53 (27.5-75.5)
Bilirubin before phototherapy (mg/dL)	13.69 ± 2.85
Bilirubin after phototherapy (mg/dL)	12.38 ± 1.69
Hemoglobin before phototherapy (g/dL)	17.05 ± 1.86
Hemoglobin after phototherapy (g/dL)	16.72 ± 1.82

Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation or median and interquartile range (p25-p75) or as number and percentage.

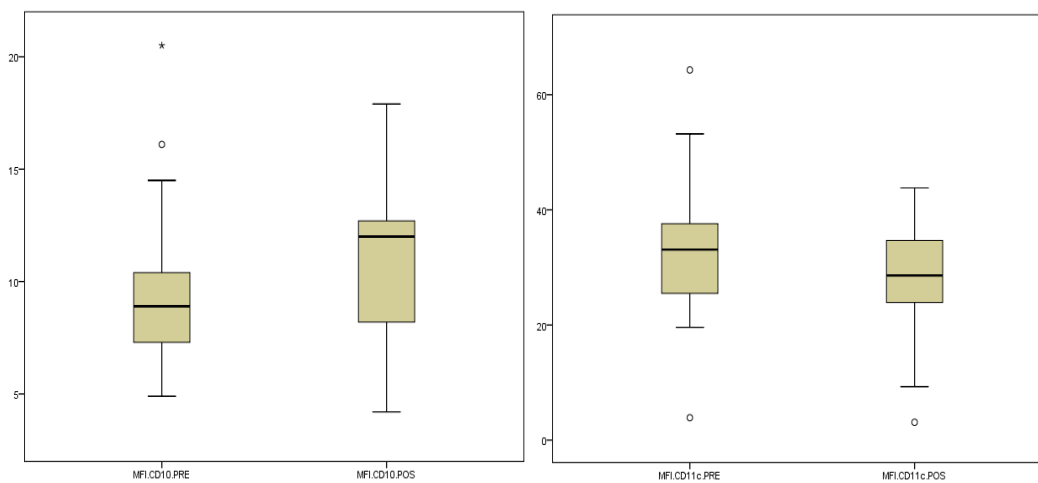
Table 3 - Markers before and after phototherapy

	n	Before phototherapy	After phototherapy	p
CD10	25	9.44 ± 3.79	10.85 ± 3.39	0.038
CD11b	25	439.65 ± 146.91	406.10 ± 116.93	0.330
CD11c	25	32.50 ± 11.72	27.91 ± 10.59	0.023

CD15	25	159.92 ± 82.75	172.86 ± 79	0.180
CD16	25	627.11 ± 232.35	775.84 ± 270.55	0.017
CD18	25	190.82 ± 61.67	164.45 ± 60.28	0.068
CD62L	25	424.99 ± 365.04	664.19 ± 418,119	0.066
CD64	25	77.98 ± 41.61	68.73 ± 38.67	0.271
CD66acde	25	784.40 ± 268.93	618.62 ± 181.66	0.004
Neutrophils %	25	49.13 ± 14.46	45.90 ± 12.77	0.213

The level of significance for all differences was set at $p < 0.05$.

Figure 1 – Analysis of the expression of the markers with statistically significant difference



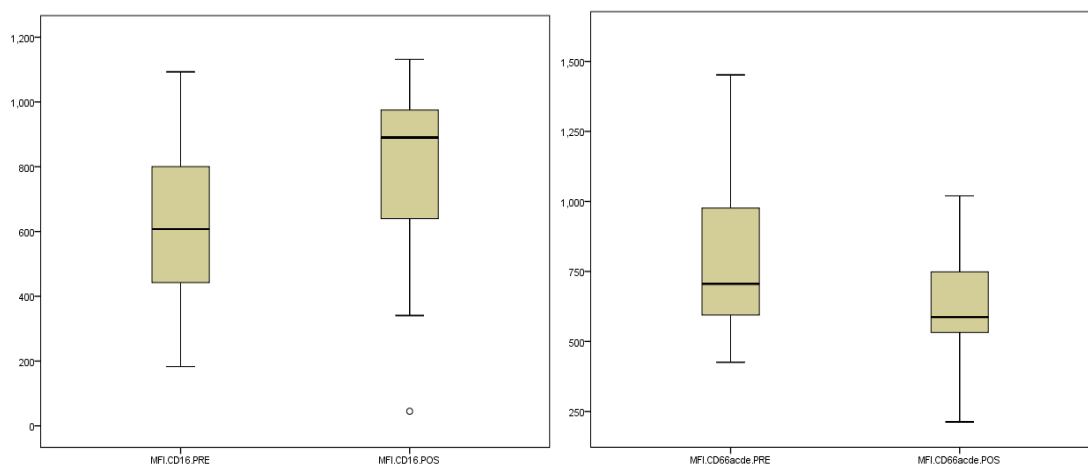
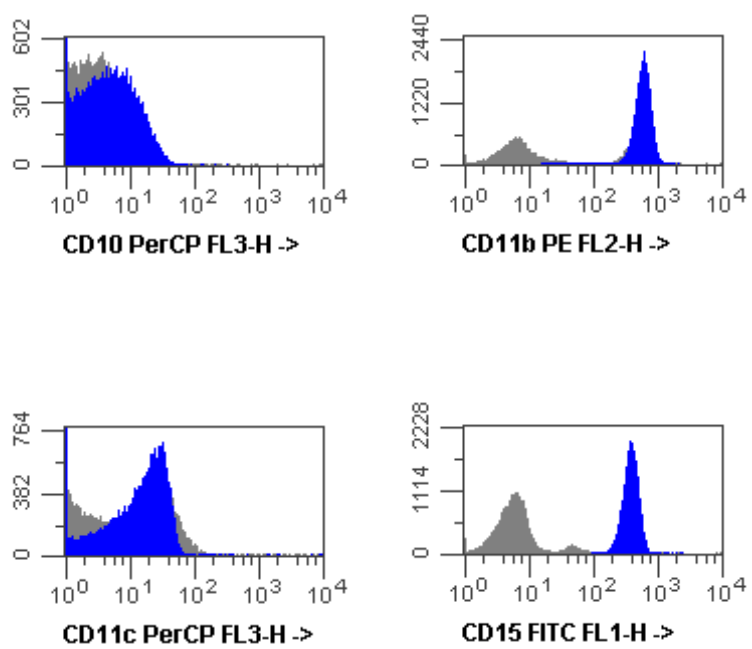
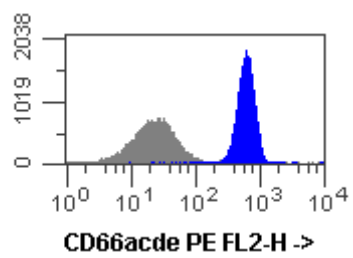
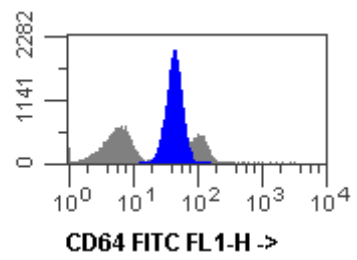
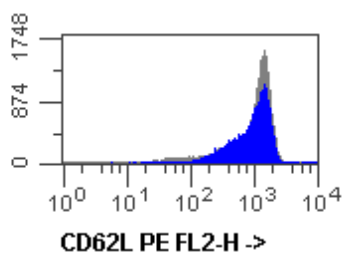
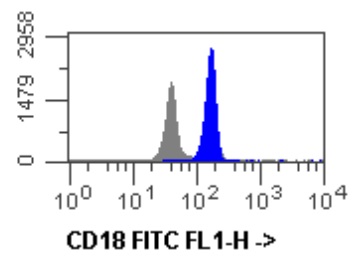
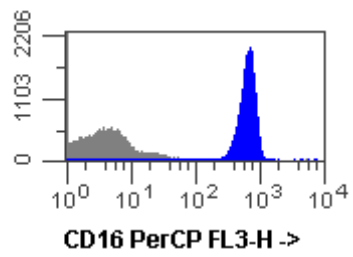


Figure 2 - Analysis of Marker Expression





16. ARTIGO 2 ORIGINAL EM PORTUGUÊS

EFEITOS COLATERAIS DA FOTOTERAPIA NEONATAL

Fabrizia R. S. Faulhaber, MD

Rita de Cássia Silveira, MD, PhD

Renato S. Procianoy, MD, PhD

Instituições às quais o trabalho está vinculado:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-Graduação em
Saúde da Criança e do Adolescente

Autor responsável pela correspondência: Fabrizia R. S. Faulhaber – Rua Tobias da
Silva, 66/201. Fone (51) 8408-8737

E-mail: fabriziaf@me.com

Efeitos Colaterais da Fototerapia Neonatal

Resumo

A fototerapia neonatal para o tratamento da icterícia patológica é uma ferramenta terapêutica eficaz e amplamente utilizada nas unidades neonatais. Nos últimos anos surgiu uma maior preocupação a respeito de seus efeitos no sistema imune e inflamatório, nos seus possíveis efeitos genotóxicos e nos seus efeitos colaterais, principalmente os tardios e possivelmente associados à doenças na infância, mostrando que seria um tratamento não tão inofensivo como se acreditava anteriormente. Inúmeros estudos avaliando estes possíveis efeitos negativos da fototerapia no recém-nascido foram publicados nos últimos anos. Através desta revisão buscamos analisar o que sabemos a respeito dos efeitos colaterais da fototerapia no período neonatal. Foram revisadas as principais causas de icterícia, as técnicas de fototerapia, os efeitos colaterais agudos e tardios deste tratamento, os efeitos no sistema imune e inflamatório. Concluiu-se que a fototerapia não é um tratamento isento de efeitos colaterais e mais estudos necessitam ser realizados com o intuito de esclarecer seus efeitos nocivos nos recém-nascidos.

Descritores: Icterícia; hiperbilirrubinemia; recém-nascido; fototerapia; efeitos colaterais.

Introdução

A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta afeta mais de 60% dos recém-nascidos. Uma grande parcela das causas de hiperbilirrubinemia em recém-nascidos a termo é benigna e reversível e não necessita de intervenção terapêutica (1,2). A mais temida toxicidade, potencialmente irreversível secundária a hiperbilirrubinemia, é a encefalopatia pela bilirrubina, denominada Kernicterus (1-4).

O principal tratamento da icterícia é realizado através da fototerapia, seguindo os critérios recomendados pela academia americana de pediatria (1). Desde a década de 1950, a fototerapia tem sido a terapia de escolha para os recém-nascidos com hiperbilirrubinemia indireta. Ela diminui os níveis de bilirrubina não conjugada no plasma, prevenindo o kernicterus e diminuindo a necessidade de exsanguineotransfusão (1-4).

Os efeitos colaterais podem ser a curto ou a longo prazo (5). Dentre os efeitos a curto prazo poderíamos citar a interferência na relação materno-infantil, desbalanço térmico e hidroeletrólítico, lesões de pele, síndrome do bebê bronzeado, alterações hematológicas, íleo paralítico, ducto arterioso patente, efeitos oculares e desordens do ciclo circadiano (4). Entre os efeitos colaterais a longo prazo, são relatadas neoplasias, lesões cutâneas tipo nevo e manchas café com leite e doenças alérgicas como asma, rinite e conjutivite.

Inúmeros estudos tem sido publicados tentando correlacionar a fototerapia com danos ao recém-nascido. Alguns estudos avaliaram a resposta imune e inflamatória, através da análise da expressão de moléculas de adesão, citocinas e marcadores de superfície de linfócitos. Outros avaliaram danos ao DNA dos recém-nascidos que

receberam fototerapia. A associação da fototerapia no período neonatal à diversas doenças na infância também tem sido investigada.

Este artigo objetivou realizar uma revisão da literatura abrangendo o conhecimento de icterícia neonatal, tratamento fototerápico e efeitos coleterais do tratamento fototerápico. Foi realizada uma revisão não sistemática da literatura realizada na base de dados PubMed, incluindo os termos “*neonatal jaundice*”, com 8177 estudos, “*neonatal jaundice phototherapy*”, encontrados 1649 estudos e “*neonatal jaundice phototherapy side effects*”, com 327 estudos. Num primeiro momento, foram revisados os títulos e resumos disponíveis no PubMed. Foram excluídos artigos não referentes ao período neonatal. Foram selecionados 60 artigos (estudos de coorte, caso-controle, revisão sistemática, relato de casos). O texto foi organizado em tópicos para melhor compreensão do tema e o foco da população avaliada foram prematuros tardios e recém-nascidos a termo devido a diretrizes de diagnóstico estabelecidas para esse grupo (4).

Definição de Icterícia Neonatal

A icterícia neonatal, em recém-nascidos com idade gestacional maior ou igual a 35 semanas, pode ser definida como o aumento dos níveis de bilirrubinas (hiperbilirrubinemia) acima do percentil 95 do nomograma de Bhutani. A coloração amarelada da pele e/ou conjuntiva do recém-nascido é ocasionada pelo depósito da bilirrubina (4, 5).

A hiperbilirrubinemia severa é definida como a dosagem de bilirrubina total maior que 25 mg/dL. Está associada ao aumento do risco da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina, que ocorre quando a bilirrubina atravessa a barreira hemato-encefálica e

deposita-se no tecido cerebral. A encefalopatia bilirrubínica aguda é usualmente descrita como uma manifestação aguda da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina e o Kernicterus é usualmente descrito como a sequela crônica e permanente da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina (4).

Causas de Icterícia Neonatal

A hiperbilirrubinemia pode ser causada por condições patológicas ou pelo aumento dos mecanismos responsáveis pela icterícia fisiológica. A identificação da causa da hiperbilirrubinemia neonatal é importante para determinar o tempo e quais as intervenções terapêuticas para prevenir a hiperbilirrubinemia severa (5, 6).

A icterícia neonatal não patológica é causada por variações no metabolismo da bilirrubina do recém-nascido, resultando em aumento da produção de bilirrubina, diminuição do seu clearance e aumento da circulação enterohepática (5).

A causa mais comum de icterícia patológica é o aumento da produção da bilirrubina devido a hemólise (7). A hemólise pode ocorrer devido a Incompatibilidade ABO ou Rh; defeitos da membrana das hemácias, como a esferocitose e a eliptocitose hereditárias; defeitos enzimáticos dos eritrócitos, como a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, a deficiência de piruvatoquinase e a porfíria eritropoietica congênita; e devido à sepse (o aumento do estresse oxidativo ocasionaria danos às hemácias, ocasionando a hemólise). Outras causas de aumento da produção de bilirrubina, devido ao aumento da destruição das hemácias, seriam a policitemia e o cefalohematoma (8).

Nas síndromes de Crigler-Najjar tipo I e II e na Síndrome de Gilbert há aumento da bilirrubina por defeitos no gene que codifica a UGT1A1, diminuindo a conjugação da bilirrubina (9).

A icterícia pelo leite materno, o prejuízo na motilidade intestinal causado por obstrução anatômica ou funcional e a icterícia por falha na amamentação são causas de icterícia patológica por aumento da circulação enterohepática (10, 11).

Tratamento da Icterícia Neonatal

Visando a prevenção de casos de kernicterus, o tratamento da icterícia neonatal tem foco na prevenção da hiperbilirrubinemia pela identificação de recém-nascidos de risco e início de intervenções terapêuticas preventivas quando necessário, sendo estas intervenções a fototerapia e a exsanguineotransfusão (4, 12).

Mecanismos de fototerapia

A fototerapia expõe a pele do recém-nascido à luz de um comprimento de onda específico, que reduz os níveis de bilirrubina por três mecanismos (13): Isomerização estrutural para lumirrubina (converte a bilirrubina em lumirrubina via isomerização estrutural que não é reversível. A lumirrubina é uma substância mais solúvel que a bilirrubina, sendo excretada sem conjugação na bile e urina. Este é provavelmente o principal mecanismo da redução da concentração de bilirrubina plasmática pela fototerapia), fotoisomerização para um isômero de bilirrubina menos tóxico (converte o isômero bilirrubina 4Z,15Z para o isômero 4Z,15E, que é mais polar e menos tóxico. Como a lumirrubina, o isômero 4Z,15E é excretado na bile sem conjugação, mas a fotoisomerização é reversível e o seu clearance é baixo. Portanto esta via pode ter um pequeno efeito na redução dos valores de bilirrubina, mas reduz 15% da bilirrubina tóxica

em forma não tóxica), foto-oxidação a moléculas polares (as reações de foto-oxidação convertem a bilirrubina em um componente polar, sem cor, que é excretado primariamente na urina. É um processo lento e acontece numa pequena proporção na eliminação da bilirrubina.

Técnicas da fototerapia:

Durante a fototerapia, a área coberta pela fralda deve ser minimizada. Os olhos devem ser protegidos com viseiras opacas. Aparelhos com luzes fluorescentes devem ser usados preferencialmente em berços abertos. Com níveis de bilirrubina > 20 mg/dL, a fototerapia deve ser administrada de forma contínua, sem interrupções. Quando o valor é < 20 mg/dL, a fototerapia pode ser interrompida para amamentação e visitas dos pais.

A dose da fototerapia, denominada irradiância, determina a sua eficácia. A medida é realizada em $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ da superfície corporal da área exposta/nm do comprimento de onda. A irradiância depende do tipo de luz utilizada, da distância entre a luz e o paciente e da área de pele exposta. Na fototerapia convencional, a irradiância varia de 6-12 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Já na fototerapia intensiva, a irradiância é maior que $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ (14). Para uma fototerapia intensiva e efetiva, os níveis de irradiância devem atingir a maior área possível de superfície do RN e deve-se colocar a luz numa distância de 10 a 30 cm do paciente, dependendo da recomendação do fabricante e da combinação de fibra óptica, LED ou luz azul especial (12). Embora não seja necessário medir o espectro de irradiância antes do uso de cada fototerapia, é importante periódicas checagens dos aparelhos para aferir se a adequada irradiância está sendo utilizada (4).

A fototerapia intensiva reduz os níveis de bilirrubina de 2 a 3 mg/dL dentro de 4 a 6 horas. Em 24 horas pode haver diminuição de 30 a 40% da bilirrubina (15). Já a

fototerapia convencional reduz a bilirrubina em 6 a 20% nas primeiras 18 a 24 horas. A taxa de declínio da bilirrubina durante a fototerapia depende de inúmeros fatores, como: grau de irradiância, superfície corporal exposta, dosagem inicial de bilirrubina (quanto mais alta, mais rápida a taxa de declínio). A efetividade do tratamento também depende da patologia do recém-nascido, sendo menos efetiva em recém-nascidos com colestase e naqueles com doença hemolítica com coombs direto positivo (4).

Tipos de Aparelhos de Fototerapia:

A bilirrubina absorve a luz mais fortemente na região azul, no espectro próximo a 460 nm. Existem vários tipos de aparelhos para fototerapia, com variáveis tipos de luz, diferentes comprimentos de onda e diferentes graus de irradiância (14,16).

Efeitos Colaterais da Fototerapia

Alterações à Nível Molecular da Fototerapia

A fototerapia pode exercer efeito tóxico ao DNA. Yahia *et al* (17) demonstraram que a fototerapia causa danos ao DNA e induz apoptose nos linfócitos de recém-nascidos à termo. Aycicek *et al* (18) demonstraram danos ao DNA dos leucócitos mononucleares endógenos em recém-nascidos a termo ictericos submetidos a fototerapia. El-Abdin *et al* (19), Karakukcu *et al* (20) e Tatli *et al* (21) também demonstraram os efeitos genotóxicos da fototerapia.

Alguns estudos demonstraram a influência da fototerapia na concentração de citocinas nos recém-nascidos, tentando correlacionar os achados à efeitos no sistema

imune e inflamatório. Procianoy *et al* (22) demonstraram diminuição dos níveis de IL-6 após 24 horas de fototerapia, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório da fototerapia. Sirota *et al* (23) encontraram aumento de IL-2 e IL-10 e diminuição de IL-1 beta em recém-nascidos pós fototerapia, demonstrando afetar a função do sistema imune. Zarkesh *et al* (24) encontraram aumento nos níveis de IL-6 e da contagem de leucócitos nos RN após fototerapia, também sugerindo alterações na função do sistema imune neonatal podendo ser desencadeadas pela fototerapia.

Estudos demonstrando alterações na expressão de antígenos de superfície de linfócitos em recém-nascidos submetidos a fototerapia também foram realizados. Rashedy *et al* (25) estudaram o efeito da fototerapia nos níveis de CD4 , CD8 e linfócitos NK, após 72 horas de fototerapia, não encontrando alteração sigificante em relação aos controles. Eyada *et al* (26) também não encontraram correlação entre níveis de CD19, CD4 e CD8 em linfócitos de RN pós 72 horas de fototerapia e nem a ocorrência de infecções após 6 meses de acompanhamento. Elfeky *et al* (27) encontraram níveis de CD3 e CD19 menores após 72 horas de fototerapia e acompanharam estes pacientes por 6 meses. Pacientes com maior declínio de CD3 tiveram um aumento no número de visitas hospitalares.

Efeitos Colaterais Agudos da Fototerapia

Interferência na Relação Materno-Infantil

O tratamento fototerápico separa do neonato de sua mãe. Ao menos que a icterícia seja muito severa, a fototerapia pode ser interrompida para amamentação e visitas dos pais de uma forma segura (28).

Desbalanço Térmico e hidroeletrólítico

A fototerapia altera o ambiente térmico do neonato, podendo levar a perda de água insensível, hipotermia ou hipertermia e desidratação (29). Pode também desencadear diarreia, possivelmente pelo aumento da secreção intestinal e alteração da diferença de potencial elétrico transepitelial. A absorção de água, sódio e potássio pode ser prejudicada nos RN que recebem fototerapia, mas este efeito é transitório e resolvido após cessar o tratamento (28). É recomendado um aumento no aporte hídrico no RN que recebe fototerapia em 10-15 ml/kg/dia para prevenir a desidratação. Não é necessária hidratação endovenosa se não há presença de desidratação severa (30).

Asl *et al* (31) mensuraram a excreção de cálcio antes e após 48 horas de fototerapia e como resultado encontraram aumento na excreção urinária de cálcio, embora sem evidência de hipocalcemia. A luz pode afetar a homeostase do cálcio pelo mecanismo de inibir a secreção de melatonina pela glândula pineal, conseqüentemente levando a hipocalcemia (32). Os níveis de cálcio voltam ao normal após 24 horas do término da fototerapia. Não é necessário cálcio profilático durante a fototerapia (28,33).

Síndrome do Bebê Bronzeado

A síndrome do bebê bronzeado é uma complicação rara que ocorre em RN com colestase (bilirrubina direta > 2mg/dL) que recebe fototerapia. Se manifesta por uma coloração cinza-marrom da pele, soro e urina. A etiologia específica é desconhecida. A pigmentação retorna ao normal após suspensão da fototerapia. Esta síndrome pode constituir um risco adicional para o desenvolvimento de kernicterus (34). Os neonatos com hiperbilirrubinemia mista (direta e indireta) que são submetidos ao tratamento fototerápico devem ser monitorados para o risco desta síndrome (29).

Lesões de Pele

A fototerapia pode ocasionar lesões de pele como máculas, pápulas e rash maculopapulares. Surmeli *et al* (35) não demonstraram diferenças na incidência e extensão de erupções cutâneas em RN recebendo fototerapia convencional comparado com LED. Há descrição de erupção purpúrica induzida por fototerapia em neonatos que receberam transfusão sanguínea e imunoglobulina endovenosa para tratamento de doença hemolítica neonatal (36).

Alterações hematológicas

Em relação a contagem de leucócitos, Zarkesh *et al* (24) e Jahanshahifard *et al* (37) demonstraram aumento de leucócitos circulantes após fototerapia em RN ictericos. Mrkaic *et al* (38) demonstraram aumento do número total de polimorfonucleares, linfócitos e monócitos, mas estes achados foram temporários. O estudo de Mrkaic avaliou os efeitos da fototerapia no sistema imune de recém-nascidos sem sinais de asfixia ou infecção, o que pode explicar essa resposta apenas temporária, não sendo possível estabelecer as consequências da fototerapia na presença de doença de base (38).

A trombocitopenia neonatal não é geralmente citada nos livros textos pediátricos como uma complicação do tratamento fototerápico (39,40). Bhargava *et al* estudaram a associação da fototerapia para icterícia neonatal com trombocitopenia em 96 recém-nascidos, encontrando trombocitopenia leve a moderada, usualmente assintomática e transitória, nos RN após 48 horas de fototerapia (39). Khera e Gupta também estudaram o efeito da fototerapia nos níveis plaquetários de 100 neonatos, sendo a trombocitopenia vista em 74% dos pacientes durante as primeiras 24 horas da fototerapia, sendo transitória e não associada à complicações como sangramento (40).

Íleo Paralítico

Estudos têm associado a fototerapia para icterícia neonatal à ocorrência de íleo paralítico. Kadalraja *et al* (41) realizaram um estudo observacional prospectivo em 14 recém-nascidos prematuros, encontrando aumento da velocidade de fluxo sanguíneo diastólico final da artéria mesentérica superior após 8-12 horas de fototerapia, podendo indicar o fotorelaxamento do músculo liso vascular mesentérico durante a fototerapia neonatal. Raghavan *et al* encontraram uma alta proporção (63,4%) de recém-nascidos prematuros de muito baixo peso com íleo paralítico quando comparados aos que não receberam fototerapia (9%), concluindo que fototerapia é um fator de risco independente para íleo paralítico no RN prematuro de muito baixo peso. (42).

Desordens do Ciclo Circadiano

Os efeitos da fototerapia neonatal na expressão do genes circadianos tem sido estudadas. Chen *et al* (43) demonstraram aumento da expressão do gene *Cry1* e diminuição dos níveis de melatonina e do gene *Bmal1*, alterando o ritmo circadiano normal e levando à comportamentos anormais nos RN em fototerapia para icterícia, como choro e nervosismo.

Ducto Arterioso Patente

Na década de 90, Burefield *et al* (44) demonstraram aumento significativo da incidência de ducto arterioso patente em RN prematuros de muito baixo peso que receberam fototerapia, quando comparados a neonatos que não receberam fototerapia (76% e 53%, respectivamente) e Benders *et al* (45) demonstraram a reabertura do ducto arterioso em mais de 50% dos RN prematuros (< 32 semanas e PN < 1400g) em

fototerapia. Numerosos estudos demonstraram que a fototerapia pode causar indiretamente ou diretamente a patência do ducto arterioso pelo efeito de fotorelaxamento via prostaglandinas. Em 2015, Surmeli-Onay *et al* (46) demonstraram um nova abordagem para uma antiga hipótese: a fototerapia não afeta a patência do ducto arterioso via prostaglandinas e que as mesmas são eliminadas juntamente com o fechamento do ducto arterioso. O efeito de fotorelaxamento não seria influenciado pelo níveis de prostaglandinas. Mais estudos são necessários para veriifcar se a fototerapia está verdadeiramente assocaida ao ducto arterioso patente.

Efeitos Oculares da Fototerapia

A retina é susceptível à luz e estudos em animais indicam degeneração da retina após exposição contínua à fototerapia (47). Devido a isso, os olhos dos RN devem ser cobertos para proteger a retina dos danos luminosos. A equipe deve estar atenta para checar o adequado posicionamento dos protetores oculares, evitando os danos retinianos que podem ser ocasionados pela luz, assim como avaliar possíveis irritações cutâneas periorbitárias destes protetores e infecções conjuntivais que podem ser decorrentes de seu uso (28).

Efeitos Colaterais Tardios da Fototerapia

Neoplasias

Dois grandes estudos de coorte realizados na Califórnia (48,49) associaram a fototerapia a um aumento do risco de desenvolvimento de câncer infantil, particularmente leucemia mielóide aguda. CNATTINGIUS *et al* (50) também demonstraram associação entre fototerapia e LMA em crianças. Embora o aumento do risco absoluto seja pequeno,

é suficiente para se avaliar com prudência a escolha do início do tratamento fototerápico.

Estudos correlacionando fototerapia e melanoma não demonstraram evidência de risco estatisticamente significativa. Estudos também não demonstraram aumento de incidência de carcinoma basocelular e de células escamosas em pacientes que receberam fototerapia no período neonatal (51,52).

Lesões Cutâneas

Estudos são conflitantes a respeito da associação de nevo melanocítico e fototerapia. WINTERMEIR *et al* (53) não acharam influência significativa no desenvolvimento de nevo melanocítico em pré-escolares submetidos a fototerapia devido a hiperbilirrubinemia quando recém-nascidos, mas demonstraram um aumento de máculas café-com-leite. LAI *et al* (54) realizaram uma revisão sistemática não encontrando também evidências de aumento do número de nevo melanocítico em RN submetidos a fototerapia. MAHE *et al* (55) não encontraram aumento na contagem de nevos em crianças de 9 anos após fototerapia neonatal com luz azul. Já Matichard *et al* (56) demonstraram alta correlação entre fototerapia neonatal e contagem de nevos, principalmente de 2 a 5 mm, em crianças de 8-9 anos. Csoma *et al* (57) investigaram 747 escolares de 14 a 18 anos que receberam fototerapia e associaram com aumento da prevalência de nevo comum e atípico.

Doenças Alérgicas

Alguns estudos têm demonstrado a associação entre a hiperbilirrubinemia neonatal e a fototerapia neonatal com doenças alérgicas na infância como asma, rinite e conjuntivite alérgicas. Aspberg *et al* (58) demonstraram em um grande estudo de base

populacional a associação entre asma na infância e fototerapia e/ou icterícia neonatal. Das *et al* (59) demonstraram aumento significativo em asma e rinite alérgica após a hiperbilirrubinemia neonatal e a fototerapia neonatal. Beken *et al* (60) demonstraram aumento de níveis de eosinófilos e na proteína catiônica eosinofílica após a fototerapia com LED, especulando que neonatos tratados com fototerapia com LED tem níveis aumentados de proteína catiônica eosinofílica e este aumento pode ter papel no desenvolvimento de doenças alérgicas posteriormente. Aydin *et al* (61) demonstraram que a contagem periférica de eosinófilos pode ser afetada pelos níveis de bilirrubina e/ou pela fototerapia. Bottini *et al* (62) demonstraram associação de fototerapia neonatal e alergia (rinite e conjuntivite)

Considerações Finais

A fototerapia é a terapia de escolha para os recém-nascidos com icterícia neonatal, diminuindo os níveis de bilirrubina indireta e prevenindo o kernicterus. Nos últimos anos surgiram preocupações a respeito de suas potenciais toxicidades a curto e longo prazo, sendo demonstrado através desta revisão inúmeros estudos quanto aos possíveis efeitos tóxicos desta modalidade de tratamento no recém-nascido. Muitos dos efeitos são transitórios. O uso da fototerapia no período neonatal deve ser criterioso, devendo ser usado somente nos RN que realmente necessitem do seu uso, seguindo os guidelines recomendados e pesando-se sempre o risco e benefício do tratamento para o neonato.

Bibliografia:

1. SILVA I, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85. n. 5, p. 455-458, 2009.
2. BHUTANI VK, *et al.* Universal bilirubin screening for severe neonatal hyperbilirubinemia. **Journal of Perinatology**, v. 30, p. S6–S15, 2010.
3. BHUTANI VK, *et al.* Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonate: for a safer first week. **Pediatr Clin North Am**, vol, 51, p. 843-61, 2004.
4. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 114, p. 297-316, 2004.
5. DENNERY PA, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia. **N Engl J Med**, v. 344, p. 581, 2001
6. HUANG MJ, *et al.* Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. **Pediatr Res**, v. 56, p. 682, 2004.
7. WHATCHKO JF, *et al.* Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. **Pediatrics**, v. 124, p. e868, 2009.
8. NEWMAN TB, *et al.* Prediction and prevention of extreme neonatal

- hyperbilirubinemia in mature health maintenance organization. **Arch Pediatr Adolesc med**, v. 108, p. 31-39, 2000.
9. BANCROFT JD, *et al.* Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. **J Pediatr**, v. 132, p. 656, 1998.
 10. MAISELS MJ, *et al.* The natural history of jaundice in predominately breastfed infants. **Pediatrics**, v. 134, e340, 2014.
 11. GOURLEY GR, *et al.* A controlled, randomized, double-blind trial of prophylaxis against jaundice among breastfed newborns. **Pediatrics**, v. 116, p. 385, 2005.
 12. BHUTANI VK, COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Phototherapy to prevent severe neonatal hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestational. **Pediatrics**, v. 128, p. e1046, 2011.
 13. ENNEVER JF, *et al.* Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy. **J Clin Invest**, v. 79, p. 1674, 1987
 14. VREMAN HJ, *et al.* Phototherapy: current methods and future directions. **Semin Perinatol**, v. 28, p. 326, 2004.
 15. MAISELS MJ, KRING E. Rebound in serum bilirubin level following intensive phototherapy. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 156, p. 669, 2002.
 16. TRIDENT A, DE LUCA D. Efficacy of light-emitting diode versus other light sources for treatment of neonatal hyperbilirubinemia: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 101, p. 458, 2012.

17. YAHIA S, *et al.* Influence of hyperbilirubinemia and phototherapy on markers of genotoxicity and apoptosis in full-term infants. **Eu J Pediatr**, v. 174, n. 4, p. 459-469, 2015.
18. AYCICEK A, *et al.* Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 2, p.141-6, 2008.
19. EL-ABDIN MYZ, *et al.* Phototherapy and DNA changes in full neonates with hyperbilirubinemia. **The Egyptian Journal of Medical Huan Genetics**. v. 13, p. 29-35, 2012.
20. KARAKUKCU C, *et al.* Assessment of DNA damage and plasma catalase activity in healthy term hyperbilirubinemic infants receiving phototherapy. **Mutat Res**, v. 690, p. 12-16, 2009.
21. TATLI MM, *et al.* Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. **Mutat Res**, v. 654, n. 1, p. 93-95, 2008.
22. PROCIANOY RS, *et al.* The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. **Amer J Perinatol**, v. 27, n. 5, p. 375-379, 2010.
23. SIROTA L, *et al.* Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 11, p. 910-913, 1999.
24. ZARKESH M, *et al.* The Effect of neonatal Phototherapy on Serum, Level of Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. **J Clin Neonatol**, v. 5, p. 189-192, 2016.

25. RASHEDY FH, *et al.* Effect oh Phototherapy on CD4, CD8 and natural Killer Cells of Full Term Neonates with Indirect Hyperbilirubinemia. **Egypt J immunol**, v. 22, n. 2, p. 23-29, 2015.
26. EYADA IK, *et al.* Effect of phototherapy on B and T lymphocytes in Egyptian infants suffering from neonatal jaundice. **Allergol Immunopathol (Madr)**, vol. 45, n. 3, p. 290-296, 2017.
27. ELFEKY RAA, *et al.* The effect of phototherapy on lymphocyte subsets in newborn infants. **J Allergy Immunol**, AB12, 2012.
28. YURDAKOK MURAT. Phototherapy in the newborn: what's new? **J Pediatr and Neonatal Individualized Medicine**, v. 4, n. 2, pe040255, 2015.
29. XIONG T, *et al.* The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1247-5125, 2011.
30. MAAYAN-METZGER A, *et al.* Transepidermal water loss and skin hydration in preterm infnats during phototherapy. **Am J Perinatol**, v. 18, n.7, p. 393-396, 2001.
31. ASL AS, *et al.* The effect of phototherapy on urinary calcium excretion in term neonates. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 27, p/ 486-492, 2016.
32. KARAMIFAR H, PISHVA N. Prevalence of phototherapy-induced hypocalcemia. **Iran J med Sci**, v. 27, p. 166-168, 2002.
33. EGHBALIAN F, MONSEF A. Phototherapy-induced hypocalcemia in icteric newborns. **Iran J med Sci**, v. 27, p. 169-171, 2001.

34. BERTINI G, *et al.* Bronze baby syndrome and the risk of kernicterus. **Acta Paediatr**, v. 94, p.968-971, 2005.
35. SURMELI-ONAY O, *et al.* Phototherapy rash in newborn infants: does it differ between conventional and light emitting diode phototherapy? **Pediatr Dermatol**, v.30, n. 5, p. 529-533, 2013.
36. LARUSSO J, *et al.* Phototherapy-induced Purpuric Eruption in a Neonate. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 8, n.3, p. 46-48, 2015.
37. JAHANSHAHIFARD S, *et al.* Effects of Phototherapy on Cytokines Levels and White Blood Cells in Term Neonate with Hiperbilirubinemia. **J Clin Neonatol**, vol.1, n. 3, p. 139-142, 2012.
38. MRKAIC LJ, *et al.* Neonatal immune system changes caused by phototherapy. **Srp Arh Celok Lek**, v. 122, p. 36-37, 1994.
39. BHARGAVA O, *et al.* Incidence of thrombocytopenia in hyperbilirubinemic neonates following phototherapy. **Asian J Res Chem**, v.8, n. 4, p. 221-230, 2015.
40. KHERA S, GUPTA R. incidence of thrombocytopenia following phototherapy in hyperbilirubinemic neonates. **Med J Armed Forces India**, v.67, n. 4, p. 329-332, 2011.
41. KADALRAJA R, *et al.* Is mesenteric blood flow compromised during phototherapy in preterm neonates? **Arch Dis Child fetal neonatal Ed**, v. 89, n. 6, F564, 2004
42. RAGHAVAN K, *et al.* Is the phototherapy a risk factor for ileus in high-risk neonates? **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 18, n.2, p. 129-131, 2005.

43. CHEN A, *et al.* The effect of blue light exposure on the expression of circadian genes: *bmal1* and cryptochrome 1 in peripheral blood mononuclear cells of jaundiced neonates. *Pediatr Res*, v. 58, p. 1180-1184, 2005.
44. BAREFIELD ES, *et al.* Association of ductus arteriosus and phototherapy in infants weighing less than 1000 grams. **J Perinatol**, v.13, n. 5, p. 376-380, 1993.
45. BENDERS MJ, *et al.* Cardiac output and ductal reopening during phototherapy in preterm infants. **Acta Paediatr**, v.88, n. 0, p. 1014-119, 1999.
46. SUMERLI-ONAY O, *et al.* A new approach to an old hypothesis; phototherapy does not affect ductal patency via PGE2 and PGI2. **J Matern Neonatal Med**, v. 28, n.1, p. 16-22, 2015.
47. GRIMM C, *et al.* Rhodopsin-mediates blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 2, p. 497-505, 2001.
48. NEWMAN TB, *et al.* Retrospective Cohort Study of Phototherapy and Childhood Cancer in Northern California. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
49. WICKREMASINGHE AC, *et al.* Neonatal Phototherapy and Infantile Cancer. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
50. CNATTIGIUS S, *et al.* Prenatal and neonatal risk factors for childhood myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 4, n. 5, p. 441-445, 1995.
51. BREWSTER DH, *et al.* Risk of skin cancer after neonatal phototherapy: retrospective cohort study. **Arch Dis Child**, v. 95, n. 10, p. 826-831.

52. BERG P, LINDELOF B. Is the phototherapy in neonates a risk factor for malignant melanoma development? **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 151, n. 12, p. 1185-1187, 1997.
53. WINTERMEIER K, *et al.* Neonatal blue light phototherapy increases café-au-lait macules in preschool children. **Eur J Pediatr**, v. 173, p. 1519, 2014.
54. LAI YC, YEW YW. Neonatal Blue Light Phototherapy and Melanocytic Nevus Count in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Pediatr Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 62-68, 2016.
55. MAHÉ E, *et al.* Neonatal blue-light phototherapy does not increase nevus count in 9-year-old children. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p.896-900, 2009.
56. MATICHARD E, *et al.* Effect of neonatal phototherapy on melanocytic nevi count in children. **Arch Dermatol**, V. 142, N. 12, P. 1599-1604, 2006.
57. CSOMA S, *et al.* Neonatal blue-light phototherapy could increase the risk of dysplastic nevus development. **Pediatrics**, v. 119, p. 1036-1037, 2007.
58. ASPBERG S, *et al.* Confirmed association between neonatal phototherapy or neonatal icterus and risk of childhood asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 21, p. 733-9, 2010.
59. DAS RR, NAIK SS. Neonatal hyperbilirubinemia and childhood allergic diseases: a systematic review. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 26, n. 1, p. 2-11, 2015.
60. BEKEN S, *et al.* The effects of phototherapy on eosinophil and eosinophilic cationic protein in newborns with hyperbilirubinemia. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 33, n. 3, p. 151-156, 2014.

61. AYDIN B, *et al.* Blood Eosinophil Levels in Newborns with Severe Indirect Hyperbilirubinemia Treated with Phototherapy. **Iranian Journal of Pediatrics**, vol. 24, n. 3 ,p. 267-272, 2014.
62. BOTTINI G, BOTTINI E. Is there a role of early neonatal events in susceptibility to allergy? **Int J Biomes Sci**, v. 18, n. 4, p. 313-319, 2007.

17. ARTIGO 2 EM INGLÊS

Side Effects of Phototherapy on Neonates

Abstract

Phototherapy in neonates for treatment of pathological jaundice is an effective therapeutic tool that is widely used in neonatal units. Over the last years, a greater concern has emerged about the effects on the immune and inflammatory system and its potential genotoxic and side effects, especially the late ones, possibly associated with childhood diseases, showing that this treatment is not as harmless as previously believed. Numerous studies assessing these possible adverse effects of phototherapy on neonates have been published over the last years. Through this review, we seek to analyze what we know about the side effects of phototherapy in the neonatal period. The main causes of jaundice, phototherapy techniques, acute and late side effects and effects on the immune and inflammatory system were reviewed. It was concluded that phototherapy is not a treatment free of side effects and further studies need to be conducted in order to elucidate its harmful effects on neonates.

Keywords: Jaundice; hyperbilirubinemia; neonate; phototherapy; side effects.

Introduction

Jaundice due to indirect hyperbilirubinemia affects more than 60% of neonates. A large number of the causes of hyperbilirubinemia in full-term neonates are benign and reversible and do not need therapeutic intervention (1,2). The most feared toxic effect, potentially irreversible and secondary to hyperbilirubinemia, is bilirubin encephalopathy, also known as kernicterus (1-4).

The main treatment for jaundice is carried out using phototherapy, following the criteria recommended by the American Academy of Pediatrics (1). Since the 1950's, phototherapy has been the therapy of choice for neonates suffering from indirect hyperbilirubinemia. It reduces the plasma levels of unconjugated bilirubin, preventing kernicterus and decreasing the need for exchange transfusion.

Side effects may occur in the short or long run (5). Among the short-term effects we could mention the interference in the maternal-infant relationship, thermal and hydroelectrolytic imbalance, skin lesions, bronze baby syndrome, hematological alterations, paralytic ileus, patent ductus arteriosus, ocular effects, and circadian cycle disorders (4). Among the long-term side effects are neoplasms, nevi, café au lait spots, and allergic diseases such as asthma, rhinitis and conjunctivitis.

Several studies trying to correlate phototherapy with damage to the newborn have been published. Some studies have assessed the immune and inflammatory response by analyzing the expression of adhesion molecules, cytokines and lymphocyte surface markers. Others have evaluated DNA damage in neonates subjected to phototherapy. The

association of phototherapy in the neonatal period to a number of childhood diseases has been investigated.

This article aimed to carry out a review of the literature covering the knowledge of neonatal jaundice, phototherapy treatment and the side effects of the phototherapy treatment. A non-systematic review of the literature was performed in the PubMed database, including the keywords "neonatal jaundice", with 8177 studies, "neonatal jaundice phototherapy", which returned 1649 studies, and "neonatal jaundice phototherapy side effects", with 327 studies. Initially, the titles and abstracts available at PubMed were reviewed. Articles not related to neonatal period were excluded.

Sixty articles (cohort studies, case-control studies, systematic review, and case report) were selected. Some references found in these articles were included. The text was organized in topics for a better understanding of the subject and the focus of the evaluated population were late premature and term newborns due to established diagnosis guidelines for this group (4).

Definition of Neonatal Jaundice

Neonatal jaundice in newborns at a gestational ≥ 35 weeks can be defined as an increase in the levels of bilirubin (hyperbilirubinemia) above the 95th percentile of the Bhutani nomogram. The yellowish color of the skin and/or conjunctiva of the neonate is caused by the deposition of bilirubin (4, 5).

Severe hyperbilirubinemia is defined as a total bilirubin level higher than 25 mg/dL. It is associated with an increased risk of bilirubin-induced neurological dysfunction, which occurs when bilirubin crosses the blood-brain barrier and deposits on

brain tissue. Acute bilirubin encephalopathy is usually described as an acute manifestation of bilirubin-induced neurological dysfunction, and kernicterus is usually described as a chronic, permanent sequela of the bilirubin-induced neurological dysfunction (4).

Causes of Neonatal Jaundice

Hyperbilirubinemia may be caused by pathological conditions or increased mechanisms responsible for physiological jaundice. Identifying the cause of neonatal hyperbilirubinemia is important to determine the time and the therapeutic interventions for prevention of severe hyperbilirubinemia (5, 6).

Non-pathological neonatal jaundice is caused by variations in the bilirubin metabolism of the newborn, resulting in higher bilirubin production, decreased clearance, and increased enterohepatic circulation (5).

The most common cause of pathological jaundice is an increase in bilirubin production due to hemolysis (7). Hemolysis can occur due to ABO or Rh incompatibility; defects of the red blood cell membrane, such as hereditary spherocytosis and elliptocytosis; enzymatic defects of erythrocytes, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, pyruvate kinase deficiency and congenital erythropoietic porphyria; and due to sepsis (increased oxidative stress may cause damage to red blood cells, leading to hemolysis). Other causes of increased bilirubin production, as a result of the increased destruction of red blood cells, are polycythemia and cephalohematoma (8).

In the Crigler-Najjar syndrome type 1 and 2 and in Gilbert's syndrome, there is an increase in bilirubin due to defects in the gene that encodes UGT1A1, decreasing the conjugation of bilirubin (9).

Breast milk jaundice, impairment of intestinal motility caused by anatomical or functional obstruction and breastfeeding failure jaundice are causes of pathological jaundice due to increased enterohepatic circulation (10, 11).

Neonatal Jaundice Treatment

Aiming at the prevention of kernicterus cases, the treatment of neonatal jaundice focuses on preventing hyperbilirubinemia by identifying neonates at risk and starting preventive therapeutic interventions when necessary, namely, phototherapy and exchange transfusion (4,12).

Phototherapy Mechanisms

Phototherapy exposes the skin of the newborn to a light with a specific wavelength, which reduces bilirubin levels through three mechanisms (13): Structural isomerization to lumirubin (bilirubin is converted to lumirubin via irreversible structural isomerization. Lumirubin is a more soluble substance than bilirubin and is excreted unconjugated in the bile and urine. This is probably the main mechanism for reducing the plasma concentration of bilirubin through phototherapy); Photoisomerization to a less toxic bilirubin isomer (the 4Z,15Z bilirubin isomer is converted to the 4Z,15E isomer, which is more polar and less toxic. Like lumirubin, the 4Z,15E isomer is excreted unconjugated in the bile, but photoisomerization is reversible and its clearance is low. Therefore, this pathway may have a small effect on reducing bilirubin levels, but it

reduces 15% of toxic bilirubin to the non-toxic form); Photooxidation to polar molecules (photooxidation reactions convert bilirubin to a colorless polar component, which is primarily excreted in the urine. This is a slow process and occurs to a small extent during the elimination of bilirubin.

Phototherapy Techniques:

During phototherapy, the area covered with diapers must be minimized. The eyes must be protected with opaque visors. Devices with fluorescent lights must be preferably used in open cradles. With levels of bilirubin > 20 mg/dL, phototherapy must be administered continuously, without interruptions. When the value is <20 mg/dL, phototherapy can be discontinued for breastfeeding and parents' visits.

The dose of phototherapy, called irradiance, determines its effectiveness. The measurement is performed in $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ of the body surface of the exposed area/nm of the wavelength. Irradiance depends on the type of light used, the distance between the light and the patient, and the area of exposed skin. In conventional phototherapy, irradiance ranges from 6 to 12 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. In intensive phototherapy, irradiance is higher than 30 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ (14). For phototherapy to be intensive and effective, the irradiance levels should reach the largest surface area of the newborn as possible and the light should be placed at a distance of 10-30 cm from the patient, depending on the manufacturer's recommendation and the combination of optical fiber, LED, or special blue light (12). Although it is not necessary to measure the irradiance spectrum prior to each phototherapy session, periodic checks to determine if the appropriate irradiance is being used are important (4).

Intensive phototherapy reduces the levels of bilirubin to 2 - 3 mg/dL within 4-6 hours. Within 24 hours, bilirubin may decline by 30-40% (15). Conventional phototherapy, on the other hand, reduces bilirubin by 6-20% within the first 18-24 hours. The rate of bilirubin decline during phototherapy depends on numerous factors, such as: degree of irradiance, exposed body surface, initial bilirubin levels (the higher, the faster the rate of decline). The effectiveness of the treatment also depends on the neonate's pathology, being less effective in neonates with cholestasis and those with hemolytic disease with a positive direct Coombs test (4).

Types of Phototherapy Devices:

Bilirubin absorbs light more strongly in the blue region, in the spectrum near 460 nm. There are several types of devices for phototherapy, with variable types of light, different wavelengths and different degrees of irradiance (14,16).

Side Effects of Phototherapy

Molecular Alterations by Phototherapy

Phototherapy may have a toxic effect on DNA. Yahia et al. (17) demonstrated that phototherapy causes DNA damage and induces apoptosis in the lymphocytes of full-term newborns. Aycicek et al. (18) showed damage to the DNA of endogenous mononuclear leukocytes in icteric full-term newborns undergoing phototherapy. El-Abdin et al. (19),

Karakukcu et al. (20) and Tatli et al. (21) also demonstrated the genotoxic effects of phototherapy.

Some studies have demonstrated the influence of phototherapy on the concentration of cytokines in neonates, in an attempt to correlate their findings with effects on the immune and inflammatory systems. Procianoy et al. (22) demonstrated decreased levels of IL-6 after 24 hours of phototherapy, suggesting a possible anti-inflammatory effect of phototherapy. Sirota et al. (23) found an increase in IL-2 and IL-10 and a decrease in IL-1 beta in neonates after phototherapy, demonstrating that it affects the immune system function. Zarkesh et al. (24) found an increase in IL-6 levels and leukocyte counts in neonates after phototherapy, also suggesting that alterations in the function of the neonatal immune system may be triggered by phototherapy.

Studies demonstrating alterations in the expression of lymphocyte surface antigens in neonates submitted to phototherapy have also been conducted. Rashedy et al. (25) studied the effect of phototherapy on the levels of CD4, CD8 and NK lymphocytes after 72 hours of phototherapy and found no significant change in relation to the controls. Eyada et al. (26) also found no correlation between the levels of CD19, CD4 and CD8 in the lymphocytes of neonates after 72 hours of phototherapy, nor the occurrence of infections after a six-month follow-up. Elfeky et al. (27) found lower CD3 and CD19 levels after 72 hours of phototherapy and followed these patients for six months. Patients with a higher CD3 decline had an increase in the number of hospital visits.

Acute Side Effects of Phototherapy

Interference in the Mother-Child Relationship

The phototherapy treatment separates the neonate from his mother. Unless jaundice is very severe, phototherapy can be safely discontinued for breastfeeding and parents' visits (28).

Thermal and Hydroelectrolytic Imbalance

Phototherapy changes the neonate's thermal environment and may lead to insensible water loss, hypothermia or hyperthermia, and dehydration (29). It may also trigger diarrhea, possibly due to increased intestinal secretion, and alteration of the transepithelial electric potential difference. The absorption of water, sodium and potassium may be impaired in neonates receiving phototherapy, but this effect is transient and resolves once treatment has been discontinued (28). An increase in the water supply to the neonate undergoing phototherapy by 10-15 ml /kg /day is recommended to prevent dehydration. No intravenous hydration is required if severe dehydration is not present (30).

Asl et al. (31) measured calcium excretion before and after 48 hours of phototherapy and, as a result, found an increase in urinary calcium excretion, although without evidence of hypocalcemia. Light can affect calcium homeostasis by inhibiting melatonin secretion by the pineal gland, consequently leading to hypocalcemia (32). Calcium levels return to normal 24 hours after the end of phototherapy. No prophylactic calcium is required during phototherapy (28,33).

Bronze Baby Syndrome

The bronze baby syndrome is a rare complication that occurs in newborns with cholestasis (direct bilirubin > 2mg/dL) undergoing phototherapy. It manifests itself through a gray-brown pigmentation of the skin, serum, and urine. Its specific etiology is

unknown. Pigmentation returns to normal once phototherapy has been discontinued. This syndrome may be an additional risk for the development of kernicterus (34). Neonates with mixed (direct and indirect) hyperbilirubinemia who undergo phototherapy should be monitored for the risk of this syndrome (29).

Skin Lesions

Phototherapy may cause skin lesions such as macules, papules and maculopapular rash. Surmeli et al. (35) did not demonstrate differences in the incidence and extent of rashes in newborns undergoing conventional phototherapy compared with LED. There is a description of a phototherapy-induced purpuric eruption in neonates who received blood transfusion and intravenous immunoglobulin for the treatment of neonatal hemolytic disease (36).

Hematologic Alterations

Regarding leukocyte counts, Zarkesh et al. (24) and Jahanshahifard et al. (37) showed an increase in circulating leukocytes after phototherapy in icteric neonates, and Mrkaic et al. (38) showed an increase in the total number of polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes and monocytes; however, these findings were temporary. The study of Mrkaica evaluated the effects of phototherapy on the immune system of newborn without signs of asphyxia or infection, which may explain this only temporary response, not being possible establish the consequences of phototherapy in the presence of baseline disease (38).

Neonatal thrombocytopenia is not commonly cited in pediatric textbooks as a complication of phototherapy (39,40). Bhargava et al. studied the association of phototherapy for neonatal jaundice with thrombocytopenia in 96 newborns, finding mild

to moderate thrombocytopenia after 48 hours of phototherapy, usually asymptomatic and transient (39). Khera and Gupta also studied the effect of phototherapy on the platelet levels of 100 neonates and the thrombocytopenia was observed in 74% of patients during the first 24 hours of phototherapy, being transient and not associated with complications such as bleeding (40).

Paralytic Ileus

The occurrence of paralytic ileus may be associated with phototherapy for neonatal jaundice according some studies. Kadalraja et al. (41) performed a prospective observational study in 14 premature newborns and finding increased superior mesenteric artery end diastolic blood flow velocity, may indicate photorelaxation of the mesenteric vascular smooth muscle during the phototherapy, and concluding that phototherapy may be a risk factor for ileus in preterm neonates. Raghavanet et al. (42) found a high proportion (63.4%) of extremely low birth weight preterm infants with paralytic ileus compared to newborn that didn't receive phototherapy (9%), also concluding that phototherapy is an independent risk factor for paralytic ileus in extremely low birth weight neonates.

Circadian Cycle Disorders

The effects of neonatal phototherapy on the expression of circadian genes have been studied. Chen et al. (43) demonstrated an increased expression of the Cry1 gene and a reduction in the levels of melatonin and the Bmal1 gene, altering the normal circadian rhythm and leading to abnormal behaviors in newborns under phototherapy for jaundice, such as crying and nervousness.

Patent Ductus Arteriosus

In the 1990s, Burefield et al. (44) demonstrated a significant increase in the incidence of patent ductus arteriosus in very extremely birth weight preterm infants when compared with neonates who did not undergo phototherapy (76% and 53%, respectively), and Benders et al. (45) showed the reopening of the ductus arteriosus in more than 50% of preterm infants (<32 weeks and birth weight <1400g) under phototherapy. Numerous studies have shown that phototherapy may indirectly or directly cause patency of the ductus arteriosus by the effect of photorelaxation via prostaglandins. In 2015, Surmeli-Onay et al.(46) demonstrated a new approach to an old hypothesis: phototherapy does not affect the patency of the ductus arteriosus via prostaglandins and these are eliminated concomitantly with the closure of the ductus arteriosus. The photorelaxation effect possibly is not influenced by prostaglandin levels. Further studies are needed to verify that phototherapy is truly associated with patent ductus arteriosus.

Ocular Effects of Phototherapy

The retina is susceptible to light and animal studies indicate retinal degeneration after a continuous exposure to phototherapy (47). In view of this, the eyes of neonates must be covered to protect their retina from light-induced damage. The staff should be careful to check the proper positioning of eye shields, avoiding the retinal damage that can be caused by light, and evaluate possible periorbital skin irritations due to these shields, as well as conjunctival infections that may arise from their use (28).

Late Side Effects of Phototherapy

Neoplasms

Two large cohort studies conducted in California (48,49) associated phototherapy with an increased risk of developing childhood cancer, particularly acute myeloid leukemia. CNATTINGIUS et al. (50) also showed an association between phototherapy and Acute Myeloid Leukemia (AML) in infants. Although the increase in the absolute risk is small, it is sufficient to cautiously judge when the phototherapy treatment should start.

Studies correlating phototherapy and melanoma have not demonstrated evidence of a statistically significant risk. Studies have not demonstrated an increased incidence of basal cell and squamous cell carcinoma in patients who underwent phototherapy in the neonatal period either (51,52).

Skin Lesions

Studies are not in agreement about the association between melanocytic nevi and phototherapy. WINTERMEIR et al. (53) found no significant influence on the development of melanocytic nevi in preschool children who had been submitted to phototherapy for hyperbilirubinemia in the neonatal period, but demonstrated an increase in café-au-lait macules. Lai et al. (54) performed a systematic review and did not find evidence of an increased number of melanocytic nevi in newborns undergoing phototherapy. Mahe et al. (55) found no increase in nevi count in 9-year-old children after neonatal phototherapy using a blue light. Matichard et al. (56) demonstrated a high correlation between neonatal phototherapy and nevi count, especially 2 to 5 mm, in children aged 8-9 years. Csoma et al. (57) investigated 747 schoolchildren aged 14 to 18 years who had undergone phototherapy and associated it with the increased prevalence of common and atypical nevi.

Allergic Diseases

Some studies have demonstrated the association between neonatal hyperbilirubinemia and neonatal phototherapy with allergic diseases in childhood, such as allergic asthma, rhinitis and conjunctivitis. Aspberg et al. (58) demonstrated, in a large population-based study, the association between childhood asthma and neonatal phototherapy and/or jaundice. Das et al. (59) showed a significant increase in allergic asthma and rhinitis following neonatal hyperbilirubinemia and neonatal phototherapy. Bekenet et al. (60) demonstrated increased levels of eosinophils and eosinophil cationic protein after LED phototherapy and speculated that neonates treated with LED phototherapy showed increased levels of eosinophil cationic protein and this increase may play a role in the development of allergic diseases later. Aydin et al. (61) demonstrated that the peripheral eosinophil count may be affected by bilirubin levels and/or phototherapy. Bottini et al. (62) showed an association between neonatal phototherapy and allergy (rhinitis and conjunctivitis).

Final Considerations

Phototherapy is the therapy of choice for neonates with neonatal jaundice, as it decreases the levels of indirect bilirubin and prevents kernicterus. Over the past years, concerns with its potential short and long-term toxicities have arisen, and this review included numerous studies demonstrating the possible toxic effects of this treatment modality on the newborn. Many effects are transient. The use of neonatal phototherapy must be judicious and aimed only at neonates who really need it, following the

recommended guidelines and always weighing the risks and benefits of the treatment for neonates.

Bibliography:

1. SILVA I, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85. n. 5, p. 455-458, 2009.
2. BHUTANI VK, *et al.* Universal bilirubin screening for severe neonatal hyperbilirubinemia. **Journal of Perinatology**, v. 30, p. S6–S15, 2010.
3. BHUTANI VK, *et al.* Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonate: for a safer first week. **Pediatr Clin North Am**, vol, 51, p. 843-61, 2004.
4. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 114, p. 297-316, 2004.
5. DENNERY PA, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia. **N Engl J Med**, v. 344, p. 581, 2001
6. HUANG MJ, *et al.* Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. **Pediatr Res**, v. 56, p. 682, 2004.
7. WHATCHKO JF, *et al.* Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. **Pediatrics**, v. 124, p. e868, 2009.
8. NEWMAN TB, *et al.* Prediction and prevention of extreme neonatal hyperbilirubinemia in mature health maintenance organization. **Arch Pediatr**

- Adolesc med**, v. 108, p. 31-39, 2000.
9. BANCROFT JD, *et al.* Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. **J Pediatr**, v. 132, p. 656, 1998.
 10. MAISELS MJ, *et al.* The natural history of jaundice in predominately breastfed infants. **Pediatrics**, v. 134, e340, 2014.
 11. GOURLEY GR, *et al.* A controlled, randomized, double-blind trial of prophylaxis against jaundice among breastfed newborns. **Pediatrics**, v. 116, p. 385, 2005.
 12. BHUTANI VK, COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Phototherapy to prevent severe neonatal hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestational. **Pediatrics**, v. 128, p. e1046, 2011.
 13. ENNEVER JF, *et al.* Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy. **J Clin Invest**, v. 79, p. 1674, 1987
 14. VREMAN HJ, *et al.* Phototherapy: current methods and future directions. **Semin Perinatol**, v. 28, p. 326, 2004.
 15. MAISELS MJ, KRING E. Rebound in serum bilirubin level following intensive phototherapy. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 156, p. 669, 2002.
 16. TRIDENT A, DE LUCA D. Efficacy of light-emitting diode versus other light sources for treatment of neonatal hyperbilirubinemia: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 101, p. 458, 2012.

17. YAHIA S, *et al.* Influence of hyperbilirubinemia and phototherapy on markers of genotoxicity and apoptosis in full-term infants. **Eu J Pediatr**, v. 174, n. 4, p. 459-469, 2015.
18. AYCICEK A, *et al.* Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 2, p.141-6, 2008.
19. EL-ABDIN MYZ, *et al.* Phototherapy and DNA changes in full neonates with hyperbilirubinemia. **The Egyptian Journal of Medical Huan Genetics**. v. 13, p. 29-35, 2012.
20. KARAKUKCU C, *et al.* Assessment of DNA damage and plasma catalase activity in healthy term hyperbilirubinemic infants receiving phototherapy. **Mutat Res**, v. 690, p. 12-16, 2009.
21. TATLI MM, *et al.* Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. **Mutat Res**, v. 654, n. 1, p. 93-95, 2008.
22. PROCIANOY RS, *et al.* The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. **Amer J Perinatol**, v. 27, n. 5, p. 375-379, 2010.
23. SIROTA L, *et al.* Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 11, p. 910-913, 1999.
24. ZARKESH M, *et al.* The Effect of neonatal Phototherapy on Serum, Level of Interleukin-6 and White Blood Cell's Count. **J Clin Neonatol**, v. 5, p. 189-192, 2016.

25. RASHEDY FH, *et al.* Effect oh Phototherapy on CD4, CD8 and natural Killer Cells of Full Term Neonates with Indirect Hyperbilirubinemia. **Egypt J immunol**, v. 22, n. 2, p. 23-29, 2015.
26. EYADA IK, *et al.* Effect of phototherapy on B and T lymphocytes in Egyptian infants suffering from neonatal jaundice. **Allergol Immunopathol (Madr)**, vol. 45, n. 3, p. 290-296, 2017.
27. ELFEKY RAA, *et al.* The effect of phototherapy on lymphocyte subsets in newborn infants. **J Allergy Immunol**, AB12, 2012.
28. YURDAKOK MURAT. Phototherapy in the newborn: what's new? **J Pediatr and Neonatal Individualized Medicine**, v. 4, n. 2, pe040255, 2015.
29. XIONG T, *et al.* The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1247-5125, 2011.
30. MAAYAN-METZGER A, *et al.* Transepidermal water loss and skin hydration in preterm infnats during phototherapy. **Am J Perinatol**, v. 18, n.7, p. 393-396, 2001.
31. ASL AS, *et al.* The effect of phototherapy on urinary calcium excretion in term neonates. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 27, p/ 486-492, 2016.
32. KARAMIFAR H, PISHVA N. Prevalence of phototherapy-induced hypocalcemia. **Iran J med Sci**, v. 27, p. 166-168, 2002.
33. EGHBALIAN F, MONSEF A. Phototherapy-induced hypocalcemia in icteric newborns. **Iran J med Sci**, v. 27, p. 169-171, 2001.

34. BERTINI G, *et al.* Bronze baby syndrome and the risk of kernicterus. **Acta Paediatr**, v. 94, p.968-971, 2005.
35. SURMELI-ONAY O, *et al.* Phototherapy rash in newborn infants: does it differ between conventional and light emitting diode phototherapy? **Pediatr Dermatol**, v.30, n. 5, p. 529-533, 2013.
36. LARUSSO J, *et al.* Phototherapy-induced Purpuric Eruption in a Neonate. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 8, n.3, p. 46-48, 2015.
37. JAHANSHAHIFARD S, *et al.* Effects of Phototherapy on Cytokines Levels and White Blood Cells in Term Neonate with Hiperbilirubinemia. **J Clin Neonatol**, vol.1, n. 3, p. 139-142, 2012.
38. MRKAIC LJ, *et al.* Neonatal immune system changes caused by phototherapy. **Srp Arh Celok Lek**, v. 122, p. 36-37, 1994.
39. BHARGAVA O, *et al.* Incidence of thrombocytopenia in hyperbilirubinemic neonates following phototherapy. **Asian J Res Chem**, v.8, n. 4, p. 221-230, 2015.
40. KHERA S, GUPTA R. incidence of thrombocytopenia following phototherapy in hyperbilirubinemic neonates. **Med J Armed Forces India**, v.67, n. 4, p. 329-332, 2011.
41. KADALRAJA R, *et al.* Is mesenteric blood flow compromised during phototherapy in preterm neonates? **Arch Dis Child fetal neonatal Ed**, v. 89, n. 6, F564, 2004
42. RAGHAVAN K, *et al.* Is the phototherapy a risk factor for ileus in high-risk neonates? **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 18, n.2, p. 129-131, 2005.

43. CHEN A, *et al.* The effect of blue light exposure on the expression of circadian genes: *bmal1* and cryptochrome 1 in peripheral blood mononuclear cells of jaundiced neonates. *Pediatr Res*, v. 58, p. 1180-1184, 2005.
44. BAREFIELD ES, *et al.* Association of ductus arteriosus and phototherapy in infants weighing less than 1000 grams. **J Perinatol**, v.13, n. 5, p. 376-380, 1993.
45. BENDERS MJ, *et al.* Cardiac output and ductal reopening during phototherapy in preterm infants. **Acta Paediatr**, v.88, n. 0, p. 1014-119, 1999.
46. SUMERLI-ONAY O, *et al.* A new approach to an old hypothesis; phototherapy does not affect ductal patency via PGE2 and PGI2. **J Matern Neonatal Med**, v. 28, n.1, p. 16-22, 2015.
47. GRIMM C, *et al.* Rhodopsin-mediates blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 2, p. 497-505, 2001.
48. NEWMAN TB, *et al.* Retrospective Cohort Study of Phototherapy and Childhood Cancer in Northern California. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
49. WICKREMASINGHE AC, *et al.* Neonatal Phototherapy and Infantile Cancer. **Pediatrics**, v. 137, 2016.
50. CNATTIGIUS S, *et al.* Prenatal and neonatal risk factors for childhood myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 4, n. 5, p. 441-445, 1995.
51. BREWSTER DH, *et al.* Risk of skin cancer after neonatal phototherapy: retrospective cohort study. **Arch Dis Child**, v. 95, n. 10, p. 826-831.

52. BERG P, LINDELOF B. Is the phototherapy in neonates a risk factor for malignant melanoma development? **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 151, n. 12, p. 1185-1187, 1997.
53. WINTERMEIER K, *et al.* Neonatal blue light phototherapy increases café-au-lait macules in preschool children. **Eur J Pediatr**, v. 173, p. 1519, 2014.
54. LAI YC, YEW YW. Neonatal Blue Light Phototherapy and Melanocytic Nevus Count in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Pediatr Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 62-68, 2016.
55. MAHÉ E, *et al.* Neonatal blue-light phototherapy does not increase nevus count in 9-year-old children. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p.896-900, 2009.
56. MATICHARD E, *et al.* Effect of neonatal phototherapy on melanocytic nevi count in children. **Arch Dermatol**, V. 142, N. 12, P. 1599-1604, 2006.
57. CSOMA S, *et al.* Neonatal blue-light phototherapy could increase the risk of dysplastic nevus development. **Pediatrics**, v. 119, p. 1036-1037, 2007.
58. ASPBERG S, *et al.* Confirmed association between neonatal phototherapy or neonatal icterus and risk of childhood asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, vol. 21, p. 733-9, 2010.
59. DAS RR, NAIK SS. Neonatal hyperbilirubinemia and childhood allergic diseases: a systematic review. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 26, n. 1, p. 2-11, 2015.
60. BEKEN S, *et al.* The effects of phototherapy on eosinophil and eosinophilic cationic protein in newborns with hyperbilirubinemia. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 33, n. 3, p. 151-156, 2014.

61. AYDIN B, *et al.* Blood Eosinophil Levels in Newborns with Severe Indirect Hyperbilirubinemia Treated with Phototherapy. **Iranian Journal of Pediatrics**, vol. 24, n. 3 ,p. 267-272, 2014.

62. BOTTINI G, BOTTINI E. Is there a role of early neonatal events in susceptibility to allergy? **Int J Biomes Sci**, v. 18, n. 4, p. 313-319, 2007.

18. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A icterícia neonatal é uma patologia fascinante, multifatorial e complexa, que exige reconhecimento rápido nos casos mais severos para instalação do tratamento adequado, evitando assim a principal toxicidade potencialmente irreversível secundária aos depósitos de bilirrubina nos núcleos da base do recém-nascido, levando a uma seqüela neurológica grave denominada kernicterus.

O principal tratamento da icterícia é realizado através da fototerapia. Nos últimos anos, com a preocupação desta modalidade de tratamento não ser totalmente inofensiva e poder gerar danos agudos e tardios nos recém-nascidos, inúmeros estudos vem sendo publicados avaliando os possíveis efeitos da fototerapia na função imune-alergo-inflamatória na infância.

Nosso estudo demonstrou aumento da expressão de CD10 e de CD16 e diminuição da expressão de CD11c e de CD66acde após 24 horas de exposição à fototerapia, sugerindo um efeito anti-inflamatório da fototerapia nos recém-nascidos expostos a este tratamento. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar a fisiologia destes marcadores na idade neonatal.

ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, na condição de pai/mãe ou representante legal do recém-nascido _____ está sendo convidado a participar de uma pesquisa do Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do RS e do Grupo Hospitalar Conceição, intitulada: ***Expressão de Marcadores de Superfície de Neutrófilos em Recém-Nascidos Ictéricos antes e após Fototerapia.***

O presente estudo busca avaliar a função das células de defesa do sangue dos recém-nascidos submetidos à fototerapia.

O trabalho está sendo realizado pela médica Fabrícia Rennó Soderó Faulhaber.

Para este estudo é necessário duas amostras de sangue do seu filho para exame de laboratório, uma antes da fototerapia e outra após a fototerapia. O seu filho não será submetido a exame de sangue exclusivamente para esta pesquisa. A quantidade de sangue que será coletada é pequena (1 ml), e será coletada somente se o médico do seu filho solicitar algum exame, não causando outros riscos para ele. Nenhuma intervenção ocorrerá com a finalidade de pesquisa. A participação no estudo não trará benefício direto ao seu filho, porém esta pesquisa poderá ajudar no futuro a definir os bebês recém-nascidos de maior risco e também a estabelecer novos tratamentos.

Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pela pesquisadora principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 466/12).

Eu _____, (pai/mãe ou representante legal) do recém-nascido acima descrito, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e autorizo a participação da mesma(o) na pesquisa.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;

- De que a participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado ao recém-nascido.

- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.

- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora, Fabrícia Faulhaber, telefone 3357-2690, e-mail: rennosodero@ig.com.br e endereço: Av. Francisco Trein, 596, Serviço Onco-hematologia Pediátrica - Bairro Cristo Redentor - Porto Alegre.

- Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3º andar, Bloco H, sala 11, das 09h às 12h e das 14h:30min às 17h.

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20__.

Nome do pai/mãe ou representante legal

Assinatura do pai/mãe ou representante legal

Nome da pesquisadora

Assinatura da pesquisadora

ANEXO II – FICHA DO PROTOCOLO DE PESQUISA

1. DADOS MATERNOS

PRÉ-NATAL: () SIM () NÃO No DE CONSULTAS: _____

IDADE MATERNA: _____ ANOS

No GESTAÇÕES: _____ IGO: _____

TIPAGEM SANGUÍNEA E FATOR RH: _____

STORCH: () ALTERADO () NORMAL () IGNORADO

BR: () >18h () <18h LA: () ALTERADO () CLARO () IGNORADO

USO DE CORTICÓIDE () SIM () NÃO

USO DE DROGAS: () SIM () NÃO

PATOLOGIAS MATERNAS:

2. DADOS RECÉM-NASCIDO

PACIENTE:

NÚMERO:

DATA NASCIMENTO: _____ DATAS COLETAS PRÉ: _____ PÓS: _____

IG Capurro: _____

SEXO: () F () M

APGAR 1 _____ 5 _____ PN _____

TIPO DE PARTO () V () V+F () C

CLASSIF. IG/P: () AIG () PIG () GIG

TIPAGEM SANGUÍNEA: _____ FATOR RH: _____

COOMBS DIRETO: () POSITIVO () NEGATIVO

INCOMPATIBILIDADE ABO: () SIM () NÃO

INCOMPATIBILIDADE RH: () SIM () NÃO

HORAS VIDA PARA INÍCIO DA FOTOTERAPIA: _____

BILIRRUBINA PRE-FOTOTERPIA: _____

BILIRRUBINA PÓS FOTOTERAPIA: _____

HEMOGLOBINA PRÉ-FOTOTERAPIA: _____

HEMOGLOBINA PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD10 PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD10 PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD11b PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD11b PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD11c PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD11c PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD15 PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD15 PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD16 PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD16 PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD18 PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD18 PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD62L PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD62L PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD64 PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD64 PÓS-FOTOTERAPIA: _____

CD66acde PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ CD66acdePÓS-FOTOTERAPIA: _____

%NETRÓFILOS PRÉ-FOTOTERAPIA: _____ PÓS -FOTOTERAPIA: _____