

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**NÍVEIS PLASMÁTICOS E LIQUÓRICOS DE
INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE
TUMORAL- α EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO COM
ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA**

RITA DE CÁSSIA SILVEIRA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**NÍVEIS PLASMÁTICOS E LIQUÓRICOS DE
INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE
TUMORAL- α EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO COM
ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA**

RITA DE CÁSSIA SILVEIRA

Orientador: Dr. Renato Soibelman Procianoy

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil
2003

Ficha Catalográfica

S587n Silveira, Rita de Cássia

Níveis plasmáticos e líquóricos de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-[alfa] em recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica / Rita de Cássia Silveira ; orient. Renato Soibermann Procianoy. – 2003.
128 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas : Pediatria. Porto Alegre – RS, 2003.

1. Hipoxia-isquemia encefálica 2. Recém-nascido 3. Fator de necrose tumoral 4. Interleucina-6 I. Procianoy, Renato Soibermann II.Título.

NLM: WS 340

Dedico minha tese de doutorado ao meu marido, **Renato**, que com muito amor e paciência apoiou-me em todos os momentos da realização deste trabalho.

Agradecimento Especial

Aos meus filhos, **Vitor e Guilherme**, que foram maravilhosos, colaborando e entendendo minhas ausências, quando necessárias.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram decisivamente na realização desta pesquisa. De modo especial agradeço:

- ao meu orientador, **Dr. Renato Soibermann Procianoy**, pela orientação competente, incentivo e confiança na minha capacidade;
- aos colegas pediatras, ex-residentes do HCPA, **Dr. Maurício Colvero**, **Dra. Cátia Cavedon** e **Dra. Cíntia Mello**, pelo auxílio na fase inicial da coleta de dados;
- à **Dra. Clarissa Miura**, ex-R3 de Neonatologia do HCPA, pelo auxílio incansável na coleta de dados;
- aos colegas contratados da Neonatologia do HCPA, especialmente, **Dr. Mário Ritta** e **Dra. Rosanna Nejedlo**, pelo empenho na obtenção do sangue de cordão e do líqüor dos recém-nascidos asfixiados;
- à **equipe de enfermagem do Centro Obstétrico do HCPA**, especialmente a enfermeira **Ivete Pretto**;
- à **Profa. Dra. Célia Carlini**, Coordenadora do Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica – Instituto de Biociências da UFRGS, pelo brilhante e eficiente auxílio na dosagem laboratorial das citocinas;
- à amiga e colega **Rosimeri da Silva Alves**, que com competência e disponibilidade preencheu as lacunas de minha ausência;
- ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pelas sugestões e orientações na análise estatística;
- aos **colegas pesquisadores do Laboratório de Proteínas Tóxicas**, pelo apoio recebido;
- ao **Dr. Afonso Luis Barth**, chefe do Laboratório de Pesquisa do HCPA.
- à **Clair Azevedo**, pelo competente e dedicado trabalho de padronização técnica do texto.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Artigo de Revisão – CITOCINAS E ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA... 2

1 – INTRODUÇÃO..... 34

2 – HIPÓTESE..... 39

3 – OBJETIVOS..... 41

 3. 1 – Objetivo Geral..... 41

 3. 2 – Objetivos Específicos..... 41

4 – METODOLOGIA..... 43

 4. 1 – Delineamento do Estudo..... 43

 4. 2 – População..... 43

 4.2.1 – População em Estudo..... 43

 4.2.2 – População da Pesquisa..... 43

 4. 3 – Amostra e Amostragem..... 44

 4.3.1 – Critérios de Inclusão..... 44

 4.3.2 – Critérios de Exclusão..... 44

 4. 4 – Variáveis em Estudo..... 45

 4. 5 – Variáveis Controladas..... 49

 4. 6 – Logística..... 50

 4. 7 – Método Bioquímico Empregado para Determinação das Citocinas..... 52

 4.7.1 – Interleucina-6..... 52

 4.7.2 – Fator de Necrose Tumoral- α 54

 4. 8 – Cálculo do Tamanho da Amostra..... 56

 4. 9 – Análise Estatística..... 57

 4.10 – Considerações Éticas..... 58

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6 - Artigo em Português: NÍVEIS PLASMÁTICOS E LIQUÓRICOS DE INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA	64
7 - Artigo em Inglês: INTERLEUKIN-6 AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA LEVELS IN THE PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID OF TERM NEWBORNS WITH HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY	84
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
ANEXOS	

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPA	Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiônico
antiTNF	α (mAb)-anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral alfa
Apaf-1	Protease apoptótica ativante do fator-1
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CNS	<i>Central nervous system</i>
CO	Centro obstétrico
CP	<i>Cerebral palsy:</i>
CS	<i>Cerebrospinal fluid:</i>
DNA	Ácido desoxinucleico
EEG	<i>Electroencephalography:</i>
EEG	Eletroencefalograma
EHI	Encefalopatia hipóxico-isquêmica
ES	<i>Effect size</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIE	<i>Hypoxic-ischemic encephalopathy</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL-1 RA	Antagonista do receptor da interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-1β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina-18
IL-2	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	Interleucina-8
iNos	Óxido nítrico sintetase induzida
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
LPV	Leucomalácia periventricular
MAP	Monitorização intra parto
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
Nos	Óxido nítrico sintetase
PC	Paralisia cerebral
Rh IL-6	Interleucina-6 recombinante humana
RN	Recém-nascido
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
STORCH	Sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes
STORCH	<i>Syphilis, toxoplasma, rubella, cytomegalovirus, herpes virus 1 and 2:</i>
tax	Temperatura axilar
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Nota: Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

Lista de Figuras

Figura 1	Estágios da encefalopatia-hipóxico isquêmica	48
Figura 2	Curva padrão para Interleucina-6	54
Figura 3	Curva padrão para fator de necrose tumoral- α	55

Lista de Tabelas

Tabelas do artigo de revisão

Tabela 1	Ações das citocinas no sistema nervoso central.....	26
-----------------	---	----

Tabelas do artigo em Português

Tabela 1	Características da população estudada.....	73
Tabela 2	Níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e TNF- α	75
Tabela 3	Características dos recém-nascidos de acordo com a gravidade da EHI.....	76

Tabelas do artigo em Inglês

Table 1	Characteristics of the population studied	91
Table 2	Levels of IL-6 and TNF- α in plasma and CSF	93
Table 3	Characteristics of the newborns according to severity of HIE	94

RESUMO

RESUMO

Objetivo: Avaliar os níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e TNF- α em recém-nascidos a termo com Encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), comparando-os com recém-nascidos a termo sépticos sem meningite e sem EHI e com recém-nascidos controles.

Método: Foi realizado um estudo de caso-controle com três grupos de recém-nascidos a termo: grupo I, 20 recém-nascidos controles com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida; grupo II, 19 recém-nascidos sépticos, sem meningite, com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida; grupo III, 19 recém-nascidos asfíxiados caracterizados pelo escore de Apgar ≤ 4 e ≤ 6 no primeiro e quinto minutos de vida, respectivamente, pH umbilical $< 7,20$ e/ou lactato arterial umbilical $> 3,0$ mmol/L, e necessidade de ventilação com pressão positiva pelo menos durante 2 minutos após o nascimento. Foram coletadas amostras de sangue e de líquido nas primeiras 48 horas de vida para determinação dos níveis de IL-6 e TNF- α pela técnica de enzimoimunoensaio, utilizando-se *kits* R & D Systems.

Resultados: Os três grupos foram semelhantes quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, classificação peso/ idade gestacional, tipo de parto e tempo médio da coleta de sangue e líquido. As medianas dos níveis plasmáticos de IL-6 foram semelhantes entre sépticos e asfíxiados e significativamente superiores aos controles ($p < 0,0001$). A mediana do TNF- α plasmático foi semelhante nos recém-nascidos asfíxiados e controles, significativamente inferior a dos sépticos ($p < 0,00001$). Nos recém-nascidos asfíxiados, as medianas dos níveis líquóricos da IL-6 e do TNF- α foram significativamente mais elevadas do que nos sépticos e

nos controles. A mediana da IL-6 líquórica foi significativamente mais elevada nos sépticos que nos controles e a mediana do TNF- α líquórico foi semelhante nos sépticos e controles. As relações líquido/plasma para IL-6 e TNF- α foram semelhantes nos sépticos e controles, e menores que nos asfixiados ($p < 0,0002$ para IL-6, $p < 0,00001$ para TNF- α).

Conclusões: 1) Recém-nascidos a termo com EHI apresentam níveis elevados de IL-6 e TNF- α no líquido. 2) IL-6 plasmática encontra-se elevada nos recém-nascidos asfixiados e nos sépticos. 3) TNF- α plasmático é elevado somente nos recém-nascidos com sepse. 4) A maior relação líquido/plasma para IL-6 e TNF- α nos recém-nascidos asfixiados sugere uma produção local intra-cerebral dessas citocinas nos recém-nascidos a termo com EHI.

ARTIGO DE REVISÃO

CITOCINAS E ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

CYTOKINES AND HYPOXIC-ISCHAEMIC ENCEPHALOPATHY

Rita de Cássia Silveira (1)

Renato S. Procianoy (2)

- (1) Mestre em Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Médica Neonatologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- (2) Professor Titular de Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Chefe do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Pesquisador 1 A CNPq

Endereço para correspondência:

Rita de Cássia Silveira

Rua General João Telles, 542/ 601

CEP: 90035-121

Porto Alegre- RS

Telefone: (XX) 51 3311 8183

e-mail: renatosp@terra.com.br

RESUMO

Objetivo: A fisiopatologia da lesão hipóxico-isquêmica cerebral tem sido objeto de interesse de muitos pesquisadores. Esta revisão tem como objetivo organizar as diversas publicações na literatura com enfoque central no papel das citocinas, IL-6 e TNF- α , na patogênese da Encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI).

Método: Revisão da literatura pelo Medline, selecionando os artigos mais relevantes ao objetivo, com enfoque na fisiopatologia da EHI.

Resultados: Diversas evidências, principalmente de estudos experimentais, demonstram que a resposta inflamatória representa um papel importante na fisiopatologia da lesão isquêmica no sistema nervoso central (SNC). Muitas dessas respostas são mediadas pelas citocinas, que são produzidas e secretadas por uma variedade de células, como os monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e no SNC pelos astrócitos e microglia, apresentam ações semelhantes a hormônios, agem na modulação da apoptose celular no SNC e na diferenciação, proliferação e infiltração leucocitárias. A interleucina-6 (IL-6) e o TNF- α estão envolvidas na patogênese da asfíxia perinatal. O papel neurotóxico e neuroprotetor de algumas citocinas não está esclarecido, especialmente a IL-6. Estudos experimentais e em adultos humanos com AVC, evidenciaram produção intra-cerebral de IL-6 e TNF- α , principalmente no início do processo isquêmico. O TNF- α é indutor da apoptose, que está relacionada com o mecanismo retardado de lesão cerebral da asfíxia perinatal.

Conclusões: Estudos experimentais demonstraram que IL-1, IL-6 e TNF- α aumentam na fase inicial da isquemia cerebral. Em estudos clínicos, os níveis de IL-6 e TNF- α no plasma e no líquido estavam correlacionados com o tamanho da área isquêmica. O TNF- α líquido está envolvido nos mecanismos da apoptose neuronal. Níveis elevados de citocinas

são observados nas lesões hipóxico-isquêmicas e, portanto, a cascata das citocinas parece ser uma área fértil para estudos de neuroproteção no futuro.

Palavras-chave: encefalopatia hipóxico-isquêmica; citocinas.

ABSTRACT

Objective: the pathophysiology of acute brain ischemia have been interesting many studies. To review the current literature about central nervous system (CNS) ischemic injury and the role of pro-inflammatory cytokines on neuronal damage after hypoxia. Special attention is given to IL-6 and TNF- α .

Method: bibliographic review of the current literature through electronic search in Medline data-base, with selection of the most relevant articles to the objective.

Results: Several lines of evidence, principally experimental models, indicate that the inflammatory response plays an important role in the pathophysiology of CNS ischemic injury. Many of these inflammatory responses appear to be mediated by cytokines which are produced and secreted by a variety cells, including monocytes, macrophages, endothelial cells, fibroblasts and inside of CNS by astrocytes and microglial cells. They appear to directly modulate CNS cell apoptosis, differentiation, proliferation and infiltration by leukocytes. Interleukin-6 and TNF- α are involved in the pathogenesis of perinatal asphyxia. It is not clear the neuroprotection versus neurotoxicity by some cytokines, specially the IL-6. Experimental studies and in adults patients with stroke have shown intrathecal production of IL-6 and TNF- α , and they are increased early after ischemia. The TNF- α is thought to be activator of apoptosis, that is related with the mechanism of delayed cerebral injury of perinatal asphyxia.

Conclusions: Experimental studies have shown that IL-1, IL-6 and TNF- α increase early after cerebral ischemia. In clinical studies, IL-6 and TNF- α levels in plasma and CSF appear to correlate with infarct size. Cytokines are elevated in hypoxic-ischemic brain injury, and therefore the cytokine cascade appears to be fertile area for future neuroprotective investigations.

Keywords: hypoxic-ischaemic encephalopathy; cytokine.

CITOCINAS E ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

O dano cerebral resultante da asfixia perinatal é a maior causa de mortalidade aguda e déficit neurológico transitório ou permanente em crianças. O prognóstico para uma criança com Encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) não tem modificado desde as décadas de 80 e 90 (1). Anualmente, há 2 a 4 recém-nascidos com EHI grave para cada 1000 nascidos vivos a termo, e a taxa de mortalidade dos recém-nascidos asfixiados que desenvolvem EHI é aproximadamente 15% a 25%. Dentre os sobreviventes, 25% a 30% apresentam alterações neuropatológicas importantes, como Paralisia Cerebral (PC), retardo mental, dificuldades de aprendizagem em níveis variados e Epilepsia. O melhor preditor para a mortalidade e seqüelas neurológicas a longo prazo é o grau da encefalopatia neonatal (2).

A EHI é uma síndrome clínica com manifestações de intensidade variável. O exame neurológico e a evolução dependem do tempo, da gravidade e da duração do insulto hipóxico-isquêmico no cérebro do recém-nascido. Ou seja, se a oxigenação e o fluxo sanguíneo são rapidamente restabelecidos, a lesão é reversível e alguns recém-nascidos recuperam-se totalmente, do contrário, desenvolvem lesões neurológicas permanentes (3). É necessária a oferta adequada de oxigênio aos tecidos para que as células mantenham o metabolismo aeróbico e suas funções vitais. Caracteristicamente, na hipóxia-isquemia grave é comum lesão cerebral. O processo da asfixia causa inicialmente, uma redistribuição do débito cardíaco com o objetivo de preservar o cérebro, coração e glândulas adrenais, ocasionando perda parcial da oferta de oxigênio aos tecidos periféricos, vísceras abdominais e pulmões. É uma forma de proteção do organismo, preservando a função dos órgãos considerados mais nobres. Entretanto, com a evolução do processo de hipóxia-isquemia há redução do fluxo sanguíneo cerebral causando glicólise anaeróbica, produção de lactato e conseqüente acidemia metabólica (4, 5).

Mecanismos Fisiopatológicos da Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica

Os mecanismos fisiopatológicos que envolvem a hipóxia-isquemia e reperfusão cerebral ocorrem em três níveis básicos que estão inter-relacionados: nível bioquímico, nível celular que constitui em alterações morfológicas no citoplasma e núcleo celular, e nível celular-humoral que são principalmente citocinas e a resposta inflamatória.

Aspectos bioquímicos: Durante a hipóxia-isquemia, inicialmente, ocorre uma inativação sináptica como resposta adaptativa, é reversível e precede uma significativa redução do aporte cerebral de fosfatos de alta energia que podem causar falta de energia progressiva, ocasionando lesão irreversível, uma vez que a energia disponível não é suficiente para manter as bombas ATPase dependentes, responsáveis pela distribuição dos íons através das membranas. A despolarização resulta na liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato. A quebra de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina, promove liberação e perda energética; a adenosina é vasodilatadora e inibe a liberação de glutamato, além disso, pode converter-se em hipoxantina, importante precursor de radicais-livres (6).

Amino-ácidos excitatórios têm sido implicados no dano neuronal e na hipóxia-isquemia. O ácido glutâmico, maior amino-ácido excitatório no cérebro, é citotóxico em células neuronais e grânulos celulares cerebelares (7). Os neurônios que liberam glutamato são ativados durante o evento hipóxico pela entrada de cálcio para dentro da célula e pela própria despolarização dessas células (8). Paralelamente, ocorre redução de ATPase – glutamato dependente na membrana pré-sináptica, contribuindo para a manutenção de concentrações elevadas do glutamato extracelular, mantendo um estímulo prolongado deste receptor. A ação dos amino-ácidos excitatórios como glutamato e aspartato, é mediada por vários subtipos de receptores, principalmente; N-metil-D-aspartato (NMDA) e amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiônico (AMPA). O receptor NMDA parece ser essencial para os mecanismos de le-

são cerebral hipóxico-isquêmica, apresenta sítios modulatórios que exercem um influxo altamente regulado de cálcio pelos canais iônicos (6,8). A atividade do complexo canal iônico-receptor NMDA pode ser modulada por sítios farmacologicamente distintos, principalmente: glutamato, glicina, magnésio e zinco. É necessário a ativação simultânea do NMDA e receptores da glicina, um co-agonista, além da liberação do bloqueio de canais iônicos magnésio-dependente para o cálcio passar através do canal (9).

O acúmulo do cálcio citosólico é o principal fator dentre as múltiplas lesões e a cascata de eventos irreversíveis que causam a morte celular induzida pela hipóxia-isquemia e reperfusão. O cálcio ativa enzimas degradativas tais como, endonucleases, proteases e fosfolipases (6, 9).

O cálcio aumentado no espaço intracelular pode iniciar vários eventos bioquímicos com geração de radicais livres:

1. Ativação da fosfolipase A2, causando uma maior geração de radicais livres pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase.
2. Ativação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), que promove formação de peroxinitrito e geração de radicais livres.
3. Ativação de proteases que convertem xantina dehidrogenase em xantina oxidase, gerando radicais livres.
4. Ativação da fosfolipase C, que resulta no aumento dos estoques de cálcio intracelular.

A geração de radicais livres pode acionar a liberação de quantias adicionais de amino-ácidos neurotransmissores excitatórios e influenciar também a ativação do receptor NMDA (9).

Aspectos morfológicos celulares: há controvérsias a respeito da forma exata como ocorre a morte celular após isquemia cerebral. A morte neuronal pode desenvolver-se

de duas formas morfológicas distintas: necrose e apoptose. Na necrose há edema, fraturas das membranas celulares com reação inflamatória intensa determinada por insulto grave suficiente para promover a completa inibição mitocondrial. A ruptura das organelas é responsável pelo edema intracelular, causando ruptura da célula e extravasamento do conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular. Os fagócitos migram para o local da lesão e acionam toda a cascata de eventos inflamatórios. Na necrose não há consumo de energia (10, 11, 12).

As células apoptóticas sofrem um processo muito diferente da necrose, a célula encolhe e o núcleo torna-se pequeno e denso. A redução do núcleo e do citoplasma é característica, há condensação da cromatina e fragmentação do ácido desoxinucleico (DNA) no mesmo momento em que ocorre invaginação da membrana plasmática, resultando em vacuolização citoplasmática. No final, a célula se separa em corpos apoptóticos múltiplos e pequenos que são fagocitados por células vizinhas saudáveis. Todo processo da apoptose é conhecido como “morte celular programada” (10). Muitas das mudanças morfológicas observadas são causadas por proteases cisteína aspartato-específicas, as Caspases, que são ativadas especificamente nas células apoptóticas (13). A apoptose é um processo celular ativo que requer vias bioquímicas específicas, consumo de energia e transcrição genética (11, 12, 13).

Os gens da morte celular programada foram primeiramente identificados no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, sendo conhecidos como CED-3, CED-4 e CED-9. A apoptose é regulada basicamente por três vias: pelas vias das caspases, principalmente caspase-1 e caspase-3 que são homólogas a CED-3; via da família de proteínas Bcl-2 que é homóloga dos produtos genéticos da morte celular do *C. elegans* CED-9, e é também regulada pelo adaptador da proteína Apaf-1 (Protease apoptótica ativante do fator 1) que é homóloga a CED-4 (13, 14).

Alguns recém-nascidos sujeitos a hipóxia-isquemia durante um episódio de asfíxia são relativamente normais logo após o nascimento, porém evidenciam sinais de Ence-

falopatia hipóxico-isquêmica algumas horas mais tarde. Esse processo bifásico de lesão cerebral pode ser atribuído à apoptose, e é por definição, reversível (12, 15). Em modelos animais submetidos a hipóxia-isquemia com lesão cerebral retardada, foi observado um elevado número de células apoptóticas, encontrando-se relação direta da gravidade da lesão hipóxico-isquêmica com a proporção de células apoptóticas após 48 horas do insulto (10).

A diferença entre necrose e apoptose também pode ser observada pela resposta terapêutica à hipotermia induzida em ratos recém-nascidos; ao se reduzir a temperatura corporal desses animais em três graus centígrados nas primeiras 12 horas após a reanimação neonatal, foi obtida a redução no número de células apoptóticas, mas não houve qualquer diferença entre as células que sofreram necrose (16). É possível que neurônios que mantenham um mínimo de atividade metabólica consigam sobreviver à apoptose, adquirindo condição de normalidade (11).

A morte da célula nervosa na doença de Alzheimer caracteriza-se pela ativação de células microgliais e resposta inflamatória intensa. É um processo de lesão isquêmica possivelmente muito semelhante ao que ocorre na EHI. A ativação da caspase-1 promove produção de citocinas inflamatórias que podem induzir uma resposta inflamatória microglial local e aumentar o número de neurônios apoptóticos (11).

Aspectos celulares e humorais: Diversas evidências indicam que a cascata inflamatória está envolvida na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A reação inflamatória acionada pela hipóxia-isquemia no sistema nervoso central (SNC) caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares seguidos pelos monócitos, e ativação da microglia. Muitas dessas respostas inflamatórias são mediadas por citocinas (17).

As Citocinas e o Sistema Nervoso Central

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis com ações semelhantes a hormônios, agindo através de receptores específicos. Apresentam muito baixo peso molecular, são produzidas e secretadas por uma variedade de células, mediante estímulos e situações específicas, fisiológicas ou patológicas. As citocinas agem principalmente, como mediadores das respostas inflamatória e imune, mas também atuam no crescimento e diferenciação de outras células (18). Hirano e colaboradores descreveram as citocinas pró-inflamatórias como produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (19). Atualmente sabe-se que as citocinas também são produzidas e secretadas dentro do SNC, pela microglia e pelos astrócitos (20). Níveis líquóricos elevados de Interleucina-6 foram detectados em pacientes com meningite viral, encefalite e esclerose múltipla (17). As doenças que causam lesão aguda cerebral, como traumatismo crânio-encefálico, Encefalopatia Hipóxico-isquêmica, Hemorragia subaracnóide e infecção no SNC, promovem liberação de citocinas, principalmente Interleucina 1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6) que apresentam ações citotóxicas nos tecidos adjacentes, induzindo a ativação de linfócitos e proliferação astrocitária (20). Além disso, parecem modular diretamente o processo de apoptose das células no SNC, promovendo diferenciação, proliferação e subsequente infiltração leucocitária (10).

Diversos pesquisadores acreditam que a resposta inflamatória de fase aguda que ocorre no cérebro que sofre um insulto hipóxico-isquêmico é análoga à resposta inflamatória clássica, ou seja, das proteínas de fase aguda hepáticas e, portanto, é regulada pelo balanço das ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias das citocinas, especialmente IL-6 (21, 22, 23). A IL-6 age como um fator estimulante do hepatócito. Desta forma, os hepatócitos produzem

proteínas plasmáticas que contribuem para a resposta inflamatória aguda, principalmente o fibrinogênio, a proteína sérica amiloide A e a proteína C reativa (24).

As citocinas têm sido implicadas em diversos mecanismos que podem potencializar a lesão isquêmica cerebral, tais como: a liberação da forma induzível da enzima Óxido Nítrico Sintetase pelos astrócitos; o recrutamento, a ativação e a adesão leucocitárias ao endotélio; a promoção do estado pró-coagulante endotelial e a regulação do processo da apoptose (22, 25). Outra ação importante e conhecida das citocinas inflamatórias após isquemia cerebral focal inclui a iniciação e potencialização da resposta de fase aguda, o que promove um ponto fundamental de discussão e dúvida para muitos pesquisadores: a liberação de citocinas pró-inflamatórias após isquemia cerebral focal indicaria um passo patogênico para a ocorrência de necrose tecidual, ou reflete simplesmente um marcador de lesão isquêmica cerebral, uma vez que concentrações mais elevadas são encontradas em áreas mais extensas de infarto isquêmico cerebral (22).

O maior suporte para o papel da resposta inflamatória promovida pelas interleucinas nas lesões isquêmicas do SNC foi obtido através de estudos que investigaram adesão e infiltração leucocitárias após AVC isquêmico. Vários estudos demonstraram que o leucócito se adere e se infiltra precocemente após isquemia no SNC, e agentes que bloqueiam a adesão leucocitária produzem benefícios terapêuticos em modelos experimentais (26).

Após isquemia cerebral experimental foram observados níveis elevados de IL-6, TNF- α e IL-1 β . O modelo experimental mais empregado é a oclusão da artéria cerebral média de ratos, possibilitando avaliar a meia-vida de liberação das citocinas após insulto isquêmico (27, 28). Os níveis plasmáticos da IL-6 geralmente são muito elevados nas primeiras 3, 6 e 12 horas de isquemia, com redução para 12 pg/ml em 24 horas e apenas 1,4 pg/ml aos 4 dias após isquemia (17). Na isquemia experimental a meia-vida do TNF- α e da IL-1 β é semelhante, os níveis de TNF- α e IL-1 β começam a elevar-se na primeira hora após oclusão da

artéria cerebral média e apresentam um pico de resposta à isquemia em 6 a 12 horas (29, 30). Esta expressão aumentada foi mais pronunciada em áreas de isquemia e reperfusão. Injeção intra-cerebral de TNF- α aumentou a infiltração leucocitária no local, sugerindo que o TNF- α pode potencializar a lesão de reperfusão no SNC (17, 29).

Algumas evidências indiretas do envolvimento das citocinas nas lesões isquêmicas foram obtidas a partir de estudos que avaliaram níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 correlacionando-os com o tamanho da lesão e predizendo a recuperação funcional do paciente após uma situação de hipóxia-isquemia, como no AVC isquêmico (20,31). Fassbender e colaboradores encontraram níveis significativamente elevados de IL-6 nas primeiras horas do AVC, com pico de nível sérico dentro de dez horas, e este nível elevado correlacionou-se com o volume da lesão cerebral e com o prognóstico neurológico desfavorável (31). No estudo realizado por Tarkowski e colaboradores, os níveis de IL-6 no líquido foram significativamente elevados no segundo dia do AVC e estavam correlacionados com o tamanho da lesão cerebral, diferente da IL-6 plasmática que não apresentou relação com o tamanho da lesão (20).

A IL-1 β é conhecida como co-fator da reação inflamatória no SNC. É importante fator de crescimento astrogliar, regulando a proliferação astrogliar nas lesões do SNC. Embora as origens celulares da IL-1 β cerebral permaneçam desconhecidas, microglia e astrócitos são possíveis fontes, além dos monócitos periféricos que entram no cérebro após uma lesão cerebral, em geral de origem isquêmica (30). Exerce suas ações através de receptores específicos cerebrais, apresentando um antagonista natural conhecido como antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RA). O tratamento com IL-1RA injetado diretamente no cérebro promove redução da lesão isquêmica experimental, do edema cerebral associado, e também do infiltrado neutrocitário que ocorre caracteristicamente nas áreas de inflamação e isquemia cerebral (21).

As interleucinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) podem influenciar a função e síntese de outras citocinas através

de uma rede complexa de interações. A cascata inflamatória parece ter início com a liberação de IL-1 β e TNF- α , que promovem a produção de outras citocinas, incluindo IL-6 e IL-8, a ativação e infiltração de leucócitos e a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (18).

Mecanismo de Ação das Citocinas

Há diversos mecanismos de ação das citocinas potencializando as lesões isquêmicas no SNC (17):

- Ação direta nos neurônios, astrócitos e células microgliais; as citocinas apresentam ações autócrinas e parácrinas no SNC, com interações diretas entre citocinas, neurônios, astrócitos e outras funções mediadas pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.
- Indução e produção de moléculas pró-inflamatórias adicionais, como prostaglandinas e proteínas do choque térmico que são reagentes de fase aguda da infecção e podem estar envolvidos nos processos de apoptose.
- Promoção do recrutamento e infiltração dos leucócitos. Recentes evidências sugerem que citocinas podem ser o componente principal na ativação e recrutamento dos leucócitos para dentro do SNC. Interleucina-1 β , Fator de Necrose Tumoral- α e Interleucina-6 ativam leucócitos e aumentam a expressão de receptores de adesão no leucócito, tais como o CD18 e também receptores de adesão que atuam nas células endoteliais e astrócitos, cujo exemplo clássico é a Molécula de Adesão Intercelular (ICAM-1).

Interação entre as citocinas e os leucócitos: O efeito direto das citocinas sob a adesão e infiltração leucocitárias é um dos mecanismos mais importante na fisiopatologia das lesões isquêmicas no Sistema Nervoso Central. Os leucócitos são mediadores da lesão de reperfusão no SNC. Os tratamentos que bloqueiam a adesão leucocitária são neuroprotetores em

modelos animais de AVC isquêmico. Em estudo recente, animais foram tratados com anticorpo neutralizante de IL-6, resultando em inibição da indução da ICAM-1 pela IL-6 (32).

A interleucina-6, a IL-1 β e o TNF- α aumentam a expressão da ICAM-1 nas células endoteliais e nos astrócitos, facilitando a infiltração leucocitária e aumentando a ativação dos leucócitos. Além disso, a indução da ICAM-1 pela IL-6 também parece estar relacionada com lesões de reperfusão (17).

Os monócitos estão muito envolvidos na produção de citocinas. Estudos *in vitro* demonstraram que as células mononucleares podem produzir grandes quantidades de citocinas, especialmente IL-6 e TNF- α ; já os neutrófilos produzem quantidades relativamente pequenas dessas citocinas no SNC. Como o infiltrado de células mononucleares é observado em 6 a 12 horas após isquemia cerebral focal no SNC, acredita-se que a produção das citocinas no cérebro nas primeiras 12 horas após a lesão hipóxico-isquêmica seja secundária à infiltração dos monócitos (17).

Citocinas: Neurotoxicidade *Versus* Neuroproteção

O desenvolvimento de estratégias de neuroproteção a partir do conhecimento bioquímico e celular-humoral das lesões cerebrais despertou o interesse nos mediadores de resposta inflamatória aguda (33). A resposta neuronal à lesão após neuroproteção, com recuperação e estabelecimento de novas sinapses, demonstrou a possibilidade de reverter-se uma situação inicial neuronal, inaugurando o conceito de neuroplasticidade, particularmente importante no recém-nascido. Os estágios do desenvolvimento cerebral normal envolvem basicamente a divisão, migração e agregação celular, o aparecimento de dendritos, alongamento e arborização axonal, a sinaptogênese, e modificações neuroquímicas e funcionais. O número de neurônios formado por mitoses é muito maior que a necessidade do indivíduo e as sinapses

apresentam mais de uma ligação entre os neurônios. Assim, de uma forma muito resumida, é possível o entendimento da capacidade de neuroplasticidade do cérebro do recém-nascido (34, 35). As citocinas, principalmente a IL-6, afetam a diferenciação das células do SNC, o crescimento e a sobrevivência *in vitro*, e em consequência, o cérebro do recém-nascido torna-se particularmente suscetível a alterações nas concentrações de citocinas (33).

O estudo do envolvimento das citocinas nas lesões do SNC é complexo na medida em que dependendo do tipo de lesão, da região cerebral afetada e, principalmente da resposta inflamatória que determina a liberação de diferentes citocinas, serão obtidos efeitos neurotóxicos contra-balanceados por efeitos neuroprotetores de outras citocinas, ou ainda, uma mesma citocina pode apresentar ambos os efeitos, de acordo com suas interações (33). As ações das citocinas no SNC encontram-se resumidas na tabela 1.

Em modelo experimental, foi realizada a oclusão da artéria cerebral média para induzir isquemia cerebral focal e promover a expressão de IL-6, tendo sido observada a ativação da micróglia em 3 a 7 dias após o evento isquêmico. A distribuição da IL-6 não foi homogênea; a área com maior expressão de IL-6 em 3 a 7 dias após isquemia, apresentava também o maior número de neurônios preservados após 14 dias da isquemia, demonstrando-se experimentalmente, o papel neuroprotetor da IL-6 na isquemia cerebral focal (36). É possível que a função maior da interleucina-6 nas lesões isquêmicas seja neuroproteção. Digne e colaboradores, em estudo experimental com ratos, concluíram que em regiões da substância *nigra pars reticulata* parece predominar a função neuroprotetora da IL-6, encontrando-se mínima degeneração neuronal trans-sináptica quando a expressão da IL-6 está elevada (23).

Por outro lado, foram detectados níveis elevados de IL-6 dentro das primeiras quatro horas de AVC isquêmico em adultos e esses níveis estavam relacionados com o tamanho do infarto e as seqüelas neurológicas (21).

Os dados de estudos experimentais são conflitantes quanto ao papel neuroprotetor ou neurotóxico da IL-6 nas lesões isquêmicas do SNC. Em ratos recém-nascidos, a injeção intra-cerebral de IL-6 reduziu o volume da lesão após isquemia cerebral focal permanente e protegeu os neurônios colinérgicos contra a toxicidade induzida pela enzima NMDA. Loddick e colaboradores, mediram a bioatividade da IL-6 após oclusão da artéria cerebral média do rato, determinando o efeito do uso de IL-6 humana recombinante (RhIL-6) na redução da morte neuronal (28). No entanto, ratos transgênicos com uma super expressão de IL-6 pelos astrócitos apresentaram dificuldades de aprendizagem e neurodegeneração acentuadas, e essas mudanças neurodegenerativas ocorreram precocemente. Concentrações elevadas de IL-6 são tóxicas em culturas de neurônios (36). O efeito mitogênico da IL-6 nos astrócitos parece contribuir para a gliose reativa observada após o insulto isquêmico (17).

A fim de determinar a influência da IL-6 na necrose excitotóxica, processo que difere da apoptose porque há edema celular acentuado e precoce, foram utilizados agonistas do glutamato para indução de necrose durante 24 horas, e após foram quantificados os efeitos neuroprotetores da IL-6. Neste estudo, os neurônios sintetizaram e liberaram IL-6 em resposta ao influxo de cálcio intracelular, proporcionado pela ativação do receptor NMDA. É provável que a indução da IL-6 constitua em mecanismo de proteção endógena autócrina, diretamente relacionada com os neurônios para prevenir a degeneração induzida pelo receptor NMDA. A IL-6 promove melhora da sobrevivência neuronal e inibe a toxicidade do receptor NMDA *in vitro* (37).

Outros autores acreditam que a função anti-inflamatória da IL-6 no AVC isquêmico consiste em impedir os efeitos da IL-1 β e do TNF- α , inibindo a produção desses mediadores de fase aguda e estimulando seus antagonistas circulantes, como o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RA) e o receptor solúvel do TNF- α . O IL-1RA bloqueia a bioatividade da IL-1, competindo pelo mesmo sítio receptor e em estudos experimentais de isquemia cerebral

focal induzida, a administração de IL-1RA possibilitou a redução das taxas de morte neuronal em 50% (30). Em pacientes com câncer tratados com IL-6 recombinante, suas propriedades anti-inflamatórias também foram demonstradas pela indução do IL-1RA circulante e pela liberação do receptor solúvel do TNF- α p 55, observando-se a presença de macrófagos teciduais como origem importante de todo esse processo (36).

A Interleucina-6 e a IL-1 β são sinérgicas na indução da produção do hormônio adreno-corticotrófico (ACTH) que, presumivelmente, age de forma benéfica no AVC hemorrágico agudo, controlando vários estágios do processo inflamatório. Este é mais um exemplo de que a cascata das citocinas pode controlar ou liberar a resposta inflamatória após lesão cerebral (20).

Na encefalomielite auto-imune experimental as citocinas pró-inflamatórias, interferon-gama, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18, foram descritas como criticamente envolvidas na iniciação e amplificação da resposta imune local no SNC, e esse efeito é contraposto por citocinas anti-inflamatórias, principalmente, a IL-10. Acredita-se que a liberação da IL-10 ao inibir o TNF- α poderia prejudicar a associação entre os níveis de TNF- α no cérebro após isquemia e sinais de deterioração clínica. A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória porque inibe o TNF- α . Administrando-se a IL-10 após oclusão da artéria cerebral média, houve redução significativa do tamanho da área isquêmica, sugerindo que o tratamento com a IL-10 pode promover neuroproteção (22, 39).

A indução de citocinas não é restrita a uma função auto-imune no SNC, as citocinas estão muito envolvidas na regeneração do nervo e na isquemia cerebral focal induzida no local do infarto e à distância, nas regiões cerebrais que não sofreram processo isquêmico (39).

Na isquemia cerebral, o TNF- α e a IL-1 β podem apresentar duas funções antagônicas: na presença e em conjunto com a enzima Óxido Nítrico Sintetase induzida (iNOS),

exercem efeitos neurotóxicos, enquanto na ausência da iNOS, ambos contribuem para neuroproteção e maior plasticidade do SNC (29,39).

O TNF- α é produzido no cérebro pelos macrófagos, monócitos e astrócitos. Estimula a secreção de proteínas de fase aguda e aumenta a infiltração leucocitária, como ações pró-inflamatórias após isquemia no SNC. Na cascata inflamatória da coagulação age estimulando o endotélio a promover a aderência leucocitária e atividade pró-coagulante endotelial, aumentando o fator tecidual, o fator de von Willebrand e o fator ativador plaquetário. Este conjunto de ações exacerba o dano isquêmico. O TNF- α ainda está envolvido na lesão da barreira hemato-encefálica, aumenta a permeabilidade capilar, com perda da seletividade da barreira hemato-encefálica. É responsável pela lesão da mielina e de oligodendrócitos, e causa maior proliferação de astrócitos, contribuindo potencialmente para a demielinização e a gliose reacional que ocorre durante a lesão cerebral (17, 29).

Muitos estudos ainda serão necessários para o exato entendimento dos mecanismos de ação do TNF- α nas lesões isquêmicas do SNC, mas é reconhecido que o bloqueio das ações do TNF- α pelo uso de um anticorpo específico conhecido que é o anticorpo monoclonal anti-TNF- α (mAb) ou pela administração do receptor solúvel do TNF- α , ambos são neuroprotetores na isquemia cerebral focal (29, 39).

Ainda não é possível definir a IL-6 como envolvida mais especificamente com neuroproteção e o TNF- α com neurotoxicidade, o que seria importante para estratégias terapêuticas futuras.

Citocinas e Leucomalácia Periventricular

É motivo de interesse de estudos recentes o mecanismo pelo qual as citocinas estão envolvidas na patogênese da Leucomalácia Periventricular (LPV). A infecção perinatal,

como a corioamnionite materna, parece constituir em importante iniciador do processo de LPV. A LPV consiste em infarto isquêmico na área da substância branca cerebral adjacente aos ventrículos laterais, é lesão característica de recém-nascido pré-termo, ocorrendo em 7% a 26% dos prematuros de muito baixo peso. Paralisia cerebral como seqüela é muito comum, podendo ser observada em 62% até 100% dos casos (40). O diagnóstico é obtido pela ultrasonografia cerebral transfontanelar, que evidencia área de ecogenicidade aumentada periventricular com subsequente desenvolvimento de lesões císticas secundárias aos focos necróticos, conhecida como LPV cística (41).

Os fatores determinantes da LPV ainda não foram adequadamente estabelecidos. A prematuridade e perfusão cerebral insuficientes são possíveis causas. A hipotensão sistêmica resulta em redução imediata do fluxo sanguíneo cerebral e, em função da imaturidade da reatividade da vasculatura cerebral, o cérebro do prematuro sofre diretamente com essas alterações. A hipotensão, a hipoxemia, a hipercapnia e a acidose intra-parto, são fatores de risco para lesões da substância branca e posterior desenvolvimento de paralisia cerebral. A acidose intra-parto pode ser um sinal de infecção fetal ou de insuficiência placentária, com consequente hipóxia-isquemia cerebral. Então, é possível que condições diversas que promovam alterações sistêmicas no recém-nascido prematuro estejam envolvidas na patogênese da LPV (42). A infecção intra-uterina está muito relacionada com trabalho de parto prematuro, causando a Síndrome da Resposta Inflamatória Fetal que pode ser identificada morfológicamente pela vasculite do cordão umbilical e da placenta, e bioquimicamente pelos níveis das citocinas, IL-6, TNF- α e IL-1 β (43, 44, 45, 46). As citocinas inflamatórias, IL-6 e TNF- α , quando analisadas em conjunto, apresentam sensibilidade de 98% para o diagnóstico de sepse neonatal precoce, constituindo-se em excelentes marcadores de infecção no período neonatal (47).

Recentemente, tem sido estudado o papel de condições inflamatórias e infecciosas perinatais na patogênese da LPV. As células gliais expressam moléculas de adesão que pro-

movem a liberação de polimorfonucleares, iniciando-se o processo de lesão cerebral (48). Parece haver um processo inflamatório imuno-mediado, onde o TNF- α agindo como fator mielinotóxico seria o principal mediador. O TNF- α estimula agregação plaquetária, induz hipotensão, estimula a produção de IL-1 β e pode agir diretamente com lesão aos oligodendrócitos, induzindo a apoptose dos oligodendrócitos e degeneração mielínica (49).

A corioamnionite histológica tem sido identificada como fator de risco para paralisia cerebral em recém-nascidos de muito baixo peso, e lesões da substância branca cerebral, semelhantes a LPV, foram induzidas experimentalmente pela administração sistêmica de endotoxinas em gatos recém-nascidos prematuros (43, 50, 51). Em meta-análise de 229 publicações sobre a associação de corioamnionite materna clínica ou histológica com paralisia cerebral e LPV no recém-nascido, ficou demonstrado que corioamnionite é um fator de risco para LPV e Paralisia Cerebral, os recém-nascidos de mães com corioamnionite apresentaram três vezes mais chances de LPV e 90% desses casos tiveram maior risco de desenvolver Paralisia Cerebral (51). Portanto, a exposição antenatal a um evento inflamatório intra-amniótico, como corioamnionite e funiculite, constitui em fator de risco independente para a ocorrência de LPV e Paralisia Cerebral (51, 52).

Em estudo multicêntrico com 1078 recém-nascidos de extremo baixo peso, indicadores de infecção materna e de resposta inflamatória fetal foram diretamente associados com imagens de ecoluscência da substância branca cerebral à ultrassonografia cerebral, e os riscos de lesão da substância branca foram maiores na presença de vasculite fetal, demonstrando a contribuição fetal no processo (41).

Os níveis de IL-6, IL8, TNF- α e IL-1 β encontravam-se elevados no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos que posteriormente desenvolveram LPV e paralisia cerebral (50, 52). Em estudo de caso-controle foram dosados IL1- β , TNF- α e IL-6 por imunohistoquímica, demonstrando-se níveis significativamente mais elevados desses marcadores nos

recém-nascidos que tinham Leucomalácia Periventricular no achado de necrópsia quando comparados com aqueles cujas peças cerebrais de necrópsia não apresentavam alterações. Os níveis de IL-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados no grupo com LPV, já a IL-1 β sozinha não foi significativa, somente em associação com o TNF- α (53). Kadhim e colaboradores, investigaram a expressão *in situ* de citocinas pró-inflamatórias, avaliando a imunoreatividade da IL-1 β , TNF- α e IL-6 em cérebros humanos. A intensidade da produção de citocinas nos cérebros com LPV foi mais elevada que nas lesões secundárias à anóxia cerebral sem LPV e, essa diferença foi mais evidente na LPV precoce que na fase de cavitação cística, que constitui o último estágio da LPV (49). A interleucina-6 e o TNF- α são as citocinas inflamatórias mais descritas com infecção materna, leucomalácia periventricular e subsequente paralisia cerebral no recém-nascido, embora dados recentes relacionam também a interleucina-8 elevada no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos prematuros que desenvolveram posteriormente paralisia cerebral (52).

Os casos de paralisia cerebral não relacionados a eventos hipóxico-isquêmicos perinatais associam-se frequentemente a eventos infecciosos perinatais, como demonstrado recentemente por Yoon e colaboradores. Esses autores encontraram concentrações de IL-6 e IL-8 e contagem de leucócitos no líquido amniótico, significativamente mais elevadas em recém-nascidos com presença de lesões da substância branca ventricular que desenvolveram mais tarde paralisia cerebral e, essa associação permaneceu significativa após ajuste da idade gestacional ao nascimento, demonstrando mais uma vez, que a resposta inflamatória fetal é fator de risco para LPV e paralisia cerebral. Esses achados confirmam a importante morbidade de uma doença como a LPV e o valor das citocinas no prognóstico (52).

Citocinas e Asfixia Perinatal

O escore de Apgar baixo e a acidemia do sangue de cordão umbilical não podem ser utilizados isoladamente como critério para o diagnóstico de asfixia perinatal (54, 55, 56). De acordo com a Academia Americana de Pediatria, para diagnosticar asfixia perinatal é necessário a ocorrência de manifestações neurológicas e de disfunção multissistêmica, conforme os seguintes critérios: 1) acidemia metabólica ou mista profunda ($\text{pH} < 7,0$) em sangue arterial de cordão umbilical; 2) escore de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos; 3) manifestações neurológicas no período neonatal (convulsões, hipotonia, hiporreflexia, coma, entre outras); 4) disfunção orgânica multissistêmica, ou seja, alterações nos sistemas cardiovascular, gastrintestinal, pulmonar, hematológico ou renal (57).

A Encefalopatia Hipóxico-isquêmica neonatal é a manifestação clínica decorrente da asfixia perinatal mais conhecida. O recém-nascido asfixiado geralmente desenvolve uma fase de hiperexcitabilidade com aumento do tônus simpático. Nos casos mais leves recupera-se totalmente, já quando a asfixia é mais grave pode permanecer letárgico, hipotônico com predomínio do parassimpático, e nos casos extremos, o recém-nascido pode evoluir com decorticação em maior ou menor grau (58). Sarnat e Sarnat estabeleceram critérios para a classificação dessas três fases da EHI: No estágio I o recém-nascido é hiperalerta, a evolução costuma ser favorável, sem seqüelas, são casos de asfixia leve. No estágio II o recém-nascido encontra-se letárgico, a asfixia é moderada, apresentando 30% de chances de incapacidades no futuro e 6% de evolução para o óbito. No estágio III, ocorre estupor, a asfixia é grave e as chances de óbito aumentam para 60%, sendo que 100% destes apresentarão seqüelas de intensidade variável (3, 59, 60, 61).

Nos últimos anos foram realizadas muitas pesquisas com a finalidade de entender os mecanismos de lesão cerebral que ocorrem após asfixia perinatal. Esses estudos são pre-

dominantemente experimentais ou em adultos com situação fisiopatologia semelhante, como no AVC isquêmico e demais situações de isquemia cerebral (22, 27, 28, 62). As citocinas, principalmente interleucina-6 e TNF- α , parecem estar diretamente envolvidas nestes mecanismos de lesão cerebral observados na Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (33).

Hagberg e colaboradores, avaliaram a bioatividade da IL-6 em ratos recém-nascidos submetidos à hipóxia-isquemia, encontrando um pico de concentração 6 horas após o insulto, com retorno aos níveis basais 20 horas após (63). Diferente do comportamento da IL-6 com pacientes adultos após AVC, neste caso a concentração máxima é observada somente 2 a 3 dias após o insulto. É possível que diferentes estágios de maturação do sistema imune estejam relacionados com essas diferenças entre recém-nascidos e adultos (64).

Os níveis de IL-6 são significativamente mais elevados no líquor que no sangue de pacientes que sofreram AVC isquêmico, sugerindo que a IL-6 líquórica é produzida em nível intra-tecal nas lesões isquêmicas do SNC. A IL-6 líquórica encontra-se elevada no início da isquemia cerebral e com o tempo, os níveis de IL-6 no líquor e sangue se equilibram, evidenciando produção intra-tecal de IL-6 entre o primeiro e o terceiro dia de evolução da doença (20).

As concentrações das citocinas séricas relatadas em estudos que envolveram pacientes adultos com AVC foram muito inferiores aos níveis de citocinas encontrados em recém-nascidos com lesão cerebral grave, provavelmente porque a asfixia perinatal produz um insulto mais global no organismo quando comparado com o AVC. Outra explicação possível é a dificuldade em definir o tempo de início do insulto na asfixia perinatal (64, 65). Em modelos animais pode-se produzir asfixia intra-útero pela oclusão da artéria uterina, e desta forma, conhecer o momento exato do insulto. No recém-nascido não é possível estabelecer ou conhecer o momento exato do evento inicial, o que dificulta também o manejo terapêutico. O tratamento deve ser instituído precocemente, nas seis horas iniciais do evento (66, 67).

Martín-Ancel e colaboradores, encontraram níveis de IL-6 no líquido de recém-nascidos com manifestações neurológicas graves significativamente mais elevados que os níveis de IL-6 no líquido de recém-nascidos com encefalopatia moderada ou leve. As concentrações de IL-6 foram significativamente mais elevadas em recém-nascidos com lesão cerebral documentada por técnicas de neuro-imagem ou estudos neuropatológicos. Além disso, nesse mesmo estudo, a IL-6 evidenciou uma correlação forte com as concentrações da Enolase Neuronal Específica e da Proteína Básica Mielínica no líquido, que são enzimas consideradas marcadores bioquímicos de lesão neuronal e mielínica, respectivamente (64). A gravidade da lesão cerebral indicada pelo estágio da EHI, a presença de alterações de neuro-imagem ou alterações neuropatológicas, e as seqüelas de manifestações neurológicas tardias, parecem estar relacionadas com os níveis de IL-6 no líquido. Infelizmente, esses autores não estabeleceram comparações entre valores plasmáticos e líquidos da IL-6 porque não realizaram dosagens séricas de IL-6, também não foi possível avaliar a contribuição da IL-6 sérica nos níveis de IL-6 no líquido (64). Especula-se a possibilidade de lesão da medula espinhal em função de EHI grave para explicar a elevação das concentrações de IL-6 no líquido, mas esta hipótese não foi comprovada até o momento atual (65).

A origem exata da IL-6 na asfixia perinatal ainda permanece a definir, também não está claro onde a IL-6 participa na degeneração ou reparo dos neurônios após asfixia perinatal. Astrócito e microglia são possíveis fontes de IL-6 no SNC (68). Os monócitos e neutrófilos, recrutados na isquemia cerebral, são capazes de produzir IL-6 em resposta ao estímulo do TNF- α e da IL-1 β (2, 17, 69).

O envolvimento do TNF- α e da IL-1 β na lesão tecidual que ocorre na asfixia perinatal foi investigado em diversos estudos experimentais. Os resultados sugerem que essas citocinas podem representar um papel importante na resposta do cérebro neonatal à lesão hipóxico-isquêmica aguda (2, 22, 27, 29, 70).

Os recém-nascidos sujeitos à hipóxia-isquemia transitória durante um episódio de asfixia ao nascimento, podem parecer relativamente normais logo após a reanimação na sala de parto, e apresentar evidências de lesão cerebral retardada algumas horas mais tarde. As convulsões ocorrem, caracteristicamente, nas primeiras 24 horas de vida (1, 71, 72). Esse mecanismo de lesão cerebral retardada ainda não foi esclarecido, mas nas necrópsias cerebrais de recém-nascidos que morreram por asfixia perinatal foram encontradas células apoptóticas, então é provável que o processo bifásico da fisiopatologia da asfixia perinatal esteja muito relacionado com os mecanismos de apoptose. O TNF- α pode ser potente indutor da apoptose através da ativação da esfingomielinase, proporcionando um aumento das concentrações citosólicas de ceramida, que é potencializadora da apoptose (12).

Oygür e colaboradores, avaliaram o valor preditivo dos níveis plasmáticos e líquóricos do TNF- α e da IL-1 β no prognóstico de recém-nascidos a termo com EHI e ambos são bons preditores de seqüelas precoces. As concentrações do TNF- α no líquido logo após o insulto hipóxico foram muito elevadas nos recém-nascidos que morreram. Estes achados sugerem que o TNF- α pode ser o responsável pelo processo bifásico da lesão cerebral e pelo prognóstico desfavorável devido à sua ação indutora da apoptose em células neuronais (73).

Recentemente, Shalak e colaboradores, encontraram uma associação significativa entre alteração no exame neurológico de recém-nascidos sujeitos a corioamnionite materna clínica e níveis elevados de citocinas, principalmente IL-6, observaram ainda, que as concentrações dessas citocinas eram mais elevadas nos recém-nascidos que desenvolveram Encéfalo-patia-hipóxico-isquêmica. No entanto, esses autores não dosaram níveis de citocinas no líquido e o número de recém-nascidos com Encefalopatia-hipóxico-isquêmica foi muito reduzido, apenas cinco casos (74). A associação entre Encefalopatia neonatal, níveis elevados de citocinas e PC foi motivo de estudos anteriores e, em publicação recente foi avaliado a grau de

comprometimento neurológico utilizando método de neuroimagem e concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias (51, 75, 76)

As estratégias de neuroproteção envolvem o entendimento das ações das citocinas nos mecanismos de lesão cerebral que ocorrem na asfixia perinatal. Para tanto, são necessários novos estudos abordando especificamente níveis plasmáticos e líquóricos das citocinas em recém-nascidos asfixiados, principalmente IL-6 e TNF- α que são as citocinas mais descritas no período neonatal.

Tabela 1 - Ações das citocinas no sistema nervoso central:
Neurotoxicidade X Neuroproteção

Interleucinas	Pró-inflamatórias	Anti-inflamatórias
IL-1 β	++	+
IL-6	+++	+++
TNF- α	++	+
IL-8	+	-
IL-10	-	+++
IL-4	-	++
IL-12	+	-
IL-1RA	-	++
TNF- α r p55	-	++
IL-18	+	-

+ = presença de ação

- = ação não conhecida

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, Hope PL, Hamilton PA, Reynolds EOR. Prognosis of Newborn Infants with Hypoxic-Ischemic Brain Injury Assessed by Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy. *Pediatr Res* 1989;25(5):445-51.
2. Nelson KB, Emery ES. Birth Asphyxia and the Neonatal Brain: What Do We Know And When Do We Know It? *Clin Perinatol* 1993;20(2):327-44.
3. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum Asphyxia and Cerebral Palsy. *Pediatrics* 1988;82(2):240-9.
4. Williams CE, Mallard C, Tan W, Gluckman PD. Pathophysiology of Perinatal Asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20(2):305-20.
5. Procianoy RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77 (Supl.1):S63-S70.
6. Du Plessis AJ, Johnston MV. Hipoxic-Ischemic brain injury in the newborn: Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin. Perinatol.* 1997;24:627-54.
7. Hagberg H, Thornberg E, Blenow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M. Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1993;82:925-9.
8. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-S34.
9. Siesjö BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1989;(9):127-40.
10. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos GD, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998;29:2622-30.
11. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407(12):802-9.
12. Mehmet H, Edwards AD. Hypoxia, ischaemia, and apoptosis. *Arch Dis Child* 1996;75:F73-F75.
13. Hengartner OM. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(12):770-6.
14. Reed JC. Double identify for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-6.

15. Wertheim D, Mercuri E, Faundez JC, Rutherford M, Acolet D, Dubowitz L. Prognostic value of continuous electroencephalographic recording in full term infants with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child* 1994;71:F97-F102.
16. Lorek A, Takei Y, Cady EB. Delayed (“secondary”) cerebral energy failure following acute hypoxia-ischaemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by 31P magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994;36:699-706.
17. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1997;49(Supl.4):S10-S14.
18. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996;105:589-98.
19. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 1992;51:153-80.
20. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-8.
21. Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and Interleukin 1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995;37:800-4.
22. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. *Stroke* 2000;31:2325-9.
23. Dihne M, Peters M, Block F. Interleukin-6 expression in exo-focal neurons after striatal cerebral ischemia. *Neuroreport* 2001;12(14):3143-8.
24. Kishimoto T. the biology of Interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10.
25. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999;30:321-7.
26. Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 1991;22:877-83.
27. Stroemer P, Rothwell NJ. Exacerbation of the ischaemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 1998;18:833-9.
28. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral Interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow metab* 1998;18:176-9.
29. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feurstein GZ. Tumor Necrosis Factor- α - A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-44.
30. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676-81.

31. Fassbender K, Rossol S, Kammer T. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci* 1994;122:135-9.
32. Younker KA, Smith CW, Anderson DC, Clark WM. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes: induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992;89:602-9.
33. Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: Biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 2000;136:433-8.
34. Palmer C, Vannucci RC. Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin. Perinatol* 1993;20(2):411-27.
35. Rotta NT. Paralisia Cerebral, novas perspectivas terapêuticas. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(1):S48-S54.
36. Dihne M, Block F. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 2001;889(1-2):165-73.
37. Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Novelot A, Buisson A, Vivien D. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb. Blood Flow Metab* 2000;20(6):956-66.
38. Tilg HB, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994;83(1):113-8.
39. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* 2000;59:81-9.
40. Leviton A, Paneth N. White matter damage in preterm newborns— epidemiologic perspective. *Early Hum Dev* 1990;24:1-22.
41. Leviton A, Paneth N, Reuss L, Susser M, Allred EN, Damman O, Kuban K, Van Marter LJ, Pagano M. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 1999;46:566-75.
42. Perlman JM, Risser R, Broyles S. Bilateral Cystic Periventricular Leukomalacia in the premature infant: associated risk factors. *Pediatrics* 1996;97:822-7.
43. Baund O, Emilie D, Pelletier E, Masmonteil-Lacaze T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6 and TNF- α in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:72-7.
44. Naccasha N, Hinson R, Montag A, Ismail M, Bentz L, Mittendorf R. Association between funisitis and elevated interleukin-6 in cord blood. *Obstet Gynecol* 2001;97:220-4.

45. Jun KJ, Yoon BH, Romero R, Kim M, Moon JB, Ki SH, Park JS. Interleukin-6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:868-73.
46. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SH, Kim JC, Jun JK. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin-6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:1124-9.
47. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.
48. Dammann O, Phillips TM, Allred EN, O'Shea M, Paneth N, Van Marter LJ, Bose C, Ehrenkranz RA, Bednarek FJ, Naples M, Leviton A. Mediators of fetal inflammation in extremely low gestational age newborns. *Cytokine* 2001;13(4):234-9.
49. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona A-M, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001;56:1278-84.
50. Yoon BH, Jun KJ, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi J-H, Kim I. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177: 19-26.
51. Wu WY, Colford JMJ. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy (a meta-analysis). *JAMA* 2000;284:1417-24.
52. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim JC, Kim HS, Choi JH, Han TR. Fetal exposure to intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:675-81.
53. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, Chi JG. High expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:406-11.
54. Goodwin TM, Belai I, Hernandez P, Durand M, Paul RH. Asphyxial complications in the term newborn with severe umbilical acidemia. *Am J Obstet Gynecol* 1992;162:1506-12.
55. Pereira DN, Rocha VLL, Procianoy RS, Azeredo RCM, Kersting D, Cardozo A. Avaliação do pH de sangue de cordão umbilical e sua relação com o escore de Apgar em recém-nascidos a termo. *J Pediatr (Rio J)* 1996;72:139-42.
56. Goldstein RF, Thompson RJ, Oehler JM, Brazy JE. Influence of acidosis, hypoxemia, and hypotension on neurodevelopmental outcome in very low birth weight infants. *Pediatrics* 1995;95:238-43.
57. American Academy of Pediatrics. Intrapartum care. In: Guidelines for perinatal care 4th ed. AAP; 1997;93-125.

58. Blennow M, Hagberg H, Ingvar M, Zeman J, Wang Y-S, Lagercrantz H. Neurochemical and biophysical assessment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Semin Perinatol* 1994;18(1):30-5.
59. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696.
60. Gaffney G, Flavell V, Johnson A, Squier M, Sellers S. Cerebral Palsy and neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child* 1994;70:F195-F200.
61. Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PNP, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.
62. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-100.
63. Hagberg H, Gilland E, Bona E. Enhanced expression of Interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40:603-9.
64. Martín-Ancel A, García-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabanäs F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatrics* 1997;100:789-94.
65. Sävman K, Blennow M, Gustafson K, Tarkowski E, Hagberg H. Cytokine response in cerebrospinal fluid after birth asphyxia. *Pediatr Res* 1998;43:746-51.
66. Levene I. Management of asphyxiated fullterm infant. *Arch Dis Child* 1993;68:612-6.
67. Wagner CL, Eicher DJ, Katikanemi LD, Barbosa E, Holden KR. The use of hypothermia: A role in the treatment of neonatal asphyxia? *Pediatr Neurol* 1999;21:429-43.
68. Maeda Y, Matsumoto M, Hori O. Hypoxia / reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin-6: a paracrine mechanisms potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994;180:2297-308.
69. Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
70. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1-beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* 2001;21(15):5528-34.
71. Rivkin M, Volpe J. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Semin Neurol* 1993; 13:30-9.
72. Ahn OM, Korst LM, Phelan JP, Martin GI. Does the onset of neonatal seizures correlate with the timing of fetal neurologic injury? *Clin Pediatr* 1998;37:673-6.

73. Oygür N, Sönmez O, Saka O, Yegin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:190-3.
74. Shalak LF, Laptook AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics* 2002;110(4):673-80.
75. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-75.
76. Foster-Barber A, Ferriero DM. Neonatal encephalopathy in the term infant: neuroimaging and inflammatory cytokines. *Ment Retard Disabil Res Rev* 2002;8:20-4

1 – INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Apesar dos recentes avanços na monitorização biofísica e bioquímica do feto no trabalho de parto e no parto, a asfixia perinatal ocorre em 2 a 5 recém-nascidos para cada 1.000 nascimentos vivos, contribuindo intensamente na morbidade e mortalidade neonatal (DU PLESSIS e JOHNSTON, 1997). A asfixia perinatal resulta de diversas condições que podem interferir com a troca de gases feto-placentária com subsequente hipoxemia, hipercapnia e acidose metabólica. A hipóxia-isquemia-reperfusão permanece uma das complicações neurológicas mais importantes no recém-nascido, embora muitos sobreviventes possam apresentar desenvolvimento neurológico normal (LUPTON *et al.*, 1988; DU PLESSIS e JOHNSTON, 1997). Se a hipoxemia é grave, inicialmente ocorre perda parcial da oferta de oxigênio aos tecidos periféricos (músculo e coração) e por último, ao tecido cerebral, ocorrendo glicólise anaeróbica e produção de lactato. O ácido láctico se difunde na corrente sanguínea causando acidemia metabólica (LUPTON *et al.*, 1988). Como consequência clínica da lesão hipóxico-isquêmica no cérebro do recém-nascido, desenvolve-se a Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica (EHI), manifestação clínica mais descrita e conhecida da asfixia perinatal (NELSON e EMERY, 1993; PROCIANOY e SILVEIRA, 2001). A distribuição e o grau do comprometimento neurológico na EHI depende da maturidade cerebral, da gravidade, e da duração do insulto hipóxico-isquêmico (NELSON e EMERY, 1993). Clinicamente, as convulsões podem ser a única manifestação neurológica; nos casos mais graves ocorre piora progressiva nas primeiras 72 horas de vida e a evolução para o óbito é comum entre 24 horas e 72 horas de vida. A Paralisia Cerebral (PC) como seqüela pode estar presente em aproximadamente 30% dos casos de

EHI (AZZOPARDI *et al.*, 1989). As alterações fisiopatológicas da asfixia no sistema neurológico do recém-nascido têm sido estudadas, principalmente os mecanismos de lesão cerebral e as estratégias de neuroproteção (MULLIGAN *et al.*, 1980; DELIVORIA-PAPPADOPOULUS *et al.*, 1998).

Diversas evidências indicam que a via inflamatória está envolvida na patogênese da lesão isquêmica cerebral, assim como na invasão bacteriana. A reação inflamatória caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares seguidos por monócitos, e ativação da microglia. Para tanto, é necessário a expressão de moléculas de adesão específicas e de fatores quimiotáticos (ZHANG *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; MARTÍN-ANCEL *et al.*, 1997).

Modelos experimentais sugerem o envolvimento das citocinas no dano isquêmico cerebral (BEANER *et al.*, 1995; STROEMER *et al.*, 1998; LODDICK *et al.*, 1998). Estudos recentes indicam que o TNF- α e a IL-1 β encontram-se elevados após isquemia cerebral, e ambas as citocinas podem induzir uma reação inflamatória no SNC, juntamente com a IL-6 (SZAFLARSKI *et al.*, 1995). Apesar das intensas investigações realizadas durante os últimos anos com modelos animais, a origem precisa da IL-6 no dano cerebral isquêmico permanece indefinida. Tanto os astrócitos como a microglia são as possíveis fontes de IL-6 no SNC (BEANER *et al.*, 1995; LODDICK *et al.*, 1998). Culturas de astrócitos produziram IL-6 quando expostas a hipóxia-isquemia e reperfusão, promovendo níveis mais elevados de IL-6 no líquido céfalo-raquidiano (LCR) (MAEDA *et al.*, 1994).

Martín-Ancel *et al.*, 1997, avaliaram os níveis de IL-6 no LCR após asfixia perinatal e correlacionaram com a severidade da EHI, o dano cerebral, e as seqüelas neurológicas. No entanto, não foi possível excluir a contribuição da IL-6 sérica nos níveis líquóricos porque os autores não obtiveram dosagens plasmáticas de IL-6 (MARTÍN-ANCEL *et al.*, 1997).

O mecanismo inflamatório que envolve as situações de Encefalopatia Hipóxico-isquêmica e sepse neonatal no SNC deve ser melhor compreendido. Poucas são as publicações avaliando as concentrações plasmáticas e líquóricas de IL-6 e TNF- α na EHI, e na sua maioria obtidas a partir de modelos experimentais (BEANER *et al.*, 1995; STROEMER *et al.*, 1998; OYGÜR *et al.*, 1998). É importante conhecermos o comportamento dessas citocinas no recém-nascido com EHI, porque é uma situação que pode causar comprometimento neurológico a longo prazo. Além disso, IL-6 e TNF- α são citocinas conhecidas na sepse neonatal, tanto que em estudo que realizamos no nosso meio a combinação de IL-6 e TNF- α obteve sensibilidade de 98,5% para o diagnóstico de sepse neonatal precoce (SILVEIRA e PROCIANOY, 1999). No entanto, o comportamento dessas citocinas no SNC frente a uma situação de infecção sistêmica merece maiores estudos.

Fatores de risco materno para sepse neonatal, como a corioamnionite clínica ou histológica, têm sido associados com a ocorrência de Leucomalácia Periventricular e PC como seqüela neurológica dessas lesões da substância branca periventricular (YOON *et al.*, 2000). Nelson *et al.*, 1998, em estudo caso-controle obtiveram três achados importantes: 1. A associação de infecção materna, diagnóstico de corioamnionite clínica ou evidência histológica de inflamação da placenta, com Encefalopatia neonatal. 2. A associação de infecção e Encefalopatia neonatal com PC na evolução clínica. 3. Níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias nos recém-nascidos com Encefalopatia neonatal (NELSON *et al.*, 1998).

A resposta inflamatória fetal e neonatal, com níveis elevados de citocinas em recém-nascidos que posteriormente desenvolvem Leucomalácia Periventricular, reforça a hipótese de que a via inflamatória é comum nas situações de infecção e de hipóxia-isquemia cerebral (YOON *et al.*, 1997; YOON *et al.* 2000; KADHIM *et al.*, 2001).

Algumas questões ainda necessitam maiores esclarecimentos: As interleucinas são marcadores de lesão? As citocinas participam ativamente da cascata de eventos inflamatórios

no SNC? Podem constituir marcadores de prognóstico neurológico? Níveis elevados de citocinas nas lesões cerebrais correlacionam-se com a gravidade da doença?

A tendência atual é o desenvolvimento de estratégias preventivas de lesões neurológicas. Intervenções iniciadas previamente ao insulto ou no período pós-insulto imediato costumam ser mais efetivas, principalmente porque a cascata de eventos fisiopatológicos tende a ser mais intensa no decorrer do processo. Estudos futuros devem ser dirigidos para terapias combinadas, que requererão o conhecimento dos mecanismos de lesão cerebral, e neste sentido as citocinas desenvolverão um papel importante. É possível que ao conhecermos a participação da IL-6 e do TNF- α na EHI, futuramente, poderemos desenvolver novas modalidades terapêuticas na forma de antagonistas dos receptores dessas citocinas.

2 – HIPÓTESE

2 – HIPÓTESE

A via inflamatória está envolvida na patogênese da Encefalopatia hipóxico-isquêmica, sendo esperado níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em recém nascidos que sofreram um insulto hipóxico importante como a asfixia perinatal.

3 – OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Determinar os níveis plasmáticos e líquóricos de interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α em recém-nascidos com Encefalopatia hipóxico-isquêmica.

3.2 - Objetivos Específicos

Comparar as concentrações plasmáticas e líquóricas de IL-6 e TNF- α entre recém-nascidos com Encefalopatia hipóxico-isquêmica, recém-nascidos com sepse neonatal precoce e recém-nascidos controles.

Comparar as relações líquido/plasma de IL-6 e TNF- α em recém-nascidos asfíxiados, sépticos e controles.

Estabelecer associação entre a gravidade da Encefalopatia hipóxico-isquêmica e os níveis de IL-6 e de TNF- α .

4 – METODOLOGIA

4 - METODOLOGIA

4.1 - Delineamento do Estudo

A pesquisa desenvolveu-se sob a forma de um estudo caso-controle, casos incidentes, de caráter observacional, com eixo de montagem dinâmico. Os fatores em estudo foram os níveis de IL-6 e TNF- α no plasma e no líquido, e o desfecho clínico, a presença de Encefalopatia hipóxico-isquêmica ou de sepse neonatal precoce.

4.2 - População

4.2.1 - População em Estudo

A população em estudo foi constituída de todos os recém-nascidos internados na Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4.2.2 - População da Pesquisa

Os pacientes efetivamente estudados foram os recém-nascidos que nasceram no Centro Obstétrico do HCPA e admitidos na Unidade de Neonatologia do hospital no período de julho de 1999 a outubro de 2001, com diagnóstico de asfixia perinatal ou com suspeita clí-

nica de sepse neonatal precoce e conseqüente necessidade de punção lombar (VISSER e HALL, 1980; GERDES, 1991).

4.3 - Amostra e Amostragem

4.3.1 - Critérios de Inclusão

Foram considerados elegíveis para a pesquisa todos os recém-nascidos a termo admitidos na Unidade de Neonatologia do HCPA durante o período do estudo, com critérios diagnósticos para asfixia ou com necessidade de punção lombar para rotina de investigação de sepse neonatal (sepse comprovada ou suspeita). Os recém-nascidos foram incluídos desde o nascimento até 48 horas de vida, idade máxima admitida para iniciar a coleta de dados.

A idade gestacional mínima para inclusão no estudo foi 37 semanas.

4.3.2 - Critérios de Exclusão

Constituíram fatores de exclusão:

- Recém-nascidos com algum tipo de malformação congênita.
- Acidentes de punção lombar durante realização do exame de líquido.
- Drogadição materna.
- Recém-nascidos com suspeita clínica ou laboratorial de infecção congênita.
- Presença de meningite neonatal.
- Recém-nascidos com crises convulsivas sem relação com evento hipóxico, de etiologia não esclarecida.

- Mães com qualquer infecção do grupo STORCH durante a gestação.
- Utilização materna de opiáceos ou drogas depressoras respiratórias no período do parto.
- Mães com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV +).
- Ausência de consentimento dos pais.

4.4 - Variáveis em Estudo

As variáveis em estudo foram obtidas a partir de informações presentes nas fichas obstétrica e do recém-nascido, preenchidas rotineiramente no momento do nascimento, e de amostras do sangue de cordão, do sangue periférico e do líquido, coletadas dos recém-nascidos estudados.

Foram estudadas as seguintes variáveis:

- **Asfixia perinatal:** Para caracterizar asfixia perinatal, era necessário a presença de pelo menos três dos critérios referidos abaixo; sendo obrigatória a presença do critério de número 3 ou 4 (EGHILUZ *et al.*, 1983; SHIREY *et al.*, 1996; CHOU *et al.*, 1998).

1. Sinais de sofrimento fetal documentado pela monitorização intra-parto (MAP) como; desacelerações persistentes, bradicardia fetal sustentada ou “MAP silente”.

2. Escore de Apgar inferior ou igual a 4 e escore de Apgar inferior ou igual a 6 no primeiro e no quinto minutos, respectivamente.

3. Valor de pH de sangue venoso umbilical inferior a 7,20.

4. Lactato de sangue arterial umbilical superior a 3,0 mmol/l

5. Necessidade de ventilação com pressão positiva no mínimo durante dois minutos para iniciar esforço respiratório.

- **Sepse neonatal:** é uma variável que inclui a Sepse neonatal comprovada, ou seja com presença do germe em cultura, e a Síndrome séptica que constitui na situação em que o exame de cultura não evidencia presença de germe, porém o recém nascido apresenta sinais clínicos definidos de infecção.

Sendo considerado como sinal clínico definido de infecção a presença de um ou mais sinais de, pelo menos, três categorias referidas a seguir ou duas destas categorias associados a um ou mais fatores de risco materno (MIURA *et al.*, 1999):

- Instabilidade térmica, sendo hipotermia a taxa inferior a 36,5° C e hipertermia a taxa superior a 37,5° C.
- Apnéia, bradipnéia, gemência, taquipnéia, retrações esternais e subcostais, batimentos de asas nasais e cianose. Para taquipnéia considerou-se a frequência respiratória superior a 60 mpm, e pausas respiratórias foram diagnosticadas quando a frequência respiratória era inferior a 30 mpm, com cessação instantânea da respiração.
- Hipotonia e convulsões.
- Irritabilidade e letargia.
- Sintomas gastrintestinais, como distensão abdominal, vômitos, resíduo gástrico e dificuldade de aceitação alimentar (inapetência).
- Icterícia idiopática.
- Palidez cutânea, pele fria e sudorética, hipotensão e tempo de enchimento capilar superior a 3 segundos.
- Sinais de sangramento, com quadro clínico sugestivo de coagulação intra-vascular disseminada.
- Avaliação subjetiva: RN que “não parece estar bem”.

Fatores de risco maternos são os achados clínicos e laboratoriais da história materna e perinatal:

- Febre materna.
- Infecção do trato urinário suspeita ou comprovada: exceto nos casos tratados no início da gestação e resolvidos antes do início do trabalho de parto, a infecção urinária materna está associada com maior risco de infecção neonatal, provavelmente por aumentar as chances de trabalho de parto prematuro e nascimentos prematuros, além da frequência maior de corioamnionite (BONE *et al.*, 1996).
 - Infecções do trato genital, como corioamnionite, líquido amniótico fétido, leucorréia, herpes genital, papiloma vírus, febre periparto e hipertermia uterina.
 - Gestação múltipla; o primeiro gêmeo é mais suscetível a sepse neonatal precoce, principalmente quando o agente etiológico é o estreptococo.
 - **Encefalopatia hipóxico-isquêmica:** presença de asfixia perinatal de acordo com os critérios estabelecidos no estudo, associada a manifestações neurológicas decorrentes da hipoxemia e isquemia como; irritabilidade, tremores, alteração no nível de consciência, alterações do tônus neuromuscular e convulsões nas primeiras 24 horas de vida (OYGÜR *et al.*, 1998). Para a classificação dos estágios da EHI foram utilizados os critérios de SARNAT e SARNAT, 1976, resumidos na figura 1 (SARNAT e SARNAT, 1976).

Estágio	Estágio 1 (leve)	Estágio 2 (moderada)	Estágio 3 (grave)
Nível de consciência	Hiperalerta	Letargia	Torpor, coma
Controle neuromuscular:	Super-reativo	Movimentos espontâneos diminuídos	Movimentos espontâneos diminuídos ou ausentes
Tônus muscular	Normal	Hipotonia leve	Flácido
Postura	Flexão distal suave	Flexão distal forte	Descerebração intermitente
Reflexos tendinosos	Super-reativo	Super-reativo-desinibido	Diminuído ou ausente
Mioclonia Segmentar	Presente ou ausente	Presente	Ausente
Reflexos complexos:	Normal	Suprimido	Ausente
Sucção	Ativa ou pouco fraca	Fraca ou ausente	Ausente
Moro	Vivo	Fraco, limiar alto	Ausente
Oculovestibular	Normal	Exacerbado	Fraco ou ausente
Tônico-cervical	Leve	Forte	Ausente
Funções autonômicas:	Simpáticas generalizadas	Parassimpáticas generalizadas	Ambos os sistemas deprimidos
Pupilas	Midríase, reativas	Miose, reativas	Médias, pouco reativas, anisocoria
Respirações	Espontâneas, regulares	Periódicas	Periódicas, apnéias
Ritmo cardíaco	Normal ou taquicardia	Bradycardia	Variável, bradicardia
Secreções vias aéreas	Escassa	Profusa	Variável
Motilidade gastrintestinal	Normal ou diminuída	Aumentada, diarreia	Variável
Convulsões	Ausentes	Frequentes: focal ou multifocal	Frequentes: descerebração
EEG	Normal (desperto)	Baixa voltagem, padrão periódico (desperto)	Periódico, com fases isoelétrico ou totalmente isoelétrico
Duração dos sintomas	< 24 horas	2 a 14 dias	Horas a semanas
Seguimento	100% normal	80% normal, anormal se sintomas por mais de 5 a 7 dias	50% óbito, os restantes, seqüelas graves

Fonte: H.B. Sarnat e M.S. Sarnat, 1976, em Neonatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Arch. Neurol.* 1976; 33: 696-705.

Fig. 1 - Estágios da encefalopatia-hipóxico isquêmica

As variáveis laboratoriais estudadas foram:

- Níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6.
- Níveis plasmáticos e líquóricos de TNF- α .

Essas citocinas foram determinadas pelo método de ensaio enzimático quimioiluminescência, com *kit* comercialmente disponível, específico para IL-6 e para TNF- α (*R&D Systems, Minneapolis, Minn. USA*). A leitura foi realizada no aparelho Elisa *Spectramax*. As amostras foram obtidas nas primeiras 48 horas de vida do recém-nascido.

A punção lombar foi realizada para exame do líquido em todo recém-nascido com suspeita de sepse (VISSER e HALL, 1980; GERDES, 1991). Nos casos de Encefalopatia hipóxico-isquêmica a punção lombar foi indicada pelo médico assistente para investigação de convulsões, aumento da pressão intra-craniana e hemorragias (NELSON e EMERY, 1993; PROCIANOY e SILVEIRA, 2001). A obtenção das amostras de líquido para as dosagens de IL-6 e TNF- α foi a partir de amostras já requeridas pela equipe assistencial.

4.5 - Variáveis Controladas

As variáveis que foram controladas estão listadas a seguir:

- **Sexo.**
- **Idade gestacional:** recém-nascidos pré-termo não foram incluídos no estudo.

Considera-se prematuro o recém-nascido com idade gestacional pediátrica inferior a 37 semanas pelos métodos de Capurro ou *New Ballard* (CAPURRO *et al.*, 1978; BALLARD *et al.*, 1991).

- **Peso de nascimento.**

- **Classificação quanto ao peso e idade gestacional:** os recém-nascidos foram classificados em pequenos para idade gestacional (PIG), adequados para idade gestacional (AIG) e grandes para idade gestacional (GIG), de acordo com a classificação utilizada na rotina da Unidade Neonatal (ALEXANDER *et al.*, 1996).

- **Tipo de parto:** vaginal, vaginal com necessidade de fórceps e cesáreo.
- **Escore de Apgar:** no grupo controle e no grupo de recém-nascidos com sepse, uma vez que nesses casos o escore de Apgar deve ser igual ou superior 9 no primeiro e quinto minutos.

4.6 - Logística

Todos os recém-nascidos incluídos na população da pesquisa, nascidos no Centro Obstétrico (CO) do HCPA no período do estudo, com escore de Apgar inferior ou igual a quatro (Apgar $\leq 4,0$) no 1º minuto e inferior ou igual a 6 (Apgar $\leq 6,0$) no 5º minuto, tiveram gasometria venosa e/ou lactato arterial coletados do sangue de cordão umbilical no momento do nascimento, afim de estabelecer o diagnóstico de asfixia perinatal em conjunto com os outros critérios. Nas situações em que ocorreu coagulação da gasometria da veia umbilical, foi utilizado o lactato da artéria umbilical e, quando ambas as amostras coagularam, os pacientes constituíram em perdas.

Recém-nascidos asfíxiados e não asfíxiados, mas que necessitaram de punção lombar como parte da investigação para sepse neonatal, foram submetidos à coleta, nas primeiras 48 horas de vida, de uma amostra adicional de sangue e de líquido àquela já solicitada pelo médico assistente, para dosagens de IL-6 e TNF- α . As amostras de sangue periférico e de líquido foram coletadas no mesmo momento, e no máximo até 48 horas de vida do recém-nascido. Antes da obtenção dessa quantidade adicional de sangue e de líquido foi solicitada au-

torização aos pais, conforme o termo de consentimento informado (Anexo I). No caso de consentimento negado, o recém-nascido foi excluído do estudo.

Os recém-nascidos com diagnóstico de asfixia perinatal estabelecido conforme os critérios anteriormente descritos, foram monitorizados para as manifestações clínicas de Encefalopatia hipóxico-isquêmica e, em seguida, classificados nos estágios da EHI conforme SARNAT e SARNAT, 1976 (figura 1). Desta forma, a amostra dos pacientes estudados foi constituída pelos seguintes grupos:

Grupo I: recém-nascidos não-asfíxiados, com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida e não-sépticos, mas que necessitaram coleta de líquido como parte da investigação para sepse neonatal, sendo a antibioticoterapia suspensa em menos de 48 horas, com boa evolução clínica. Este grupo teve hemograma e hemocultura coletados pelo médico assistente antes de iniciar antibioticoterapia, que posteriormente resultaram normais.

Grupo II: recém-nascidos com suspeita clínica de sepse e achados laboratoriais compatíveis ou sepse comprovada pela hemocultura com presença de germe, e não asfíxiados, ou seja, com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida.

Grupo III: recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica e sem o diagnóstico de sepse neonatal.

Nos casos de EHI (grupo III), os níveis de IL-6 e TNF- α foram comparados de acordo com a gravidade da EHI, utilizando-se a classificação de SARNAT e SARNAT, 1976 (SARNAT e SARNAT, 1976). Esta avaliação clínica foi realizada pela pesquisadora nas primeiras 24 horas de vida, sem o conhecimento das concentrações laboratoriais das citocinas, uma vez que as dosagens foram posteriores (39).

Todos os pacientes foram acompanhados quanto a sua evolução até o momento da alta hospitalar. No grupo III foram realizados; acompanhamento neuropediátrico, eletroencefalograma quando o paciente apresentava condições clínicas de deslocamento, e ultrasso-

nografia cerebral transfontanelar. No HCPA não há eletroencefalograma no leito, portanto, o recém-nascido necessita de condições clínicas para transporte a fim de realizar o exame.

Cada recém-nascido tinha uma ficha-protocolo com seus dados de identificação, dados maternos, sexo, idade gestacional, classificação quanto a idade gestacional, tipo de parto, peso de nascimento, escores de Apgar no 1º e 5º minutos, e naqueles recém-nascidos com o diagnóstico de asfixia perinatal, foram obtidos também escores de Apgar no 10º, 15º e 20º minutos. Na ficha-protocolo foram preenchidos dados de exames laboratoriais adjuvantes, estes foram solicitados pelo médico assistente, sem implicar coleta de sangue específica para a pesquisa ou realização de exame adjuvante, como EEG ou ultrassonografia cerebral, exclusivamente com a finalidade de pesquisa. O momento da coleta das citocinas no sangue e no líquido também foi considerado (Anexos II e III).

Nos três grupos as amostras sanguíneas de IL-6 e TNF- α foram coletadas usando um tubo plástico com EDTA, e imediatamente após centrifugadas a 5.000 rotações por minuto. O plasma foi armazenado em um tubo Eppendorf, identificado com o número do paciente e congelado a -70°C , para posterior análise dessas citocinas. Da mesma forma, as amostras do líquido foram armazenadas em um freezer (-70°C) e identificadas para posterior análise conjunta. O líquido foi obtido pela punção lombar, com agulha apropriada para recém-nascido.

4.7 - Método Bioquímico Empregado para Determinação das Citocinas

4.7.1 - Interleucina-6

As concentrações plasmáticas e líquóricas de IL-6 foram determinadas pela técnica de enzimoimunoensaio com *kit* R&D Systems (Quantikine Human IL-6, R & D systems,

Inc. MN,USA), cujo limite de detecção é 0,7 pg/ml e coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%. O *kit* tem capacidade para 96 testes (placa com 96 espacinhos), porém 7 espaços foram utilizados para o desenvolvimento da curva-padrão que, da mesma forma que as amostras, foi realizada em duplicata. Então, cada *Kit* possibilitou a realização de 41 testes, sendo dosados IL-6 no LCR e no plasma de 20 pacientes.

A técnica para a dosagem de IL-6 é a mesma no plasma e no líquido. O princípio do desenvolvimento da técnica é baseado em uma reação do tipo antígeno-anticorpo. Inicialmente, foram preparados todos os reagentes e foi desenvolvida a curva-padrão a partir de reduções do reagente IL-6, definindo-se 7 pontos com concentrações progressivamente menores (figura 2). A placa do *kit* para IL-6 já contém em cada espacinho um anticorpo monoclonal específico para IL-6, sendo pipetados em cada um deles, 100 µl de diluente RD1A, um reagente composto de uma proteína básica com função preservativa da reação. Em seguida, foram adicionados 100 µl de amostras de plasma ou de líquido, e nos pontos destinados à curva-padrão, as alíquotas de 100 µl da solução-padrão. Desta forma, qualquer IL-6 presente nestas amostras pôde ligar-se ao anticorpo imobilizado durante um período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente. Após, todos os espacinhos eram lavados e aspirados 4 vezes, a fim de remover qualquer substância não-ligada que pudesse interferir na reação, pipetando-se em cada um deles, 200 µl de um conjugado composto por uma enzima ligada a um anticorpo policlonal específico para IL-6. Foi realizada nova incubação durante 2 horas, seguida de lavagens e aspirações para remoção de qualquer complexo anticorpo-enzima não ligado. O próximo passo consistiu na adição de 200 µl de uma Solução Substrato previamente preparada com a mistura de dois reagentes responsáveis pelo desenvolvimento da coloração da reação. Após período de incubação de 20 minutos sob proteção da luz, foram acrescentados 50 µl da solução *Stop* em cada espacinho. Durante esse período ocorre o desenvolvimento de

uma coloração, na mesma proporção e intensidade da concentração de IL-6 que reage na fase inicial do método bioquímico. O desenvolvimento da cor é uniformemente interrompido pela Solução *Stop*, e a intensidade da reação é medida pela intensidade da cor. A leitura da placa deve ser realizada em 30 minutos. No procedimento de dosagem são utilizadas 6 horas.

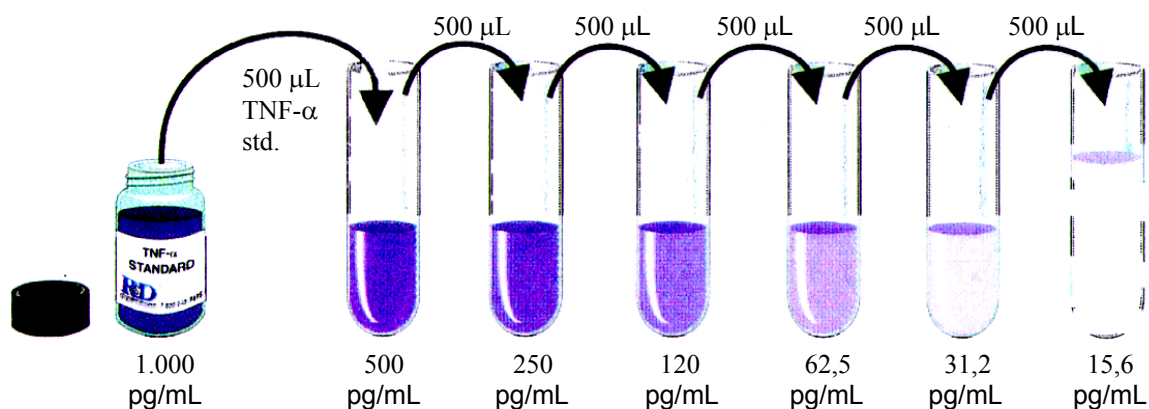


Fig. 2 - Curva padrão para Interleucina-6

4.7.2 - Fator de Necrose Tumoral- α

Os níveis plasmáticos e líquóricos do TNF- α foram dosados pela técnica de enzimoimunoensaio com *kit* R & D Systems (Quantikine Human TNF- α , R & D systems, Inc. MN, USA). O limite de detecção é 4,4 pg/ml e as precisões intra e interensaios são inferiores a 6%. A placa contém 96 testes e, da mesma forma que para IL-6, 7 destes são destinados à curva-padrão. Todos os testes foram realizados em duplicada, possibilitando determinar as concentrações do TNF- α no líquido e no plasma de 20 pacientes por *Kit*.

Foi empregada a mesma técnica nas dosagens das amostras de plasma e de líquido. O princípio é o de uma reação do tipo antígeno-anticorpo, onde um anticorpo monoclonal es-

pecífico para o TNF- α encontrava-se pré-colocado nos espacinhos. Após a preparação de todos os reagentes e da solução-padrão, que é diluída várias vezes fornecendo valores de referência para o TNF- α (em pg/mL) progressivamente menores (figura 3), foram pipetados 50 μ l do diluente RD1F em cada espacinho e acrescentado 200 μ l das amostras ou da solução-padrão. Em seguida, foi realizada incubação por 2 horas e o TNF- α presente foi imobilizado pelo anticorpo. Os espacinhos foram lavados e aspirados 3 vezes, e após foram adicionados 200 μ l de um conjugado enzima-anticorpo específico para o TNF- α em cada um deles. Cada espacinho recebeu 200 μ l da Solução Substrato, previamente preparada com dois reagentes que fornecem cor à reação, deixando-se a placa protegida da luz durante os 20 minutos de incubação para, posteriormente, pipetar 50 μ l da solução *Stop* e observar o desenvolvimento e intensidade da cor da reação através da leitura da placa dentro de 30 minutos. O tempo total necessário para dosagem do TNF- α foi de aproximadamente 6 horas.

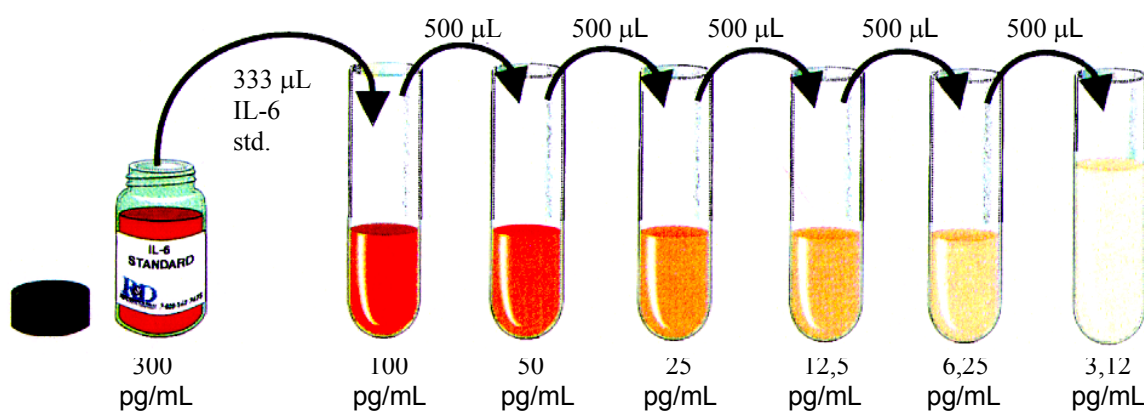


Fig. 3 - Curva padrão para fator de necrose tumoral- α

A leitura das placas de IL-6 e de TNF- α foi realizada no aparelho *Spectramax 2000* que possui um leitor de microplacas de ELISA automático, com ajuste para leitura no comprimento de onda de 570 nm (ideal para estes kits), fornecendo os valores em pg/mL.

Todas as dosagens laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UFRGS: Campus do Vale pela própria pesquisadora, seguindo as recomendações dos catálogos da empresa R & D systems, e com a orientação da Prof. Dra. Célia Carlini.

4.8 - Cálculo do Tamanho da Amostra

Como os estudos semelhantes existentes na literatura não preencheram totalmente os requisitos que permitissem o cálculo do tamanho da amostra, foi realizado um estudo-piloto com vinte ($n = 20$) pacientes em cada grupo, totalizando sessenta recém-nascidos ($n = 60$) na pesquisa, que era esperado constituir na casuística efetivamente analisada. Para obter-se o número suficiente de recém-nascidos asfixiados ($n = 20$) com critérios adequadamente preenchidos para o estudo-piloto, foram necessários 2 anos e 3 meses consecutivos de coleta de dados. Na literatura, está descrito que a asfixia perinatal ocorre em 2 a 5 recém-nascidos para cada 1.000 nascimentos vivos (DU PLESSIS e JOHNSTON, 1997).

O tamanho da amostra foi calculado a partir de um valor esperado de poder do teste de 0,97 (97% de confiabilidade) com a amostra coletada no estudo-piloto, e considerando-se um *effect size* (ES) pequeno ($ES = 0,2$), ou seja pouca diferença entre as médias das citocinas entre os três grupos, o que seria a pior situação possível em termos de tamanho de amostra (necessidade de “n” muito grande). O nível de significância utilizado no procedimento foi $\alpha = 5\%$ (COHEN, 1988). A amostra coletada foi suficiente para comparação dos níveis de citocinas entre os três grupos, mesmo com a possibilidade hipotética da diferença nos valores não ser grande entre esses grupos e a distribuição das concentrações das citocinas apresentar-se assimétrica.

4.9 - Análise Estatística

Inicialmente foi realizado o cálculo das médias e dos desvios padrões das variáveis estudadas. Em algumas situações a mediana foi mais representativa dos dados devido à assimetria da variável considerada, nestes casos foi empregado amplitude inter-quartil (p25-p75).

A função logarítmica conhecida como *Lognormal Distribution*, foi empregada nas variáveis quantitativas com comportamento assimétrico, possibilitando a escolha de testes paramétricos na comparação entre os três grupos (ALTMAN, 1994).

As interleucinas são variáveis quantitativas que apresentam comportamento assimétrico e desvio-padrão elevado. Em algumas circunstâncias, os dados com distribuição assimétrica podem ser transportados para uma distribuição simétrica, empregando-se para isso, a função logarítmica. Ou seja, utilizando-se *logs* dos dados com distribuição assimétrica frequentemente proporciona-se uma distribuição que é muito próxima da Normal. A vantagem principal é a localização de uma diferença entre três grupos, que um teste paramétrico permite em relação aos testes não paramétricos, os quais apenas evidenciam a existência de diferença, sem no entanto, localizá-la (ALTMAN, 1994).

Na análise dos dados foram utilizados os testes de Mantel-Haenszel para associação linear, teste t de Student para amostras independentes e ANOVA seguido pelo teste de Duncan.

O nível de significância estatística aceito foi $\alpha = 5\%$. O programa estatístico empregado foi o SPSS (*Statistical Package for Social Science*).

4.10 - Considerações Éticas

Toda pesquisa realizada em seres humanos visa o mínimo de intervenções possível. Com esta preocupação, os recém-nascidos não foram submetidos a procedimentos invasivos, como coleta de sangue ou de líquido exclusivamente para o estudo. Todas as amostras foram obtidas a partir do material já requisitado pelo médico assistente durante o atendimento rotineiro ao paciente internado. O volume de sangue e de líquido adicional ao já requerido pelo médico assistente foi mínimo. Cada recém-nascido coletou 1 ml/kg de sangue que correspondeu a 1,2% da volemia dele, o que constitui em pesquisa com risco mínimo, pois o volume de sangue extraído do recém-nascido foi inferior a 2% de sua volemia (NORMAS DE PESQUISA EM SAÚDE, 1988).

Os pais ou familiares responsáveis pelo paciente foram devidamente informados e orientados, conforme formulário de consentimento pós-informação (Anexo I). Não foram admitidos no estudo recém-nascidos sem o consentimento de seus pais ou responsáveis legais.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde e foi protocolado com o número 99-069.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander GR, Himes JH, kaufman RB, Mor J, Kogan M. A united states national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996;87:163-8.

Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman & Hall; 1994.

Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, Hope PL, Hamilton PA, Reynolds EOR. Prognosis of Newborn Infants with Hypoxic-Ischemic Brain Injury Assessed by Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy. *Pediatr Res* 1989;25(5):445-51.

Ballard JL, Khouri JC, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman L, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-23.

Baund O, Emilie D, Pelletier E, Masmonteil-Lacaze T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6 and TNF- α in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:72-7.

Beaner NB, Coull BM, Clark WM, Hazel S, Silberger JR. Interleukin-6 and Interleukin 1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995;37:800-4.

Bone RC. Why sepsis trial fail. *JAMA* 1996;276(7):565-6.

Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartman P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 1994;93:54-8.

Capurro H, Korichevzky S, Fonseca D. Simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1978;93:120.

Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20:287-98.

Chou Y-H, Yau TK-I, Wang P-J. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.

Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. New Jersey: Erlbaum Associates, publishers; 1988.

Delivoria-Papadopoulus M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-S34.

Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-Ischemic brain injury in the newborn: Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin. Perinatol.* 1997;24:627-54.

Eghiluz A, López BA, McPherson K, Parrilla JJ, Abad L. the use of intrapartum fetal blood lactate measurements for early diagnosis of fetal distress. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:949-54.

Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin in Perinatol* 1991;18:361-81.

Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona A-M, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001;56:1278-84.

Krüger K, Kublickas M, Westgren M. Lactate in scalp and cord blood from fetuses with ominous fetal heart rate patterns. *Obstet Gynecol* 1998;92:918-22.

Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral Interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:176-9.

Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: Pathogenesis and outcome. *Pediatr.* 1988;82:139-46.

Maeda Y, Matsumoto M, Hori O. Hypoxia / reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin-6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994;180:2297-308.

Martín-Ancel A, García-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabanãs F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatr* 1997;100:789-94.

Meadow W, Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 1995;22:519-36.

Messer J, Eyer D, Donato L, Gallatti H, Matis J, Simeoni U. Evaluation of interleukin -6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996;129:574-80.

Miura E, Silveira RS, Procianoy RS. Sepsis neonatal: diagnóstico e tratamento. *J Pediatr. (Rio J)*. 1999;75 (1):S57-S62.

Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PNP, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.

Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-75.

Nelson KB, Emery ES. Birth Asphyxia and the Neonatal Brain: What Do We Know And When Do We Know It? *Clin Perinatol* 1993;20(2):327-44.

Normas de Pesquisa em Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988.

Oygür N, Sönmez O, Saka O, Yegin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:190-3.

Procianoy RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77 (Supl.1):S63-S70.

Sarnat HB, Sarnat MS. Neoanatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696.

Shirey T, Pierre JS, Winkelman J. Cord lactate, pH, and blood gases from healthy neonates. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:15-9.

Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.

Stroemer P, Rothwell NJ. Exacerbation of the ischaemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:833-9.

Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-100.

Thorp JA, Sampson JE, Parisi VM, Creasy RK. Routine umbilical cord blood gas determinations? *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:600-5.

Visser VE, Hall RT. Lumbar puncture in the evaluation of suspected neonatal sepsis. *J Pediatr* 1980;96:1063-7.

Wang X, Yue T-L, Barone FC, Feuerstein GZ. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995;26:661-6.

Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, Chi JG. High expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:406-11.

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim JC, Kim HS, Choi JH, Han TR. Fetal exposure to intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:675-81.

Zhang RL, Chopp M, Jiang N. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemia cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 1995;26:1438-43.

6 – Artigo em Português

**NÍVEIS PLASMÁTICOS E LIQUÓRICOS DE INTERLEUCINA-6 E
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM RECÉM-NASCIDOS
A TERMO COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA**

Rita de Cássia Silveira (1)

Renato Soibelman Procianoy (2)

(1) Mestre em Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Médica Neonatologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(2) Professor Titular de Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Chefe do

Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Pesquisador CNPq

Endereço para correspondência:

Rita de Cássia Silveira

Rua General João Telles, 542/ 601

CEP: 90035-121

Porto Alegre- RS

NÍVEIS PLASMÁTICOS E LIQUÓRICOS DE INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

Resumo

Objetivos: Avaliar os níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e TNF- α em recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), comparando-os com recém-nascidos a termo sépticos sem meningite e sem EHI e com recém-nascidos controles.

Metodologia: O estudo incluiu três grupos de recém-nascidos a termo: grupo I, 20 recém-nascidos controles com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida; grupo II, 19 recém-nascidos sépticos, sem meningite, com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida; grupo III, 19 recém-nascidos asfíxiados caracterizados pelo escore de Apgar ≤ 4 e ≤ 6 no primeiro e quinto minutos de vida, respectivamente, pH umbilical $< 7,20$ e/ou lactato arterial umbilical $> 3,0$ mmol/L e necessidade de ventilação com pressão positiva pelo menos durante 2 minutos após o nascimento. Foram coletadas amostras de sangue e de líquido nas primeiras 48 horas de vida para determinação dos níveis de IL-6 e TNF- α pelo método de enzimoimunoensaio.

Resultados: Os três grupos foram semelhantes quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, classificação peso/ idade gestacional, tipo de parto e tempo médio da coleta de sangue e líquido. As medianas dos níveis plasmáticos de IL-6 foram semelhantes entre sépticos e asfíxiados, e significativamente superiores aos controles ($p < 0,0001$). A mediana do TNF- α plasmático foi semelhante nos recém-nascidos asfíxiados e nos controles, significativamente inferior aos valores dos sépticos ($p < 0,00001$). Nos recém-nascidos asfíxiados, as medianas

dos níveis líquóricos da IL-6 e do TNF- α foram significativamente mais elevadas do que nos sépticos e nos controles. A mediana da IL-6 líquórica foi significativamente mais elevada nos sépticos que nos controles, já a mediana do TNF- α líquórico foi semelhante nos sépticos e controles. As relações líquido/plasma para IL-6 e TNF- α foram semelhantes nos sépticos e controles, e menores que nos asfíxiados ($p < 0,0002$ para IL-6, $p < 0,00001$ para TNF- α).

Conclusões: 1) Recém-nascidos a termo com EHI apresentam níveis elevados de IL-6 e TNF- α no líquido. 2) IL-6 plasmática encontra-se elevada nos recém-nascidos asfíxiados e nos sépticos. 3) TNF- α plasmático é elevado somente nos recém-nascidos com sepse. 4) A maior relação líquido/plasma para IL-6 e TNF- α nos recém-nascidos asfíxiados sugere uma produção local intracerebral dessas citocinas nos recém-nascidos a termo com EHI.

Palavras-chave: asfíxia perinatal, citocinas, encefalopatia hipóxico-isquêmica.

Introdução

Apesar dos recentes avanços na monitorização biofísica e bioquímica do feto no trabalho de parto e no parto, a asfixia perinatal ainda contribui intensamente na morbidade e mortalidade neonatal, ocorrendo em 2 a 5 recém-nascidos para cada 1.000 nascimentos vivos (1, 2). É o resultado de diversas condições que podem interferir com a troca de gases feto-placentária levando à hipoxemia progressiva, hipercapnia e acidose metabólica; como consequência clínica da lesão hipóxico-isquêmica no cérebro do recém-nascido, desenvolve-se a Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica (EHI), manifestação clínica da asfixia perinatal mais descrita e conhecida (3, 4). A mortalidade dos recém-nascidos asfixiados que desenvolvem Encefalopatia Hipóxico-isquêmica é 15% a 25%. Dos recém-nascidos que sobrevivem, 30% desenvolvem paralisia cerebral (PC) como seqüela (5). As alterações fisiopatológicas da asfixia no sistema neurológico do recém-nascido têm sido estudadas, principalmente os mecanismos de lesão cerebral e as estratégias de neuroproteção (4, 6, 7, 8). Esses mecanismos fisiopatológicos desenvolvem-se em três níveis básicos: 1) nível bioquímico, através de ações que permitam o maior influxo do cálcio iônico para o intra-celular, maior estímulo de amino-ácidos excitatórios (ácido glutâmico) e pela ativação do receptor NMDA (6, 9). 2) nível celular que constitui em alterações morfológicas observadas na deterioração da célula nervosa que sofre o insulto hipóxico-isquêmico, envolvendo citoplasma e núcleo celular (morte da célula nervosa por necrose ou apoptose) (10, 11, 12). 3) nível celular-humoral: mecanismo fisiopatológico que envolve a resposta inflamatória mediada por citocinas, objeto de interesse deste estudo (13).

Diversas evidências indicam o envolvimento da cascata inflamatória na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A reação inflamatória acionada pela isquemia no sistema nervoso central (SNC) caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares

seguidos pelos monócitos, e pela ativação da microglia, sendo necessária a expressão de moléculas de adesão específicas e de fatores quimiotáticos. Essas ações inflamatórias são mediadas por citocinas, proteínas de baixo peso molecular, produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e no SNC, são produzidas e secretadas pela microglia e pelos astrócitos (13, 14, 15).

Modelos experimentais sugerem o envolvimento de citocinas, principalmente interleucina-6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no dano isquêmico cerebral (16-20). O TNF- α e a interleucina-1 β (IL-1 β) encontram-se elevados após isquemia cerebral, e ambas as citocinas podem induzir uma reação inflamatória no SNC, juntamente com a IL-6. Além disso, parecem modular diretamente o processo de apoptose das células no SNC, promovendo diferenciação, proliferação e subsequente infiltração leucocitárias (21,22). Em adultos têm sido demonstrada a correlação direta entre os níveis de IL-6 e TNF- α no líquido e o prognóstico neurológico após isquemia cerebral aguda (23). Em recém-nascidos a termo com Encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) os níveis líquidos de TNF- α e de IL-1 β foram mais elevados naqueles com alterações neurológicas aos 12 meses de idade (24). Martín-Ancel e colaboradores, encontraram níveis de IL-6 no líquido de recém-nascidos com manifestações neurológicas graves significativamente mais elevados que nos com encefalopatia moderada ou leve (25). Em estudo recente, foi demonstrada uma associação significativa entre alteração no exame neurológico de recém-nascidos sujeitos a corioamnionite materna clínica e níveis elevados de citocinas, principalmente IL-6, e as concentrações dessas citocinas eram mais elevadas nos recém-nascidos que desenvolveram Encefalopatia-hipóxico-isquêmica (26). A associação entre Encefalopatia neonatal, níveis elevados de citocinas e PC foi motivo de estudo anterior (27). Recentemente foi avaliado o grau de comprometimento neurológico utilizando método de neuroimagem e concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias. Foram encontrados

níveis séricos elevados de IL-1, IL-6 e TNF- α em recém-nascidos com alterações na ressonância magnética características de encefalopatia e com posterior evolução para PC (28).

Nossa hipótese é que a via inflamatória está envolvida na patogênese da Encefalopatia hipóxico-isquêmica, sendo esperado níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em recém-nascidos que sofreram um insulto hipóxico perinatal grave. A proposta deste estudo foi avaliar os níveis plasmáticos e líquóricos de interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α em recém-nascidos com EHI, comparando-os com recém-nascidos infectados sem meningite e sem EHI e com recém-nascidos normais (controles).

Pacientes e Métodos

População do estudo: em estudo prospectivo, controlado, foram incluídos todos os recém-nascidos a termo nascidos no Centro Obstétrico do hospital e admitidos na UTI neonatal, com diagnóstico de asfixia perinatal ou com necessidade de realização de punção lombar nas primeiras 48 horas de vida para investigação de sepse neonatal precoce, durante o período de julho de 1999 a outubro de 2001.

Os critérios para exclusão foram: Recém-nascidos com suspeita clínica ou laboratorial de infecção congênita, presença de meningite, malformação congênita, acidentes de punção lombar durante realização de exame do líquido, recém-nascidos com crises convulsivas sem relação com evento hipóxico e de etiologia não esclarecida, drogadição materna, mães com qualquer infecção do grupo STORCH durante a gestação ou com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV+), utilização materna de opiáceos ou drogas depressoras respiratórias no período do periparto.

CrITÉRIOS para diagnóstico de asfíxia perinatal: no mínimo três critérios, dentre os referidos abaixo; sendo obrigatória a presença dos critérios 3 ou 4 (29-32): 1) sinais de sofrimento fetal documentado pela monitorização intraparto (MAP) como; desacelerações persistentes, bradicardia fetal sustentada ou “MAP silente”; 2) escores de Apgar inferior ou igual a 4 no primeiro minuto e inferior ou igual a 6 no quinto minuto; 3) valor de pH umbilical inferior a 7,20; 4) Lactato de sangue arterial umbilical superior a 3,0 mmol/L; 5) necessidade de ventilação com pressão positiva no mínimo durante dois minutos, para iniciar esforço respiratório.

CrITÉRIOS para diagnóstico de sepse: sepse neonatal comprovada com presença do germe em hemocultura ou sepse clínica, quando o exame de cultura não evidenciou presença de germe e o recém nascido apresentou sinais clínicos de infecção, definidos pela presença de três ou mais das seguintes categorias (33,34): Fatores de risco materno, como febre, ruptura prematura de membranas ovulares por tempo superior a 18 horas, infecção do trato gênito-urinário; achados clínicos no recém nascido como, apnéia, dificuldade respiratória; cianose; taquicardia ou bradicardia e déficit de perfusão ou choque; irritabilidade, letargia, hipotonia e convulsões; distensão abdominal, vômitos, intolerância alimentar, resíduo gástrico, hepatomegalia; icterícia idiopática; instabilidade térmica; petéquias ou púrpura; recém-nascido que “não parece bem”.

O diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica foi estabelecido pela presença de asfíxia perinatal associada a manifestações neurológicas decorrentes da hipoxemia e isquemia (24). EHI foi classificada de acordo com os critérios de Sarnat H.B. e Sarnat M.S. (35).

Classificação dos recém-nascidos:

Grupo I: recém-nascidos não-asfíxiados, com escore de Apgar ≥ 9 no primeiro e quinto minutos de vida e não-sépticos. Foram incluídos recém-nascidos que necessitaram líquido como parte da investigação para sepse neonatal, sendo a antibioticoterapia suspensa em

menos de 48 horas, com boa evolução clínica. Este grupo teve hemograma e hemocultura coletados pelo médico-assistente antes de iniciar antibioticoterapia, com resultado normal.

Grupo II: recém-nascidos com suspeita clínica de sepse e achados laboratoriais compatíveis, ou sepse comprovada com hemocultura com presença de germe, e não asfixiados, com Apgar \geq a 9 no primeiro e quinto minutos de vida.

Grupo III: recém-nascidos com Encefalopatia hipóxico-isquêmica e não-sépticos.

Os recém-nascidos foram acompanhados durante a internação até o momento da alta hospitalar ou ocorrência de óbito. No grupo III foram realizados: acompanhamento neuropediátrico, eletroencefalograma; quando o paciente apresentava condições clínicas de deslocamento, e ultrassonografia cerebral transfontanelar.

Método para determinação de IL-6 e TNF- α no plasma e líquido: Todos os recém-nascidos foram submetidos à coleta, nas primeiras 48 horas de vida, de uma amostra adicional de sangue e de líquido àquela já solicitada pelo médico assistente, para dosagens de IL-6 e TNF- α . Os recém-nascidos não tiveram sangue e líquido coletados exclusivamente para a pesquisa. As amostras de sangue periférico e de líquido foram obtidas no mesmo momento. As amostras de sangue (100 μ L para IL-6 e 200 μ L para TNF- α) foram colocadas em frasco com EDTA, imediatamente centrifugadas e o plasma congelado a -70° C. O líquido foi obtido pela punção lombar (500 μ L de volume total) e em seguida congelado a -70° C. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A técnica empregada para as dosagens de IL-6 e TNF- α foi ensaio imunoenzimático (Quantikine Human IL-6 e TNF- α , R & D Systems, Inc. MN,USA). O limite de detecção para IL-6 foi 0,7 pg/ml e para TNF- α 0,1 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios para IL-6 e TNF- α inferiores a 5%. A leitura foi realizada no leitor óptico automático *Spectramax* no comprimento de onda de 570 nm.

Estatística: A amostra foi calculada para um poder de 0,97 e significância de 0,05.

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana com amplitude inter-quartil (p25-p75).

A utilização da função logarítmica na comparação entre os níveis das citocinas nos três grupos possibilitou o emprego de testes paramétricos: teste t de Student para amostras independentes, ANOVA seguido pelo teste de Duncan nas medidas das citocinas e teste de Mantel-Haenszel para associação linear. O teste de Kruskal-Wallis também foi aplicado para avaliar a diferença entre os três grupos quanto aos níveis de citocinas. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da nossa instituição e em todos os casos foi obtido consentimento por escrito do responsável.

Resultados

Inicialmente, foram admitidos 60 recém-nascidos, sendo vinte em cada grupo. No grupo II houve uma perda, um recém-nascido, inicialmente considerado séptico melhorou com cinco dias de antibiótico e recebeu alta hospitalar, não sendo possível mantê-lo no grupo II e nem considerá-lo um controle. No grupo III, um recém-nascido asfíxiado foi retirado do estudo porque foi verificado que apresentava Erro Inato do Metabolismo em teste de triagem. Com isso, participaram da análise 58 pacientes distribuídos nos grupos I (n = 20), II (n = 19) e III (n = 19).

Os três grupos não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, classificação quanto ao peso e idade gestacional, tipo de parto e tempo médio de obtenção do sangue e do líquido. Os três grupos de recém-nascidos tiveram seus exames obtidos em média com 17 horas de vida. Os escores de Apgar foram significativamente mais baixos no grupo

III, e não houve diferença entre os grupos I e II. Foram isolados microorganismos em hemoculturas de cinco pacientes do grupo II (26% da amostra deste grupo), nos grupos I e III todas as hemoculturas não evidenciaram presença de germe (tabela 1).

Tabela 1 - Características da população estudada

Grupo	EHI	Séptico	Controle
N	19	19	20
Peso de nascimento (g)	3278 ± 550	3169 ± 679	3046 ± 118
Idade gestacional (sem)	39,4 ± 0,2	39 ± 0,2	38,1 ± 0,4
Escore Apgar 1 min	2 (0 - 4)	9 (9 - 10)	9 (9 - 10)
Escore Apgar 5 min	4 (0 - 6)	9 (9 - 10)	9 (9 - 10)
Tipo de Parto			
Vaginal	11 (58%)	11 (58%)	13 (65%)
Cesária	7	5	6
Fórceps	1	3	1
Momento da coleta (horas de vida)	8 (2 - 25)	13 (3 - 26)	10 (3 - 26)
Hemocultura positiva	0	5 (26%)*	0
Óbito	3 (15,8%)	2 (10,5%)	0

* Hemocultura positiva

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana com variação

Os recém-nascidos asfixiados foram classificados em três estágios da EHI, conforme critérios de Sarnat e Sarnat; encontrando EHI grau I em 10 recém-nascidos (52%), EHI grau II em 3 (18%) e EHI grau III (32%) em 6 recém-nascidos. Dos dezesseis recém-nascidos asfixiados que realizaram ultrassonografia cerebral, seis tiveram alterações (37,5%), edema cerebral difuso e hiperecogenicidade talâmica foram as alterações mais frequentes ao ultrassom cerebral. Em quinze pacientes que fizeram eletroencefalograma, seis apresentaram altera-

ções significativas atribuíveis a EHI (40%). Três pacientes com EHI grau III foram ao óbito antes da realização da Ultrassonografia cerebral e do Eletroencefalograma. Em oito dos asfixiados (42%), o exame neurológico encontrava-se alterado na alta ou momentos anteriores ao óbito. Não houve diferença na frequência de óbitos entre recém-nascidos asfixiados e sépticos.

A comparação dos três grupos com relação aos níveis plasmáticos de IL-6 não evidenciou diferença significativa entre sépticos e asfixiados, ambos os grupos apresentaram níveis de IL-6 significativamente mais elevados que os controles. Foram obtidas concentrações significativamente maiores do TNF- α plasmático nos recém-nascidos sépticos em relação aos controles e asfixiados. Não foi demonstrado diferença significativa entre os controles e asfixiados com relação aos níveis plasmáticos de TNF- α (tabela 2).

Os níveis de IL-6 no líquido foram significativamente mais elevados nos recém-nascidos asfixiados quando comparados com recém-nascidos controles e sépticos, e nestes últimos, as concentrações líquóricas de IL-6 foram mais elevadas que nos controles. Para o TNF- α a diferença nos níveis líquóricos foi mais evidente, com concentrações significativamente mais elevadas nos recém-nascidos asfixiados e praticamente indetectáveis no líquido de recém-nascidos controles e sépticos.

A comparação das medianas das relações líquido/plasma para IL-6 e TNF- α nos três grupos, forneceu valores significativamente mais elevados no grupo de recém-nascidos asfixiados. A relação líquido/plasma para IL-6 e TNF- α foi semelhante nos recém-nascidos sépticos e controles (tabela 2).

Tabela 2 - Níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e TNF- α

Grupo	EHI	Séptico	Controle	P
N	19	19	20	
IL-6 (pg/ml) plasma	44,3 (36-282) ^a	89,7 (62 - 292) ^a	20,24 (12 - 34) ^b	< 0,0001
IL-6 (pg/ml) LCR	157,5 (66,8-288) ^a	18,6 (5,8 - 46) ^b	4,1 (2,5 - 5,8) ^c	< 0,00001
TNF- α (pg/ml) plasma	5,2 (3,9-6,3) ^a	54,5 (24 - 63) ^b	4,4 (3,7 - 6,0) ^a	< 0,00001
TNF- α (pg/ml) LCR	14,7 (13,8-15,3) ^a	0,16(0 - 0,16) ^b	0,16(0 - 0,25) ^b	< 0,00001
IL-6 LCR/P	1,488 (1,0-2,9) ^a	0,134 (0,05 - 0,4) ^b	0,221 (0,08 - 0,36) ^b	< 0,0002
TNF α LCR/P	3,25 (2,8-3,5) ^a	0 ^b	0 ^b	< 0,00001

Dados expressos em mediana e amplitude interquartil (p25-p75).

^{a,b,c} Representam resultados significativamente diferentes entre os três grupos de acordo com testes ANOVA seguido pelo teste de Duncan. Os seguintes resultados foram observados:

IL-6 plasma: recém-nascidos com EHI e recém-nascidos sépticos apresentaram medianas significativamente diferente dos controles. Não houve diferença significativa entre recém-nascidos com EHI e sépticos.

IL-6 LCR: recém-nascidos com EHI apresentaram mediana significativamente diferente dos sépticos e controles, e os sépticos apresentaram mediana significativamente diferente dos controles.

TNF- α plasma: recém-nascidos sépticos apresentaram medianas significativamente diferente dos recém-nascidos com EHI e controles, não houve diferença entre EHI e controle.

TNF- α LCR, relações IL-6L/IL-6p, TNF- α L/ TNF- α p: recém-nascidos com EHI apresentaram medianas significativamente diferentes dos sépticos e controles, nenhuma diferença significativa foi observada entre sépticos e controles.

Os recém-nascidos com EHI grau II e III foram agrupados em EHI grave (n = 9), e comparados com aqueles com EHI leve (grau I) (n = 10). Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de IL-6 e TNF- α no plasma e no líquido desses recém-nascidos. Os casos de EHI leve apresentaram exame neurológico alterado transitoriamente. Foi encontrada uma diferença significativa no exame neurológico do recém-nascido na alta hospitalar ou no momento do óbito, e também na ocorrência de óbitos entre os dois grupos (tabela 3).

Tabela 3 - Características dos recém-nascidos de acordo com a gravidade da EHI

	EHI leve	EHI moderada/grave
N	10	9
pH umbilical	7,0 ± 0,095	6,8 ± 0,15
Lactato arterial umbilical (mmol/L)	6,0 ± 3,4	6,16 ± 2,2
IL-6 plasma (pg/ml)	90,44 (40,2 - 217,9)	113,85 (36,3 - 286,8)
IL-6 LCR (pg/ml)	142,9 (66,8 - 248,6)	157,6 (68,5 - 397,2)
TNF- α plasma(pg/ml)	5,2 (4,5 - 6,3)	5,21 (3,9 - 9,4)
TNF- α LCR (pg/ml)	14,66 (14,4 - 15,0)	14,96 (13,7 - 17,2)
Exame neurológico alterado (alta/óbito)	0% (n = 0)	89% (n = 8)*
Óbito	0% (n = 0)	33% (n = 3)*

* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,0001$

Dados expressos em média \pm desvio padrão ou mediana com amplitude interquartil (p25-p75)

Discussão

Modelos experimentais têm sugerido o papel das citocinas na EHI (16-20). Interleucina-6 e TNF- α participam ativamente dos mecanismos de lesão cerebral que ocorrem na asfixia perinatal (24-26). Os resultados do nosso estudo demonstram esses achados em recém-nascidos humanos e permitem comparar relações plasmáticas e líquóricas dessas citocinas. As amostras do sangue e do líquido foram obtidas em média com 17 horas de vida, e quase simultaneamente, a fim de possibilitar uma comparação fidedigna das relações líquido/plasma. Em adultos com acidente vascular isquêmico foram encontrados níveis de IL-6 mais elevados no líquido que no sangue nos primeiros 2 a 3 dias após o insulto, com o tempo estes níveis se equilibraram, sugerindo produção intra-tecal precoce de IL-6 (36). Ratos recém-nascidos submetidos à hipóxia-isquemia apresentaram pico plasmático de IL-6, aproximadamente 6 horas após o insulto com retorno para os níveis basais em 20 horas (17). A meia-vida da IL-6 no re-

recém-nascido asfíxiado é muito menor que no adulto com lesão isquêmica cerebral, provavelmente em função de diferenças nos estágios de maturação do sistema imune (25). O TNF- α , por sua vez, começa a elevar-se na primeira hora após a oclusão da artéria cerebral média, com pico de resposta à isquemia em 6 a 12 horas (37, 38). A preocupação de coletarmos as amostras de sangue e de líquido ao mesmo tempo foi fundamental para a adequada análise dos resultados.

Nossos resultados demonstraram níveis elevados de IL-6 no plasma e principalmente no líquido de recém-nascidos que sofreram asfíxia perinatal. A concentração plasmática da IL-6 não permitiu discriminar sepse neonatal de asfíxia perinatal, já a elevação significativa do TNF- α plasmático nos recém-nascidos sépticos quando comparados com os asfíxiados, demonstrou sua importância como marcador do comprometimento multissistêmico que ocorre na sepse (33). O TNF- α plasmático não foi um bom marcador de asfíxia perinatal, em contraste com os níveis significativamente mais elevados do TNF- α no líquido dos recém-nascidos asfíxiados. O TNF- α é considerado fator mielino-tóxico no processo inflamatório imuno-mediado da lesão cerebral, promovendo a estimulação da agregação plaquetária, a produção de IL-1 β , e pode agir diretamente nos oligodendrócitos, induzindo a apoptose dos oligodendrócitos e a degeneração mielínica (39).

Ao realizarmos a comparação das relações líquido/plasma para IL-6 e TNF- α nos três grupos, os asfíxiados apresentaram relação significativamente maior que os controles e os sépticos, nestes os valores foram semelhantes; o que demonstra e reforça a hipótese de que a elevação dos níveis de IL-6 no líquido de recém-nascidos sépticos deve-se, principalmente, à passagem hemato-líquórica; e que na asfíxia perinatal há produção local cerebral de IL-6 e de TNF- α .

O aumento da IL-6 e do TNF- α líquidos observado nos recém-nascidos com EHI deve ser por ação direta do estímulo asfíxico sobre o sistema nervoso central. Os mono-

citos e neutrófilos recrutados no processo inflamatório que ocorre na isquemia cerebral, são capazes de produzir IL-6 em resposta ao estímulo do TNF- α (13,40). Os astrócitos e a microglia são possíveis fontes de IL-6 (41). Martín-Ancel e colaboradores concluíram que níveis elevados de IL-6 no líquido parecem estar relacionados com a gravidade da EHI, mas não conseguiram excluir a participação da IL-6 plasmática nesses níveis líquidos porque a dosagem sérica da IL-6 não foi realizada neste estudo (25). O processo bifásico da lesão cerebral pode ser atribuído à apoptose neuronal. O TNF- α apresenta uma ação indutora da apoptose em células neuronais, promove a ativação da esfingomielinase, que causa aumento das concentrações citosólicas de ceramida que, por sua vez, é potencializadora direta da apoptose (11). Esta ação específica do TNF- α pode justificar os níveis líquidos elevados que encontramos nos recém-nascidos com EHI.

A interleucina-6 foi particularmente mais elevada no líquido de recém-nascidos sépticos em relação aos controles em função da passagem hemato-líquórica. Qualquer processo infeccioso, mesmo à distância do SNC, promove uma resposta inflamatória sistêmica, com liberação de IL-6 que pode atravessar a barreira hemato-líquórica, em função da imaturidade dessa barreira ou porque as próprias citocinas diminuem a eficácia da barreira (42). Ao estabelecermos a relação líquido/plasma os níveis ficaram muito próximos, não observando-se diferença significativa entre sépticos e controles. Recém-nascidos com meningite não foram incluídos na análise porque poderiam promover elevação da IL-6 e do TNF- α líquidos (13, 14). O TNF- α apresenta um mecanismo de passagem hemato-líquórica diferente da IL-6, muito comparável ao da albumina, atravessando, principalmente, a barreira hemato-líquórica lesada (43, 44). No nosso estudo, apesar de obtermos níveis plasmáticos significativamente mais elevados nos recém-nascidos sépticos, os níveis do TNF- α no líquido foram praticamente indetectáveis. É provável que na sepse neonatal sem meningite concomitante, não exista pro-

dução intracerebral do TNF- α . Em estudo recente, foi demonstrada a associação de infecção materna e níveis mais elevados de IL-6 no plasma de recém-nascidos sépticos que apresentaram exame neurológico alterado e sugestivo de encefalopatia neonatal (26).

Não foi encontrada relação entre a gravidade da Encefalopatia hipóxico-isquêmica e os níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e de TNF- α . Talvez esta diferença possa ser obtida em um número maior de casos. Como este não era o objetivo do estudo, o cálculo do tamanho da amostra foi realizado para avaliar a diferença nos níveis de interleucinas entre recém-nascidos asfíxiados, sépticos sem asfíxia e sem meningite, e controles.

Em estudo anterior, outros autores encontraram relação entre os níveis líquóricos do TNF- α e principalmente da IL-1 β , com alterações no exame neurológico com 12 meses de vida de recém-nascidos que sofreram asfíxia perinatal (24). Em adultos com acidente vascular isquêmico, foi demonstrada correlação significativa da IL-6 líquórica com o tamanho da lesão cerebral (36).

Interleucina-6 e TNF- α parecem representar um papel importante na cascata de eventos inflamatórios da asfíxia perinatal. Recém-nascidos a termo com EHI apresentaram níveis elevados de IL-6 e TNF- α no líquido. Os níveis plasmáticos de IL-6 foram semelhantes na EHI e na sepse neonatal. As concentrações do TNF- α no plasma de recém-nascidos a termo sépticos foram muito elevadas, o mesmo não ocorrendo em recém-nascidos a termo asfíxiados. As taxas elevadas das relações líquido/plasma da IL-6 e do TNF- α , sugerem produção dessas citocinas dentro do SNC dos recém-nascidos com EHI. A produção local cerebral do TNF- α nos recém-nascidos que sofreram insulto hipóxico-isquêmico foi muito evidente e significativa, possibilitando estudos futuros com a finalidade de instituir novas modalidades terapêuticas, como bloqueadores cerebrais da ação do TNF- α .

Referências

1. Chou Y-H, Yau TK-I, Wang P-J. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.
2. Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PNP, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.
3. Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: Pathogenesis and outcome. *Pediatr* 1988;82:139-46.
4. Williams CE, Mallard C, Tan W, Gluckman PD. Pathophysiology of Perinatal Asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20(2):305-20.
5. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum Asphyxia and Cerebral Palsy. *Pediatrics* 1988;82(2):240-9.
6. Delivoria-Papadopoulus M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-S34.
7. Nelson KB, Emery ES. Birth Asphyxia and the Neonatal Brain: What Do We Know And When Do We Know It? *Clin Perinatol* 1993;20(2):327-44.
8. Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-Ischemic brain injury in the newborn: Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin. Perinatol.* 1997;24:627-54.
9. Hagberg H, Thornberg E, Blenow M, Kjelçlmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M. Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1993;82:925-9.
10. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407; (12): 802-9.
11. Mehmet H, Edwards AD. Hypoxia, ischaemia, and apoptosis. *Arch Dis Child* 1996;75: F73-F75.
12. Hengartner OM. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(12):770-6.
13. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1997;49(Supl.4):S10-S14.
14. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996;105:589-98.

15. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 1992;51:153-80.
16. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-100.
17. Hagberg H, Gilland E, Bona E. Enhanced expression of Interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40:603-9.
18. Stroemer P, Rothwell NJ. Exacerbation of the ischaemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:833-9.
19. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral Interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow metab* 1998;18:176-9.
20. Dihne M, Block F. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 2001;889(1-2):165-73.
21. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos GD, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998;29:2622-30.
22. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999;30:321-7.
23. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. *Stroke* 2000;31:2325-9.
24. Oygür N, Sönmez O, Saka O, Yegin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:190-3.
25. Martín-Ancel A, García-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabanäs F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatrics* 1997;100:789-94.
26. Shalak LF, Lupton AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics* 2002;110(4):673-80.
27. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-75.
28. Foster-Barber A, Dickens B, Ferriero DM. Human perinatal asphyxia: correlation of neonatal cytokines with MRI and outcome. *Dev Neurosci* 2001;23:213-8.

29. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20:287-98.
30. Thorp JA, Sampson JE, Parisi VM, Creasy RK. Routine umbilical cord blood gas determinations? *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:600-5.
31. Shirey T, Pierre JS, Winkelman J. Cord lactate, pH, and blood gases from healthy neonates. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:15-9.
32. Chou Y-H, Yau TK-I, Wang P-J. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.
33. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.
34. Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin in Perinatol* 1991;18:361-81.
35. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696.
36. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-8.
37. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feurstein GZ. Tumor Necrosis Factor- α - A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-44.
38. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676-81.
39. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona A-M, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001;56:1278-84.
40. Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
41. Maeda Y, Matsumoto M, Hori O. Hypoxia / reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin-6: a paracrine mechanisms potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994;180:2297-308.

42. Megyeri P, Abraham CS, temesvari P, Kovacs J, Vas T, Speer CP. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci Lett* 1992; 148: 137-40.
43. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-48.
44. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci* 1999; 19: 3649-55.

7 - Artigo em Inglês

**INTERLEUKIN-6 AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA
LEVELS IN THE PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID OF
TERM NEWBORNS WITH HYPOXIC-ISCHEMIC
ENCEPHALOPATHY**

Rita de Cássia Silveira, MD

Renato S. Procianoy, MD

Newborn Section, Department of Pediatrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Financial assistance: This project was partially funded by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (FIPE-HCPA) grant no. 99069.

Correspondence and reprint requests:

Dr. Renato S. Procianoy

Rua Tobias da Silva 99/302

90570-020 - Porto Alegre, RS

Brazil

E-mail: renatosp@terra.com.br

List of key-words not included in the title: perinatal asphyxia, cytokines.

Abstract

Objective: To determine plasma and cerebrospinal fluid (CSF) levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE).

Study design: Controlled, prospective study. Group I, 20 controls with Apgar score ≥ 9 at first and fifth minutes; Group II, 19 term newborns presenting sepsis and no meningitis, with Apgar ≥ 9 at first and fifth minutes; Group III, 19 asphyxiated term newborns with Apgar ≤ 4 and ≤ 6 at first and fifth minutes, umbilical blood cord pH < 7.20 and/or umbilical arterial blood lactate > 3.0 mmol/L, and requiring positive pressure ventilation for at least 2 minutes after birth. Blood and CSF samples were collected within 48 hours of birth for determination of IL-6 and TNF- α by enzyme immunoassay.

Results: All groups were similar concerning birthweight, gestational age, type of delivery and mean time required for blood and CSF sample collection. Median plasma IL-6 was similar in babies with sepsis and asphyxia and significantly higher in these groups vs. controls ($p < 0.0001$). Median plasma TNF- α was similar in asphyxiated and control babies, and significantly lower in these groups vs. newborns with sepsis ($p < 0.00001$). In asphyxiated newborns, median CSF IL-6 and TNF- α were significantly higher than in babies with sepsis and controls. Median CSF IL-6 was significantly higher in babies with sepsis than in controls, and median CSF TNF- α was similar in babies with sepsis and controls. IL-6 and TNF- α CSF/plasma ratios were similar in babies with sepsis and controls, and lower in these groups vs. asphyxiated babies ($p < 0.0002$, IL-6; $p < 0.00001$, TNF- α).

Conclusions: Term newborns with HIE present elevated CSF IL-6 and TNF- α levels. Plasma IL-6 is increased in asphyxia and sepsis. Plasma TNF- α is increased in sepsis only. The higher IL-6 and TNF- α CSF/plasma ration in asphyxia suggests that these cytokines are produced in the brain in term newborns with HIE.

Introduction

Despite the recent advances in the biophysical and biochemical monitoring of the fetus during labor and delivery, perinatal asphyxia still contributes significantly to neonatal morbidity and mortality, affecting 2 to 5 newborns in 1.000 live births (1, 2). This is due to a combination of factors which may interfere with placental gas exchange leading to progressive hypoxia, hypercapnia and metabolic acidosis and eventually to hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), the best known and described clinical manifestation of perinatal asphyxia (3, 4). The mortality in newborns who develop HIE ranges from 15 to 25%. Among surviving newborns, 30% develop cerebral palsy (CP) (5).

Several studies have focused on the pathophysiological alterations caused by asphyxia in the neurological system of newborns, with special attention to the mechanisms of brain injury and the strategies of neuroprotection (4, 6-8). These pathophysiological mechanisms develop at three basic levels: 1) biochemical level, through actions that allow increased inflow of ionic calcium into the cell, increased stimulation of excitatory amino acids (glutamic acid) and activation of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor (6, 9); 2) cellular level, which encompasses morphologic alterations associated with the deterioration of nervous cells suffering the hypoxic-ischemic insult (necrosis or apoptosis) (10-12); and 3) humoral-cellular level, which involves cytokine-mediated inflammatory responses and will be the focus of the present study (13). There is evidence supporting the involvement of the inflammatory cascade in the pathogenesis of ischemic brain injury. The inflammatory reaction triggered by central nervous system (CNS) ischemia is characterized by the inflow of leukocytes (including polymorphonuclear lymphocytes) and monocytes and by microglial activation, requiring the expression of specific adhesion molecules and chemotactic factors. These inflammatory

actions are mediated by cytokines – low molecular weight proteins that are produced and secreted by monocytes, macrophages, endothelial cells and fibroblasts. Inside the CNS, cytokines are produced and secreted by the microglia and astrocytes (13-15).

Experimental models suggest the involvement of cytokines, especially interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in ischemic brain damage (16-20). The levels of these cytokines, which may induce an inflammatory reaction in the CNS, have been shown to be elevated when following brain ischemia. In addition, they seem to directly modulate the process of apoptosis of CNS cells, promoting differentiation, proliferation and subsequent leukocyte infiltration (21, 22). A direct correlation between the cerebrospinal fluid (CSF) levels of IL-6 and TNF- α and the prognosis in acute brain ischemia has been demonstrated in adults (24). In term newborns with HIE, increased CSF levels of TNF- α and IL-1 β have been associated with neurological alterations at 12 months of age (24). Martín-Ancel *et al.* (25) have observed significantly higher levels of IL-6 in the CSF of newborns with severe neurological manifestations when compared to those with mild or moderate encephalopathy. A recent study has reported that neurological alterations in newborns affected by maternal chorioamnionitis are associated with elevated cytokine levels, especially IL-6, and with the concentration of these cytokines in newborns who develop HIE (26); the association between neonatal encephalopathy, elevated cytokine levels and CP had been the focus of a previous study (27). Also, elevated serum levels of IL-1, IL-6 and TNF- α have been reported in newborns presenting alterations characteristic of encephalopathy on magnetic resonance imaging (MRI) and evolution to CP (28).

Our hypothesis is that the inflammatory pathway is involved in the pathogenesis of HIE, and that increased levels of pro-inflammatory cytokines will be observed in newborns with perinatal brain damage. Therefore, the aim of the present study was to assess the levels of IL-

6 and TNF- α in newborns with HIE and to compare this population with infected newborns without meningitis or HIE and with a control group of normal newborns.

Patients and Methods

Study Population: A controlled, prospective study was designed with all term newborns delivered at the obstetric center at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, and admitted to the neonatal intensive care unit between July 1999 and October 2001 with a diagnosis of perinatal asphyxia or requiring lumbar puncture in the first 48 hours of life for investigation of early neonatal sepsis.

The exclusion criteria were: clinical or laboratory evidence of congenital infection, presence of meningitis, congenital malformation, accidents during the lumbar puncture for CSF sampling, seizures not related to hypoxia or of unknown etiology, maternal drug addiction, maternal syphilis, toxoplasma, rubella, cytomegalovirus, herpes virus 1 and 2 (STORCH) during pregnancy, HIV-positive mothers, and maternal use of opiates or drugs capable of causing respiratory depression in the peripartum period.

The diagnosis of perinatal asphyxia was based on the presence of umbilical cord blood pH < 7.20 or umbilical cord arterial blood lactate > 3.0 mmol/L plus at least two of the criteria listed below (29-32): signs of fetal distress documented by intrapartum monitoring, such as persistent deceleration, sustained fetal bradycardia or “silent” heart rate on intrapartum monitoring, Apgar score \leq 4 at the first minute and \leq 6 at the fifth minute; and need for positive pressure ventilation for at least 2 min to begin respiratory effort.

The diagnosis of sepsis was based on a positive blood culture or on the presence of three or more of the following (33, 34): maternal risk factors such as fever, premature rupture of membranes for more than 18 hours, and urinary tract infection; or newborn risk factors, such as apnea, difficult breathing, cyanosis, tachycardia or bradycardia, perfusion deficit or shock; irritability, lethargy, hypotonia and seizures; abdominal distention, vomits, dietary intolerance, gastric residue, hepatomegaly, idiopathic jaundice, thermal instability, petechiae or purpura; and a general poor appearance.

The diagnosis of HIE was based on the presence of perinatal asphyxia associated with neurological manifestations resulting from hypoxia and ischemia (24). HIE was classified following the criteria of Sarnat & Sarnat (35).

Classification of newborns:

Group I: Non-asphyxiated newborns without sepsis with Apgar score ≥ 9 at the first and fifth minutes. This group included babies submitted to CSF sampling as part of the investigation for neonatal sepsis, with antibiotic therapy interrupted in less than 48 hours and good clinical evolution. In this group, the results of a blood culture performed before the beginning of antibiotic therapy were normal.

Group II: Non-asphyxiated newborns with Apgar score ≥ 9 at the first and fifth minutes, clinical signs of sepsis and compatible laboratory findings, or a positive blood culture.

Group III: newborns with HIE and without sepsis.

The babies were followed throughout their hospital stay until discharge or death. Group III was submitted to neuropsychiatric follow-up and electroencephalogram, when they were able to be transported to electroencephalographic laboratory, and transfontanelle ultrasound.

Determination of IL-6 and TNF- α in plasma and CSF: In the first 48 hours of life, all the babies were submitted to collection of one additional blood sample and one additional CSF sample besides that requested by the assistant physician, for IL-6 and TNF- α dosing. No

blood or CSF was collected exclusively for the study. The peripheral blood and CSF samples were obtained simultaneously and no later than 48 hours after birth. The blood samples (100 μ L for IL-6 and 200 μ L for TNF- α) were stored in flasks with EDTA and centrifuged immediately; the plasma was frozen at -70° C. CSF was obtained through lumbar puncture (500 μ L total volume) and immediately frozen at -70° C. All samples were tested in duplicate. The dosing of IL-6 and TNF- α was performed using an enzyme immunoassay (Quantikine Human IL-6 and TNF- α , R & D Systems, Inc. MN, USA). The detection limit for IL-6 was 0.7 pg/ml, and for TNF- α 0.1 pg/ml, with intra and interassay coefficients of variation below 5% for both IL-6 and TNF- α . Readings were carried out in an automated optical Spectramax reader at 570 nm.

Statistical analysis: The sample size was calculated so as to ensure a power of 0.97 with significance of 0.05. The results are expressed as means \pm standard deviation (SD) or medians and interquartile range (p25-p75).

Since logarithmic functions were used for the comparison between cytokine levels in the three groups, we were able to employ the following parametric tests: Student's t test for independent samples, ANOVA with Duncan's test for cytokine measurements and Mantel-Haenszel's test for linear association. The Kruskal-Wallis test was also used to assess the difference among the three groups in terms of cytokine levels. Significance was established at $p < 0.05$.

The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent was obtained from the parents or guardians of all patients.

Results

Sixty newborns were enrolled in the study (20 in each group). One patient was lost in Group II – a newborn diagnosed with sepsis who presented significant improvement after five days of antibiotic treatment and was discharged from the hospital, so that it was not possible to either keep him in Group II or place him in the control group. In Group III, one asphyxiated newborn was removed from the study after a screening test verified the presence of inborn errors of metabolism. Therefore, 58 patients were analyzed in Groups I (n = 20), II (n = 19) and III (n = 19).

The three groups were similar concerning weight at birth, gestational age, weight and gestational age classification, type of delivery and mean time required to obtain blood and CSF samples. In the three groups, exams were performed on average at 17 hours of life. Apgar scores were significantly lower in Group III, with no difference between Groups I and II (table 1). Five patients in Group II presented positive blood cultures (26% of the samples in this group). No positive blood cultures were observed in Groups I and III.

Table 1 - Characteristics of the population studied

Group	HIE	Sepsis	Controls
N	19	19	20
Birthweight (grams)	3278 ± 550	3169 ± 679	3046 ± 118
Gestational age (weeks)	39.4 ± 0.2	39 ± 0.2	38.1 ± 0.4
Apgar 1 min**	2 (0 - 4)	9 (9 - 10)	8 (8 - 10)
Apgar 5 min**	4 (0 - 6)	9 (9 - 10)	9 (9 - 10)
Type of delivery			
Vaginal	11 (58%)	11 (58%)	13 (65%)
Cesarian	7	5	6
Forceps	1	3	1
Exams collected (hours)**	8 (2-25)	13 (3-26)	10 (3-26)
Positive blood culture	0	5 (26%)*	0
Death	3 (15.8%)	2 (10.5%)	0

*Positive blood culture

** Median and range

Asphyxiated newborns were classified according to the criteria of Sarnat & Sarnat: 10 newborns were classified as stage 1 (52%); 3 (18%) as stage 2; and 6 (32%) as stage 3. From the 16 asphyxiated newborns submitted to brain ultrasonography, 6 (37.5%) presented alterations. Diffuse brain edema and hyperechogenicity of thalamic vessels were the most frequent alterations on brain ultrasound. In 15 patients who underwent electroencephalography (EEG), six (40%) presented significant alterations attributable to HIE. Three patients with HIE stage 3 died before the performance of brain ultrasonography and EEG. In eight (42%) asphyxiated babies, the neurological examination was altered at admission or right before death. There was no difference in the frequency of deaths between newborns with asphyxia or sepsis. The comparison among the three groups in terms of plasma IL-6 levels did not reveal any significant differences between babies with sepsis or asphyxia; both groups presented significantly higher IL-6 levels than controls. Significantly higher TNF- α concentrations were observed in newborns with sepsis in relation to controls and to babies with asphyxia. TNF- α levels were similar in controls and asphyxiated babies (table 2).

The levels of IL-6 in CSF were significantly more elevated in asphyxiated newborns when compared to the control and sepsis groups; and the CSF levels of IL-6 in the sepsis group were higher than in the control group. For TNF- α the difference in CSF levels was more evident, with significantly higher concentrations in asphyxiated newborns and practically undetectable concentrations in the control and sepsis groups.

The median IL-6 and TNF- α CSF/ plasma ratios were significantly higher in the group with asphyxia in relation to the two other groups, but similar between the sepsis and control groups (table 2).

Table 2 - Levels of IL-6 and TNF- α in plasma and CSF

Group	HIE	Sepsis	Controls	P
N	19	19	20	
IL-6 (pg/ml) plasma	44.3 (36-282) ^a	89.7 (62 - 292) ^a	20.24 (12 - 34) ^b	< 0.0001
IL-6 (pg/ml) CSF	157.5 (66.8-288) ^a	18.6 (5.8 - 46) ^b	4.1 (2,5 - 5.8) ^c	< 0.00001
TNF- α (pg/ml) plasma	5.2 (3.9-6.3) ^a	54.5 (24 - 63) ^b	4.4 (3,7 - 6.0) ^a	< 0.00001
TNF- α (pg/ml) CSF	14.7 (13.8-15.3) ^a	0.16(0 - 0.16) ^b	0.16(0 - 0.25) ^b	< 0.00001
IL-6 CSF/P	1.488 (1.0-2,9) ^a	0.134 (0.05 - 0.4) ^b	0.221 (0.08 - 0.36) ^b	< 0.0002
TNF α CSF/P	3.25 (2.8-3.5) ^a	0 ^b	0 ^b	< 0.00001

Data expressed as means and interquartile range (p25-p75).

^{a,b,c} Significantly different results among the three groups according to ANOVA followed by Duncan's test. The following results were observed: plasma IL-6: newborns with HIE and newborns with sepsis presented significantly different means from controls. No difference was observed between newborns with HIE and sepsis. CSF IL-6: newborns with HIE presented a significantly higher median than newborns with sepsis and controls. The median in newborns with sepsis was significantly different than in controls. Plasma TNF- α : The medians of newborns with sepsis were significantly different from newborns with HIE and controls. There was no difference between HIE and controls. TNF- α CSF, IL-6 CSF/plasma ratio, TNF- α CSF/plasma ratio: the medians of newborns with HIE were significantly different from the medians of babies with sepsis and controls. No difference was observed between babies with sepsis and controls

Newborns classified as HIE stage 2 and 3 were grouped (n = 9) and compared with those presenting HIE stage 1 (n = 10). No difference was observed between IL-6 and TNF- α levels in the plasma or CSF of these two groups. A significant difference was observed in the neurological examination of newborns at discharge or death, and also in the number of deaths in the two groups (table 3).

Table 3 - Characteristics of the newborns according to severity of HIE

	Mild HIE	Moderate/severe HIE
N	10	9
Umbilical pH	7.0 ± 0.095	6.8 ± 0.15
Umbilical arterial lactate (mmol/L)	6.0 ± 3.4	6.16 ± 2.2
IL-6 plasma (pg/ml)	90.44 (40.2 - 217.9)	113.85 (36.3 - 286.8)
IL-6 CSF (pg/ml)	142.9 (66.8 - 248.6)	157.6 (68.5 - 397.2)
TNF- α plasma (pg/ml)	5.2 (4.5 - 6.3)	5.21 (3.9 - 9.4)
TNF- α CSF (pg/ml)	14.66 (14.4 - 15.0)	14.96 (13.7 - 17.2)
Altered neurological examination (discharge/death)	0% (n = 0)	89% (n = 8)*
Death	0% (n = 0)	33% (n = 3)*

Data expressed as mean \pm standard deviation or median with interquartile range (p25-p75).

*Statistically significant difference, $p < 0.0001$

Discussion

Experimental models have suggested that cytokines play a role in HIE (16-20). In the present study, IL-6 and TNF- α were observed to have an active part in the mechanisms of brain lesion in perinatal asphyxia, as previously shown (24-26). The present results also allow the comparison between the plasma and CSF ratios of IL-6 and TNF- α . The analyzed blood and CSF samples were obtained on average at 17 hours of life and almost simultaneously, so as to enable a reliable determination of CSF/plasma ratios. In adults with stroke, IL-6 levels have been reported to be more elevated in CSF than in blood in the first 2 to 3 days after the insult. With time, those levels tend to reach a balance, suggesting an early intrathecal production of IL-6 (36). Newborn rats submitted to hypoxia-ischemia present an IL-6 plasma peak approximately 6 hours after the insult with return to basal levels after 20 hours (17). The half-life of IL-6 in asphyxiated newborns is much shorter than in adults with stroke, probably

because of differences in the maturity of immune functions (25). The levels of TNF- α , on the other hand, start increasing in the first hour after middle cerebral artery occlusion, with a peak response to ischemia after 6 to 12 hours (37, 38). The concern with the simultaneous collection of blood and CSF samples was crucial to ensure the accuracy of our results.

We observed elevated IL-6 levels in plasma and especially in CSF in newborns with perinatal asphyxia. The plasma IL-6 concentration did not allow discrimination between sepsis and perinatal asphyxia; however, the significant elevation of plasma TNF- α in newborns with sepsis when compared to those presenting asphyxia shows the importance of TNF- α as a marker of the multisystemic involvement that occurs in sepsis (33). Plasma TNF- α was not a good marker of perinatal asphyxia, in contrast with the significantly elevated CSF TNF- α levels. TNF- α has been thought to be a myelinotoxic factor mediating the process of brain lesion, promoting the stimulation of platelet aggregation and the production of IL-1 β , and it may act directly on oligodendrocytes, inducing apoptosis and myelin degeneration (39).

When comparing the CSF/plasma ratios of IL-6 and TNF- α in the three groups, significantly higher ratios were observed in the group with asphyxia in relation to the control and sepsis groups (with the two last groups presenting similar rates). This supports the hypothesis that the elevation in IL-6 levels in the CSF of newborns with sepsis is due mainly to the transport of cytokines between plasma and CSF, whereas in asphyxia there is local production of IL-6 and TNF- α in the brain.

The increase in CSF IL-6 and TNF- α observed by us in newborns with HIE probably results from the direct stimulation of the CNS by asphyxia. The monocytes and neutrophils recruited in the inflammatory process that occurs during brain ischemia are capable of producing IL-6 as a response to stimulation by TNF- α (13, 40). Astrocytes and microglia are possible sources of IL-6 (41). Martín-Ancel *et al.* (25) have concluded that elevated levels of IL-6 in CSF may

be related to the severity of HIE, but they were not able to rule out the influence of plasma IL-6 in determining these CSF levels because the serum dosage of IL-6 was not performed in that study (25). The biphasic process of brain damage may be attributed to neuronal apoptosis. TNF- α induces apoptosis in neuronal brain cells and promotes the activation of sphingomyelinase, which causes an increase in the cytosolic concentration of ceramide which, in turn, is a direct inducer of apoptosis (11).

IL-6 is especially elevated in the CSF of newborns with sepsis in relation to controls due to the transport of this cytokine across the blood-brain barrier. The presence of infection, even if far from the CNS, promotes a systemic inflammatory response with liberation of IL-6; this IL-6 crosses the barrier either because it is immature or because the cytokines themselves reduce blood-brain barrier efficacy (42). The CSF and plasma ratios of IL-6 are very similar, without a significant difference between babies with sepsis and controls. Newborns with meningitis were not included in the analysis because their inclusion could have resulted in an elevation in the recorded CSF levels of IL-6 and TNF- α (13, 14). The mechanism of cytokine transport across the blood-brain is different for TNF- α and IL-6. For TNF- α , this mechanism is similar to that of albumin, which crosses mainly the injured barrier (43, 44). In the present study, although plasma TNF- α levels were significantly higher in newborns with sepsis, the levels of TNF- α in the CSF were practically undetectable. It is possible that there is no intra-brain production of TNF- α in neonatal sepsis without concomitant meningitis. A recent study has shown an association between maternal infection and elevated IL-6 levels in the plasma of newborns with sepsis presenting altered neurological examination suggesting neonatal encephalopathy (26).

No relationship was observed in this study between severity of HIE and plasma or CSF levels of IL-6 and TNF- α . This distinction may require inclusion of a larger number of patients.

Since this was not our objective, the calculated sample size was adequate to evaluate the difference in interleukin levels between asphyxiated newborns, newborns with sepsis and without meningitis and controls.

Previous investigations have reported a relationship between CSF levels of TNF- α and especially IL-1 β and alterations on neurological examination at 12 months of life in newborns who had suffered perinatal asphyxia (24). In adults with stroke, a significant correlation between CSF IL-6 and the size of the lesion has been demonstrated (36).

In conclusion, IL-6 and TNF- α seem to play an important role in the cascade of inflammatory events in perinatal asphyxia. Our term newborns with HIE presented elevated CSF levels of IL-6 and TNF- α , whereas the plasma levels of IL-6 were similar in HIE and neonatal sepsis. The concentrations of TNF- α in the plasma of term newborns with sepsis were very elevated; however, this was not true for newborns with asphyxia. The elevated CSF/plasma ratio of IL-6 and TNF- α suggests that these cytokines are produced in the CNS of newborns with HIE. The local production of TNF- α in the brain of newborns with hypoxic-ischemic injury was evident and significant, supporting a recommendation for future studies with the aim of instituting new therapeutic modalities, such as brain blockers of TNF- α .

Acknowledgments: The authors thank Prof. Dr. Mario Wagner for his assistance with the statistical analysis and Prof. Dr. Célia Carlini for her assistance with the laboratory analysis of IL-6 and TNF- α .

References

1. Chou Y-H, Yau TK-I, Wang P-J. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.
2. Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PNP, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-907.
3. Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: Pathogenesis and outcome. *Pediatr*. 1988;82:139-146.
4. Williams CE, Mallard C, Tan W, Gluckman PD. Pathophysiology of perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20(2):305-20.
5. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum asphyxia and cerebral palsy. *Pediatrics* 1988;82(2):240-49.
6. Delivoria-Papadopoulus M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-S34.
7. Nelson KB, Emery ES. Birth asphyxia and the neonatal brain: what do we know and when do we know it? *Clin Perinatol* 1993;20(2):327-44.
8. Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 1997;24:627-654.
9. Hagberg H, Thornberg E, Blenow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M. Excitatory amino acids in the CSF of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1993;82:925-9.
10. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407(12):802-9.

11. Mehmet H, Edwards AD. Hypoxia, ischaemia, and apoptosis. *Arch Dis Child* 1996;75:F73-F75.
12. Hengartner OM. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(12):770-6.
13. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1997;49(Supl.4):S10-S14.
14. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996;105:589-598.
15. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 1992;51:153-180.
16. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-1100.
17. Hagberg H, Gilland E, Bona E. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40:603-9.
18. Stroemer P, Rothwell NJ. Exacerbation of the ischaemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 1998;18:833-839.
19. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:176-179.
20. Dihne M, Block F. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 2001;889(1-2):165-73.
21. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos GD, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998;29:2622-30.
22. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999;30:321-7.

23. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:2325-29.
24. Oygür N, Sönmez O, Saka O, Yegin O . Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:190-3.
25. Martín-Ancel A, García-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabanãs F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatrics* 1997;100:789-794.
26. Shalak LF, Lupton AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics* 2002;110(4):673-80.
27. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-75.
28. Foster-Barber A, Dickens B, Ferriero DM. Human perinatal asphyxia: correlation of neonatal cytokines with MRI and outcome. *Dev Neurosci* 2001;23:213-8.
29. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20:287-98.
30. Thorp JA, Sampson JE, Parisi VM, Creasy RK. Routine umbilical cord blood gas determinations? *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:600-5.
31. Shirey T, Pierre JS, Winkelman J. Cord lactate, pH, and blood gases from healthy neonates. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:15-19.
32. Chou Y-H, Yau TK-I, Wang P-J. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.
33. Silveira RC, Procianny RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.

34. Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin in Perinatol* 1991;18:361-381.
35. Sarnat HB, Sarnat MS. Neoanatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Arch. Neurol.* 1976;33:696.
36. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A . Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-98.
37. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feurstein GZ. Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-44.
38. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676-81.
39. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona A-M, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001;56:1278-1284.
40. Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
41. Maeda Y, Matsumoto M, Hori O . Hypoxia / reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin-6: a paracrine mechanisms potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994;180:2297-2308.
42. Megyeri P, Abraham CS, Temesvari P, Kovacs J, Vas T, Speer CP. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci Lett* 1992;148:137-40.
43. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995;2:241-48.
44. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci* 1999;19:3649-55.

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A via inflamatória está envolvida na fisiopatologia da Encefalopatia hipóxico-isquêmica. Inteleucina-6 e TNF- α parecem representar um papel importante na cascata de eventos inflamatórios da asfixia perinatal. Recém-nascidos a termo com Encefalopatia hipóxico-isquêmica, apresentaram níveis líquóricos elevados de IL-6 e TNF- α . Os níveis plasmáticos de TNF- α não foram significativamente elevados nos recém-nascidos asfixiados, já as concentrações de IL-6 no plasma apresentaram elevação significativa.

As concentrações de IL-6 no plasma foram igualmente elevadas em recém-nascidos asfixiados e recém-nascidos sépticos, demonstrando uma resposta inflamatória imuno-mediada em ambas as situações. Os recém-nascidos sépticos apresentaram níveis de TNF- α no plasma muito elevados, mais elevados que nos recém-nascidos asfixiados e controles. As concentrações líquóricas do TNF- α foram praticamente indetectáveis nos recém-nascidos sépticos e nos controles. É provável que na sepse neonatal sem meningite concomitante não exista produção intra-cerebral do TNF- α . Os níveis elevados de IL-6 no líquido dos recém-nascidos sépticos evidenciam passagem hemato-líquórica dessa citocina, mesmo na ausência de meningite neonatal.

As taxas elevadas das relações líquido/plasma da IL-6 e do TNF- α observadas nos recém-nascidos asfixiados, sugerem produção dessas citocinas dentro do SNC dos recém-nascidos com EHI. A produção local cerebral do TNF- α nos recém-nascidos que sofreram insulto hipóxico-isquêmico foi muito evidente e significativa, possibilitando estudos futuros com a

finalidade de instituir novas modalidades terapêuticas, como bloqueadores cerebrais da ação do TNF- α .

A associação entre a gravidade da EHI e os níveis plasmáticos e líquóricos de IL-6 e TNF- α não foi observada. No entanto, os recém-nascidos com EHI grave apresentaram alteração significativa no exame neurológico no momento da alta hospitalar ou do óbito, e também maior ocorrência de óbitos que aqueles com EHI leve.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Pós-Informação

A asfixia perinatal e a sepse neonatal precoce são doenças graves que ocorrem nos bebês, a causa e os efeitos dessas situações ainda não foram bem estabelecidas. O risco de vida é grande, e muitos recém-nascidos que sobrevivem desenvolvem seqüelas no futuro, ou seja, “problemas graves de inteligência e de entendimento”.

É necessário conhecer essas situações para estabelecer novas modalidades de tratamento no futuro, por isso, solicito seu consentimento na admissão de seu filho ou tutelado no estudo. Seu filho não será submetido a exame de sangue ou de líquido (líquido da espinha) exclusivamente para a pesquisa. Nenhuma intervenção ocorrerá com a finalidade de pesquisa e todos os dados serão mantidos em sigilo, os pacientes serão codificados, afim de manter a confidencialidade e privacidade dos pacientes. O seu filho poderá ser retirado do estudo, se assim for seu desejo, em qualquer etapa da pesquisa.

Eu, _____, responsável pelo recém-nascido de _____, fui informado dos objetivos do estudo e sua justificativa, de forma detalhada e precisa. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho ou tutelado está envolvido, e os desconfortos ou riscos possíveis, tanto quanto sobre os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento, contactando com a pesquisadora responsável para esclarecimento de eventuais dúvidas, estando a mesma à disposição para contato pelo telefone 51-99869993.

Declaro, portanto, que autorizo a inclusão de meu filho ou tutelado na pesquisa realizada pela Dra. Rita de Cássia Silveira.

Assinatura do responsável: _____

Assinatura da pesquisadora: _____

Informações: 9986 9993
3316 8142 (UTI Neonatal HCPA)

Porto Alegre, _____

ANEXO II

Protocolo

ID.: _____ Registro: _____

Nº: _____ DN: ____/____/____ Sexo: 1. F 2. M (). PN: _____ g

IG (semanas): _____

Parto: 1. Vaginal 2. Vag.+ fórceps 3. Cesáreo ()

Class. P/IG: 1. PIG 2 AIG 3. GIG ()

Apgar: 1º min.____, 5º min____, 10º min____, 15º min____, 20º min____

Gasometria venosa sangue de cordão: pH____, pCO₂____, EB____, pO₂____

Lactato: _____

Hemograma: _____

Hemocultura positiva 1. Sim 2. Não ()

Lactato sérico: _____

Momento da coleta sangue periférico e LCR: _____ horas de vida

LCR Alterado: 1. Sim 2. Não ()

1. Germe + (tipo) _____, 2. Germe - ().

Células: _____ leucócitos por campo

Glicose: _____ mg/dl Proteínas _____ mg/dl

Interleucinas:

IL-6 plasma _____ pg/ml, IL-6 LCR _____ pg/ml

TNF- α plasma _____ pg/ml, TNF- α LCR _____ pg/ml

Diagnósticos:

1. CONTROLE

2. SEPSE OU SÍNDROME SÉPTICA

3. ASFIXIA

ANEXO III

Protocolo para Seguimento dos Asfixiados

Estágio EHI: I () II () III ()

Evolução: EEG ALTERADO 1.SIM 2.NÃO ()

Descrição do EEG: _____

ECO CEREBRAL COM ANORMALIDADE 1. Sim 2. Não ()
ACHADOS ECOGRÁFICOS: _____

Tempo de internação: _____ dias

Alta () Óbito ()

Exame neurológico na alta 1. Normal 2. Alterado ()

ANEXO IV

Grupo I - Controle (RNs normais)

PAC	Sexo (1 = F)	PN (g)	IG (sem,d)	Classlg	TP*	Apgar 1/5	Coleta (hs)	IL6p (pg/ml)	IL6L (pg/ml)	TNFp (pg/ml)	TNFL (pg/ml)	Intern (d)	obito	Hemo+
1	1	2770	38	AIG	3	9/9	7	19,560	4,115	20,490	0,106	10	NÃO	NÃO
2	2	3440	40	AIG	1	9/10	22	36,000	8,309	3,766	0,000	2	NÃO	NÃO
3	1	2635	37,2	AIG	1	9/9	8	11,470	4,212	4,175	0,000	11	NÃO	NÃO
4	1	4450	40	GIG	2	9/10	47	12,900	1,066	4,700	0,000	2	NÃO	NÃO
5	1	2830	39	AIG	3	10/10	4	10,900	0,965	3,766	0,184	7	NÃO	NÃO
6	2	3775	41	AIG	1	9/9	46	0,720	8,400	11,971	0,000	11	NÃO	NÃO
6	2	3390	38	AIG	3	9/9	10	25,920	3,001	5,198	0,000	9	NÃO	NÃO
8	2	3790	40,1	AIG	1	9/10	16	18,740	4,945	15,780	0,000	7	NÃO	NÃO
9	2	2960	37	AIG	3	9/9	3	64,580	0,000	2,990	0,000	8	NÃO	NÃO
10	2	2330	37	PIG	1	9/9	26	32,650	10,650	6,408	0,000	5	NÃO	NÃO
11	1	4355	40,3	GIG	1	9/9	18	33,120	2,033	6,675	0,000	2	NÃO	NÃO
12	2	2475	37,3	PIG	1	9/9	6	8,410	5,470	2,239	0,000	2	NÃO	NÃO
13	1	2850	37	AIG	3	9/9	5	15,267	5,434	3,819	0,000	4	NÃO	NÃO
14	2	2500	40	AIG	1	9/9	24	33,350	6,173	4,640	0,000	12	NÃO	NÃO
15	2	2740	37	AIG	1	9/9	3	39,210	10,780	5,434	0,000	9	NÃO	NÃO
16	2	2690	37	AIG	1	9/9	24	46,360	3,089	4,132	0,000	8	NÃO	NÃO
17	1	3175	39	AIG	1	10/10	24	12,680	4,679	3,969	0,106	10	NÃO	NÃO
18	1	2490	37,4	PIG	1	10/10	12	20,930	1,681	2,624	0,000	13	NÃO	NÃO
19	1	2705	39,5	AIG	1	9/9	10	40,850	3,346	5,656	0,000	4	NÃO	NÃO
20	1	4375	40,3	GIG	3	9/9	12	7,590	3,391	2,477	0,000	11	NÃO	NÃO

*Tipo de parto: 1 - vaginal; 2 - vaginal + fórceps; 3 - cesareo

ANEXO V

Grupo II - RNs sépticos, sem meningite, não asfixiados

PAC	Sexo (1 = F)	PN (g)	I G sem, dias	Classlg	TP*	Apgar 1/5	Coleta horas de vida	IL6p (pg/ml)	IL6L (pg/ml)	TNFp (pg/ml)	TNFL (pg/ml)	Intern (d)	obito	Hemo+
1	2	2910	39	PIG	2	9/9	3	80,800	18,610	9,200	0,106	10	NÃO	NÃO
2	1	3020	40	AIG	2	9/10	47	49,655	19,910	4,380	0,000	10	NÃO	SIM
3	1	3385	37	AIG	2	9/10	3	89,060	55,025	37,026	0,000	15	NÃO	NÃO
4	2	3560	40	AIG	2	9/10	23	244,700	12,520	40,191	0,000	11	NÃO	SIM
5	1	3345	40	AIG	2	9/9	20	297,110	29,290	61,710	0,116	11	SIM	SIM
6	2	2930	38	AIG	1	9/9	4	299,260	9,457	15,783	0,368	18	NÃO	NÃO
7	2	4345	41	GIG	3	9/9	7	85,190	93,719	54,550	0,255	11	NÃO	NÃO
8	2	4120	41	GIG	2	9/10	24	89,700	3,148	62,890	0,000	10		NÃO
9	2	2720	39	AIG	2	9/10	20	297,980	209,540	65,270	0,368	15	NÃO	NÃO
10	2	2520	37	PIG	2	9/9	4	181,900	46,015	23,690	0,106	15	NÃO	NÃO
11	2	2570	37	PIG	1	9/9	8	291,720	439,050	208,820	0,000	4	SIM	SIM
12	2	3480	41,5	AIG	2	9/9	12	162,456	21,762	48,710	0,000	10	NÃO	NÃO
13	2	2945	37,4	AIG	2	10/10	13	282,960	26,680	136,130	0,254	10	NÃO	SIM
14	1	2585	38,4	PIG	2	9/10	21	71,056	4,400	98,370	0,000	14	NÃO	NÃO
15	2	2880	39,5	AIG	2	9/10	46	45,211	13,136	57,240	0,000	12	NÃO	NÃO
16	1	2480	37	PIG	1	9/9	21	62,398	14,822	60,105	0,000	14	NÃO	NÃO
17	2	3240	40,3	AIG	2	10/10	20	33,620	1,742	60,540	0,368	11	NÃO	NÃO
18	2	4110	39,1	GIG	3	9/9	12	299,510	5,788	28,050	0,000	15	NÃO	NÃO
19	2	3475	40	AIG	2	9/10	36	29,177	2,980	3,766	0,106	16	NÃO	NÃO

*Tipo de parto: 1 - vaginal; 2 - vaginal + fórceps; 3 - cesareo

ANEXO VI

Grupo III - RNs asfixiados

PAC	Sexo (1 = F)	PN (g)	I G sem, dias	Classlg	TP*	Apgar 1/5	Coleta horas de vida	IL6p (pg/ml)	IL6L (pg/ml)	TNFp (pg/ml)	TNFL (pg/ml)	Intern (d)	obito	Hemo+
1	1	2515	37	AIG	1	2/4	16	44,300	68,480	2,539	13,636	14	NÃO	NÃO
2	2	3025	41	AIG	1	2/5	18	23,060	66,802	5,406	14,698	7	NÃO	NÃO
3	2	3960	39	GIG	3	2/6	5	217,970	248,640	4,543	13,531	14	NÃO	NÃO
4	1	3510	39	AIG	1	2/6	6	71,380		6,350		5	NÃO	NÃO
5	1	3385	39	AIG	1	3/5	1	286,820		9,899		5	SIM	NÃO
6	1	4800	40	GIG	3	4/6	5	28,380	143,640	3,878	13,743	63	NÃO	NÃO
7	2	3430	40,3	AIG	1	0/3	13	42,980	171,380	5,496	13,868	15	NÃO	NÃO
8	2	3590	37,1	AIG	3	2/5	12	287,230	288,290	6,232	14,388	10	NÃO	NÃO
9	1	3615	40,3	AIG	1	1/5	25	282,260	414,989	3,473	11,748	13	NÃO	NÃO
10	2	3460	37	AIG	3	2/4	4	113,850		5,209		11	SIM	NÃO
11	2	3375	39	AIG	2	1/5	2	43,490	193,164	4,921	14,840	10	NÃO	NÃO
12	2	3130	39	AIG	1	0/0	6	293,734	397,279	2,052	16,201	41	SIM	NÃO
13	2	3150	38,5	AIG	1	1/5	25	40,268	28,211	5,202	14,697	8	NÃO	NÃO
14	2	3300	41	AIG	3	2/6	3	36,369		9,425	14,065	10	NÃO	NÃO
15	1	3410	41,2	AIG	1	3/5	8	21,798	11,360	5,316	17,282	11	NÃO	NÃO
16	1	2645	39,5	PIG	3	1/5	4	44,110		8,299		13	NÃO	NÃO
17	2	3145	41,4	AIG	1	1/5	4	90,440	92,677	2,606	15,020	11	NÃO	NÃO
18	1	3210	40,3	AIG	1	1/5	3	299,730	451,179	21,112	14,991	14	NÃO	NÃO
19	2	3935	39,2	GIG	3	1/3	8	20,810	42,862	4,070	14,060	34	NÃO	NÃO

*Tipo de parto: 1 - vaginal; 2 - vaginal + fórceps; 3 - cesareo

ANEXO VII

Características dos Recém-Nascidos Asfixiados

PAC	USOM*	EEG*	EXAME*	EHI GRAU	Apgar 10'/15'/20'	pH	Lac (mmol/L)
1	2	1	2	II	7/7/8	6,780	
2	2	2	2	I	7/7/7	6,990	13,90
3	2		2	I	7/8/8	7,040	2,180
4			2	I	8/8/8	7,170	3,970
5	1		1	III	4/7/7	6,960	5,770
6	1	1	1	III	4/6/7	7,080	4,610
7	2	2	1	II	6/7/8	6,730	2,090
8	1	2	2	I	6/8/8	6,950	4,500
9	2	2	2	I	6/8/8	7,050	4,810
10			1	III	6/6/8	6,960	6,700
11	2	2	2	I	8/8/8	6,870	4,800
12	1	1	1	III	2/3/4		8,170
13	2	2	2	I	6/8/8		3,870
14	2	1	1	II	8/8/8	6,830	5,390
15	2	2	2	I	6/8/8	7,020	4,600
16		2	2	I	6/8/8	7,050	8,990
17	2	2	2	I	7/8/8	6,870	8,410
18	1	1	1	III	5/5/6	6,640	7,470
19	1	1	1	III	5/6/6	7,010	9,020

*Ultrassom

*Eletroencefalograma

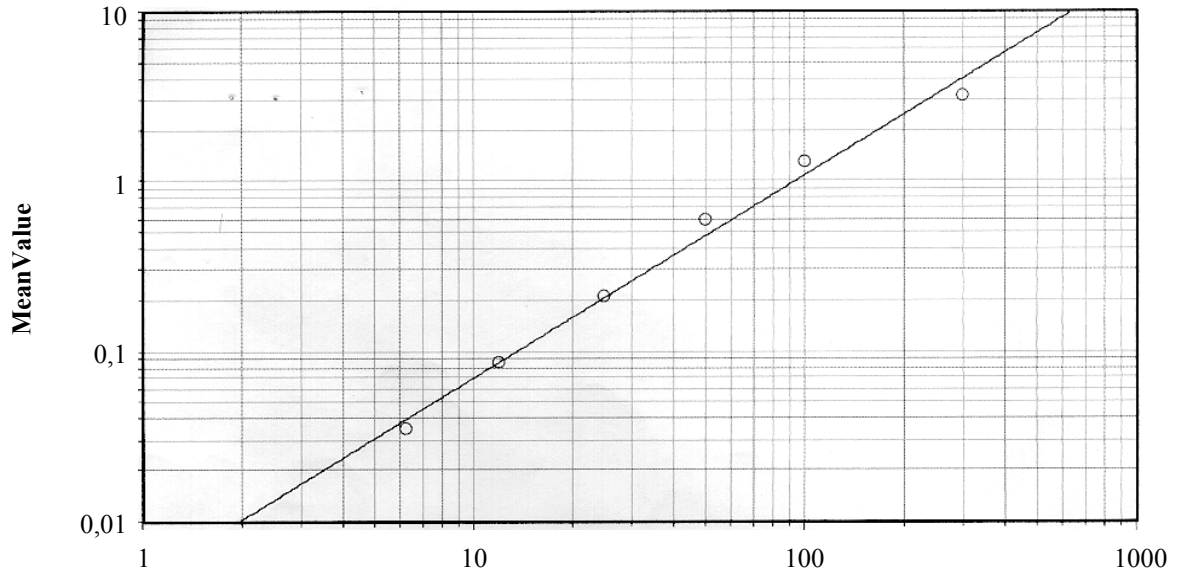
*Exame neurológico na alta/óbito

1- Alterado

2- Normal

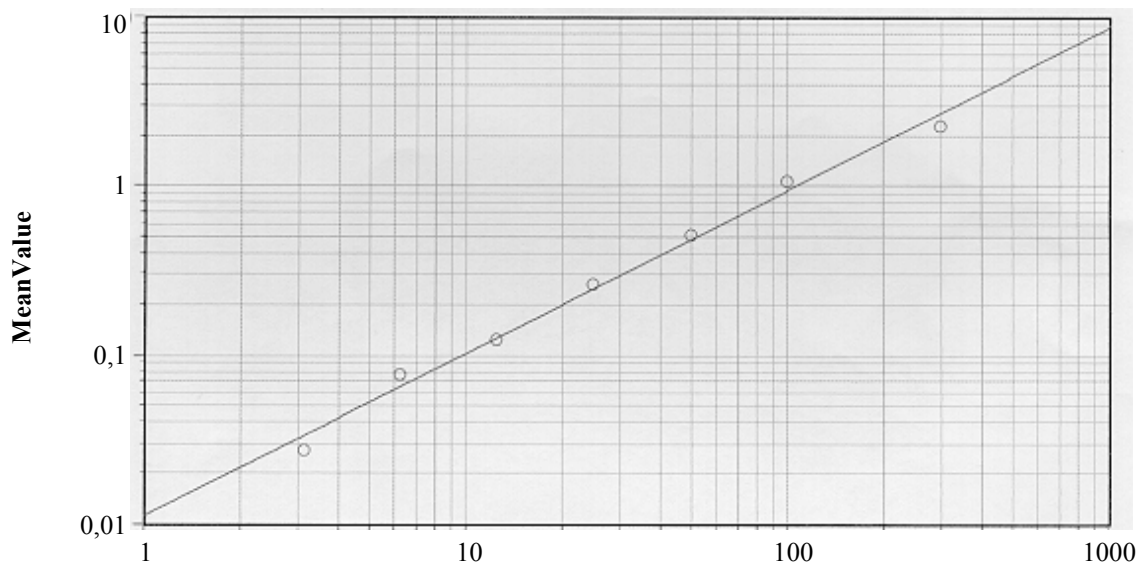
ANEXO VIII

Curva da Análise Laboratorial da IL-6 no Plasma



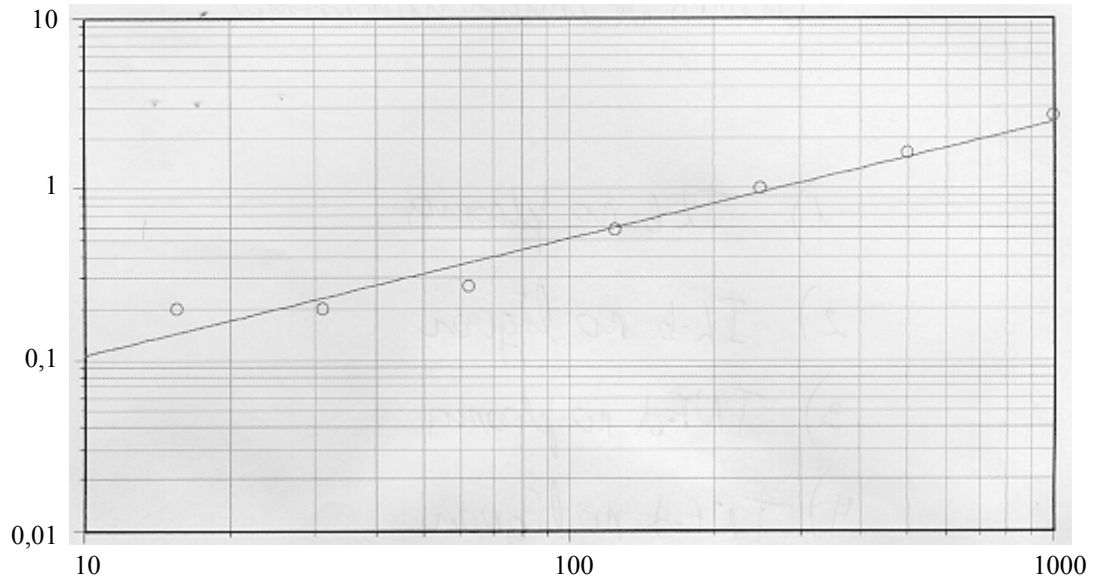
	Concentration		
	A	B	R ²
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	-2,346	1,192	0,99

Curva da Análise Laboratorial da IL-6 no Líquor



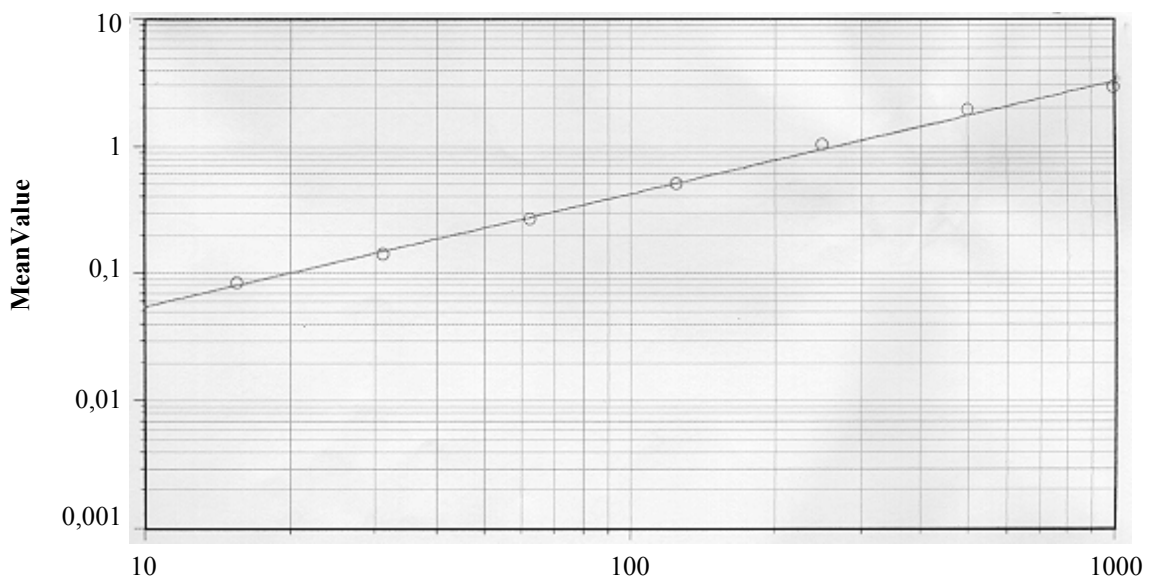
	Concentration		
	A	B	R ²
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	-1,948	0,962	0,99

Curva da Análise Laboratorial do TNF- α no Plasma



	Concentration		
	A	B	R ²
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	-1,652	0,681	0,964

Curva da Análise Laboratorial do TNF- α no Líquor



	Concentration		
	A	B	R ²
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	-2,139	0,883	0,997