



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Marta Lúcia Gabriel

**Correlação da Patogênese da Leucomalácia
Periventricular com Polimorfismos em Genes das
Citocinas**

São José do Rio Preto

2018

Marta Lúcia Gabriel

**Correlação da Patogênese da Leucomalácia
Periventricular com Polimorfismos em Genes das
Citocinas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do título de Doutor
no Curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde.

Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Soares Souza

São José do Rio Preto

2018

Ficha Catalográfica

Gabriel, Marta Lúcia

Correlação da Patogênese da Leucomalácia Periventricular com Polimorfismos em Genes das Citocinas/ Marta Lúcia Gabriel

São José do Rio Preto, 2018

53 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Antônio Soares Souza

1. Leucomalácia Periventricular; 2. Fator-Alfa de Necrose Tumoral; 3. Interleucina-10; 4. Interleucina-1Beta; 5. Polimorfismo.

Marta Lúcia Gabriel

**Correlação da Patogênese da Leucomalácia
Periventricular com Polimorfismos em Genes das
Citocinas**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Antônio Soares
Souza

2º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Regacini

3º Examinador: Prof^a Dr^a Thais Santana Gastardelo
Bizotto

4º Examinador: Prof^a Dr^a Fernanda Del Campo
Braojos Braga

5º Examinador: Prof^a Dr^a Vânia Belintani Piatto

Suplentes: Prof^a Dr^a Soraia El Hassan

Prof^a Dr^a Marciali Gonçalves Fonseca

São José do Rio Preto, 07/12/2018.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Etiopatogenia e neuropatologia da HPIV e da LPV	1
1.3 Localização e Classificação	3
1.4 LPV e Citocinas	4
1.4.1 Citocinas	5
1.4.2 Polimorfismos nos genes TNF- α , IL1- β e IL-10 associados à LPV.....	8
2. Objetivos	10
3. Casuística e Métodos	11
3.1 Análise por Imagem.....	12
3.2 Investigação Molecular	12
3.2.1 Extração de DNA Genômico.....	13
3.2.2 Investigação dos Polimorfismos.....	13
3.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	13
3.2.2.2 Análise de Restrição (Técnica da RFLP) dos Fragmentos Amplificados para Identificação dos Polimorfismos	15
3.3 Análise Estatística.....	16
4. Resultados	17
4.1 Características Demográficas.....	17

4.2 Características Clínicas	18
4.3 Diagnósticos Ultrassonográficos.....	19
4.4 Extração do DNA Genômico	22
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	22
4.6 Técnica da RFLP (Digestão Enzimática) dos Fragmentos Amplificados para Identificação dos Polimorfismos	24
5. Discussão	34
6. Conclusões	41
7. Referências Bibliográficas	42
8. Anexos	52
9. Apêndice	53

*Aos meus pais Miguel Gabriel (in memorian) e Odete
Nassif Gabriel (in memorian) e aos meus irmãos
Milton Gabriel (in memorian) e Miriam Teresa Gabriel
Siano pelo incentivo profissional e científico
Aos meus filhos Tomás Gabriel Jacomini e Marina Gabriel
Jacomini pelo apoio e consideração.*

Ao Prof. Dr. Antônio Soares Souza, Chefe do Departamento de Imagem da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) pela orientação, amizade e incentivo, mesmo nas horas mais difíceis, sempre contribuindo para o meu crescimento profissional.

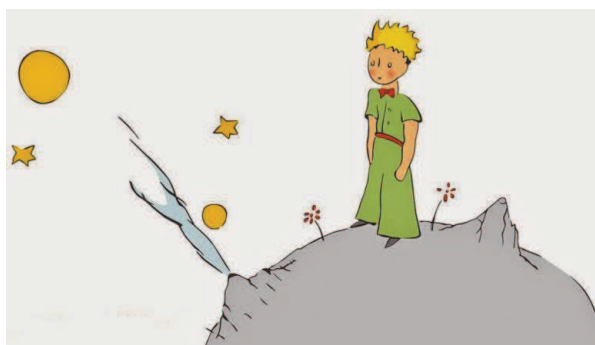
À Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto, pelo grande e indispensável auxílio na condução do presente trabalho.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pelas importantes sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Chefe da Disciplina de Imunologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e à Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho, analista de serviço acadêmico do Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), pelo apoio e liberação ao uso do termociclador no Laboratório, aos finais de semana e feriados. A cooperação é e sempre será fundamental para o desenvolvimento das pesquisas.

Aos médicos e residentes da Disciplina de Radiologia do Departamento de Imagem da FAMERP, pela amizade e apoio na coleta de dados e na escolha das imagens.

Aos pais das crianças estudadas, por terem liberado a coleta de amostras para o nosso estudo, que sem eles, nada disso seria possível.



***“O verdadeiro homem mede a sua
força, quando se defronta com o
obstáculo”.***

Antoine de Saint-Exupéry

Figura 1. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau I	20
Figura 2. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau II	20
Figura 3. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau III/IV	21
Figura 4. Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M-marcador 100 pb (Ladder®)	22
Figura 5. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 150 pb amplificado da região promotora do gene <i>TNF-α</i> , em gel de agarose 2%. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb	22
Figura 6. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 305 pb amplificado da região promotora do gene <i>IL-1β</i> , em gel de agarose 2%. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb-1,5 kb	23
Figura 7. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 400 pb amplificado da região promotora do gene <i>IL-10</i> , em gel de agarose 2%. M-marcador 100 pb (Ladder®)	23
Figura 8. Fotografia do produto da <i>RFLP</i> (digestão enzimática) - fragmentos de 150, 88 e 62 pb da região promotora do gene <i>TNF-α</i> , em gel de agarose 2%. TT-homozigoto selvagem; TC-heterozigoto; CC-homozigoto polimórfico. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb	24
Figura 9. Fotografia do produto da <i>RFLP</i> (digestão enzimática) - fragmentos de 305, 190 e 115 pb da região promotora do gene <i>IL-1β</i> , em gel de agarose 2%. CC-homozigoto selvagem; CT-heterozigoto; TT-homozigoto polimórfico. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb	25
Figura 10. Fotografia do produto da <i>RFLP</i> (digestão enzimática) - fragmentos de 400, 320 e 80 pb da região promotora do gene <i>IL-10</i> , em gel de agarose 2%. GG-homozigoto selvagem; GA-heterozigoto. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb	26

Tabela 1. Distribuição, em porcentagens, das características demográficas entre casos e controles	17
Tabela 2. Distribuição das características clínicas de casos e controles	18
Tabela 3. Distribuição, em porcentagens, dos diagnósticos ultrassonográficos (transfontanela) no Grupo Casos	19
Tabela 4. Distribuição, em porcentagens, dos genótipos e alelos dos polimorfismos analisados entre Casos e Controles	27
Tabela 5. Distribuição, em porcentagens, das combinações entre os genótipos <i>TNF-α</i> -1031T/C, IL-1 β -511C/T e IL-10-1082G/A e os RN dos Grupos Casos e Controles	29
Tabela 6. Distribuição, em porcentagens, entre Graus de LPV e os genótipos dos três polimorfismos analisados no Grupo Casos (N=50)	30
Tabela 7. Distribuição, em porcentagens, das combinações entre os genótipos <i>TNF-α</i> -1031T/C, IL-1 β -511C/T e IL-10-1082G/A e os RN com e sem LPV Grau III	31
Tabela 8. Distribuição, em porcentagens, entre os RN com e sem HPIV e os genótipos dos três polimorfismos analisados no Grupo Casos (N=50)	32
Tabela 9. Distribuição, em porcentagens, entre os genótipos dos três polimorfismos analisados e os RN do Grupo Casos com e sem HPIV e (N=50)	32

A – Adenina
AvaI – Anabaena variabilis
BbsI – Bacillus laterosporus
C – Citosina
dATP – Desoxinucleotídeo Trifosfato Adenina
dCTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato Citosina
dGTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato Guanina
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs – Desoxinucleotídeos Trifosfato
dNTPs – Desoxinucleotídeos Trifosfato
DP – Desvio Padrão
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHI – Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
F – Forward
FSC – Fluxo Sanguíneo Cerebral
G – Guanina
g – gramas
HLA – Human Leukocyte Antigens
HPIV – Hemorragia Peri-Intraventricular
IC – intervalo de confiança
IG – Idade Gestacional
IFN – Interferon
IL – Interleucinas
INF- γ – interferon-gama
Int – internação
Kb – Kilobase
KCl – Cloreto de Potássio
kDa – Kilodalton
LPV – Leucomalácia Periventricular
M –(Média)
MAP – Monitorização Intraparto
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

- MI** – Mililitros
- mM** – milimolar
- M** – marcador
- N** – número
- NA** – não analisado.
- NCBI** – National Center for Biotechnology Information
- Ng** – Nanogramas
- NO** – Óxido Nítrico
- OLs** – Oligodendrócitos
- OPCs** – Células Progenitoras dos Oligodendrócitos
- OR** – Odds Ratio = Razão de Chance
- Pb** – Pares de Bases
- PCR** – Polimerase Chain Reaction = Reação em Cadeia da Polimerase
- PGE2** – Prostaglandina E2
- Pmoles** – Picomoles
- % – porcentagem
- R** – Reverse
- RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição)
- RM** – Ressonância Magnética
- RN** – Recém-nascidos
- RNPT** – Recém-nascidos Prematuros
- RNT** – Recém-nascidos a Termo
- SNC** – Sistema Neural Central
- STORCH** – Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes
- T** – Timina
- Taq DNA polimerase** – Enzima Polimerase do DNA *Thermus Quaticus*
- TC** – Tomografia Computadorizada
- TGF- β** – Fator de Transformação do Crescimento
- Th** – Linfócito T-helper
- Th0** – Linfócito T-helper zero
- Th1** – Linfócito T-helper 1

Th2 – linfócito T-helper 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alfa

TNF- β – Fator de Necrose Tumoral-beta

Tris-HCl – Tris-Ácido Clorídrico

U – Unidade

UCI-Neonatal – Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal

UTI-Neonatal – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

US – Ultrassom

μg – Micrograma

μL – Microlitros

Introdução: A leucomalácia periventricular é uma consequência frequente de lesões hipóxico-isquêmicas. Variantes funcionais dos genes das citocinas que resultam em produção alterada de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) ou anti-inflamatórias (IL-10) podem modificar a evolução da doença, incluindo a leucomalácia periventricular. **Objetivos:** Investigar a associação entre ambos os polimorfismos inflamatórios (-1031T/C no gene *TNF- α* e -511C/T no gene *IL-1 β*) e o anti-inflamatório (-1082G/A no gene *IL-10*) e o risco da leucomalácia periventricular em neonatos com e sem esta afecção. **Material e Métodos:** Estudo de caso-controle realizado na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital da Criança e Maternidade da Faculdade Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Cinquenta neonatos prematuros e a termo (Grupo Casos) e 50 neonatos a termo (Grupo Controle), de ambos os gêneros, foram incluídos. O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico e os sítios que abrangem os três polimorfismos foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase/Análise de Restrição Enzimática (PCR/RFLP). **Resultados:** A idade gestacional variou de 25 a 39 semanas no Grupo Casos e, no Grupo Controle, a idade gestacional variou de 38 a 42,5 semanas ($p < 0,0001$). Foi encontrada associação entre o genótipo TC (produtor intermediário de citocina inflamatória) (OR, 2,495; 95% IC, 1,10-5,63; $p = 0,043$) assim como entre os genótipos TC+CC (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR, 2,471; 95% IC, 1,10-5,55; $p = 0,044$) no gene *TNF- α* e o risco de leucomalácia periventricular. Estatisticamente significativa associação foi encontrada entre os genótipos (CT+TT) (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR, 23,120; 95% IC, 1,31-409,4; $p = 0,003$) no gene *IL-1 β* e o risco de leucomalácia periventricular. No gene *IL-10*, foi encontrada associação significativa a menor risco de leucomalácia periventricular para o genótipo GG (alto produtor anti-inflamatório) (OR, 0,07407; 95% IC, 0,02-0,34; $p < 0,0001$) assim como para o alelo G (OR, 0,5098; 95% IC, 0,29-0,91; $p = 0,030$). Houve associação significativa entre a combinação dos genótipos TC/CT/GA e o risco de leucomalácia periventricular (OR, 6,469; 95% CI, 2,00-20,92; $p = 0,001$). **Conclusão:** Há associação entre os polimorfismos inflamatórios (-1031T/C no gene *TNF- α* e -511C/T no gene *IL-1 β*) e o risco de desenvolvimento de leucomalácia periventricular e associação do polimorfismo anti-inflamatório (-1082G/A no gene *IL-10*) ao menor risco de desenvolvimento da leucomalácia periventricular, na população de neonatos estudada.

Palavras-chave: Leucomalácia Periventricular; Fator-Alfa de Necrose Tumoral; Interleucina-10; Interleucina-1Beta; Polimorfismo.

Introduction: Periventricular leukomalacia is a frequent consequence of hypoxic-ischemic injury. Functional cytokine gene variants that result in altered production of inflammatory (TNF- α , and IL-1 β) or anti-inflammatory (IL-10) cytokines may modify disease processes, including periventricular leukomalacia. **Objective:** The aim of this study was to evaluate if there is a relationship between the two pro-inflammatory polymorphisms (TNF- α -1031T/C and IL-1 β -511C/T) and the anti-inflammatory polymorphism IL-10-1082G/A and periventricular leukomalacia risk in newborns with and without this injury. **Materials and methods:** A case-control study performed at the Neonatal Intensive Care Unit of the Children's Hospital and Maternity of the SJRio Preto Medical School (FAMERP). Fifty preterm and term newborns were examined as index cases and 50 term newborns as controls, of both genders to both groups. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, and the sites that encompassed the three polymorphisms were amplified by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR/RFLP). **Results:** Gestational age ranged from 25 to 39 weeks, in Case Group, and at Control Group it ranged from 38 to 42.5 weeks ($p < 0.0001$). Statistically significant association was found between TNF- α -1031T/C high expression genotype TC (intermediate producer inflammatory cytokine) (OR, 2.495; 95% CI, 1.10-5.63; $p = 0.043$) as well as between genotypes (TC+CC) (intermediate + high producers inflammatory cytokine) (OR, 2.471; 95% CI, 1.10-5.55; $p = 0.044$) and risk of periventricular leukomalacia. Statistically significant association was found between IL-1 β -511C/T high expression genotypes (CT+TT) (intermediate + high producers inflammatory cytokine) (OR, 23.120; 95% CI, 1.31-409.4; $p = 0.003$) and risk of periventricular leukomalacia. Statistically significant association between IL-10-1082G/A high expression genotype GG (anti-inflammatory cytokine high producer) (OR, 0.07407; 95% CI, 0.02-0.34; $p < 0.0001$) as well as between IL-10-1082G high expression allele (OR, 0.5098; 95% CI, 0.29-0.91; $p = 0.030$) and periventricular leukomalacia reduced risk was observed. There was a statistically significant association between TC/CT/GA genotypes combination and the risk of periventricular leukomalacia (OR, 6.469; 95% CI, 2.00-20.92; $p = 0.001$). **Conclusions:** There is evidence of an association between the both TNF- α -1031T/C and IL-1 β -511C/T inflammatory polymorphisms and periventricular leukomalacia risk, and an association of the IL-10-1082G/A anti-inflammatory polymorphism and periventricular leukomalacia reduced risk, in this studied newborns population.

Key-words: Leukomalacia Periventricular; Tumor Necrosis Factor-Alpha; Interleukin-10; Interleukin-1Beta; Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) é a mais importante causa de lesão cerebral no período peri e neonatal tanto em recém-nascidos prematuros (RNPT) quanto nos a termo (RNT), ocorrendo em cerca de 33% dos nascimentos com anóxia e, também, é a causa mais comum de convulsão no recém-nascido (RN), representando 60% a 65% das mesmas, sendo importante fator de sequelas neurológicas a longo prazo.^{1,2}

Os avanços tecnológicos e científicos levaram à obtenção de resultados satisfatórios na assistência neonatal com significativa melhora nos cuidados intensivos aos recém-nascidos (RN), possibilitando maior sobrevida e intervenções obstétricas precoces. As principais entidades mórbidas relacionadas ao nascimento prematuro são doença da membrana hialina, displasia broncopulmonar, sepse, enterocolite necrotizante, persistência do canal arterial, retinopatia da prematuridade, hemorragia peri-intraventricular (HPIV) e leucomalácia periventricular (LPV), sendo esses dois últimos eventos consequentes da síndrome hipóxico-isquêmica cerebral.³

A hemorragia peri-intraventricular (HPIV) e a leucomalácia periventricular (LPV) são as afecções cerebrais mais comuns decorrentes da EIH.^{4,5} A incidência de HPIV em RN com peso inferior a 1500g é variável devido à diferença entre populações estudadas, disponibilidade de métodos de diagnóstico e uso de diferentes protocolos, variando de 35 a 45%, sendo inversamente proporcional ao peso do RN.⁶⁻⁸ A LPV é estimada ocorrer em 0,2 -1,1 por 1.000 nascidos vivos. Em crianças com paralisia cerebral, a LPV isolada é incomum, e a lesão da substância branca muitas vezes coexiste com outros padrões neuropatológicos. Embora a LPV seja quase universalmente presente em recém-nascidos prematuros com diplegia espástica, é também evidente em 14% a 85% de bebês nascidos a termo com esse específico déficit motor, o qual é observado em 30% a 60% dos casos.^{2,3,9,10}

1.2. Etiopatogenia e neuropatologia da HPIV e da LPV

A lesão básica da HPIV é o sangramento da matriz germinativa subependimária, local anatômico típico de ocorrência de HPIV em prematuros com menos de 32 semanas de gestação. Durante o desenvolvimento anatômico cerebral, a matriz germinativa é altamente vascularizada, consistindo de células proliferativas frouxamente organizadas que dão origem aos neurônios e neuróglia do córtex cerebral e núcleos da base e localizadas ventrolateralmente aos ventrículos laterais no forame de Monro. A parede vascular é constituída apenas de endotélio, não se observando musculatura lisa, elastina ou colágeno. Após esse período, essa área praticamente desaparece, reduzindo a probabilidade de ocorrer hemorragia.³⁻⁵

A patogênese da HPIV no RN além de ser multifatorial, depende de fatores intravasculares, vasculares e extravasculares:

- Os fatores intravasculares controlam o fluxo sanguíneo e a pressão nos vasos da matriz germinativa, relacionados à interação entre plaquetas e capilares e aos distúrbios de coagulação.
- Os fatores vasculares são inerentes aos vasos da matriz germinativa, os quais são mais susceptíveis ao rompimento e a lesões hipóxico-isquêmicas, uma vez que a matriz germinativa está localizada na fronteira vascular. Os capilares, por apresentarem menor quantidade de células endoteliais e mitocôndrias, requerem mais oxigênio, explicando a suscetibilidade a agressões isquêmicas.
- Os fatores extravasculares acometem o espaço de sustentação da matriz germinativa, pela ausência de estroma que suporte seus vasos. Além disso, há atividade fibrinolítica aumentada na matriz, que é um tecido não permanente e que sofre remodelação, podendo permitir que pequenos focos de hemorragia possam evoluir para lesões maiores.³⁻⁵

A LPV consiste em infarto isquêmico na área da substância branca cerebral adjacente aos ventrículos laterais, ocorrendo comumente em prematuros com menos de 35 semanas de gestação. O diagnóstico é obtido pelo ultrassom (US) cerebral transfontanela, que evidencia inicialmente uma área de ecogenicidade aumentada periventricular, com subsequente desenvolvimento de lesões císticas representando os focos necróticos. Atualmente, com a evolução dos métodos de diagnóstico por imagem, inclusive por Ressonância Magnética (RM) é possível observar um novo padrão conceitual, a leucoencefalopatia cerebral, a qual compreende a LPV cística e o componente da lesão difusa da substância branca cerebral e deve ser empregado atualmente como sinônimo de LPV.¹¹

A necrose periventricular focal é distribuída ao nível da radiação occipital, no trígono dos ventrículos laterais e na substância branca cerebral, ao redor do forame de Monro. As mudanças histológicas ocorrem pela necrose de coagulação, com infiltração microglial, proliferação astrocitária e eventual formação cística. Os cistos são diagnosticados pelo US cerebral quando superiores a 0,2 cm de diâmetro. As cavidades císticas diminuem de tamanho com o tempo, em decorrência da progressão da gliose. As sequelas a longo prazo incluem perda de mielina e dilatação ventricular focal na região do trígono dos ventrículos laterais.¹¹

Os principais fatores para o desenvolvimento da LPV incluem vascularização imatura no limite periventricular, ausência de autorregulação vascular (principalmente da substância branca) e vulnerabilidade da célula precursora oligodendroglial dependente de maturação, que é

lesionada na LPV por radicais livres produzidos durante o processo de isquemia e reperfusão.^{5,12,13}

A hipotensão sistêmica resulta na redução imediata do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e, em função da reatividade imatura da vasculatura cerebral, as consequências são diretas ao tecido neural. Clinicamente, a redução do FSC pode ocorrer no RN em resposta a diversas condições: choque séptico com hipotensão sistêmica, apnéias persistentes, acidose importante, hipocarbia, persistência de canal arterial e cardiopatia congênita grave com baixo débito sistêmico, as quais são exemplos de situações que se associam à LPV.^{11,14,15} O leito vascular da substância branca periventricular apresenta uma resposta vasodilatadora mais limitada que a de outros locais do cérebro, com maior risco para lesão isquêmica por redução do FSC. Na fase de reperfusão, após a isquemia, há queda do FSC e perda de sua autorregulação, o que aumenta ainda mais o risco de isquemia das regiões limítrofes da substância branca.^{11,14,15}

Em função disso, a hipóxia perinatal, a prematuridade e a perfusão cerebral insuficiente são as principais causas da lesão cerebral^{5,12,13} e, a ocorrência de LPV em recém-nascidos a termo, provavelmente envolve mecanismos similares ao do recém-nascido prematuro, relativos a lesão isquêmica pré-natal no início do terceiro trimestre.⁹

Além desses fatores, níveis elevados de citocinas como Fator de Necrose Tumoral- α (*TNF- α*) e interleucinas (IL), IL-1 β , IL-6, IL-8, no sangue do cordão umbilical, no líquido e em tecidos cerebrais de RNPT e RNT, têm sido recentemente associados à subsequente LPV, sugerindo que o seu desenvolvimento se inicia no período pré-natal.¹⁶⁻²³

1.3. Localização e classificação

Em RNPT as HPIV mais frequentes são a subependimária, intraventricular ou intraparenquimatosa, enquanto que no RNT, a hemorragia intracraniana é rara, localizando-se nos espaços subdural e subaracnóide, no córtex cerebral e/ou plexo coróide. Por outro lado, na LPV a localização mais comum inclui a substância branca peritrigonal occipital adjacente ao forame interventricular, na coroa radiada, onde se encontram as artérias ventriculopetais e ventriculofugais, consideradas as áreas de fronteira ou áreas de irrigação no cérebro do RN prematuro.²⁴

A gravidade de HPIV em RNPT pode ser avaliada de acordo com a classificação de Papile *et al* (1978)²⁵, a qual foi estabelecida com base na localização topográfica da hemorragia e na presença de dilatação ventricular, sendo considerados os graus I e II leve, grau III moderado e IV grave:

- Grau I - hemorragia é de matriz germinativa ou periventricular isolada.
- Grau II - hemorragia é de matriz germinativa e intraventricular, sem dilatação ventricular.
- Grau III - hemorragia é de matriz germinativa e intraventricular, com dilatação ventricular.
- Grau IV - ocorre qualquer das três situações acima citadas associadas à hemorragia intraparenquimatosa cerebral.

Com o aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos por imagem como ultrassom (US),²⁶ US com Doppler,²⁷ tomografia computadorizada (TC),²⁸ ressonância magnética (RM) e espectroscopia de prótons por RM,²⁹ maior número de prematuros com HPIV e LPV têm sido diagnosticados, especialmente aqueles com menos de 32 semanas de gestação, propiciando o diagnóstico morfológico, prognóstico, além do auxílio na conduta terapêutica e melhora na sobrevida. O estudo do US com Doppler, além de possibilitar o diagnóstico por imagem da LPV, fornece informações relativas à perfusão cerebral vascular. A RM fornece neuroimagens que possibilitam melhor visibilização das fases de desenvolvimento da LPV: 1) necrose; 2) reabsorção e 3) formação de cicatriz ou cisto glial.³⁰

Em relação aos aspectos ultrassonográficos da LPV, utiliza-se a classificação em quatro graus, proposta por De Vries et al, 1992:³¹

- Grau I - Hiperecogenicidade periventricular persistindo por mais de 7 dias.
- Grau II - Cistos localizados nos ângulos externos dos ventrículos laterais.
- Grau III - Cistos em toda a extensão da substância branca periventricular fronto-parietal e/ou occipital.
- Grau IV - Cistos extensivos à substância branca subcortical.

A presença de imagens císticas desde o nascimento ou hiperecogenicidade anormal evoluindo para cistos na 1ª semana, são a favor de origem pré-natal. Por vezes, o aparecimento tardio de dilatação ventricular, na ausência de HPIV, com contornos ventriculares irregulares é a favor de LPV.³²⁻³³

1.4. LPV e Citocinas

Estudos experimentais indicam que a inflamação está envolvida na patogênese da LPV. A cascata inflamatória deflagrada pela isquemia no sistema neural central (SNC) consiste de grande afluxo de leucócitos no local, que incluem neutrófilos e monócitos, além de macrófagos. Participam também dessa cascata, células da micróglia, sendo que a ativação dessas ocorre mais rapidamente no RN (tanto RNPT como também no RNT, quando em hipóxia perinatal) do que em adultos, além de moléculas específicas de adesão intercelular.^{5,20,23,34}

Estudos demonstram que as células progenitoras dos oligodendrócitos (*OPCs*), que é a linhagem celular dominante no período de 24 a 32 semanas de gestação (fase de alto risco para desenvolver LPV), são o alvo principal da lesão celular. Micróglia são células macrofágicas existentes no SNC responsáveis pela resposta imune a lesões cerebrais, mais comumente devido a uma infecção e/ou hipóxia-isquemia, sendo a primeira linha de defesa. A micróglia ativada protege o SNC contra lesões por muitos meios, como destruição de bactérias, fagocitose de restos de células e reparação tecidual.^{5,35}

A ativação descontrolada da micróglia pode causar lesões nos neurônios vizinhos e nas *OPCs*. Na LPV, a micróglia ativada têm sido encontrada em ambas as formas de lesões na substância branca, focais e difusas.³⁶ A micróglia ativada pode liberar uma variedade de moléculas tóxicas, incluindo o óxido nítrico (*NO*), glutamato e citocinas pró-inflamatórias.³⁷⁻³⁹ Como os fatores tóxicos derivados da micróglia variam de simples produtos químicos (por exemplo, *NO*) à pequenas proteínas (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias), o tempo de síntese, liberação e *turnover* desses fatores pela micróglia variam consideravelmente.⁴⁰

Lesões nas *OPCs* pela micróglia ativada pode ocorrer em várias fases (isto é, aguda e tardia). Além da morte celular, a micróglia ativada também pode afetar a biologia dos oligodendrócitos (OLs). O número de OLs maduros depende da proliferação e diferenciação das *OPCs* que são controlados nos locais de crescimento e por fatores secretados pelas células neuronais e gliais, incluindo a micróglia.³⁶ Interferências na proliferação e diferenciação das *OPCs* acarretarão a hipomielinização, pois a lesão da substância branca induzida pela hipóxia-isquemia crônica acarreta a interrupção persistente da maturação das *OPCs* e a falha na diferenciação e produção de mielina,⁴¹ processo esse que ocorre dentro de poucos minutos a algumas horas após a lesão inicial.⁴²

É cada vez mais reconhecido que a ativação da micróglia está envolvida em muitas doenças do SNC^{43,44} incluindo LPV.^{4,45} A característica neuropatológica da LPV é a grande concentração da micróglia ativada além de outros macrófagos que produzem citocinas pró-inflamatórias, que diretamente podem causar a morte celular oligodendroglial ou exacerbar as lesões da substância branca, contribuindo na fisiopatologia da lesão cerebral perinatal, na etiopatogênese da LPV e suas manifestações clínicas subsequentes.^{46,47}

1.4.1. Citocinas

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos e linfócitos. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou

peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). As citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias, fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$, $TNF-\beta$) e fator de transformação do crescimento ($TGF-\beta$).⁴⁸

São moléculas pleiotrópicas (atuam sobre muitos tipos celulares diferentes) e também redundantes (várias citocinas efetuam as mesmas ações), podendo induzir efeitos diferentes sobre as mesmas células alvo de forma separada no tempo ou simultaneamente. Podem também influir na ação de outras citocinas de forma antagonista ou sinérgica. Diferente dos hormônios, as citocinas têm uma atuação parácrina (atuação local, próxima às células que as produzem), ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem), e apenas ocasionalmente entram no sistema circulatório para agirem como mediadores endócrinos. As citocinas são produzidas durante as fases de ativação e efetora da imunidade para mediar e regular positiva ou negativamente a resposta inflamatória e imune, estimulando apenas as células com receptores específicos na membrana da célula alvo, com uma vida média curta.⁴⁸

Assim, as citocinas podem ser caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatório) ou inibidores (anti-inflamatório), dependendo do subtipo de clone de linfócitos Th (*T-helper*) ativados. A descoberta de duas populações de células Th, do tipo 1 e do tipo 2, derivadas da diferenciação de uma célula inicial comum (Th0) em camundongos e humanos, fornece algumas explicações para a expressão recíproca da resposta imune humoral e da mediada por células. As células Th1 têm como principal função a defesa, mediada pelos fagócitos, contra as infecções, especialmente por microorganismos intracelulares (pró-inflamatórias). Quando ativadas, produzem interferon-gama ($INF-\gamma$, citocina característica das células Th1), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15 a IL-18) e TNF .⁴⁸

Em contraste, a função principal das citocinas Th2 ocorre nas reações imunes mediadas por IgE e pelos eosinófilos/mastócitos, produzindo as interleucinas IL-4 e IL-5 (citocinas definidoras das células Th2), IL-9, IL-10, IL-13. As IL-4, IL-10 e IL-3 antagonizam as ações do $INF-\gamma$ e inibem a ativação do macrófago. Por isso, as Th2 podem funcionar como "células supressoras" (anti-inflamatórias) para controlar respostas imunes mediadas por células, particularmente as respostas Th1.⁴⁸

A secreção das diferentes citocinas contribui de forma eficaz para as diferenças entre os subtipos de células T. Assim, a regulação das respostas humoral e celular pode ser explicada em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células Th1 (pró-inflamatória) e Th2 (anti-inflamatória) no decorrer de uma resposta imune.⁴⁸

a) Fator de Necrose Tumoral (*TNF*) e o Gene *TNF*

O *TNF* é o principal mediador da resposta inflamatória aguda estimulando as células endoteliais e os macrófagos a secretarem quimiocinas e os fagócitos mononucleares para o estímulo da secreção da IL-1, iniciando assim a cascata das citocinas. Também chamado de *TNF- α* , para distingui-lo do *TNF- β* (ou linfotoxina), foi originalmente identificado (e assim designado) como uma substância presente no soro de animais tratados com lipopolissacarídeo bacteriano ou endotoxina, que causava necrose de tumores *in vivo*, pela trombose dos vasos sanguíneos do tumor.⁴⁹

O *TNF- α* existe em duas formas: uma transmembrana de 26 Kilodalton (kDa) e outra secretada de 17 kDa, ambas biologicamente ativas. Quando em baixas concentrações, atua sobre os leucócitos e o endotélio para induzir inflamação aguda. Em concentrações intermediárias, medeia os efeitos sistêmicos da inflamação e, em altas concentrações, o *TNF- α* causa as anormalidades patológicas do choque séptico e apoptose celular.⁴⁹

O gene humano *TNF- α* , que codifica o polipeptídeo *TNF*, está localizado no cromossomo 6 (6p21.33) e contém quatro éxons que constituem um segmento de aproximadamente 3,0 quilobases (Kb).⁴⁹

b) Interleucina 1 (IL-1) e o gene *IL-1*

A IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunes, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Há duas formas conhecidas: IL-1 α e IL-1 β , com 31 a 33 kDa cada, que compartilham menos de 30% de homologia entre si, porém ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular e medeiam as mesmas atividades biológicas.⁴⁸

A principal função da interleucina-1, de modo semelhante ao *TNF- α* , é mediar a resposta inflamatória às infecções e a outros estímulos inflamatórios, atuando assim, em conjunto com o *TNF- α* na imunidade inata e na inflamação, pela ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de Prostaglandina E2 (PGE2) no hipotálamo anterior, causando febre, produção da substância-P (SP), NO (pela ativação da enzima sintase de óxido nítrico) e moléculas de adesão endotelial, mas não induz morte apoptótica celular e, mesmo em elevadas concentrações séricas, por si só, não causa choque séptico. A maior concentração de IL-1 encontrada na circulação sanguínea é a de IL-1 β . Quando secretada em baixas concentrações atua como um mediador da inflamação local. Quando em concentrações maiores, exerce efeitos de excitotoxicidade e morte neuronal.^{50,51}

O gene humano *IL-1 β* que codifica o polipeptídeo IL-1 β está localizado no cromossomo 2 (2q14.1) e contém seis éxons.⁵⁰

c) Interleucina 10 (IL-10) e o gene *IL-10*

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado com cerca de 18 kDa, sintetizado em células imunológicas e tecido neural. Inibe as citocinas pró-inflamatórias (Th1), principalmente *TNF- α* , IL-1 β e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN- γ pelas células *natural-killer*. Sendo assim, a IL-10, atuando sobre os macrófagos ativados finaliza essas reações e faz o sistema retornar ao seu estado de repouso à medida que a infecção e o processo inflamatório vão sendo erradicados.⁴⁸

O gene humano *IL-10* que codifica o polipeptídeo IL-10 está localizado no cromossomo 1 (1q32.1) abrangendo um segmento de aproximadamente 5,1 Kb pelos cinco éxons que o constitui.⁵²

1.4.2. Polimorfismos nos genes *TNF- α* , *IL-1 β* e *IL-10* associados à LPV

Conforme referido, a resposta imune, responsável pela defesa do organismo, é determinada pela interação entre moléculas [citocinas, complexo *HLA* (*Human Leukocyte Antigens*)] e células (monócitos, linfócitos) do sistema imunológico. Alterações nos níveis dessas moléculas podem interferir na resposta imune, oferecendo maior proteção ou susceptibilidade a diversas doenças inflamatórias e/ou infecciosas.⁴⁸

Alterações genéticas podem estar associadas a um grau de maior ou menor produção dessas moléculas, ou ainda interferir em sua fisiologia. Algumas dessas alterações genéticas podem ser suficientemente graves para ocasionar doenças, enquanto outras podem ser silenciosas ou gerar mudanças sutis ou subclínicas. Entre essas, destacam-se os polimorfismos genéticos que podem ser definidos como a troca de um nucleotídeo (adenina – A, timina – T, citosina – C e guanina – G) por outro em determinado local de um gene (*locus*), cuja frequência na população geral é superior a 1%.⁵³

A presença de polimorfismos em um determinado gene pode ou não acarretar alterações funcionais. As citocinas e seus receptores são frequentemente codificados por genes altamente polimórficos. Polimorfismos hereditários em genes imunomodulatórios podem contribuir para a variação na função imunológica e na susceptibilidade genética para doenças complexas.^{54,55} Recentemente foi demonstrado que polimorfismos no gene de citocinas que aumentam a intensidade da resposta inflamatória ou que diminuem a produção de citocinas anti-inflamatórias também estão associados ao aumento do risco de nascimento prematuro e todas as afecções decorrentes da síndrome hipóxico-isquêmica como a LPV.^{47,56}

A citocina *TNF- α* é codificada por um gene altamente polimórfico, especialmente em sua região promotora. A substituição de timina na posição –1031 (alelo *TNF*-1031T*) por

citocina (alelo *TNF*-1031C*) na região promotora é um dos polimorfismos que foi recentemente associado à alta produção de *TNF- α* , pela presença do alelo polimórfico, com o consequente desenvolvimento e progressão da LPV em RNPT.⁴⁷

Os níveis da citocina IL-1 β são regulados a nível transcricional e polimorfismos no gene *IL-1 β* são responsáveis não só por influenciar os níveis da citocina IL-1 β , mas também por alterar a susceptibilidade a diversas doenças.⁵⁷ Do mesmo modo do *TNF- α* , o polimorfismo -511C/T, na região promotora do gene *IL-1 β* , tem sido associado à etiopatogênese da LPV em RNPT, devido a alta produção de IL-1 β , pela presença do alelo polimórfico *IL-1 β *-511T*.⁴⁷

Em relação ao gene *IL-10*, alterações na resposta imune têm sido associadas ao polimorfismo -1082G/A, pela baixa produção da citocina anti-inflamatória IL-10, devido a presença da base nitrogenada A na posição -1082 em sua região promotora, fazendo com que ocorra diminuição na resposta anti-inflamatória.^{58,59}

Os fatores associados à persistência de infecção e progressão de doenças, inclusive LPV, não estão ainda completamente compreendidos, no entanto há evidências de que a resposta imune do hospedeiro afete a susceptibilidade às lesões e sua progressão. Os polimorfismos dos genes de citocinas podem potencialmente afetar a progressão da doença por diversos mecanismos, incluindo o controle da produção das mesmas, pela alteração no balanço entre as citocinas pró-inflamatórias (aumento) e anti-inflamatórias (diminuição).^{22,60}

2. OBJETIVOS

Verificar a relação entre os polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* , -511C/T no gene *IL-1 β* e -1082G/A no gene *IL-10* e o risco de LPV em recém-nascidos com e sem esta lesão.

Comparar os genótipos obtidos, pela análise molecular, com os graus de LPV diagnosticados por ultrassom transfontanela.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

De acordo com as Normas Reguladoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/1996 do Ministério da Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP, Parecer nº 216.753/2013) (Anexo 1).

No período de 01/04/2015 a 30/07/2015, foi realizado estudo de caso-controle em corte transversal no qual, dentre o total de 85 RN internados no período nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-Neonatal) e de Cuidados Intermediários (UCI-Neonatal) do Hospital da Criança e Maternidade (HCM) de São José do Rio Preto, SP, foram selecionados 50 recém-nascidos (59%), de ambos os sexos, com diagnóstico ultrassonográfico de LPV. Os 35 (41%) RN restantes não foram selecionados por apresentarem algum dos critérios de exclusão ou falecido durante o período da pesquisa.

Este grupo com LPV foi denominado Grupo Casos e, para a seleção, foram considerados os seguintes critérios de inclusão, sendo obrigatória a presença dos critérios 4 e 5:

- 1) sinais de sofrimento fetal documentado pela monitorização intraparto (MAP), como desacelerações persistentes e/ou bradicardia fetal sustentada ou presença de líquido amniótico meconial.
- 2) escores de Apgar inferior ou igual a 4 ou 5 no primeiro minuto.
- 3) necessidade de ventilação, com pressão positiva no mínimo durante dois minutos, para iniciar esforço respiratório.
- 4) diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica estabelecido pela presença de asfíxia perinatal associada a manifestações neurológicas decorrentes da hipoxemia e isquemia (um ou mais sinais neurológicos anormais como irritabilidade, tremores, alteração de consciência, alterações do tônus e convulsões nas primeiras 24 hs de vida).⁶¹
- 5) diagnóstico de LPV obtido por neuroimagens de US transfontanela.

O Grupo Controle foi constituído por 50 RN, de ambos os sexos, sem quadro de encefalopatia hipóxico-isquêmica, Apgar maior ou igual a sete no primeiro minuto e com US transfontanela sem alterações, nascidos no mesmo período.

Foram excluídos os RN de ambos os grupos com suspeita clínica ou laboratorial de infecção congênita, presença de sepse e/ou meningite, malformação congênita, presença de crises convulsivas sem relação com evento hipóxico e de etiologia não esclarecida, toxicodpendência materna, mães com qualquer infecção do grupo STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes) 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.

Os RN de ambos os grupos foram classificados, de acordo com a idade gestacional, em RN Pós-Termo (≥ 42 sem), RN Termo (38 sem a 41 sem e 6 dias), RNPT Limítrofe (36 sem a 37 sem e 6 dias), RNPT Moderado (31 sem a 35 sem e 6 dias), RNPT Extremo (22 sem a 30 sem e 6 dias).^{62,63}

3.1. Análise por imagem

Cada RN foi submetido a quatro US transfontanela na UTI/UCI-Neonatal ou, quando possível, na Unidade de Ultrassonografia do HCM de São José do Rio Preto, SP. O US foi realizado, sempre pelo mesmo profissional, pela técnica transfontanela anterior e transtemporal pela qual são feitos cortes seriados nos planos coronal (anterior, médio e posterior), sagital (mediano e paramediano) e axial. Com o auxílio do Doppler foram estudadas a anatomia e vasculatura cerebral, demonstrando o polígono de Willis (círculo arterial do cérebro). Os exames foram realizados com todos os cuidados em assepsia do aparelho e do profissional, estando o gel aquecido e o ambiente em temperatura adequada ao RN. Os aparelhos utilizados foram os de modelo ATL-HDI 3000 e ATL-HDI 5000 Sono CT (Philips Medical Systems Company)[®], Botheel, WA, EUA.

Os exames de neuroimagens fazem parte do protocolo de investigação da LPV em RNPT e também em RNT, com eventos hipóxicos, independentemente de pesquisas científicas paralelas.

A gravidade da LPV, em relação aos aspectos ultrassonográficos, nos RN do Grupo Casos foi determinada de acordo com a classificação de De Vries et al, 1992.³¹

3.2. Investigação molecular

Os RN de ambos os grupos foram submetidos à coleta de sangue venoso periférico (0,5 ml, quando possível, em tubo *Vacutainer*[®] contendo *EDTA*), a fim de iniciar o procedimento de investigação molecular.

Para evitar viés na observação molecular e nos resultados finais, todas as amostras de DNA foram analisadas sem o conhecimento das informações obtidas de cada paciente do estudo.

3.2.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue estocadas a 4°C, não por mais que três dias, usando-se o Kit de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™* (*GE Healthcare UK Limited*), de acordo com o protocolo do fabricante, e o procedimento realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Imunomorfologia (LAEPI) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP). O DNA extraído foi armazenado a 4°C por 24 horas antes de ser congelado em freezer -20°C.

3.2.2. Investigação dos polimorfismos:

3.2.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

a) Amplificação da região promotora do gene *TNF-α*

Para se detectar o polimorfismo -1031T/C (*Gene Bank NCBI RefSeqGene: NG_007462.1*), o fragmento do DNA nuclear, que abrange o polimorfismo na região promotora do gene *TNF-α*, foi amplificado pela técnica da PCR. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como TNFA-1031T/C(F) e TNFA-1031T/C(R).⁴⁷

b) Amplificação da região promotora do gene *IL-1β*

Para se detectar o polimorfismo -511C/T (*Gene Bank NCBI RefSeqGene: AY137079*), o fragmento do DNA nuclear, que abrange o polimorfismo na região promotora do gene *IL-1β*, foi amplificado pela técnica da PCR. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como IL-1B-511C/T(F) e IL-1B-511C/T(R).⁴⁷

c) Amplificação da região promotora do gene *IL-10*

Para se detectar o polimorfismo -1082G/A (*Gene Bank NCBI RefSeqGene: X78437.2*), o fragmento do DNA nuclear, que abrange o polimorfismo na região promotora do gene *IL-10*, foi amplificado pela técnica da PCR. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como IL-10-1082G/A(F) e IL-10-1082G/A(R).^{58,59}

Cada uma das três reações da PCR foi processada em ciclador de temperatura (*Bioer Technology®*, Modelo TC-XPG), em reações de 25 µL de volume final, contendo:

- 1) DNA (200-300 ng),
- 2) *primers* - 10 pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)].
- 3) Conjunto de Reagentes *FideliTaq™ PCR MasterMix (2X)* (*GE HEALTHCARE®*) composto por: tampão de PCR 1X [Tris-HCl - 30 mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50 mM], cloreto de magnésio (MgCl₂) - 1,5 mM, *dNTPs* - 0,2 mM de cada

desoxinucleotídeo trifosfato (*dATP*, *dTTP*, *dCTP*, *dGTP*) e *Taq DNA* polimerase - 1,25 U. Protocolo utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Foi utilizado o seguinte ciclo padrão para as reações da *PCR*, com diferença apenas no tempo de anelamento do *primer*, que é sempre específico para cada par utilizado: inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 30 segundos a X°C para anelamento do *primer* (vide respectiva temperatura nos quadros 1 a 3) e 50 segundos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos de cada uma das três reações da *PCR* foram adicionados ao corante de frente de corrida FlashGel™ Loading Dye 5x e submetidos à eletroforese em cassetes de gel de agarose 2% no FlashGel™ DNA System para confirmar o sucesso das mesmas e o gel, fotodocumentado pela FlashGel™ Camera (Lonza Group Ltd Muenchensteinerstrasse 38 CH-4002 Basel Switzerland).

3.2.2.2 Análise de restrição (Técnica da *RFLP*) dos fragmentos amplificados para identificação dos polimorfismos

a) -1031T/C no gene *TNF-α*

O fragmento de 150 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *BbsI* - *Bacillus laterosporus* (New England Biolabs)[®], a 37°C por 1 hora, para detecção do polimorfismo -1031T/C na região promotora do gene.

Quando o polimorfismo está presente em ambos os alelos (amostra homozigota polimórfica), o produto da *PCR* é digerido pela enzima *BbsI* em dois fragmentos de 88 e 62 pb cada, devido o reconhecimento do sítio de restrição enzimático pela substituição das bases nitrogenadas T->C, na posição -1031 do gene *TNF-α*. Quando o polimorfismo está presente em apenas um alelo (amostra heterozigota), o produto da *PCR* do alelo polimórfico é digerido em dois fragmentos de 88 e 62 pb e o do alelo selvagem não é digerido, apresentando este um fragmento de 150 pb. Na ausência do polimorfismo, em ambos os alelos (homozigoto selvagem), o produto da *PCR* não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 150 pb, pois não há o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *BbsI*.

b) -511C/T no gene *IL-1β*

O fragmento de 305 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *AvaI* - *Anabaena variabilis* (New England Biolabs)[®], a 37°C por 1 hora, para detecção do polimorfismo -1031T/C na região promotora do gene.

A digestão do fragmento de amostras sem o polimorfismo -511C/T (homozigota selvagem), produzirá dois fragmentos de 190 pb e 115 pb, devido o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *AvaI*. As amostras homozigotas para o polimorfismo terão apenas o fragmento de 305 pb, pois não haverá reconhecimento do sítio da enzima, pela substituição das bases nitrogenadas C->T na posição -511 do gene *IL-1β*, e as amostras heterozigotas terão três fragmentos: de 305 pb (alelo polimórfico), de 190 e 115 pb (alelo selvagem).

c) -1082G/A no gene *IL-10*

O fragmento de 400 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *BsmFI* - *Bacillus stearothermophilus FI* (New England Biolabs)[®], a 65°C por 1 hora, para detecção do polimorfismo -1082G/A na região promotora do gene.

A digestão do fragmento de amostras sem o polimorfismo -1082G/A (homozigota selvagem), produzirá dois fragmentos de 320 pb e 80 pb, devido o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *BsmFI*. As amostras homozigotas para o polimorfismo terão apenas o fragmento de 400 pb, pois não haverá reconhecimento do sítio da enzima, pela substituição das bases nitrogenadas G->A na posição -1082 do gene *IL-10*, e as amostras heterozigotas terão três fragmentos: de 400 pb (alelo polimórfico), de 320 e 80 pb (alelo selvagem).

Os produtos de cada uma das três reações da *RFLP* foram adicionados ao corante de frente de corrida FlashGel™ Loading Dye 5x e submetidos à eletroforese em cassetes de gel de agarose 2% no FlashGel™ DNA System para confirmar o sucesso das mesmas e o gel fotodocumentado pela FlashGel™ Camera (Lonza Group Ltd Muenchensteinerstrasse 38 CH-4002 Basel Switzerland).

Todos os procedimentos descritos foram realizados somente após concordância e assinatura, pelos pais e/ou responsáveis dos recém-nascidos, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP-FAMERP.

3.3. Análise estatística

Os resultados foram submetidos previamente à estatística descritiva para determinação da normalidade. Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para amostras independentes com distribuição não normal. Quando aplicáveis, foram utilizados os testes do *Chi-square* ou Exato de Fisher para comparação entre as variáveis. O *odds ratio* (*OR*) com intervalo de confiança de 95% (IC-95%) foi utilizado para determinar o fator de risco à LPV pelos polimorfismos analisados. Valores de *OR* menores que 1,0, quando significativos, indicam uma associação de proteção entre o polimorfismo avaliado e a doença, isto é, a presença de uma determinada

variante pode auxiliar para que a LPV não se desenvolva. Valores iguais a 1,0 não são significativos e representam que a probabilidade de desenvolvimento da doença não difere entre os grupos considerados. Entretanto, valores significativamente acima de 1,0 indicam que a presença do polimorfismo está associada a maior risco de desenvolver a LPV.

O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os resultados foram expressos em porcentagens (%), média (M) e desvio padrão (DP). Os testes estatísticos foram realizados usando o programa GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software Inc, San Diego California USA, www.graphpad.com.

4. RESULTADOS

4.1. Características Demográficas (Tabela 1)

Considerando os dados demográficos dos 50 casos índice (com LPV) e dos 50 controles, houve maior prevalência do sexo masculino (62%) nos casos índice e o sexo feminino foi o predominante no grupo controle em 54% dos casos, sendo esta diferença não significativa ($p=0,1598$).

Em relação à classificação do RN de acordo com idade gestacional, no Grupo Casos houve maior prevalência de RNPT extremo (48%) seguido de RNPT moderado (40%).

Quatro RN a Termo (8%) apresentaram quadro encefalopatia hipóxico-isquêmica, com documentada LPV, sendo incluídos no Grupo Casos. Nos controles, 96% são RNT e 4% RN Pós-Termo. A análise estatística para esta variável demográfica mostrou significância entre os grupos ($p<0,0001$).

Quanto ao tipo de parto, ambos os Grupos apresentaram maior prevalência do parto cirúrgico, mas sem significância estatística ($p=0,0928$).

Em relação ao tipo de nascimento, houve maior prevalência de nascimento único no Grupo Controle (98%), tendo o Grupo Casos maior prevalência de nascimento múltiplo (gemelar-14%), quando comparado ao Grupo Controle, sendo esta diferença significativa ($p=0,0496$).

Tabela 1. Distribuição, em porcentagens, das características demográficas entre casos e controles.

Variáveis	Casos N=50 (%)	Controles N=50 (%)	p
Sexo			
Masculino	31 (62)	23 (46)	0,1598*
Feminino	19 (38)	27 (54)	
Classificação do RN			
RN Pós-Termo	0 (0)	2 (4)	NA
RN Termo	4 (8)	48 (96)	
RNPT Limítrofe	2 (4)	0 (0)	
RNPT Moderado	20 (40)	0 (0)	
RNPT Extremo	24 (48)	0 (0)	
Tipo de Parto			
Natural	13 (26)	22 (44)	0,0928*
Cirúrgico	37 (74)	28 (56)	
Tipo Nascimento			
Único	N=44 (%) 38 (86)	N=49 (%) 48 (98)	0,0496*
Múltiplo (Gemelar)	6 (14)	1 (2)	

*Teste Exato de Fisher.

NA - não analisado.

4.2. Características Clínicas (Tabela 2)

Em relação às características clínicas, a idade gestacional média entre casos e controles foi, respectivamente, de 31,0 semanas e 39,4 semanas, sendo esta diferença significativa ($p < 0,0001$).

O peso médio, em gramas, foi de 1561,1 para os casos e 3509,9 para controles com significância estatística ($p < 0,0001$).

Quanto ao índice de Apgar no 1º minuto, o valor médio foi de 4,30 para casos e 8,44 para controle e no 5º minuto, o valor médio foi, respectivamente, de 7,44 e 9,42, tendo diferença estatística ($p < 0,0001$) para ambas as variáveis.

Em relação ao tempo médio de internação, foram 56,32 dias para casos e 1,6 dias para controles, com significância estatística ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Distribuição das características clínicas de casos e controles.

Variáveis	Casos	Controles	<i>p</i>
IG (sem)			
Média (\pm DP)	31,0 (\pm 3,7)	39,4 (\pm 1,2)	<0,0001*
Mínimo	25	38	
Máximo	39	42,5	
Mediana	31	39,1	
Peso (g)			
Média (\pm DP)	1561,1 (\pm 927,98)	3509,9 (\pm 320,09)	<0,0001*
Mínimo	630	2870	
Máximo	4130	4020	
Mediana	1265	3552	
Apgar 1º minuto			
Média (\pm DP)	4,30 (\pm 1,38)	8,44 (\pm 1,11)	<0,0001*
Mínimo	0	7	
Máximo	5	10	
Mediana	5	8	
Apgar 5º minuto			
Média (\pm DP)	7,44 (\pm 1,96)	9,42 (\pm 0,57)	<0,0001*
Mínimo	0	8	
Máximo	9	10	
Mediana	8	9	
Tempo Int (dias)			
Média (\pm DP)	56,32 (\pm 30,64)	1,6 (\pm 0,57)	<0,0001*
Mínimo	15	1	
Máximo	170	3	
Mediana	57	2	

*Teste de *Mann-Whitney*.

DP: Desvio Padrão.

IG (sem): Idade Gestacional (semanas).

g: gramas. Int: internação

4.3. Diagnósticos Ultrassonográficos (Tabela 3)

O US transfontanela permitiu o diagnóstico de LPV nos RN selecionados para o Grupo Casos e sua classificação em Graus.³¹ A LPV Grau I foi a mais prevalente, ocorrendo em 46% dos RN seguida da LPV Grau III, em 32% dos casos. Não houve casos com LPV Grau IV.

Também foram diagnosticadas outras alterações como a HPIV, classificada em Graus,²⁵ em 76% dos casos e Hidrocefalia em 40%. A HPIV Grau I acometeu 30% dos casos, seguida da HPIV Graus III e IV em 18% dos casos para cada um destes graus.

Tabela 3. Distribuição, em porcentagens, dos diagnósticos ultrassonográficos (transfontanela) no Grupo Casos.

Diagnósticos Ultrassonográficos	
LPV	Casos n=50 (%)
Grau I	23 (46)
Grau II	11 (22)
Grau III	16 (32)
Grau IV	0 (0)
Outras Alterações ao US	
Hemorragia Peri-intraventricular	
Grau I	15 (30)
Grau II	5 (10)
Grau III	9 (18)
Grau IV	9 (18)
Total	38 (76)
Hidrocefalia	20 (40)

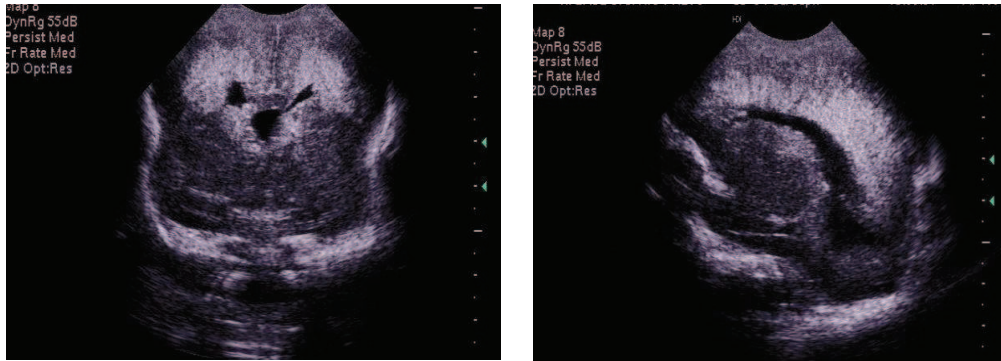
LPV- Leucomalácia periventricular.

US- Ultrassom transfontanela.

As figuras, a seguir, representam as imagens ultrassonográficas referentes aos Graus da LPV encontradas nos RN do Grupo Casos.

Grau I

Hiperecogenicidade periventricular bilateral

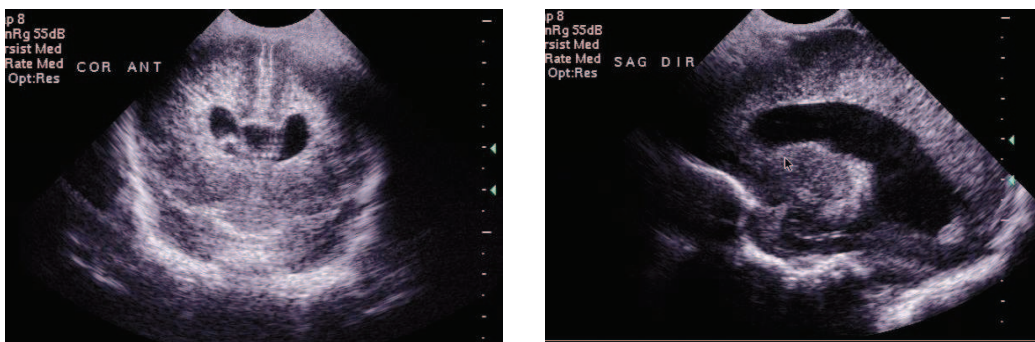


Acervo do Departamento de Imagem, FAMERP-FUNFARME, 2009

Figura 1. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau I.

Grau II

Cistos nos ângulos externos dos ventrículos laterais

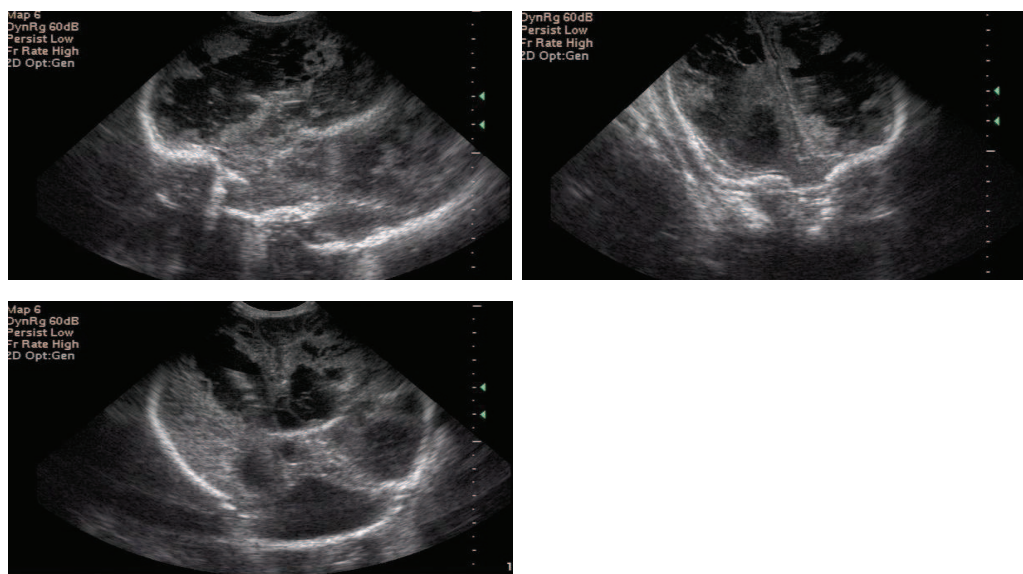


Acervo do Departamento de Imagem, FAMERP-FUNFARME, 2009

Figura 2. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau II.

Grau III/IV

Cistos em toda a extensão da substância branca periventricular fronto-parietal ou occipital / subcortical



Acervo do Departamento de Imagem, FAMERP-FUNFARME, 2009

Figura 3. Imagem de US transfontanela de Leucomalácia Periventricular Grau III.

4.4. Extração do *DNA* genômico

Foi possível a extração do DNA genômico, a partir de leucócitos de sangue periférico, de todas as amostras de ambos os grupos do estudo (n=100 - 100%) (Figura 4).

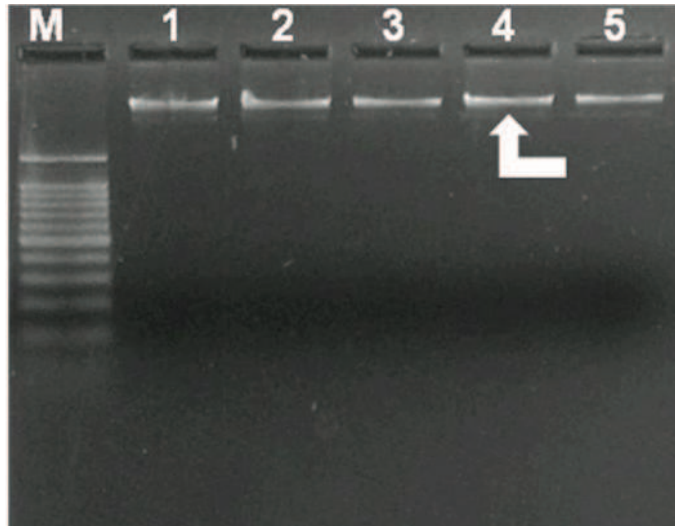


Figura 4. Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M-marcador 100 pb (Ladder[®]).

4.5. Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*)

a) Amplificação da região promotora do gene *TNF- α*

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 150 pb que abrange a região polimórfica, em todas as amostras analisadas de ambos os Grupos do estudo (n=100 - 100%) (Figura 5).

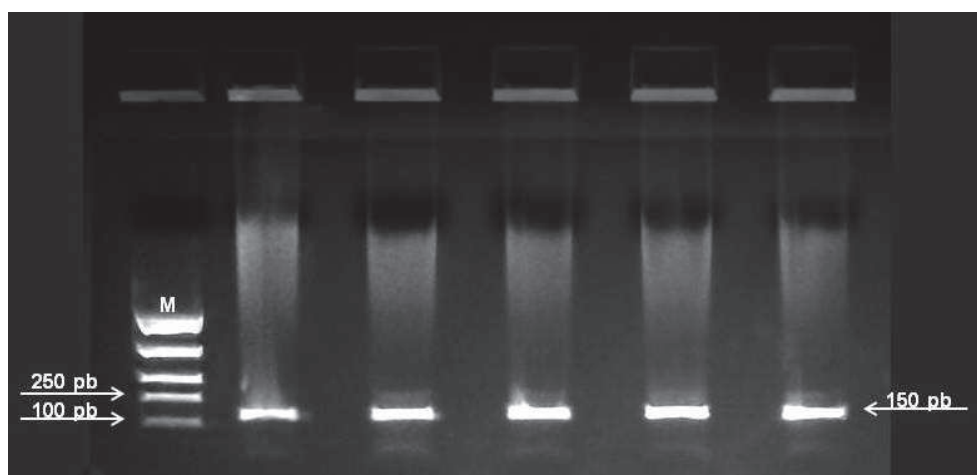


Figura 5. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 150 pb amplificado da região promotora do gene *TNF- α* , em gel de agarose 2%. M-Marcador FlashGel[®] Quant Ladder 100 pb.

b) Amplificação da região promotora do gene *IL-1 β*

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 305 pb que abrange a região polimórfica, em todas as amostras analisadas de ambos os Grupos do estudo (n=100 - 100%) (Figura 6).

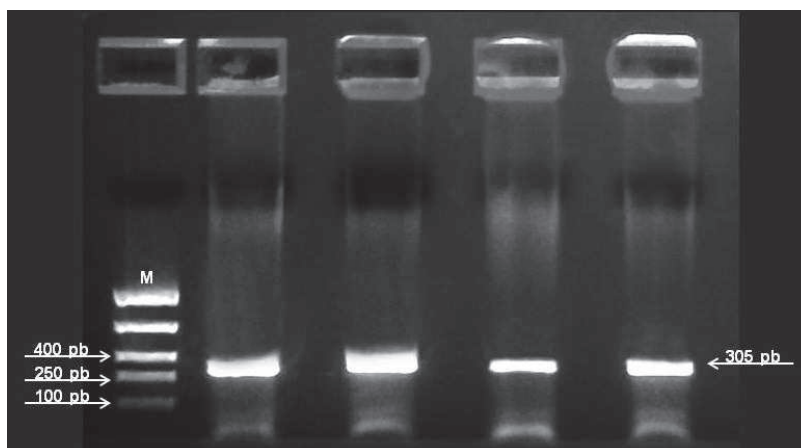


Figura 6. Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 305 pb amplificado da região promotora do gene *IL-1 β* , em gel de agarose 2%. M-Marcador FlashGel[®] Quant Ladder 100 pb-1,5 kb.

c) Amplificação da região promotora do gene *IL-10*

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 400 pb que abrange a região polimórfica, em todas as amostras analisadas de ambos os Grupos do estudo (n=100 - 100%) (Figura 7).

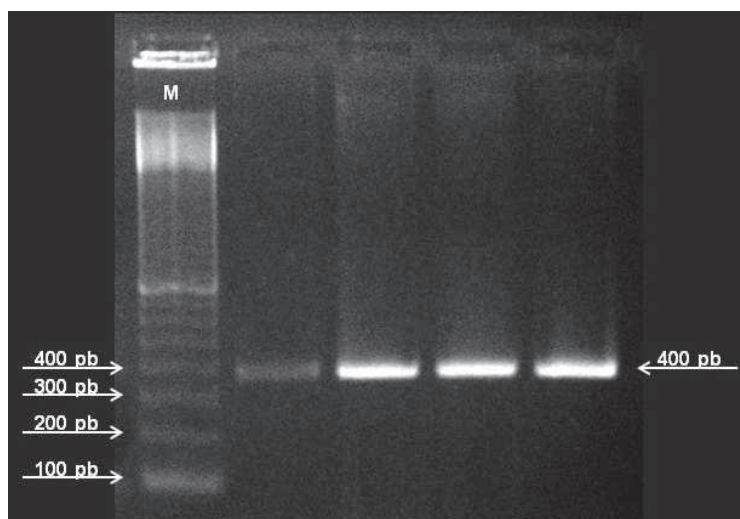


Figura 7. Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 400 pb amplificado da região promotora do gene *IL-10*, em gel de agarose 2%. M-marcador 100 pb (Ladder[®]).

4.6. Técnica da *RFLP* (Digestão Enzimática) dos fragmentos amplificados para identificação dos polimorfismos

a) -1031T/C no gene *TNF- α* (Figura 8)

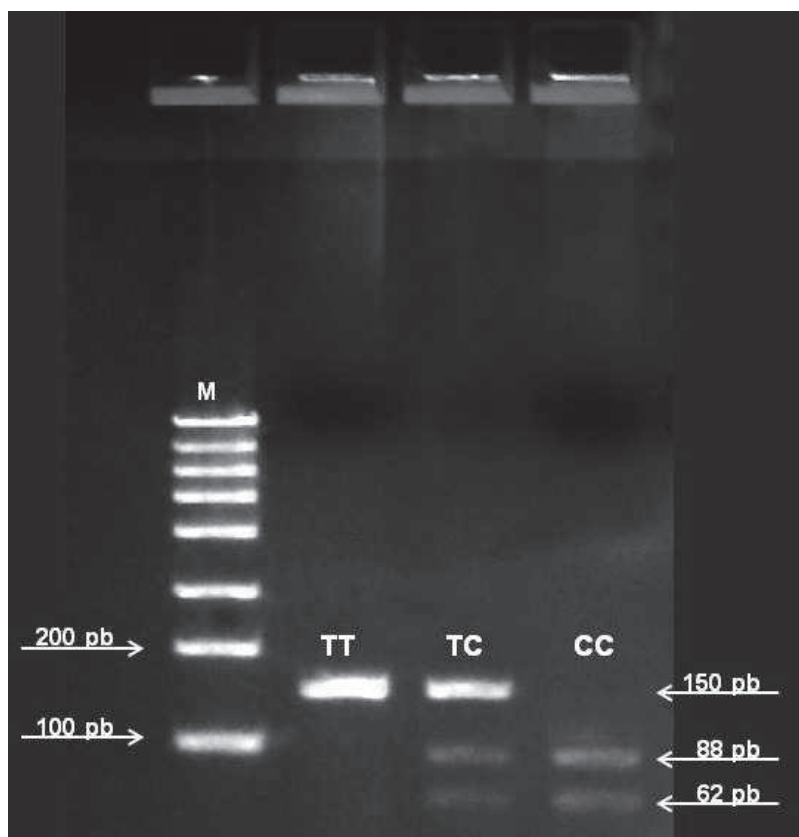


Figura 8. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 150, 88 e 62 pb da região promotora do gene *TNF- α* , em gel de agarose 2%. TT-homozigoto selvagem; TC-heterozigoto; CC-homozigoto polimórfico. M-Marcador FlashGel[®] Quant Ladder 100 pb.

Os resultados genotípicos obtidos expressam os seguintes fenótipos:

- TT - relacionado ao fenótipo de baixo produtor da citocina inflamatória *TNF- α* , isto é, produção de quantidades suficientes para mediar a resposta inflamatória sem as consequências inerentes a intermediária e a alta produção.
- TC - relacionado ao fenótipo de produtor intermediário da citocina inflamatória *TNF- α* .
- CC - relacionado ao fenótipo de alto produtor da citocina inflamatória *TNF- α* .

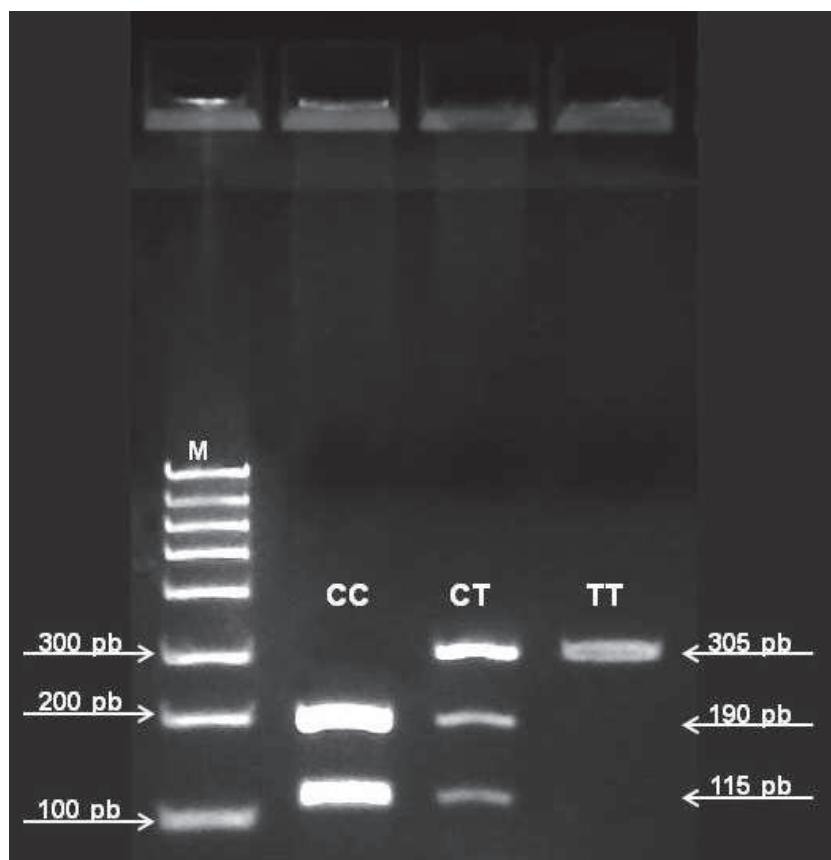
b) -511C/T no gene *IL-1 β* (Figura 9)

Figura 9. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 305, 190 e 115 pb da região promotora do gene *IL-1 β* , em gel de agarose 2%. CC-homozigoto selvagem; CT-heterozigoto; TT-homozigoto polimórfico. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb.

Os resultados obtidos expressam os seguintes genótipos correlacionados aos fenótipos:

- CC - relacionado ao fenótipo de baixo produtor da citocina inflamatória *IL-1 β* , isto é, produção de quantidades suficientes para mediar a resposta inflamatória sem as consequências inerentes a intermediária e a alta produção.
- CT - relacionado ao fenótipo de produtor intermediário da citocina inflamatória *IL-1 β* .
- TT - relacionado ao fenótipo de alto produtor da citocina inflamatória *IL-1 β* .

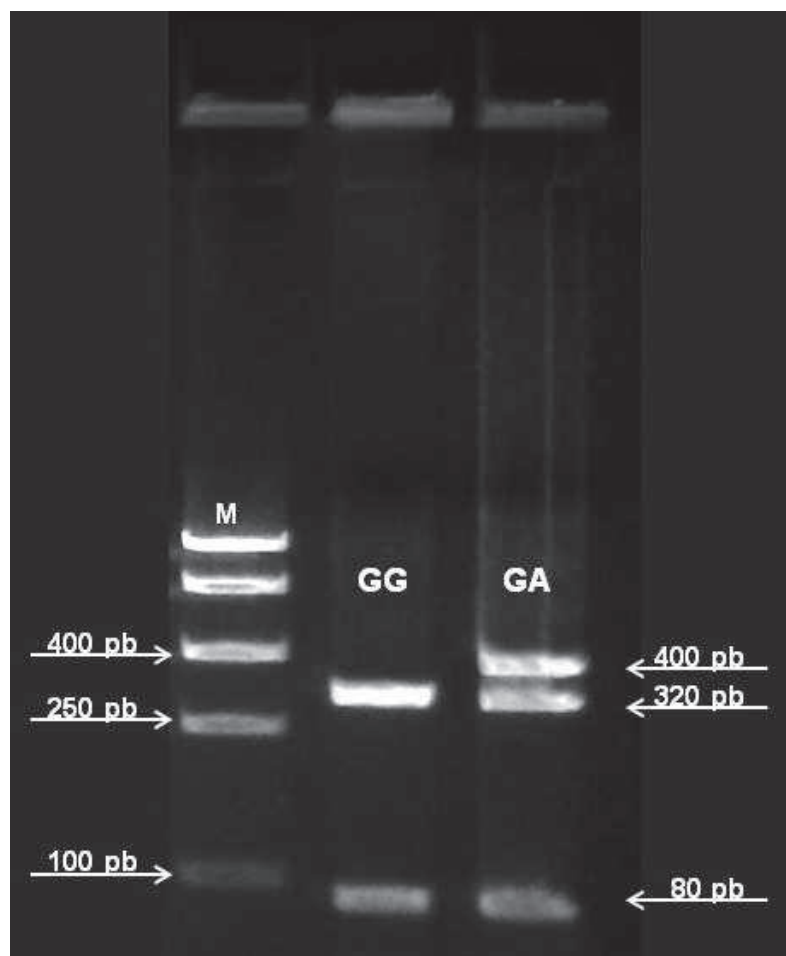
c) -1082G/A no gene *IL-10* (Figura 11)

Figura 10. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 400, 320 e 80 pb da região promotora do gene *IL-10*, em gel de agarose 2%. GG-homozigoto selvagem; GA-heterozigoto. M-Marcador FlashGel® Quant Ladder 100 pb.

Os resultados obtidos expressam os seguintes genótipos correlacionados aos fenótipos:

- GG - relacionado ao fenótipo de alto produtor da citocina anti-inflamatória *IL-10*, isto é, produção de quantidades suficientes para mediar a resposta inflamatória, pela inibição das citocinas inflamatórias, sem as consequências inerentes a intermediária e a baixa produção.
- GA - relacionado ao fenótipo de produtor intermediário da citocina anti-inflamatória *IL-10*.
- AA - relacionado ao fenótipo de baixo produtor da citocina anti-inflamatória *IL-10*.

A Tabela 4 apresenta as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos analisados nos 100 RN da casuística.

Tabela 4. Distribuição, em porcentagens, dos genótipos e alelos dos polimorfismos analisados entre Casos e Controles.

Gene/ Polimorfismo	Genótipos/ Alelos	Casos N=50 (%) Alelos N=100 (%)	Controles N=50 (%) Alelos N=100 (%)	OR (95% IC)	<i>p</i>
<i>TNF-α</i> -1031T/C	TT	22 (44)	33 (66)	0,4048 0,18-0,91	0,044
	TC	27 (54)	16 (32)	2,495 1,10-5,63	0,043
	CC	01 (02)	01 (02)	1,000 0,06-16,4	1,505
	TC+CC	28 (56)	17 (34)	2,471 1,10-5,55	0,044
	T	71 (71)	82 (82)	0,5374 0,27-1,05	0,095
	C	29 (29)	18 (18)	1,861 0,95-3,63	0,095
<i>IL-1β</i> -511C/T	CC	0 (0)	09 (18)	0,04325 0,002-0,76	0,003
	CT	38 (76)	30 (60)	2,111 0,89-4,99	0,133
	TT	12 (24)	11 (22)	1,120 0,44-2,84	1,000
	CT+TT	50 (100)	41 (82)	23,120 1,31-409,4	0,003
	C	38 (38)	48 (48)	0,6640 0,38-1,17	0,198
	T	62 (62)	52 (52)	1,506 0,86-2,64	0,198
<i>IL-10</i> -1082G/A	GG	02 (4)	18 (36)	0,07407 0,02-0,34	< 0,0001
	GA	48 (96)	32 (64)	13,500 2,93-62,2	< 0,0001
	AA	0 (0)	0 (0)	-	-
	GA+AA	48 (96)	32 (64)	13,500 2,93-62,2	< 0,0001
	G	52 (52)	68 (68)	0,5098 0,29-0,91	0,030
	A	48 (48)	32 (32)	1,962 1,10-3,49	0,030

OR - Odds ratio.

IC - Intervalo de confiança.

Alelos polimórficos em negrito.

Em relação ao polimorfismo -1031T/C do gene *TNF- α* , o genótipo homozigoto selvagem TT (baixo produtor de citocina inflamatória) foi significativamente mais prevalente nos controles, indicando um fator 2,45 vezes maior de proteção ou de menor risco de LPV (OR: 0,408; 95%IC: 0,18-0,91; p=0,044). O genótipo heterozigoto TC (produtor intermediário de citocina inflamatória) foi significativamente associado ao risco de LPV (OR: 2,495; 95%IC: 1,10-5,63; p=0,043). O genótipo homozigoto polimórfico CC (alto produtor de citocina inflamatória) foi encontrado na mesma baixa prevalência (2%) em ambos os grupos, mas sem significância estatística (OR: 1,000; 95%IC: 0,06-16,45; p=1,505). Mas, quando analisado em conjunto com o genótipo TC (TC+CC) foi encontrada associação significativa ao risco de LPV (OR: 2,471; 95%IC: 1,10-5,55; p=0,044). O alelo selvagem T foi associado (não significativamente) em 1,9 vezes mais ao fator de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,5374; 95%IC: 0,27-1,05; p=0,095). Em relação ao alelo polimórfico C, o mesmo foi associado (mas não significativamente) ao risco de LPV (OR: 1,861; 95%IC: 0,95-3,63; p=0,095).

O genótipo homozigoto selvagem CC (baixo produtor de citocina inflamatória), do polimorfismo -511C/T do gene *IL-1 β* , foi encontrado somente nos controles (18%), indicando um fator significativo 23 vezes maior de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,04325; 95%IC: 0,002-0,76; p=0,003). Os genótipos heterozigoto CT + homozigoto polimórfico TT (produtores intermediário e alto de citocina inflamatória, respectivamente), quando analisados em conjunto, foram associados, significativamente, ao risco de LPV (OR: 23,120; 95%IC: 1,31-409,4; p=0,003). Quando analisados isolados, os genótipos CT e TT foram associados ao risco de LPV, mas sem significância estatística (respectivamente, OR: 2,111; 95%IC: 0,89-4,99; p=0,133 e OR: 1,120; 95%IC: 0,44-2,84; p=1,00). O alelo selvagem C foi associado (mas não significativamente) em 1,5 vezes mais ao fator de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,6640; 95%IC: 0,39-1,17; p=0,198). Em relação ao alelo polimórfico T, o mesmo foi associado (mas não significativamente) ao risco de LPV (OR: 1,506; 95%IC: 0,86-2,64; p=0,198).

Quanto ao polimorfismo -1082G/A do gene *IL-10*, o genótipo homozigoto selvagem GG (alto produtor de citocina anti-inflamatória) foi significativamente associado em 13,5 vezes mais ao fator de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,07407; 95%IC: 0,02-0,34; p<0,0001). O risco de LPV teve associação significativa ao genótipo heterozigoto GA (produtor intermediário de citocina anti-inflamatória) (OR: 13,500; 95%IC: 2,93-62,2; p<0,0001). O genótipo homozigoto polimórfico AA (baixo produtor de citocina anti-inflamatória) não foi encontrado em ambos os grupos. O alelo selvagem G foi significativamente associado em 1,9 vezes mais ao fator de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,5098; 95%IC: 0,29-0,91; p=0,030), e o alelo polimórfico A foi significativamente associado ao risco de LPV (OR: 1,962; 95%IC: 1,10-3,49; p=0,030).

Os genótipos dos três polimorfismos *TNF- α* -1031T/C, *IL-1 β* -511C/T e *IL-10*-1082G/A foram combinados entre si e comparados aos RN de ambos os Grupos a fim de verificar qual combinação estaria associada ao fator de proteção ou ao risco de LPV. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição, em porcentagens, das combinações entre os genótipos *TNF- α* -1031T/C, *IL-1 β* -511C/T e *IL-10*-1082G/A e os RN dos Grupos Casos e Controles.

Combinação Genótipos			Casos	Controles	OR	P
<i>TNF-α</i> -1031T/C	<i>IL-1β</i> -511C/T	<i>IL-10</i> -1082G/A	N=50 (%)	N=50 (%)	(95% IC)	
TT	CT	GG	2 (4)	6 (12)	0,3056 0,056-1,59	0,269
TT	TT	GG	0	3 (6)	0,1344 0,007- 2,7	0,242*
TT	CC	GA	0	6 (12)	0,06778 0,004-1,24	0,027*
TT	CT	GA	17 (34)	15 (30)	1,202 0,52-2,79	0,830
TT	TT	GA	3 (6)	3 (6)	1,000 0,192-5,21	1,322
TC	CC	GG	0 (0)	2 (4)	0,1921 0,009-4,11	0,495*
TC	CT	GG	0 (0)	5(10)	0,08191 0,004-1,52	0,056*
TC	TT	GG	0 (0)	2 (4)	0,1921 0,009-4,11	0,495*
TC	CC	GA	0 (0)	1 (2)	0,3267 0,013-8,22	1,000*
TC	CT	GA	18 (36)	4 (8)	6,469 2,00-20,92	0,001
TC	TT	GA	9 (18)	2 (4)	5,268 1,08-25,79	0,051
CC	CT	GA	1 (2)	0 (0)	3,061 0,12-77,01	1,000*
CC	TT	GA	0 (0)	1 (2)	0,3267 0,013-8,22	1,000*

*Com correção de Haldane.

OR - Odds ratio.

IC - Intervalo de confiança.

Alelos polimórficos em negrito.

Os genótipos combinados são apresentados sempre nesta ordem respectiva aos polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* , -511C/T no gene *IL-1 β* e -1082G/A no gene *IL-10*.

A combinação TT/CC/GA foi significativamente associada em 14,7 vezes mais ao fator de proteção ou menor risco de LPV (OR: 0,06778; 95%IC: 0,004-1,24; p=0,027).

A combinação **TC/CT/GA** foi significativamente associada ao risco de LPV (OR: 6,469; 95%IC: 2,00-20,92; p=0,001).

As combinações **TT/CT/GA** e **TC/TT/GA** foram, respectivamente, associadas ao risco de LPV, mas sem significância estatística (OR: 1,202; 95%IC: 0,52-2,79; p=0,830 e OR: 5,268; 95%IC: 1,08-25,79; p=0,051).

Os Graus I e II da LPV, pela classificação ultrassonográfica, foram agrupados em Graus I/II e o Grau III compôs outra variável a fim de serem comparadas aos genótipos encontrados dos três polimorfismos analisados nos RN do Grupo Casos, não havendo relação significativa entre as variáveis (Tabela 6). O Grau IV não foi agrupado ao Grau III, pois não houve casos.

Tabela 6. Distribuição, em porcentagens, entre Graus de LPV e os genótipos dos três polimorfismos analisados no Grupo Casos (N=50).

Genótipos	LPV GRAUS I/II n=34 (68%)	LPV GRAU III n=16 (32%)	p
TNF-α -1031T/C			
TT	15 (30)	7 (14)	0,7815*
TC	18 (36)	9 (18)	
CC	1 (2)	0 (0)	
IL-1β -511C/T			
CT	25 (50)	13 (26)	0,7278 [†]
TT	9 (18)	3 (6)	
IL-10 -1082G/A			
GG	1 (2)	1 (2)	0,5420 [†]
GA	33 (66)	15 (30)	

* Teste do qui-quadrado.

[†]Teste exato de Fisher.

Alelos polimórficos em negrito.

A Tabela 7 apresenta a distribuição das combinações dos genótipos **TNF- α -1031T/C**, **IL-1 β -511C/T** e **IL-10-1082G/A** nos RN analisados do Grupo com LPV comparando entre a presença ou não do Grau III de LPV, pela maior gravidade do mesmo. Conseqüentemente, os casos sem LPV Grau III são aqueles que foram diagnosticados com Graus I/II.

Tabela 7. Distribuição, em porcentagens, das combinações entre os genótipos TNF- α -1031T/C, IL-1 β -511C/T e IL-10-1082G/A e os RN com e sem LPV Grau III.

Combinação Genótipos			Casos	Casos	OR	<i>p</i>
TNF- α	IL-1 β	IL-10	com LPV	sem LPV	(95% IC)	
-1031T/C	-511C/T	-1082G/A	Graus III	Graus III		
			N=16(32%)	N=34(68%)		
					2,200	0,542
TT	CT	GG	1 (2)	1 (2)	0,129-37,6	
					0,3297	0,200
TT	CT	GA	3 (6)	14 (28)	0,079-1,38	
					17,889	0,029*
TT	TT	GA	3 (6)	0 (0)	0,86-370,2	
					3,571	0,059
TC	CT	GA	9 (18)	9 (18)	1,03-12,44	
					0,08134	0,043*
TC	TT	GA	0 (0)	9 (18)	0,004-1,49	
					0,6768	1,000*
CC	CT	GA	0 (0)	1 (2)	0,03-17,56	

*Com correção de Haldane.

OR - Odds ratio.

IC - Intervalo de confiança.

Alelos polimórficos em negrito.

A combinação **TT/TT/GA** foi significativamente associada ao risco de LPV Grau III (OR: 17,889; 95%IC: 0,86-370,2; $p=0,029$).

A combinação **TC/TT/GA** foi significativamente associada em 12,3 vezes mais ao risco de LPV Graus I/II = casos sem LPV Grau III (OR: 0,8134; 95%IC: 0,004-1,49; $p=0,043$). Da mesma forma, a combinação **TT/CT/GA** foi associada em três vezes mais ao risco de LPV Graus I/II, mas sem significância estatística (OR: 0,3297; 95%IC: 0,079-1,38; $p=0,200$).

A mesma prevalência (18%) foi encontrada para a combinação **TC/CT/GA**, mas indicando risco para LPV Grau III sem significância estatística (OR: 3,571; 95%IC: 1,03-12,44; $p=0,059$).

Os RN do Grupo Casos com e sem HPIV foram comparados aos genótipos dos três polimorfismos analisados e, apesar de maiores prevalências genótípicas em todos os Casos com HPIV, a comparação entre as variáveis não se mostrou significativa (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição, em porcentagens, entre os RN com e sem HPIV e os genótipos dos três polimorfismos analisados no Grupo Casos (N=50).

Genótipos	Casos com HPIV n=38 (76%)	Casos sem HPIV n=12 (24%)	<i>p</i>
TNF-α -1031T/C			
TT	18 (36)	4 (8)	1,193*
TC	19 (38)	8 (16)	
CC	1 (2)	0 (0)	
IL-1β -511C/T			
CT	29 (58)	9 (218)	1,000 [†]
TT	9 (18)	3 (6)	
IL-10 -1082G/A			
GG	1 (2)	1 (2)	0,426 [†]
GA	37 (74)	11 (22)	

* Teste do qui-quadrado.

[†]Teste exato de Fisher.

Alelos polimórficos em negrito.

Foram também relacionadas à presença ou não de HPIV, as combinações dos três polimorfismos analisados no Grupo Casos (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição, em porcentagens, entre os genótipos dos três polimorfismos analisados e os RN do Grupo Casos com e sem HPIV (N=50).

Combinação Genótipos			Casos com HPIV N=38(76%)	Casos sem HPIV N=12(24%)	OR (95% IC)	<i>p</i>
TNF- α -1031T/C	IL-1 β -511C/T	IL-10 -1082G/A				
TT	CT	GG	1 (2)	1 (2)	0,2973 0,02-5,155	0,426
TT	CT	GA	14 (28)	3 (6)	1,750 0,45-7,56	0,510
TT	TT	GA	3 (6)	0 (0)	2,465 0,12-51,2	1,000*
TC	CT	GA	13 (26)	5 (10)	0,7280 0,19-2,75	0,735
TC	TT	GA	6(12)	3 (6)	0,5625 0,12-2,71	0,667
CC	CT	GA	1 (2)	0 (0)	1,000 0,04-26,2	1,000*

*Com correção de Haldane.

OR - Odds ratio

IC - Intervalo de confiança

Alelos polimórficos em negrito

As combinações TT/CT/GA e TC/CT/GA foram as mais prevalentes nos casos com HPIV, mas o risco não teve significância estatística (respectivamente, OR: 1,750; 95%IC: 0,45-7,56; $p=0,510$ e OR: 0,7280; 95%IC: 0,19-2,75; $p=0,735$).

A associação entre os Graus da LPV e os genótipos obtidos com a frequência de óbitos não foi realizada, pois não houve falecimento dos RN do Grupo Casos no período do estudo, não permitindo, portanto, análise estatística.

5. DISCUSSÃO

Apesar de recentes avanços na monitorização biofísica e bioquímica do feto durante o trabalho de parto e no momento do nascimento, a asfixia perinatal ainda contribui intensamente na morbidade e mortalidade neonatal, ocorrendo em dois a cinco recém-nascidos para cada 1.000 nascimentos vivos.^{1,2}

É o resultado de diversas condições que pode interferir com a troca de gases fetoplacentária, levando à hipoxemia progressiva, hipercapnia e acidose metabólica e, 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. Os mecanismos fisiopatológicos da EHI têm sido objeto de interesse recente, com a finalidade principal de desenvolver estratégias de neuroproteção a partir do conhecimento bioquímico, celular e humoral das lesões cerebrais.^{3,13}

Evidências indicam o envolvimento da cascata inflamatória na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A reação inflamatória, acionada pela isquemia no sistema neural central, caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares seguidos pelos monócitos, e pela ativação da microglia. Para tanto, é necessária a expressão de moléculas de adesão específicas, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias, que são proteínas de baixo peso molecular, produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e, no SNC, produzidas e secretadas pela microglia e pelos astrócitos.^{5,64}

As citocinas inflamatórias, especialmente *TNF- α* e *IL-1 β* , podem ocasionar lesão cerebral por diferentes mecanismos, pois por terem citotoxicidade direta no tecido neural, inibem a diferenciação de precursores de oligodendrócitos, estimulam a apoptose dos oligodendrócitos e causam degeneração vacuolar da mielina. Também apresentam potentes efeitos vasomotores e vaso-oclusivos e sua toxicidade é mediada por distúrbios no transporte de glutamato, potencializando o estresse oxidativo. Por outro lado, a citocina anti-inflamatória *IL-10* inibe esses efeitos pela redução indireta na síntese de citocinas inflamatórias.^{1,55}

Variantes funcionais dos genes das citocinas que resultam na produção alterada de proteínas inflamatórias (*TNF- α* e *IL-1 β*) ou anti-inflamatória (*IL-10*) podem modificar os processos de doença. Uma vez que a expressão de ambas as citocinas, *TNF- α* , e *IL-1 β* , está intimamente associada à patogênese da lesão cerebral, variantes genéticas dessas e de outras citocinas são fatores modificadores do risco de lesão cerebral no RN prematuro e também no RN a termo.^{1,5,55}

Sendo assim, diante do conhecimento do papel das citocinas *TNF- α* e *IL-1 β* na cascata inflamatória e da *IL-10* no efeito anti-inflamatório atuando essa, portanto, como fator de

neuroproteção, o objetivo do estudo foi determinar a associação entre polimorfismos nos genes produtores destas citocinas e o risco de LPV em neonatos.

Foram avaliados 100 RN de ambos os sexos, sendo 50 RN com diagnóstico de LPV, constituindo o Grupo Casos, e 50 RN a Termo, sem alterações ultrassonográficas, como Grupo Controle, obedecendo ambos os grupos aos critérios de inclusão e exclusão descritos.

A prevalência de LPV, dentre os 85 RN internados no período do estudo foi de 59% (1:1,7), dado este de acordo com a faixa descrita na literatura - 1:1,1 a 1:2,1.^{2,3,7,9}

Desde a década de 1980, a LPV também tem sido identificada em RN a termo (*term-born PVL*) em estudos que demonstram que mais da metade das crianças com paralisia cerebral nasceram nessa faixa de idade gestacional e que, uma proporção significativa (12 a 53%) das mesmas, de acordo com dados de neuroimagem, exibiu um padrão de lesão na substância branca periventricular que é mais tipicamente visto em prematuros.^{1,9,65-71}

Em contraste, os achados considerados específicos à hipóxia-isquemia em bebês nascidos a termo, tais como, áreas de hipoperfusão localizadas superficialmente nas regiões cerebrais parassagitais, com lesões isquêmicas acentuadas na substância cinzenta e nas camadas adjacentes da substância branca subcortical, estavam presentes em apenas 5% dos que foram submetidos a esses exames. Devido a isso, a LPV em RNT tem sido considerada consequente à lesão cerebral intrauterina, mesmo diante de agravos perinatais e/ou neonatais.^{1,4,5,9,65-71}

Em particular, na principal forma de agravo hipóxico/isquêmico no RNT, ou seja, a asfixia intrauterina, não há ainda método confiável que possa detectar, com precisão, o início da lesão cerebral. Da mesma forma, nos prematuros, nos quais a maioria das lesões ocorre no período pós-natal, pode não haver sinais clínicos de lesão ou os mesmos podem ser extremamente sutis. O reconhecimento tardio da lesão cerebral, tanto no RN prematuro quanto no RN a termo pode restringir seriamente a "janela terapêutica" disponível.¹

Dentre os 50 casos do estudo, foram incluídos quatro RNT (8%), todos do sexo masculino, que apresentaram quadro de asfixia perinatal e anóxia neonatal, com diagnóstico de LPV entre o 10º e 25º dias de vida. Esta prevalência foi abaixo da descrita na literatura, talvez por alguma das razões: casuística pequena, ou como as lesões hipóxico-isquêmicas aparecem como áreas de baixo sinal na RM, quando realizadas depois da primeira semana e ao US, nos primeiros dias, podem não ser bem visibilizadas, ou a extensão de tais lesões podem ser melhor avaliadas entre o 9º e 23º dias após a asfixia ou ainda pelo fato de que exames de imagem, neste período ou posteriores, não são solicitados pelo conceito de que LPV é inerente ao RNPT, perdendo-se, portanto, o diagnóstico nos RN a termo.^{33,65,72}

Dados em relação às lesões hipóxico-isquêmicas, incluindo LPV, e suas consequências em RN a termo são relativamente esparsos quando comparados ao grande número de estudos

realizados em RNPT. Os médicos devem considerar o diagnóstico de LPV no contexto de RNT e de crianças com atraso no neurodesenvolvimento e alterações motoras, nascidas a termo, mesmo na ausência de histórico de agravos perinatais.^{9,71}

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao sexo, tipo de parto e tipo de nascimento, estando estes dados de acordo com a literatura.^{19,23,47,71} Apesar de não ter havido diferença estatística, o sexo masculino foi mais prevalente no Grupo Casos. Os loci heterozigotos relacionados à proteção à infecção/inflamação estão localizado no cromossomo X. O sexo masculino tem menor quantidade desses loci do que o sexo feminino devido a presença de um único cromossomo X estando, portanto, mais suscetível às consequências inerentes aos processos infecciosos/inflamatórios.⁷³

As características clínicas como idade gestacional, peso, Apgar de 1º e 5º minutos e tempo de internação apresentaram significativa diferença estatística. Na literatura, estas variáveis não apresentaram diferença significativa, pois nesses estudos ambos os grupos foram constituídos somente de RNPT com idade gestacional que variou de 21 a 34 semanas, diferentemente do presente estudo.^{16,19,22,23,47,74}

Após a análise molecular, as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* , -511C/T no gene *IL-1 β* e -1082G/A no gene *IL-10* foram comparadas entre os RN dos Grupos Casos e Controle. De posse então dos dados das possíveis diferenças polimórficas encontradas entre RN com LPV e controles, foi calculado o valor de risco (*OR = odds ratio*), o qual mostra a relação existente entre os polimorfismos e LPV.

Como já descrito, a citocina *TNF- α* é um mediador central da lesão cerebral. Sendo assim, estudos de associação mostram claramente que variantes genéticas do gene *TNF- α* , pelo aumento da expressão da citocina no início do período isquêmico, podem ser deletérias e aumentar o risco a lesões no período peri e neonatal estando, portanto, claramente envolvida na patogênese dessas lesões, incluindo LPV. Nesses estudos, o polimorfismo -308G/A foi o mais frequentemente analisado nesse gene, com um desses estudos tendo RNT como grupo controle, mas os resultados são muito heterogêneos e inconsistentes e a correlação entre o alelo polimórfico A e elevada expressão da citocina *TNF- α* não foi uniformemente corroborada entre os diferentes trabalhos.^{47,75-79}

Entretanto, na análise do polimorfismo -1031T/C no gene *TNF- α* em 60 crianças nascidas prematuramente (28 a 32 semanas) com paralisia cerebral, sendo 35 delas com LPV, e em 84 controles de mesma idade gestacional, foi encontrada significativa associação entre os genótipos TC e CC, assim como o alelo polimórfico C, e o risco de paralisia cerebral, inclusive nas crianças com LPV.⁴⁷ No presente estudo, com número maior de casos com LPV e idade gestacional que variou de 25 a 39 semanas, resultado semelhante foi encontrado, no qual, tanto

o genótipo heterozigoto TC isolado (produtor intermediário de citocina inflamatória) como em conjunto ao genótipo CC (alto produtor de citocina inflamatória) foram associados a significativo risco de LPV nos casos, de aproximadamente 2,5 vezes mais. O genótipo homozigoto selvagem TT (baixo produtor de citocina inflamatória) foi associado a um fator 2,45 vezes maior de proteção ao risco de LPV. Em relação aos alelos, o alelo selvagem T foi associado ao fator de proteção à LPV e o alelo polimórfico C associado ao fator de risco, mas sem significância estatística, resultados também semelhantes ao estudo de referência.⁴⁷

Evidências experimentais e clínicas, envolvendo a citocina IL-1 β também como outro mediador chave na lesão cerebral hipóxico-isquêmica, demonstram que a magnitude da expressão da mesma tem um componente geneticamente determinado. O alelo T do polimorfismo -511C/T no gene *IL-1 β* está associado à maior produção dessa citocina inflamatória com consequente aumento do risco de lesão em vários estados inflamatórios.^{80,81} O papel do polimorfismo -511C/T do gene *IL-1 β* foi analisado em RNPT com LPV em dois estudos até o presente momento, os quais associaram, significativamente, os genótipos CT/TT ao risco de LPV, em aproximadamente quatro vezes mais.^{47,55} Esses dados são concordantes com o presente estudo, no qual esta combinação apresentou associação 23 vezes maior ao risco de LPV nos casos.

Citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, atuam como protetores do tecido neural pela inibição da citocina IL-1 β e da produção de citocinas, induzida por endotoxina, pelas células gliais.⁵² A intensidade da secreção de IL-10 está geneticamente determinada por vários polimorfismos na região promotora, sendo o polimorfismo -1082G/A considerado um fator determinante, pelo alelo polimórfico A estar associado à baixa produção de IL10.⁸³

Três estudos foram realizados em RNPT com e sem LPV, com idade gestacional variando de 26 a 32 semanas e casuística de 18 a 36 RNPT com LPV, tendo um deles RNT como grupo controle.^{79,84,85} Os resultados de dois desses estudos demonstram que a prevalência de LPV não foi afetada pelos genótipos -1082G/A do gene *IL-10*.^{79,84} Entretanto, o terceiro estudo revela que o genótipo GG (alto produtor de citocina anti-inflamatória) foi associado a significativo menor risco de LPV,⁸⁵ dados esses concordantes com o presente estudo, no qual o genótipo homozigoto selvagem GG também foi significativamente associado em 13,5 vezes mais ao fator de proteção ao risco de LPV. Interessantemente, ambos os estudos apresentaram mesmo número de casos com genótipo GG e a LPV, desses pacientes, não persistiu por mais de sete dias. Em contrapartida, o risco de LPV teve associação significativa, em treze vezes mais, ao genótipo heterozigoto GA (produtor intermediário de citocina anti-inflamatória).

Como foram avaliados três polimorfismos, os mesmos foram combinados entre si, de acordo com os genótipos encontrados em cada paciente. Esta combinação permitiu verificar

qual delas estaria associada ao fator de proteção ou ao risco de LPV e também em relação aos Graus de LPV. Os genótipos combinados são apresentados sempre nesta ordem respectiva aos polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* , -511C/T no gene *IL-1 β* e -1082G/A no gene *IL-10*.

A combinação TT/CC/GA foi significativamente associada em 14,7 vezes mais ao fator de proteção ao risco de LPV. E, a combinação TC/CT/GA foi significativamente associada ao risco de LPV, em 6,46 vezes mais. As combinações TT/CT/GA e TC/TT/GA foram associadas ao risco de LPV, mas sem significância estatística. Em relação aos Graus de LPV, as combinações TC/TT/GA e TT/TT/GA tiveram relação significativa ao risco de LPV, respectivamente, nos Graus I/II e Grau III. Até o presente momento, não há estudos na literatura que tenham realizado esta combinação genotípica para corroboração destes resultados. Mas, quando os genótipos dos três polimorfismos foram analisados separadamente em relação aos Graus da LPV, não foi encontrada relação significativa entre as variáveis, resultado este de acordo com a literatura.^{84,85}

Embora a LPV e a HPIV sejam afecções patológicas distintas, muitas vezes ocorrem em combinação, como encontrado no presente estudo. A patogênese de ambas envolve mecanismos diferentes, apesar de distúrbios na hemodinâmica cerebral serem fatores comuns. O aumento da variabilidade do fluxo sanguíneo cerebral desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da HPIV, ao passo que hipoperfusão cerebral, exposição à infecção pré-natal e subsequente aumento da produção de mediadores inflamatórios são considerados os mecanismos dominantes na LPV.^{8,86}

Devido a essas considerações, os genótipos dos três polimorfismos foram comparados à presença ou não de HPIV não revelando diferença significativa entre as variáveis, confirmando que, apesar de poder ocorrer conjuntamente à LPV, a HPIV não está associada aos mesmos fatores fisiopatogênicos. Resultados estes corroborados pela literatura,^{84,85} exceto por um estudo que, como citado anteriormente, além de revelar associação significativa do genótipo CT, do polimorfismo -511C/T do gene *IL-1 β* , à LPV, apresentou também relação significativa dos genótipos CT e TT, do mesmo polimorfismo, ao risco de HPIV.⁵⁵

A comparação dos resultados de associação dos polimorfismos, tanto à LPV quanto à HPIV, é prejudicada por diferenças nas populações. Todos os RNPT avaliados nesse citado estudo,⁵⁵ diferentemente do presente, eram de muito baixo peso para idade gestacional e todos sob ventilação mecânica. A hipocarbia, induzida por técnica inadequada de ventilação mecânica, está associada à elevação da pressão média de vias aéreas, que promove queda do retorno venoso e do débito cardíaco, aumentando a pressão no seio sagital. O aumento da pressão venosa e a redução no fluxo sanguíneo cerebral, promovidos pela hipocarbia, resultam em redução na pressão de perfusão cerebral, incluindo a região da substância branca

periventricular, com consequentes maiores riscos de HPIV e LPV, além de displasia broncopulmonar e/ou retinopatia.¹⁴ Sendo assim, a influência do polimorfismo -511C/T no risco de ambas afecções, LPV e HPIV, nessa referência,⁵⁵ pode ter sido superestimada.

As imagens de ressonância magnética geralmente correlacionam-se bem com as obtidas pelo ultrassom, assim como com as sequelas neurológicas. No entanto, como a ultrassonografia apresenta uma sensibilidade relativamente baixa na fase aguda ou na detecção de pequenas áreas de necrose ou lesão celular difusa, uma abordagem integrada desses métodos tem se mostrado eficaz na avaliação e em diagnósticos neurorradiológicos corretos e precoces.^{33,87,88}

A ultrassonografia craniana é realizada rotineiramente em RN asfisiados e/ou com encefalopatia hipóxico-isquêmica permitindo o diagnóstico das quatro fases do desenvolvimento da LPV: (i) congestão inicial, seguida por (ii) resolução relativa (ou normalização); (iii) desenvolvimento de cistos; e (iv) resolução de cistos acompanhada por dilatação periventricular. Os pseudocistos periventriculares aparecem após 2 semanas e a LPV é progressivamente caracterizada pela assimetria ventricular (com paredes irregulares) e/ou atrofia cerebral.^{32,33}

O diagnóstico precoce das lesões cerebrais peri/neonatais e a previsão fiável da evolução clínica, durante o período de internação e, posteriormente, no acompanhamento ambulatorial desses RN, exigem o conhecimento da fisiopatogênese de cada lesão em particular. Além disso, a combinação com métodos de neuroimagens, realizados por profissionais habilitados, permite adequada intervenção, influenciando assim, a evolução das alterações neuromotoras subsequentes. A prevenção das manifestações da lesão cerebral nos RN hipoxiados/asfisiados deve ser o principal objetivo de toda equipe multiprofissional, especialmente com a interação entre pediatras e radiologistas.

Os resultados do presente estudo, apesar de limitada casuística, reforçam o papel das citocinas inflamatórias *TNF- α* e *IL-1 β* , previamente associadas à maiores concentrações no líquido, tecido cerebral, sangue ou cordão umbilical na susceptibilidade genética, definida por polimorfismos nos genes que as expressam, à lesão da substância branca em RN hipoxiados/asfisiados.¹⁶⁻²³

A variação genética interindividual na produção de citocinas é um fator modificador potencial das complexas interações entre genes e ambiente, hospedeiro e agentes patogênicos e entre mãe e feto. A regulação genética da inflamação é um importante fator de risco biológico e pode contribuir para a diferente susceptibilidade dos RN, com agravos peri/neonatais, à lesões cerebrais, tal como a LPV.⁴⁷

Portanto, este é o primeiro estudo brasileiro que demonstra a associação entre polimorfismos de citocinas inflamatórias *TNF α -1031T/C* e *IL1 β -511C/T* e o risco de LPV e da

citocina anti-inflamatória IL-10 no fator de proteção à LPV tanto em RNPT como em RNT com encefalopatia hipóxico-isquêmica e a correlação com neuroimagens.

As pesquisas nesta área precisam ser concentradas nas questões de particular relevância para a lesão cerebral nos RN, tais como o atraso no diagnóstico no RNT asfíxiado e a lesão de oligodendrócitos no RNPT, por ativação da cascata inflamatória. Os avanços obtidos associados às melhorias dos métodos de imagem serão fundamentais para o desenvolvimento de estratégias seguras e eficazes para a neuroproteção de ambos os recém-nascidos, prematuros e a termo.

6. CONCLUSÕES

A análise molecular em RNPT e RNT permitiu verificar que:

- os polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* e -511C/T no gene *IL-1 β* estão associados ao risco de Leucomalácia Periventricular (LPV) e o polimorfismo -1082G/A no gene *IL-10* está associado ao fator de proteção ao desenvolvimento de LPV, nesta população.
- pela correlação com neuroimagens, os polimorfismos estão associados aos Graus de LPV, mas não à ocorrência de Hemorragia Peri-intraventricular.

7. REFERÊNCIAS

1. du Plessis AJ, Volpe JJ. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol.* 2002;15:151-7.
2. da Cruz ACS, Ceccon MEJ. Prevalência de asfixia perinatal e encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos. *Rev Bras Cresc Desenv Hum.* 2010;20(2):302-16.
3. Silveira RC, Procianoy RS. Lesões isquêmicas cerebrais no recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. *J Pediatr.* 2005;81(1Supl):23-32.
4. Rezaie P, Dean A. Periventricular leucomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology.* 2002;22:106-32.
5. Distefano G, Praticò AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr.* 2010;36:63. doi:10.1186/1824-7288-36-63.
6. Ponte MD, Marba STM. Peri-intraventricular hemorrhage in newborns weighing less than 1500 grams: comparative analysis between 2 institutions. *Rev Hosp Clin.* 2003;58:299-304.
7. Marinho RS, Cardoso LA, Idalgo GF, Jucá SSH. Hemorragia periventricular, intraventricular e mecanismos associados à lesão em recém-nascidos pré-termos. *Acta.* 2007;14(3):154-8.
8. Caldas JP, Braghini CA, Mazzola TN, Vilela MM, Marba ST. Peri-intraventricular hemorrhage and oxidative and inflammatory stress markers in very-low birth weight newborns. *J Pediatr.* 2015;91(4):373-9.
9. Miller SP, Shevell MI, Patenaude Y, O’Gorman AM. Neuromotor spectrum of periventricular leukomalacia in children born at term. *Pediatr Neurol.* 2000;23:155-9.

10. Oskoui M, Coutinho F, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2013;55:509-19.
11. Volpe JJ. Cerebral White matter injury of the preterm infant - more common than you think (commentaries). *Pediatrics.* 2003;112:176-80.
12. Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rodees PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2001;898:126-35.
13. Procianoy RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr.* 2001; 77(Supl 1):63-70.
14. Tsuji M, Saul JP, du Plessis A, Eichenwlad E, Sobh J, Crocker R, et al. Cerebral intravascular oxygenation correlates with mean arterial pressure in critically ill premature infants. *Pediatrics.* 2000;106:625-32.
15. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res.* 2001;50:553-62.
16. Deguchi K, Oguchi K, Takashima S. Characteristic neuropathology of leukomalacia in extremely low birth weight infants. *Pediatr Neurol.* 1997;16(4):296-300.
17. 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.
18. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, et al. 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.

19. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 2001;56:1278-84.
20. Silveira RC, Procianoy RS. Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa no liquor de recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. *J Pediatr*. 2003;74:297-302.
21. Goepfert AR, Andrews WW, Carlo W, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1375-81.
22. Tsukimori K, Komatsu H, Yoshimura T, Hikino S, Hara T, Wake N, et al. Increased inflammatory markers are associated with early periventricular leukomalacia. *Dev Med Child Neurol*. 2007;49(8):587-90.
23. Lin CY, Chang YC, Wang ST, Lee TY, Lin CF, Huang CC. Altered inflammatory responses in preterm children with cerebral palsy. *Ann Neurol*. 2010;68(2):204-12.
24. Abrão N, Moreira MT, Amaro Júnior E. Afecções hemorrágicas e hipóxico-isquêmicas. In: Abrão N, et al, editores. *Ultra-sonografia intracraniana: anatomia ultra-sonográfica*. São Paulo; Sarvier; 1998. p.107-24.
25. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr*. 1978;92(4):529-34.
26. Siegel MJ, Shackelford GD, Perlman JM, Fulling KH. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term infants: diagnosis and prognosis evaluated by ultrasound. *Radiology*. 1984;152:395-9.
27. Archer LNJ, Levene MI. Cerebral artery Doppler ultrasonography for prediction of outcome after perinatal asphyxia. *Lancet*. 1986;2:1116-8.

28. Adsett DB, Fitz CR, Hill A. Hypoxic-ischaemic cerebral injury in the term newborn: correlation of CT findings with neurological outcome. *Develop Med Child Neurology*. 1985;27:155-60.
29. Boichot C, Walker PM, Durand C, Grimaldi M, Chapuis S, Gouyon JB, et al. Term neonate prognoses after perinatal asphyxia: contributions of MR imaging, MR spectroscopy, relaxation times, and apparent diffusion coefficients. *Radiology*. 2006;239:839-48.
30. Vlasiuk VV. Morphologic diagnosis of periventricular leukomalacia in newborn infants. *Arkh Patol*. 1983;45:26-33.
31. de Vries LS, Eken P, Dubowitz LM. The spectrum of leukomalacia using cranial ultrasound. *Behav Brain Res*. 1992;49:1-6.
32. Cioni G, Bartalena L, Biagioni E, Boldrini A, Canapicchi R. Neuroimaging and functional outcome of neonatal leukomalacia. *Behav Brain Res*. 1992;49:7-19.
33. Hashimoto K, Hasegawa H, Kida Y, Takeuchi Y. Correlation between neuroimaging and neurological outcome in periventricular leukomalacia: diagnostic criteria. *Pediatr Int*. 2001;43:240-5.
34. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004;4:65-84.
35. Pang Y, Campbell L, Zheng B, Fan L, Cai Z, Rhodes P. Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. *Neuroscience*. 2010;166:464-75.
36. Haynes RL, Folkerth RD, Keefe RJ, Sung I, Swzeda LI, Rosenberg PA, et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:441-50.

37. Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci.* 2004;20:1713-26.
38. Follett PL, Deng W, Dai W, Talos DM, Massillon LJ, Rosenberg PA, et al. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. *J Neurosci.* 2004;24:4412-20.
39. Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T. MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem.* 2006;281:20095-106.
40. Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res.* 1999;35:95-100.
41. Segovia KN, McClure M, Moravec M, Luo NL, Wan Y, Gong X, et al. Arrested oligodendrocyte lineage maturation in chronic perinatal white matter injury. *Ann Neurol.* 2008;63:520-30.
42. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8:752-8.
43. Barger SW, Basile AS. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem.* 2001;76:846-54.
44. Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol.* 2005;8:315-21.
45. Huleihel M, Golan H, Hallak M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:17.

46. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child.* 2008;93:F153-F161.
47. Vidak HK, Ivkovic TC, Jokic M, Spaventi R, Kapitanovic S. The association between proinflammatory cytokine polymorphisms and cerebral palsy in very preterm infants. *Cytokine.* 2012;58:57-64.
48. Abbas AK, Lichtman AH, Pilai SHIV. *Imunologia Celular e Molecular.* 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
49. OMIM. On-Line Mendelian Inheritance in Man, 2015;<http://omim.org/entry/191160>.
50. OMIM. On-Line Mendelian Inheritance in Man, 2015;<http://omim.org/entry/147720>.
51. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain.* 2013;136:28-42.
52. OMIM. On-Line Mendelian Inheritance in Man, 2015;<http://omim.org/entry/124092>.
53. Harvey L, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploeg H, Amon A. *Biología Celular e Molecular.* 7^a ed, Porto Alegre: Artmed; 2014.
54. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun.* 2002;3:313-30.
55. Baier RJ. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infants. *Front Biosci.* 2006;11:1371-87.
56. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation - the role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;141:3-9.

57. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet.* 2006;15:519-29.
58. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24:1-8.
59. Rees LE, Wood NA, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:560-9.
60. Raedler D, Illi S, Pinto LA, von Mutius E, Illig T, Kabesch M, et al. IL10 polymorphisms influence neonatal immune responses, atopic dermatitis, and wheeze at age 3 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:789-96.
61. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol.* 1976;33(10):696-705.
62. American College of Obstetricians and Gynecologists. Definition of term pregnancy. Committee Opinion No. 579. [homepage na internet]. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1139–40. [acesso em set 2016]. Disponível em: <http://www.acog.org/resources-and-publications/committee-opinions/committee-on-obstetric-practice/definition-of-term-pregnancy>.
63. Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. WHO Media Centre. [homepage na internet] Preterm birth. 2014; [acesso em set 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>.
64. Smith SMC, Mitchell GS, Friedle SA, Sibigtroth CM, Vinit S, Watters JJ. Hypoxia attenuates purinergic P2X receptor-induced inflammatory gene expression in brainstem microglia. *Hypoxia.* 2013;1:1-11.

65. Lipp-Zwahlen AE, Deonna T, Chrzanowski R, Micheli JL, Calame A. Temporal evolution of hypoxic-ischaemic brain lesions in asphyxiated full-term newborns as assessed by computerized tomography. *Neuroradiology*. 1985;27(2):138-44.
66. Krägeloh-Mann I, Hagberg B, Petersen D, Riethmüller J, Gut E, Michaelis R. Bilateral spastic cerebral palsy-Pathogenetic aspects from MRI. *Neuropediatrics*. 1992;23:46-8.
67. Truwit CL, Barkovich AJ, Koch TK, Ferriero DM. Cerebral palsy: MR findings in 40 patients . *AJNR Am J Neuroradiol*. 1992;13(1):67-78.
68. Krägeloh-Mann I, Petersen D, Hagberg G, Vollmer B, Hagberg B, Michaelis R. Bilateral spastic cerebral palsy-MRI pathology and origin: Analysis from a representative series of 56 cases. *Dev Med Child Neurol*. 1995;37:379-97.
69. Okumura A, Hayakawa F, Kato T, Kuno K, Watanabe K. MRI findings in patients with spastic cerebral palsy. I: Correlation with gestational age at birth. *Dev Med Child Neurol*. 1997;39(6):363-8.
70. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991–94. *Acta Paediatr*. 2001;90:271-7.
71. Wu YW, Croen LA, Shah SJ, Newman TB, Najjar DV. Cerebral palsy in a term population: risk factors and neuroimaging findings. *Pediatrics*. 2006;118(2):690-7.
72. Babcock DS. Sonography of the brain in infants: role in evaluating neurologic abnormalities. *Am J Roentgenol*. 1995;165:417-23.
73. Morris JA, Harrison LM. Hypothesis: increased male mortality caused by infection is due to a decrease in heterozygous loci as a result of a single X chromosome. *Med Hypotheses*. 2009;72(3):322-4.

74. Pinto CG, Abrantes M, Moniz C, Costa J. Factores de risco associados à leucomalácia periventricular em recém-nascidos com peso inferior a 1500 gramas. *Acta Pediatr Port.* 2005;36:23-6.
75. Adcock K, Hedberg C, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. The TNF-alpha -308, MCP-1 -2518 and TGF-beta₁ +915 polymorphisms are not associated with the development of chronic lung disease in very low birth weight infants. *Genes Immun.* 2003;4:420-6.
76. Baier RJ, Loggins J, Yanamandra K. Association of the Interleukin-1beta -511 C/T Polymorphism with Intraventricular Hemorrhage and Periventricular Leukomalacia in ventilated very low birth weight infants. Conference: Canadian Pediatric Society Annual Meeting, At Vancouver, British Columbia, Vol:Paediatr Child Health 2005;10:25B; DOI: 10.13140/2.1.4537.9847.
77. Gibson CS, MacLennan AH, Goldwater PN, Haan EA, Priest K, Dekker GA. The association between inherited cytokine polymorphisms and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:674.e1-11.
78. Nelson KB, Dambrosia JM, Iovannisci DM, Cheng S, Grether JK, Lammer E. Genetic Polymorphisms and Cerebral Palsy in Very Preterm Infants. *Pediatr Res.* 2005;57(4):494-9.
79. Nuk M, Orendi K, Rosenberger S, Griesbacher A, Holzappel-Bauer M, Resch B, et al. Genetic variations in fetal and maternal tumor necrosis factor- α and interleukin 10: is there an association with preterm birth or periventricular leucomalacia? *J Perinatol.* 2012;32(1):27-32.
80. Froen JF, Munkeby BH, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Research.* 2002;942:87-94.

81. Kimura R, Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. Cis-acting effect of the IL1B C-31T polymorphism on IL-1beta mRNA expression. *Genes Immun.* 2004;5:572-5.
82. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *Journal of Neuroimmunology.* 2005;162:71-80.
83. Mormann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL, Kremsner PG, Luty AJ, Kube D. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun.* 2004;5:246-55.
84. Yanamandra K, Boggs P, Loggins J, Baier RJ. Interleukin-10 -1082 G/A polymorphism and risk of death or bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Pulmonol.* 2005;39:426-32.
85. Dördelmann M, Kerk J, Dressler F, Brinkhaus MJ, Bartels DB, Dammann CE, Dörk T, Dammann O. Interleukin-10 high producer allele and ultrasound-defined periventricular white matter abnormalities in preterm infants: a preliminary study. *Neuropediatrics.* 2006;37(3):130-6.
86. Kissack CM, Garr R, Wardle SP, Weindling AM. Postnatal changes in cerebral oxygen extraction in the preterm infant are associated with intraventricular hemorrhage and hemorrhagic parenchymal infarction but not periventricular leukomalacia. *Pediatr Res.* 2004;56:111-6.
87. Maalouf EF, Duggan PJ, Rutherford MA, Counsell SJ, Fletcher AM, Battin M, et al. Magnetic resonance imaging of the brain in a cohort of extremely preterm infants. *J Pediatr.* 1999;135(3):351-7.
88. Debillon T, N'Guyen S, Muet A, Quere MP, Moussaly F, Roze JC. Limitations of ultrasonography for diagnosing white matter damage in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88(4):F275-9.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 216.753

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 13486213.0.0000.5415 sob a responsabilidade de **Marta Lúcia Gabriel Jacomini** com o título "Leucomalácia periventricular em prematuros extremos: correlação do diagnóstico por neuroimagens com polimorfismos em gene de citocinas" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 12 de março de 2013.


Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP

The association between pro- and anti-inflammatory cytokine polymorphisms and periventricular leukomalacia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy

This article was published in the following Dove Press journal:

Journal of Inflammation Research

5 May 2016

Number of times this article has been viewed

Marta Lúcia Gabriel¹
Fernanda Braojos Braga¹
Mariana Rodero Cardoso¹
Ana Cláudia Lopes²
Vânia Belintani Piatto²
Antônio Soares Souza¹

¹Radiology Department, ²Morphology Department, São José do Rio Preto Medical School, FAMERP, São Paulo, Brazil

Background: Periventricular leukomalacia (PVL) is a frequent consequence of hypoxic-ischemic injury. Functional cytokine gene variants that result in altered production of inflammatory (tumor necrosis factor- α [TNF- α] and interleukin-1 beta [IL-1 β]) or anti-inflammatory (interleukin-10 [IL-10]) cytokines may modify disease processes, including PVL.

Objective: The aim of this study was to evaluate if there is a relationship between the two proinflammatory polymorphisms (TNF- α -1031T/C and IL-1 β -511C/T) and the anti-inflammatory polymorphism IL-10-1082G/A and PVL risk in Brazilian newborns with and without this injury.

Materials and methods: A cross-sectional case-control study performed at the Neonatal Intensive Care Unit of the Children's Hospital and Maternity of the São José do Rio Preto Medical School (FAMERP). Fifty preterm and term newborns were examined as index cases and 50 term newborns as controls, of both sexes for both groups. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, and the sites that encompassed the three polymorphisms were amplified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Results: Gestational age ranged from 25 to 39 weeks, in the case group, and in the control group it ranged from 38 to 42.5 weeks ($P < 0.0001$). Statistically significant association was found between TNF- α -1031T/C high expression genotype TC (odds ratio [OR], 2.495; 95% confidence interval [CI], 1.10–5.63; $P = 0.043$) as well as between genotypes (TC + CC) (OR, 2.471; 95% CI, 1.10–5.55; $P = 0.044$) and risk of PVL. Statistically significant association was found between IL-1 β -511C/T high expression genotypes (CT + TT) (OR, 23.120; 95% CI, 1.31–409.4; $P = 0.003$) and risk of PVL. Statistically significant association between IL-10-1082G/A high expression genotype GG (OR, 0.07407; 95% CI, 0.02–0.34; $P < 0.0001$) as well as between IL-10-1082G high expression allele (OR, 0.5098; 95% CI, 0.29–0.91; $P = 0.030$) and PVL reduced risk was observed. There was a statistically significant association between TC/CT/GA genotype combination and the risk of PVL (OR, 6.469; 95% CI, 2.00–20.92; $P = 0.001$).

Conclusion: There is evidence of an association between the polymorphisms TNF- α -1031T/C, IL-1 β -511C/T, and IL-10-1082G/A and PVL risk in this Brazilian newborn population studied.

Keywords: leukomalacia periventricular, tumor necrosis factor- α , interleukin-10, interleukin-1beta, polymorphism single nucleotide

Correspondence: Vânia Belintani Piatto
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil (FAMERP), Departamento de Anatomia – Pavilhão Mário Covas 2º Andar, Laboratório de Macroscopia, Av. Brig. Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, CEP: 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
Tel +55 17 3201 5903
Email vbpiatto@gmail.com

Introduction

Periventricular leukomalacia (PVL) is a frequent consequence of hypoxic-ischemic lesion and its occurrence is 0.2 cases per 1,000 births. This injury occurs mostly in

