

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

**RAFAEL COELHO MAGALHÃES**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E  
DO DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR EM CRIANÇAS COM  
PARALISIA CEREBRAL**

**Belo Horizonte**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E  
DO DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR EM CRIANÇAS COM  
PARALISIA CEREBRAL**

Tese apresentada ao curso de  
Doutorado em Medicina Molecular da  
Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito à obtenção do título de  
Doutor em Medicina Molecular.

**Aluno:** Rafael Coelho Magalhães

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Janaina Matos Moreira

Belo Horizonte

2019

Magalhães, Rafael Coelho.

M188a Avaliação longitudinal da resposta imuno-inflamatória e do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral [manuscrito]. / Rafael Coelho Magalhães. -- Belo Horizonte: 2019. 99f.: il.

Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.  
Coorientador (a): Janaina Matos Moreira.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Paralisia Cerebral. 2. Inflamação. 3. Estresse Oxidativo. 4. Citocinas. 5. Quimiocinas. 6. Fatores de Crescimento Neural. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Moreira, Janaina Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 342

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E  
DO DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR EM CRIANÇAS COM  
PARALISIA CEREBRAL**

**Rafael Coelho Magalhães**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular  
da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do grau Doutor.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina Simões e Silva

Professora Titular do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Janaina Matos Moreira

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2019

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitora: Prof.<sup>a</sup>. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró Reitor de Pós Graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice Diretor: Prof.<sup>a</sup> Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.<sup>a</sup>. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof.<sup>a</sup>. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

Coordenadora: Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

## **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR:**

Prof.<sup>a</sup> Carolina Cavaliéri Gomes

Prof.<sup>a</sup> Débora Marques de Miranda

Prof. Humberto Correa da Silva

Discente - Eduardo de Souza Nicolau

A Tarcísio de Melo Nogueira, por fomentar em mim o desejo de ser uma pessoa e um profissional melhor a cada dia.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cristina Simões e Silva, por me ensinar a importância da pesquisa, pela presença, disponibilidade, ensinamentos e confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Janaína Matos Moreira, pelo apoio, disponibilidade e paciência constantes. Por estar sempre presente e me ensinar a valorizar cada resultado.

A Roberta Silva Filha, pela amizade e grande colaboração na execução desse trabalho, seu apoio constante e por fazer tudo ser mais leve.

A Érica Leandro Marciano Vieira, por toda paciência e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos e auxiliar no que fosse necessário.

A Tarcísio de Melo Nogueira, por todo apoio e amor nessa caminhada. Sua presença fez com que tudo fosse possível e cada obstáculo uma oportunidade de crescimento. Não conseguiria sem você.

Aos meus pais, Roger e Íris, pelo amor incondicional, confiança, dedicação, e por, muitas vezes, terem aberto mão de seus sonhos para que eu pudesse alcançar os meus.

À minha irmã Fabiana, pela sua presença tão marcante na minha vida.

Aos meus familiares e amigos por compreenderem meus momentos de ausência.

A Silvia Soares do Nascimento, pela amizade, apoio e por me ajudar em toda logística para que tudo funcionasse.

À Associação Mineira de Reabilitação (AMR), por abrir as portas para esse estudo e à sua equipe por serem fundamentais em minha coleta de dados e por não medirem esforços para me ajudar.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, o meu carinho.

## **NOTA EXPLICATIVA**

A apresentação da presente tese foi organizada sob a forma de artigos científicos, de acordo com a resolução 03/2010, aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

O primeiro artigo consiste em uma revisão da literatura, na qual são discutidos os principais aspectos, achados recentes e controvérsias sobre a associação das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos com o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral. O segundo artigo avalia o impacto e relevância do programa de intervenção precoce de reabilitação para crianças com paralisia cerebral, associando os valores plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos com o desenvolvimento neuropsicomotor mensurado através do teste Bayley Scales of Infant and Toddler Development – 3<sup>th</sup> Edition (Bayley III). Cada artigo está formatado de acordo com as especificações das revistas a que foram submetidos.

A estrutura dessa tese consiste em introdução, manuscrito de revisão sistemática, objetivos, métodos, manuscrito original e considerações finais. As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO REVISÃO

Tabela 1	Assessment of the studies by the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non-randomized studies in meta-analyses.....	46
Tabela 2	Association between inflammatory molecules and neurodevelopment outcome in cerebral palsy.....	47
Tabela 3	Association between inflammatory molecules, motor and/or cognitive development, and sepsis in cerebral palsy.....	48
Tabela 4	Association between the most studied inflammatory molecules and neurological outcome in cerebral palsy.....	49

### ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1	Clinical characteristics of children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention.....	74
Tabela 2	Characteristics at birth and at two time-points for collection of biological samples and evaluation of neuropsychomotor development in children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to rehabilitation intervention.....	75
Tabela 3	Comparison between plasma levels of the molecules at time-point 1 (baseline) and time-point 2 (after six months of intervention) in children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to early intervention on rehabilitation program.....	76
Tabela 4	Correlation of inflammatory mediators and neuropsychomotor development showed as scaled score in the five sub-scales of the BDSI-III test used in the assessment of the neuropsychomotor development of children with cerebral palsy.....	77

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1 Representação esquemática da atuação de citocinas e quimiocinas na ativação da micróglia e células da glia, na ruptura da barreira hematoencefálica e a interferência no funcionamento dos neurônios, podendo ocasionar lesão ou reparo celular no parênquima cerebral.....18
- Figura 2 Representação esquemática do funcionamento do sistema nervoso em homeostase (fisiológico) e em resposta inflamatória com os possíveis mecanismos pelos quais a inflamação promove lesão cerebral precoce. Figura retirada do artigo Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates.....19

### ARTIGO REVISÃO

- Figura 1 PRISMA flow diagram for observational studies of correlation between inflammatory markers and neurodevelopment.....45

### ARTIGO ORIGINAL

- Figura 1 Plasma BDNF levels at Time-point 1 (baseline) and Time-point 2 (after six months of intervention) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not submitted to the rehabilitation intervention (non-rehab group, B).....78
- Figura 2 Plasma levels of IL-12p70 (A), TNF (B), IL-10 (C), IL-6 (D) and IL1 $\beta$  (E) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention after six months of intervention.....79
- Figura 3 Plasma chemokine levels of CXCL10/IP-10 (A), CXCL9/MIG (B) and CXCL8/IL-8 (C) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not

submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention after six months of the intervention.....80

Figura 4

Plasma neurotrophic factors levels of BDNF (A) and GDNF (B) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group, n=60) (A) or not submitted (non-rehab group, n=30) to the rehabilitation intervention after six months of intervention.....81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BDSI -III	Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil
BHE/BBB	Barreira Hemato-Encefálica
CBA	Cytometric Bead Array
CCL/CXCL	Quimiocinas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRP	Proteína C Reativa
DAS	Escala de Habilidade Diferencial
DENVER II:	Teste de Triagem do Desenvolvimento Denver II
DNPM/NPMD	Desenvolvimento Neuropsicomotor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	Agência Europeia de Medicina
FDA	Administração de Drogas e Alimentos
FM	Faculdade de Medicina
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais
HIE	Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
IC/CA	Idade Corrigida
IGFBP-1	Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucinas
IP-10	Proteína Induzida por Interferon- $\gamma$ -10
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos -1
MIG	Monokine-Induced by Interferon- $\gamma$
MSD	Sistema de eletroquimioluminescência Meso Scale Discovery
NEC	Enterocolite Necrosante
PC/CP	Paralisia Cerebral
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PPVT-III	Teste de vocabulário por figuras Peabody - 3ª edição
Q1 e Q3	Quartil 1 e 3 respectivamente
RANTES	Regulado na Ativação, Normal T Expresso e Secreto
RIC	Reciclagem de cromatografia por imunoafinidade
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório

TLRs	Receptores do Tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-R1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral – 1
SNC/CNS	Sistema Nervoso Central
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WISC-IV	Escala de Inteligência Wechsler para Crianças-IV

## RESUMO

**Introdução:** As lesões cerebrais ocorridas no período fetal-neonatal podem ter causas distintas, sendo a resposta inflamatória sistêmica exacerbada e/ou neuroinflamação classicamente correlacionada à lesão cerebral precoce. Essa inflamação persistente pode resultar em alteração do funcionamento dos mecanismos neurais, com consequente limitação na capacidade funcional das crianças, devido à espasticidade, redução da coordenação e do controle motor. Dentre as principais consequências clínicas da lesão cerebral no período fetal-neonatal destaca-se a paralisia cerebral (PC). As intervenções de reabilitação, por sua vez, podem promover mudanças funcionais no cérebro, que se associam a maior liberação de fatores neurotróficos, além de favorecer o desenvolvimento neuropsicomotor com aprendizado de novas habilidades. **Objetivos:** Avaliar os efeitos de programa de reabilitação sobre o DNPM, marcadores inflamatórios e fatores neurotróficos em crianças com PC. **Métodos:** Para revisão da literatura foi realizada busca sistemática nas bases de dados Bireme, Embase, PubMed e Scopus, incluindo estudos que foram publicados até abril de 2018. A qualidade dos estudos elegíveis foi determinada de acordo com os critérios da escala Newcastle-Ottawa. Para a compreensão da relação paralisia cerebral, reabilitação e desenvolvimento neuropsicomotor foi realizado estudo de coorte prospectivo que incluiu 90 crianças com diagnóstico de paralisia cerebral. Dessas, 60 crianças foram submetidas à reabilitação por seis meses e foram comparadas a 30 crianças não submetidas à reabilitação. Biomarcadores periféricos e parâmetros neuropsicomotores (Bayley III) foram comparados entre os grupos intervenção vs. controle no início do estudo e seis meses depois. **Resultados:** Na revisão sistemática, os estudos diferiram quanto aos fatores de risco relacionados à PC e sua classificação. Níveis mais altos de citocinas foram associados a piores desfechos neurológicos. Em nossa pesquisa, após seis meses de reabilitação, as crianças exibiram escores mais altos no Bayley III, níveis mais baixos de IL-12p70, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 e CXCL9/MIG, e níveis mais altos de BDNF e GDNF. **Conclusão:** Programas de intervenção precoce parecem ter efeito na modulação dos mediadores sistêmicos, diminuindo os níveis de moléculas inflamatórias e aumentando os fatores neurotróficos, além de promover o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com PC.

**Palavras-chave:** Paralisia cerebral; inflamação; estresse oxidativo; citocinas; quimiocinas; fatores neurotróficos; desenvolvimento neuropsicomotor; criança.

## ABSTRACT

**Background:** Brain damage in the fetal-neonatal period may have different causes. An exacerbated systemic inflammatory response and/or neuroinflammation have been associated with early brain injury. This persistent inflammatory response may result in abnormal neural mechanism, with consequent limitation in children's functional capacity due to spasticity, reduced coordination and motor control. Cerebral palsy (CP) is one of the main consequences of brain injury in fetal and neonatal period. Rehabilitation interventions may promote functional changes in the brain, which are associated with greater release of neurotrophic factors, besides favoring neuropsychomotor development with learning of new abilities. **Objective:** To evaluate the effects of rehabilitation program on DNPM, inflammatory markers and neurotrophic factors in children with CP. **Methods:** A systematic search was conducted in Bireme, Embase, PubMed and Scopus including studies that were published until April 2018. The quality of the eligible studies was determined according to the criteria of Newcastle-Ottawa Scale. We performed a prospective, observational, cohort study to better understand the relationship of cerebral palsy, rehabilitation programs and neuropsychomotor development. Ninety children with a diagnosis of CP were enrolled in this study. Sixty children were submitted to rehabilitation for six months and were compared to 30 children waiting for rehabilitation enrollment. Peripheral biomarkers and neuropsychomotor parameters (Bayley III) were compared between intervention vs. control groups at baseline and six months later. **Results:** In the systematic review, the studies differed regarding the risk factors related to PC and its classification. Higher levels of cytokines were associated with worse neurological outcomes. In our research, after six months of rehabilitation, children exhibited higher scores on Bayley III, lower levels of IL-12p70, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8 / IL-8 and CXCL9 / MIG, and higher levels of BDNF and GDNF. **Conclusion:** Early intervention programs seem to modulate systemic mediators. It decreases inflammatory molecules levels, increases neurotrophic factors levels, and promotes neuropsychomotor development in children with cerebral palsy.

**Key-words:** Cerebral palsy; inflammation; oxidative stress; cytokines; chemokines; neuropsychomotor development, neurodevelopment outcomes and child.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
3.	MANUSCRITO REVISÃO.....	29
4.	OBJETIVOS.....	50
5.	PACIENTES E MÉTODOS.....	51
6.	MANUSCRITO ORIGINAL.....	58
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

### ANEXOS

	ANEXO I – PRODUÇÕES TÉCNICAS/PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS...85
	ANEXO II – PARECER COEP/UFMG.....88
	ANEXO III – CARTA DE ANUÊNCIA AMR.....95
	ANEXO IV – FOLHA DE APROVAÇÃO.....96

### APÊNDICE

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....97
--	--

## 1 INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma encefalopatia crônica não progressiva<sup>1,2</sup> que acomete cerca de três a cada 1000 nascidos vivos<sup>1,3</sup>. É a incapacidade física mais comum na infância, sendo um diagnóstico heterogêneo e de etiologia variada<sup>2,3</sup>. De todos os casos de PC, 70% podem não ter causa definida e o restante dos casos podem estar associados à prematuridade, trauma perinatal, hipóxia cerebral, bem como infecções e malformações que surgem durante a vida fetal<sup>3</sup> até os primeiros anos de vida da criança<sup>2</sup>.

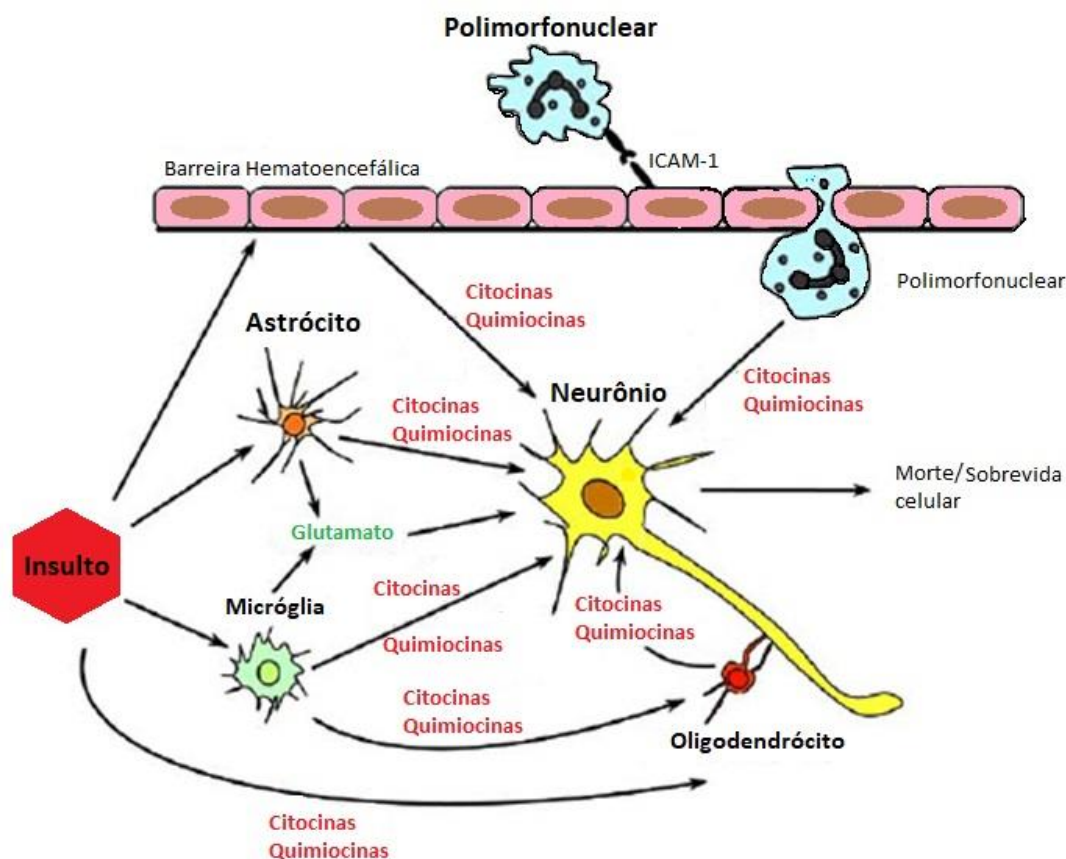
A PC é descrita como um grupo de desordens do desenvolvimento do movimento e postura, causando limitação nas atividades, que são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem no cérebro fetal ou na primeira infância. A incapacidade motora da PC frequentemente é acompanhada por alterações sensoriais, cognitivas, da percepção, da comunicação, comportamentais e/ou por crises convulsivas<sup>4,5</sup>. A PC pode ser dividida em espástica, discinética ou atáxica, de acordo com as alterações neuromotoras<sup>5</sup>. A forma espástica, também pode ser dividida em unilateral ou bilateral, de acordo com o envolvimento motor<sup>5</sup>.

A gravidade da PC pode ser classificada em um dos cinco do Sistema de Classificação da Função Motora Grossa (GMFCS) de acordo com a capacidade da criança iniciar movimentos voluntariamente, com ênfase no sentar, transferências e mobilidade<sup>6</sup>. Trata-se de uma escala ordinal, sendo classificada no nível I a criança com amplo repertório de habilidade e função motora grossa preservada, e, no nível V, a criança com repertório restrito de habilidades e com limitação significativa na função motora grossa<sup>7</sup>.

O diagnóstico de PC baseia-se em histórico médico cuidadosamente coletado. No entanto, o diagnóstico precoce pode ser difícil em crianças com discretas alterações<sup>2</sup>. A PC, incluindo diferentes tipos clínicos, padrões de imagem cerebral, comorbidades e causas múltiplas, tem como mecanismo sugerido alterações na resposta inflamatória com consequente neuroinflamação<sup>8</sup>.

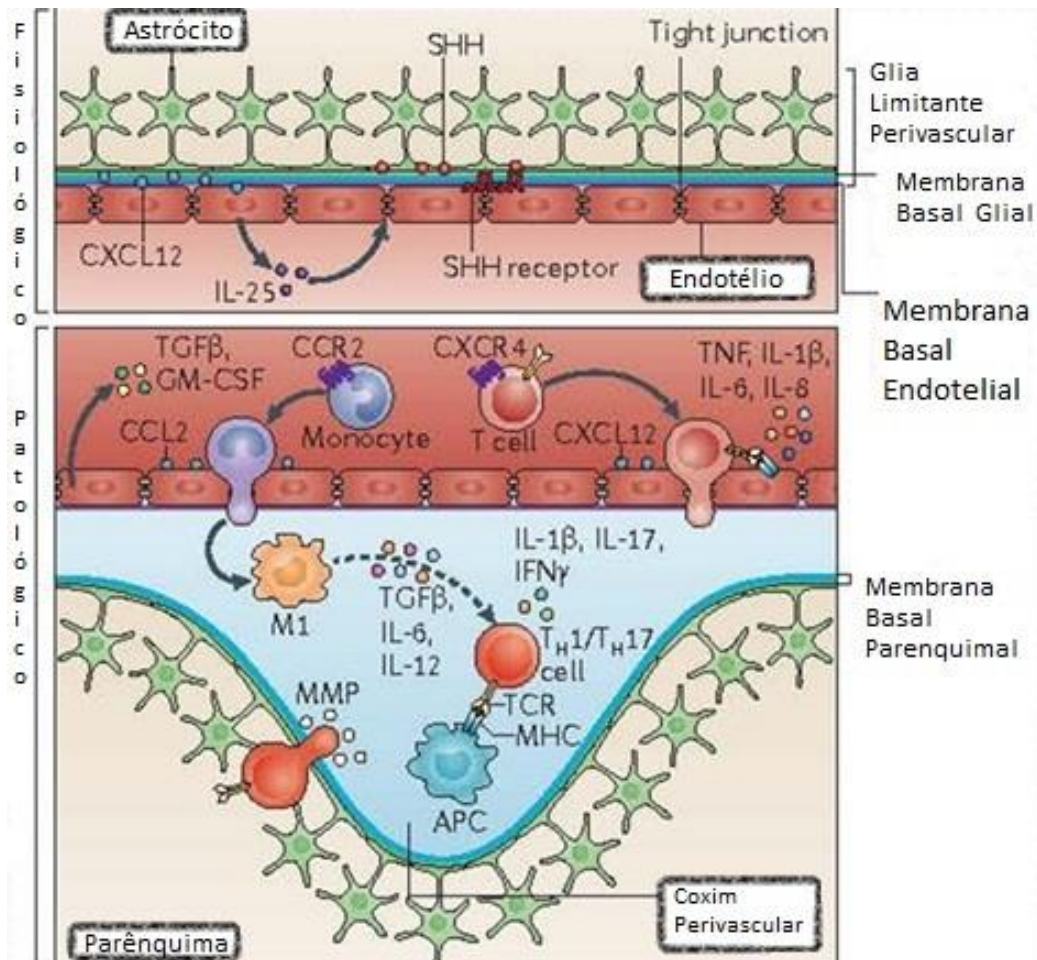
A neuroinflamação desempenha papel central na patogênese da lesão cerebral<sup>9,10</sup>. É caracterizada por infiltração de leucócitos no parênquima cerebral, com ativação da micróglia e astrócitos, os quais podem causar morte neuronal e comprometimento do desenvolvimento da substância branca<sup>11</sup>. Diversos mecanismos relacionados ao sistema imune, incluindo a liberação de citocinas e a ativação de células T, podem contribuir para

a neuroinflamação, que, por sua vez, potencialmente interfere no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC)<sup>12</sup>. (Figura 1)



**Figura 1** – Representação esquemática da atuação de citocinas e quimiocinas na ativação da micróglia e células da glia, na ruptura da barreira hematoencefálica e sua interferência no funcionamento dos neurônios, podendo causar lesão ou reparo celular no parênquima cerebral.

De acordo com essa teoria, a inflamação sistêmica e no SNC altera a proliferação, a diferenciação da micróglia e células neuronais, podendo também aumentar a taxa de morte celular com lesão neuronal, astrogliose e perda de oligodendrócitos<sup>11,13,14</sup>. Os possíveis mecanismos pelos quais a inflamação promove lesão cerebral precoce são: (i) redução do fluxo sanguíneo para o SNC, o que reduz a disponibilidade de oxigênio e glicose; (ii) ruptura da barreira hematoencefálica (BHE); (iii) infiltração de leucócitos no SNC; (iv) aumento da liberação de citocinas e quimiocinas no parênquima cerebral; (v) disfunção mitocondrial e falha de energia; (vi) aumento do influxo de cálcio, liberação de neurotoxinas, formação de radicais livres de oxigênio e oxigênio nítrico; (viii) edema cerebral. Todos esses mecanismos têm sido associados à apoptose de células neuronais e gliais<sup>11,15</sup> (Figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática do funcionamento do sistema nervoso em homeostase (fisiológico) e em presença de resposta inflamatória, mostrando os possíveis mecanismos pelos quais a inflamação promove lesão cerebral precoce. Figura adaptada do artigo *Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates*<sup>16</sup>.

As lesões neuronais relacionadas à inflamação podem induzir uma cascata de respostas imunes envolvidas na instauração da lesão cerebral<sup>17-19</sup>, incluindo a elevação de citocinas e quimiocinas circulantes<sup>15</sup>. As citocinas são responsáveis pela mediação da maioria das interações celulares desse processo, e são liberadas sob ação de diferentes estímulos<sup>15,20</sup>. Os leucócitos e células endoteliais são sensíveis às lesões neuronais e, podem liberar e/ou responder a citocinas e quimiocinas<sup>21</sup>. Essas moléculas no sangue também estão correlacionadas com o início e manutenção da resposta inflamatória, bem como desfechos neurológicos adversos<sup>22,23</sup>.

Esse processo conta com a liberação desregulada de citocinas pro-inflamatórias incluindo Fator de Necrose Tumoral (TNF), interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8/CXCL-8 e receptores

do tipo Toll (TLR's) no plasma e no tecido cerebral<sup>11,23</sup>. Essas citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6) e quimiocinas (CXCL8/IL-8 e CXCL9/MIG) circulantes estão relacionadas ao desenvolvimento de lesão cerebral<sup>21,22</sup> e PC<sup>22</sup>. Essas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF, também afetam negativamente o tamanho do músculo esquelético e o trofismo<sup>24</sup>. Assim, níveis elevados dessas citocinas representam um mecanismo comum plausível para o crescimento atrofiado e a formação de contratura no músculo esquelético em crianças com PC<sup>24</sup>. Além disso, respostas anti-inflamatórias e regulatórias inapropriadas, detectadas por baixos níveis de IL-10 e altos níveis de metabólitos citotóxicos, podem aumentar o risco de lesão cerebral<sup>25</sup>.

Na fase aguda, em resposta aos fatores de agressão ao tecido cerebral, há aumento na liberação de fatores tróficos, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), capazes de ativarem mecanismos neuroprotetores endógenos na tentativa de reduzir a extensão do acometimento causado pelo processo inflamatório e estimular a neuroplasticidade<sup>26</sup>.

O BDNF promove os efeitos protetores das células-tronco neurais, desempenha um papel significativo na neurogênese e aumenta a sobrevivência do cérebro<sup>27,28</sup>. O GDNF é um fator protetor identificado como essencial para a sobrevivência e diferenciação neuronal, por sua ação na neuroplasticidade<sup>29</sup> e proteção aos neurônios motores<sup>27</sup>. Embora os fatores neurotróficos estejam mais presentes no SNC, essas moléculas também são detectáveis na circulação sistêmica<sup>27</sup>. Como essas moléculas podem atravessar a BHE<sup>28,29</sup>, os níveis periféricos de BDNF podem refletir os níveis de BDNF no cérebro<sup>28</sup>. Além disso, interações mútuas entre citocinas e fatores neurotróficos, tanto no SNC quanto periféricamente, podem resultar em variações dinâmicas na concentração e na ação dessas moléculas<sup>15,28</sup>.

A inflamação persistente pode resultar em alteração do funcionamento dos mecanismos neurais, com conseqüente limitação na capacidade funcional das crianças, devido à espasticidade, redução da coordenação e do controle motor<sup>6</sup>. Assim, a neuroinflamação é considerada um dos principais fatores relacionados ao comprometimento do neurodesenvolvimento<sup>11,12,15</sup>. No entanto, é importante ressaltar que o desenvolvimento cerebral após a lesão associada à inflamação neonatal não é estático, nem decorrente de evento único. Nesse processo dinâmico, há participação de diversas cascatas celulares e moleculares, presentes no SNC ao longo da vida<sup>29</sup>.

Em geral, altos níveis de biomarcadores inflamatórios, incluindo citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores neurotróficos, moléculas produzidas pelo fígado e neutrófilos ativados, durante as primeiras semanas após o nascimento, têm sido associados à lesão cerebral e/ou pior desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) em longo prazo<sup>30-39</sup>. Os recém-nascidos que possuem elevados níveis de citocinas e quimiocinas e baixos níveis de fatores neurotróficos circulantes no primeiro mês de vida apresentam pior DNPM em longo prazo<sup>32,40,41</sup>.

Em contrapartida, as intervenções de reabilitação, por sua vez, promovem mudanças funcionais no cérebro, que se associam a maior liberação de fatores neurotróficos, além de favorecer o desenvolvimento neuropsicomotor com aprendizado de novas habilidades<sup>42</sup>. Em resposta à estimulação ambiental e/ou reabilitação, o mecanismo de plasticidade cerebral permite que o SNC reorganize a rede neuronal, com surgimento de novas sinapses, espinhas dendríticas e circuitos neuronais<sup>42-46</sup>. É uma propriedade intrínseca do SNC, refletindo sua capacidade de responder, de maneira dinâmica, ao ambiente e às novas experiências por meio da modificação de circuitos neurais e/ou restauração estrutural<sup>45</sup>.

Os estudos disponíveis que investigaram inflamação e desenvolvimento concentraram-se na associação entre a inflamação peri/neonatal e o desenvolvimento neuropsicomotor em longo prazo<sup>29-41</sup>. Esses estudos se limitaram a mensurar os marcadores biológicos nas primeiras semanas após o nascimento e correlacionaram tais medidas com o DNPM avaliado aos 24<sup>31-36,39</sup>, 36 meses de idade corrigida<sup>38</sup> e aos dez anos de idade<sup>30</sup>. Outro estudo avaliou a associação desses marcadores com o desenvolvimento durante o primeiro mês de vida<sup>29</sup>. Por outro lado, os estudos que avaliaram a neuroplasticidade cerebral o fizeram por meio de técnicas de neuroimagem funcionais<sup>43-46</sup>, como a ressonância magnética<sup>46</sup>.

A reorganização cerebral após lesões cerebrais pré-natais e perinatais é mais intensa durante os primeiros anos de vida. Dessa forma, considera-se que a intervenção precoce possa interferir positivamente no desenvolvimento neuropsicomotor<sup>46</sup>. No entanto, existem dados insuficientes na literatura sobre o impacto das intervenções de reabilitação, nos processos inflamatório e anti-inflamatório, no DNPM e na aquisição de novas habilidades funcionais nas crianças com PC.

São crescentes as evidências da alteração de marcadores inflamatórios e fatores neurotróficos circulantes em decorrência da neuroinflamação em neonatos e seu possível

papel na detecção precoce de lesão cerebral. Entretanto, há poucas informações sobre o comportamento longitudinal desses biomarcadores após a fase aguda da lesão cerebral e sua associação com o neurodesenvolvimento nos primeiros anos de vida. Estudos em crianças com PC também são escassos, o que torna relevante compreender e descrever o comportamento longitudinal de moléculas inflamatórias em resposta ao período de reabilitação em crianças com PC.

Portanto, o presente estudo se insere na mesma linha de pesquisa de minha dissertação de mestrado, que compreende aspectos clínicos, do neurodesenvolvimento e biomarcadores que atuam no SNC. Desta vez, porém, estudando crianças com diagnóstico de PC.

A hipótese desta tese é de que programas de reabilitação que utilizam intervenção sistematizada e estruturada, realizada por equipe multidisciplinar, são capazes de modular a resposta inflamatória, a liberação de fatores neurotróficos e promover o DNPM.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Colver A, Fairhurst C, Pharoah PO. Cerebral palsy. *Lancet*. 2014;383(9924):1240-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)
- [2] Boruczkowski D, Pujal JM, Zdolińska-Malinowska I. Autologous cord blood in children with cerebral palsy: a review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10). pii:E2433. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20102433>.
- [3] Pregnolato S, Chakkarapani E, Isles AR, Luyt K. Glutamate Transport and Preterm Brain Injury. *Front Physiol*. 2019;10:417. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00417>.
- [4] Fitzgerald E, Boardman JP, Drake AJ. Preterm Birth and the Risk of Neurodevelopmental Disorders - Is There a Role for Epigenetic Dysregulation?. *Curr Genomics*. 2018;19(7):507-521. DOI:10.2174/1389202919666171229144807.
- [5] Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 2007;49(109):8-14.
- [6] Shin HI, Sung KH, Chung CY, Lee KM, Lee SY, Lee IH, Park SM. Relationships between isometric muscle strength, gait parameters, and gross motor function measure in patients with cerebral palsy. *Yonsel Medical Journal*. 2016;57(1):217-24. DOI: <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.217>.
- [7] McDowell B. The Gross Motor Function Classification System--expanded and revised. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(10):725. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2008.03104.x>.
- [8] Fragopoulou AF, Qian Y, Diaz Hejtz R, Forssberg H. Correction to: Can Neonatal Systemic Inflammation and Hypoxia Yield a Cerebral Palsy-Like Phenotype in Periadolescent Mice?. *Mol Neurobiol*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1610-6>.
- [9] Colella M, Zinni M, Pansiot J, Cassanello M, Mairesse J, Ramenghi L, Baud O. Modulation of Microglial Activation by Adenosine A2a Receptor in Animal Models of Perinatal Brain Injury. *Front Neurol*. 2018 Sep 11;9:605. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00605>.

- [10] Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol*. 2012 Apr;71(4):444-57. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.22620>.
- [11] Paton MCB, Allison BJ, Li J, Fahey MC, Sutherland AE, Nitsos I. Human Umbilical Cord Blood Therapy Protects Cerebral White Matter from Systemic LPS Exposure in Preterm Fetal Sheep. *Dev Neurosci*. 2018;40(3):258-270. DOI: <https://doi.org/10.1159/000490943>.
- [12] Lei J, Rosenzweig JM, Mishra MK, Alshehri W, Brancusi F, McLane M, et al. Maternal dendrimer-based therapy for inflammation-induced preterm birth and perinatal brain injury. *Sci Rep*. 2017;7(1):6106. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06113-2>.
- [13] Stewart A, Tekes A, Huisman TA, Jennings JM, Allen MC, Northington FJ. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(1):27.e1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.02.049>.
- [14] Hielkema T, Hadders-Algra M. Motor and cognitive outcome after specific early lesions of the brain - a systematic review. *Dev Med Child Neurol*. 2016;58 Suppl 4:46-52. DOI: <https://doi.org/10.1111/dmcn.13047>.
- [15] Magalhães RC, Pimenta LP, Barbosa IG, Moreira JM, de Barros JLVM, Teixeira AL, Simões e Silva AC. Inflammatory molecules and neurotrophic factors as biomarkers of neuropsychomotor development in preterm neonates: A Systematic Review. *Int J Dev Neurosci*. 2018;65:29-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.006>.
- [16] Shechter R1, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):206-18. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3391>.
- [17] Kazak F, Yarim GF. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice: Involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2017;658:32-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.059>.
- [18] Malaeb S, Dammann O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *J Child Neurol*. 2009;24(9):1119-26. DOI:<https://doi.org/10.1177/0883073809338066>

- [19] Molnár Z, Rutherford M. Brain maturation after preterm birth. *Sci Transl Med*. 2013;5(168):168ps2. DOI: <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005379>
- [20] Cordeiro CN, Savva Y, Vaidya D, Argani CH, Hong X, Wang X, Burd I. Mathematical modeling of the biomarker milieu to characterize to preterm birth and predict adverse neonatal outcomes. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(5):594-601. DOI: <http://doi.org/10.1111/aji.12502>.
- [21] De Luca C, Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. Neuro-Immune Hemostasis: Homeostasis and Diseases in the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:459. DOI: 10.3389/fncel.2018.00459.
- [22] Xia L, Chen M, Bi D, Song J, Zhang X, Wang Y, et al. Combined Analysis of Interleukin-10 Gene Polymorphisms and Protein Expression in Children With Cerebral Palsy. *Front Neurol*. 2018;9:182. DOI: 10.3389/fneur.2018.00182.
- [23] Galinsky R, Davidson JO, Dean JM, Green CR, Bennet L, Gunn AJ. Glia and hemichannels: key mediators of perinatal encephalopathy. *Neural Regen Res*. 2018;13(2):181-189. DOI: 10.4103/1673-5374.226378.
- [24] Von Walden F, Gantelius S, Liu C, Borgström H, Björk L, Gremark O, et al. Muscle contractures in patients with cerebral palsy and acquired brain injury are associated with extracellular matrix expansion, pro-inflammatory gene expression, and reduced rRNA synthesis. *Muscle Nerve*. 2018;58(2):277-285. DOI: 10.1002/mus.26130.
- [25] Wixey JA, Chand KK, Colditz PB, Bjorkman ST. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2017;54:117-124. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.11.012>.
- [26] Liberman AC, Trias E, da Silva Chagas L, Trindade P, Dos Santos Pereira M, Refojo D, et al. Neuroimmune and Inflammatory Signals in Complex Disorders of the Central Nervous System. *Neuroimmunomodulation*. 2018;25(5-6):246-270. DOI: <http://doi.org/10.1159/000494761>.
- [27] Koh H, Rah WJ, Kim YJ, Moon JH, Kim MJ, Lee YH. Serial Changes of Cytokines in Children with Cerebral Palsy Who Received Intravenous Granulocyte-colony Stimulating Factor Followed by Autologous Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Korean Med Sci*. 2018;33(21):e102. DOI: <http://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e102>.

- [28] Koh H, Hwang K, Lim HY, Kim YJ, Lee YH. Mononuclear cells from the cord blood and granulocyte colony stimulating factor-mobilized peripheral blood: is there a potential for treatment of cerebral palsy?. *Neural Regen Res.* 2015;10(12):2018-24. DOI: <http://doi.org/10.4103/1673-5374.172321>.
- [29] Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC. Urinary Levels of IL-1 $\beta$  and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflamm.* 2017;2017:8201423. DOI: <http://doi.org/10.1155/2017/8201423>.
- [30] Tilley SK, Joseph RM, Kuban KCK, Dammann OU, O'Shea TM, Fry RC. Genomic biomarkers of prenatal intrauterine inflammation in umbilical cord tissue predict later life neurological outcomes. *Plos One.* 2017;12(5):e0176953. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176953>
- [31] Korzeniewski SJ, Allred E, Logan JW, Fichorova RN, Engelke S, Kuban KCK, et al. Elevated endogenous erythropoietin concentrations are associated with increased risk of brain damage in extremely preterm neonates. *PLoS One.* 2015;10(3):e0115083-e. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115083>
- [32] Kuban KC, O'Shea TM, Allred EN, Fichorova RN, Heeren T, Paneth N, et al. The breadth and type of systemic inflammation and the risk of adverse neurological outcomes in extremely low gestation newborns. *Pediatr Neurol.* 2015;52(1):42-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.10.005>
- [33] Rose J, Vassar R, Cahill-Rowley K, Hintz SR, Stevenson DK. Neonatal Biomarkers of Inflammation: Correlates of Early Neurodevelopment and Gait in Very-Low-Birth-Weight Preterm Children. *American Journal of Perinatology.* 2015;33(1):71-8. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557106>
- [34] Korzeniewski SJ, Soto-Rivera CL, Fichorova RN, Allred EN, Kuban KCK, O'Shea TM, et al. Are preterm newborns who have relative hyperthyrotropinemia at increased risk of brain damage? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2014;27(11-12):1077-88. DOI: <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0059>
- [35] Leviton A, Fichorova RN, Shea TM, Kuban K, Paneth N, Dammann O, et al. Two-hit model of brain damage in the very preterm newborn: small for gestational age and postnatal systemic inflammation. *Pediatr Res.* 2013;73(3):362-70. DOI: <https://doi.org/10.1038/pr.2012.188>

- [36] O'Shea TM, Shah B, Allred EN, Fichorova RN, Kuban KCK, Dammann O, et al. Inflammation-initiating illnesses, inflammation-related proteins, and cognitive impairment in extremely preterm infants. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013;29:104-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.012>
- [37] O'Shea TM, Allred EN, Kuban KCK, Dammann O, Paneth N, Fichorova R, et al. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. *Journal of Pediatrics*. 2012;160(3):395-401.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.08.069>
- [38] Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, et al. Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Human Development*. 2011;87(6):439-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.03.006>
- [39] Silveira RC, Procianoy RS. High plasma cytokine levels, white matter injury and neurodevelopment of high risk preterm infants: Assessment at two years. *Early Human Development*. 2011;87(6):433-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.03.009>
- [40] Varner MW, Marshall NE, Rouse DJ, Jablonski KA, Leveno KJ, Reddy UM, Mercer BM, Iams JD, Wapner RJ, Sorokin Y, Thorp JM, Malone FD, Carpenter M, O'Sullivan MJ, Peaceman AM, Hankins GD, Dudley DJ, Caritis SN, et al. The association of cord serum cytokines with neurodevelopmental outcomes. *Am J Perinatol*. 2015;30(2):115-22. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0034-1376185>.
- [41] Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Lupton AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr*. 2014;164(3):468-74.e1. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.067>.
- [42] Dinomais M, Marret S, Vuillerot C. Brain plasticity and early rehabilitative care for children after neonatal arterial cerebral infarction. *Arch Pediatr*. 2017;24(9S):9S61-9S68. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0929-693X\(17\)30333-0](http://doi.org/10.1016/S0929-693X(17)30333-0).
- [43] Matusz PJ, Key AP, Gogliotti S, Pearson J, Auld ML, Murray MM, et al. Somatosensory Plasticity in Pediatric Cerebral Palsy following Constraint-Induced Movement Therapy. *Neural Plast*. 2018;2018:1891978. DOI: <http://doi.org/10.1155/2018/1891978>.

[44] Weinstein M, Green D, Rudisch J, Zielinski IM, Benthem-Muñiz M, Jongsma MLA. Understanding the relationship between brain and upper limb function in children with unilateral motor impairments: A multimodal approach. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018;22(1):143-154. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.09.012>.

[45] Gaberova K, Pacheva I, Ivanov I. Task-related fMRI in hemiplegic cerebral palsy-A systematic review. *J Eval Clin Pract*. 2018;24(4):839-850. DOI: <http://doi.org/10.1111/jep.12929>.

[46] McClelland VM. The neurophysiology of paediatric movement disorders. *Curr Opin Pediatr*. 2017;29(6):683-690. DOI: <http://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000547>.

### 3 MANUSCRITO REVISÃO

#### **Inflammatory molecules in children with cerebral palsy: a systematic review.**

Rafael Coelho Magalhães<sup>1</sup>, et al.

1- Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG

#### **Abstract:**

**Background:** An exacerbated systemic inflammatory response has been associated with the occurrence of central nervous system injuries that may determine, in long term, motor, sensorial and cognitive disabilities. Persistence of this exacerbated inflammatory response seems to be involved in the pathophysiology of cerebral palsy (CP). **Methods:** A systematic search was conducted in Bireme, Embase, PubMed and Scopus including studies that were published until August 2018. The key words used were “cerebral palsy”, “inflammation”, “oxidative stress”, “cytokines”, “chemokines”, “neuropsychomotor development”, “neurodevelopment outcomes” and “child”. The quality of the eligible studies was determined according to the criteria suggested by the Newcastle-Ottawa Scale (NOS). **Results:** Six eligible studies aimed to investigate the association between peripheral inflammatory molecules and neurodevelopment in infants. No studies including markers of oxidative stress were found. The studies differed regarding CP-related risk factors and its classification. All of them measured inflammatory proteins in whole blood, plasma or serum. In four studies, higher circulating levels of cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CXCL8/IL-8, were associated with abnormal neurological findings. **Conclusion:** The investigation of the potential association between inflammatory molecules and neurological development in children with CP requires further original studies in order to clarify the influence of prenatal and perinatal inflammation on neurological outcomes.

**Key words:** cerebral palsy, inflammation, oxidative stress, cytokines, neurodevelopmental outcome.

#### **What this paper adds?**

This systematic review about the relation between inflammatory molecules and neurodevelopment in children with cerebral palsy showed current evidence on the role of cytokines and brain damage. In this review, studies were selected through rigorous inclusion criteria and were carefully analyzed. The main finding was that higher circulating levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CXCL8/IL-8 were associated with abnormal neurological findings in patients with cerebral palsy.

## **1- Introduction**

Cerebral palsy (CP) is a chronic non-progressive encephalopathy characterized by the occurrence of acquired brain injury associated with altered neuropsychomotor development [1-3]. It is the most common cause of motor disability in children worldwide with an estimated prevalence of 1.5 to 4 per 1000 children [1,4,5], but with a higher prevalence of up to 10 per 1000 in low-resource settings [5].

The classification of CP varies according to the type and distribution of motor abnormalities and the location of the brain injury, including spastic (quadriparetic, diparetic or hemiparetic/unilateral), dyskinetic and ataxic subtypes [9].

Central nervous system (CNS) injury is multifactorial and includes exposure of the fetus or the newborn to acute and chronic infection/inflammation and/or perinatal hypoxia-ischemia (HI) [11]. The exacerbated inflammatory response is related to neuronal death [12,13] and, as a consequence, long-term motor, sensorial, or cognitive disabilities [7,12,13]. There is also evidence that CP may be related to the persistence of exacerbated or chronic inflammatory processes in CNS [7-8].

Neuronal lesions related to inflammation can induce a cascade of immune responses, including elevation of circulating cytokines and chemokines that might participate in the establishment of brain injury [14,15], [16]. Some molecules, including interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), have been frequently associated with inflammatory response and adverse neurologic outcomes [17,18].

The balance between pro-inflammatory and immunomodulatory processes modulates the repair/resolution continuum and the consequent occurrence of injury [17,19-21]. It is important to emphasize that brain development after an injury related to inflammation is not a static event, but a complex and dynamic process, in which several cellular and molecular cascades are involved, throughout lifetime [22].

Thereby, we conducted a systematic review to evaluate the current findings regarding the association between cerebral palsy, inflammatory mediators, oxidative stress and neurodevelopmental outcome in children. Our aim is to better understand this relationship, by the hypothesis of exacerbate inflammatory response and increased oxidative stress may impair neurodevelopment in children with CP.

## **2- Objective**

The aim of this study was to provide a systematic review on the evidence of the interaction between inflammatory biomarkers, oxidative stress and neuropsychomotor development in children with CP.

## **3- Methods**

### *3.1- Design*

This systematic review was conducted according to the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [23].

### *Criteria for Considering Studies for this Review*

### *3.2- Types of Studies*

Observational studies, as well as transversal or cohort, were eligible for inclusion. The following studies were excluded from this review: (i) animal studies, (ii) review articles, (iii) intervention studies, or (iv) studies in which inflammatory or oxidative stress markers were not measured.

### *3.3- Studies Populations*

The target population of this review consisted of children with CP.

### *3.4- Search Methods for Identification of Studies*

An electronic search for relevant articles was performed independently by three authors (R.C.M., A.O.L. and A.A.S.S.) using BIREME, EMBASE, PUBMED and SCOPUS. Articles published until August 2018 were included in this review. No language restrictions were applied. The search terms utilized were “cerebral palsy”, “inflammation”, “oxidative stress”, “cytokines”, “chemokines”, “neuropsychomotor development”, “neurodevelopment outcomes” and “child”. The search combinations used were: ((cerebral palsy) OR (brain injury)) AND ((inflammation OR (oxidative stress) OR (cytokines) OR (chemokines))) AND ((neuro psychomotor development) OR (neurodevelopmental outcomes)) AND child.

### *3.5- Selection of Studies*

Three researchers independently (R.C.M., A.O.L. and A.A.S.S.) reviewed the eligibility of the studies and analyzed their characteristics, quality, and accuracy. Studies were initially extracted for abstract screening and those found to be relevant were fully

retrieved for a detailed review. Disagreements on eligibility were resolved by discussion between the authors. Once the studies to be included were established, the authors extracted relevant data. Whenever necessary, authors of the selected articles were contacted and asked to provide raw data. To describe potential for bias, the level of evidence of each retrieved study was evaluated according to the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non-randomized studies in meta-analyses [24].

#### **4- Results**

The first search strategy identified 461 articles. Prisma Protocol was used to select the studies [23]. Initial screening removed duplicates, studies with no apparent relevance and papers that included subjects specific conditions, such as autism, yielded 375 unique articles. After excluding non-experimental review articles, studies with animal models, and clinical trials in which inflammatory markers were not measured, six original studies were considered eligible for this systematic review (Figure 1). All selected studies [25-30] were assessed by the Newcastle-Ottawa Scale [24] (Table 1).

##### *4.1- Study characteristics and methodological issues*

The selected studies (n=6) investigated diverse populations exposed to different risk factors for neurodevelopmental delay [25-30]. The gestational age varied among the studies. Preterm [25,28,29] and term neonates [26,30] were included. Only one study had birth weight between 401-1000g as an inclusion criterion (Table 2). We did not find any study evaluating oxidative stress markers. Inflammatory molecules analyzed included IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, CXCL8/IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CCL4/MIP- $\beta$ , CCL5/RANTES [26-30]. The samples for the analysis of these molecules were collected within the first three weeks after birth, and analyzed in whole blood, plasma or serum [26-30]. Patients with diagnosis of sepsis or necrotizing enterocolitis (NEC) were included in three studies [27-29]. The results from these latter articles were shown separately, considering that infection may be an independent risk factor for increased inflammatory response [27-29] (Table 3).

In only one study inflammatory molecules were analyzed in association with placental culture and histopathology [29]. Comparison to a control group occurred in three studies [25,28]. Samples were collected at different time points: at birth (umbilical cord serum) [22,27,29], at one [26,30], two [26] three [26,27], seven [27], fourteen or 21 days after birth [27,28]

The methods used to assess inflammatory molecules differed among the studies. In regard to immunoassay techniques, three studies used Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) [25,26,29] and three used cytometry techniques, including Multiplex Luminex Assay [27], DPC Immulite System [28] and Recycling Immunoaffinity Chromatography [30].

All studies evaluated the association between inflammatory molecules and neuropsychomotor development [25-30]. In these studies, the collection of biological material and the evaluation of neurodevelopmental outcome were not simultaneous. The protocol of each study had a different age parameter for the developmental evaluation, being performed only once within a corrected gestational age of 15-18 [26], 18-22 [27], 24 [25], 24-28 [28] or 30 months [30]. Only one study investigated long-term outcome, at the age of five to eight years [29].

The studies also differed in regard to the choice of developmental tests used to measure children's neuropsychomotor abilities. The tests used were the Bayley Scales of Toddler Development II or III scale (BDS II/III) [25-28,30] and Peabody Picture Vocabulary test 3rd edition (PPVT-III), Wechsler Intelligence Scale for Children-IV (WISC-IV) or the Differential Ability Scales (DAS) [29]. The BDS II/III, PPVT-III and WISC-IV were indicative of delay or significant impairment if the scores were below 70 [25-30].

The studies also diverged regarding the diagnosis and classification of CP. Different diagnostic criteria were used by the studies, including: (i) the proposed definition and classification of cerebral palsy [25]; (ii) abnormal tone, muscle tone and impaired range or control of movements assessed by a neurologist [27-29]; (iii) asphyxia with metabolic acidosis [26,30]; and (iv) magnetic resonance (MR) alterations [30]. Additionally, the age of diagnosis varied from 6 months to 8 years of age [25-27]. Two studies stratified CP by standardized classification such as Gross Motor Function Classification System (GMFCS) [25], Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health (NICHD) classification [26]. Other two studies presented CP classification according to severity type [28,30], while one study subdivided CP between quadriparetic, diparetic or hemiparetic/unilateral [27]. One study did not rank the CP [29].

#### *4.2- Blood Analysis and Neurodevelopment Outcome*

The neurodevelopment outcome was associated with peripheral inflammatory biomarkers [25-30] (Table 4). Four of the studies associated higher levels of cytokines and chemokines, including IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8 and TNF- $\alpha$ , and trophic factors, such as VEGF

and GFAP, with abnormal neuropsychomotor development [26-28,30]. IL-6 and CXCL8/IL-8 have been described as responsible for a variety of inflammatory challenges and represent a final common pathway of brain injury [26]. CXCL8/IL-8 promotes the infiltration of activated neutrophils in brain parenchyma and has been associated with neuropsychomotor delay or moderate-severe CP [27,28]. In addition, VEGF is a growth factor that may contribute to inflammatory responses by causing edema and vascular permeability [26]. The cytokine signaling is a potential mechanism through which IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  may lead to or exacerbate neonatal brain injury. Summarizing, in four studies, peripheral inflammatory biomarkers can be predictive of abnormal neurological outcome [26-28,30] and increase risk for CP [27]. On the other hand, no significant relation between inflammatory molecules and neurodevelopment was found in two studies [25,29].

In three studies, neurological examination and MR or ultrasound (US) were used to correlate the inflammatory profile with neuropsychomotor development [26,28,30]. In these studies, neurological evaluation may help to understand the severity of brain injury. It was used to strengthen the correlation of inflammatory profile and neurological outcome [26,28,30].

## **5- Discussion**

The current systematic review summarizes the available evidence on the association between inflammatory molecules and neurodevelopment outcome in children with CP. Six studies were identified and the majority reported an association between peripheral inflammation and neurological impairment during the first years of life [25-30].

A prolonged or exacerbated inflammatory response may be characterized by the elevation of inflammatory molecules, including cytokines, chemokines, adhesion molecules, liver-produced proteins, neutrophil activation molecules and also growth factors [31]. The selected studies analyzed cytokines, chemokines and neurotrophic factors. No studies including markers of oxidative stress were found.

Inflammation is considered a physiological and necessary process for the protection and development of CNS [17,32-35]. It can become pathological depending on its location, timing, intensity, and chronicity [17,33]. Systemic inflammatory response characterized by higher levels of cytokines, as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , chemokines, as CXCL8/IL-8, and lipopolysaccharide (LPS) may result in activation of the cerebrovascular endothelium and

surrounding cells, breaking the blood-brain-barrier (BBB) [36,37]. As a consequence, there is infiltration of circulating immune cells and extravasation of plasma components into the brain tissue, resulting in brain damage [36,37].

These increased levels of cytokines trigger the inflammatory response in the CNS [38-40]. Inflammatory stimulus may induce neuronal and glial cell apoptosis, therefore interfering in axonal growth and myelin sheath formation [41,42]. Problems with neuronal migration, division and synaptic development may also occur, resulting in neurodevelopmental alterations [43]. When this response occurs and is fully resolved without brain cells death, typical abilities are maintained [44]. On the contrary, if this response is prolonged or exacerbated, cell death in CNS and consequent loss of function may occur [17,32]. In summary, brain damage and lasting functional impairment most likely result from the abnormal balance between injury mechanisms and endogenous protection [45].

MR findings are important resources to evaluate the extension and severity of brain injury [26,30,46], aiding in the detection of ischemia and/or diffuse axonal injury, and complementing the neurological evaluation to establish the prognosis [46]. Nevertheless, in the studies that analyzed inflammatory molecules and MR, peripheral cytokine levels were not associated with structural MR findings [26,30]. The majority of neuropsychomotor deficits did not relate to specific patterns of injury, including severe grade intraventricular hemorrhage with post hemorrhagic ventricular dilatation, hemorrhagic parenchymal infarction or cystic periventricular leukomalacia (PVL) [47]. This suggests that there might be damage and remodeling in the developing brain that result in a more diffuse process, not detected as brain lesions on MR imaging [47].

Brain injury at birth is multifactorial, frequently correlated to preterm birth and hypoxia-ischemia. External factors can modulate how injury evolves, and affect the measurements used for diagnosis and prognosis. [48]. Hypoxia-ischemia at birth and prematurity were associated with nearly half of all cases of CP [48]. Subjects included in these six selected studies diverge in clinical characteristics and in the exposure to risk factors related to brain injury and CP. Demographic factors, gestational age and neonatal care may be key factors, capable to influence the pro or anti-inflammatory response and neurodevelopmental outcomes [47,49,50]. Also, birth weight is a known independent risk factor for worst neurodevelopment, and is associated with systemic inflammation [51]. However, only one study had low birth weight as the single inclusion criterion. Perinatal

infection and inflammation are also independent risk factors related to brain injury [52] and neuropsychomotor delay [53]. Recent reports have shown that any form of systemic inflammation, such as sepsis, meningitis with or without bacteremia, bronchopulmonary dysplasia (BPD) and necrotizing enterocolitis (NEC) were all associated with impaired growth and increased risk of adverse neurologic sequelae in premature neonates [47]. Three among the six selected studies included subjects with sepsis, although with contradictory results [27-29]. In two of them, elevated cytokine levels were associated with worst development [27,28]. The presence of neonatal bacteremia may imply in the activation of the fetal inflammatory response [51,54]. It is a key event, in which the duration of exposure to inflammation can aggravate brain injury and adverse development [52]. Both a sensitizing and preconditioning role of bacterial endotoxin upon the effect of hypoxia-ischemia on the immature brain have been seen in animal models, but supporting clinical data are limited [52]. In addition, neurotrophins, such as BDNF and NT-3, were associated with NEC and sepsis, rather than neurological outcomes. These findings suggest that neurotrophins may have additional roles in the inflammatory response [18]. In one study, neonatal complications, gestational age at delivery and caregiver intelligence quotient were related to neuromotor impairment, but not to *in utero* exposure to acute inflammation [29]. These findings emphasize the crucial impact of demographic characteristics on neurodevelopment.

This systematic review has limitations. The studies used different time-points in their research, impairing the comparison of their findings. Different results, diverse etiology and poor understanding of the exactly trigger or moment of the inflammatory stimuli hinder the definition of cause or consequence of the elevated levels of inflammatory markers in relation to brain injury and neurological outcome. The knowledge gap regarding the mechanisms by which the neurodevelopmental delay occurs is also considered another problem. As a matter of fact, it is hard to define whether the elevation of inflammatory related-proteins is responsible for the neurodevelopmental impairment or if both processes occur in parallel. It is also difficult to obtain homogenous groups in observational studies.

This review summarizes the current results regarding the association of inflammatory molecules and neurodevelopment outcome in children with CP. It should be pointed that there are established precepts by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) that encourage the integration of biomarkers in drug

development [55]. Still, more knowledge is necessary in order to discriminate reliable biomarkers that might assist in the prediction of outcomes and be used in clinical practice.

## **6- Conclusion**

The association of inflammatory molecules with CP and neurodevelopment outcome requires further investigation in order to clarify the real influence of inflammation on neurological outcomes.

### **Acknowledgement section:**

#### **Financial disclosure:**

The authors do not have any financial relationships relevant to this article to disclose.

#### **Funding source:**

None.

#### **Conflicts of interest:**

None.

#### **Contributors' statement**

Dr. Magalhães conceptualized and designed the study, reviewed identified articles to determine if they met defined study inclusion and exclusion criteria, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Dr. Simões e Silva conceptualized and designed the study, reviewed identified articles to determine if they met defined study inclusion and exclusion criteria, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Drs. Lumar and Saldanha da Silva reviewed identified articles to determine if they met defined study inclusion and exclusion criteria, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Drs. Moreira and Teixeira conceptualized the study, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

## 7-References

- [1] Chambers C, Sokhey T, Gaebler-Spira D, Kording KP. The integration of probabilistic information during sensorimotor estimation is unimpaired in children with cerebral palsy. *Plos One*. 2017;12(11):e0188741. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188741>
- [2] Dreher T, Thomason P, Švehlík M, Döderlein L, Wolf SI, Putz C, Uehlein O, Chia K, Steinwender G, Sangeux M, Graham HK. Long-term development of gait after multilevel surgery in children with cerebral palsy: a multicentre cohort study. *Dev Med Child Neurol*. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/dmcn.13618>.
- [3] Colver A, Fairhurst C, Pharoah PO. Cerebral palsy. *Lancet*. 2014;383(9924):1240-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)
- [4] Franzén M, Hägglund G, Alriksson-Schmidt A. Treatment with Botulinum toxin A in a total population of children with cerebral palsy - a retrospective cohort registry study. *BMC Musculoskel Disord*. 2017;18(1):520. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1880-y>
- [5] Monokwane B, Johnson A, Gambah-Sampanye C, Khurana E, Baier J, Baronov E, Westmoreland KD, Mazhani L, Steenhoff AP, Bearden DR. Risk Factors for cerebral palsy in Botswana. *Pediatr Neurol*. 2017;77:73-77 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.07.014>
- [6] Savard A, Brochu ME, Chevin M, Guiraut C, Grbic D, Sébire G. Neuronal self-injury mediated by IL-1 $\beta$  and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation*. 2015;12:111. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0330-8>.
- [7] Girard S, Kadhim H, Rou M, Lavoie K, Brouchu ME, Larouche A, Sébirre G. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatric Neurology*. 2009;40(3):168-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.09.016>
- [8] Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, Dan B, Jacobsson B. A report: the definition and classification of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 2007;109:8-14. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.tb12610.x>
- [9] Longo M, Hankins GD. Defining cerebral palsy: pathogenesis, pathophysiology and new intervention. *Minerva Ginecol*. 2009;61(5):421-29. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(03\)00574-X](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(03)00574-X)

- [10] Shin HI, Sung KH, Chung CY, Lee KM, Lee SY, Lee IH, Park SM. Relationships between isometric muscle strength, gait parameters, and gross motor function measure in patients with cerebral palsy. *Yonsel Medical Journal*. 2016;57(1):217-24. DOI: <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.217>.
- [11] Bennet L, Dhillon S, Lear CA, van den Heuvel L, King V, Dean JM, Wassink G, Davidson JO, Gunn AJ. Chronic inflammation and impairment development of the preterm brain. *J Reprod Immunol*. 2018;125:45-55 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.11.003>
- [12] Falahati S, Breu M, Waickman AT, Phillips AW, Arauz EJ, Snyder S, Porambo M, Goeral K, Comi AM, Wilson MA, Johnston MV, Fatemi A. Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia. *Dev Neurosci*. 2013;35(2-3):182-96. DOI: <https://doi.org/10.1159/000346682>
- [13] Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol*. 2012; 71(4): 444-57. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.22620>
- [14] Kazak F, Yarim GF. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice: Involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2017;658:32-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.059>.
- [15] Malaeb S, Dammann O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *J Child Neurol*. 2009; 24(9):1119-26. DOI: <https://doi.org/10.1177/0883073809338066>
- [16] Molnár Z, Rutherford M. Brain maturation after preterm birth. *Sci Transl Med*. 2013;5(168):168ps2. DOI: <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005379>
- [17] Magalhães RC, Pimenta LP, Barbosa IG, Moreira JM, de Barros JLVM, Teixeira AL, Simões e Silva AC. Inflammatory molecules and neurotrophic factors as biomarkers of neuropsychomotor development in preterm neonates: A Systematic Review. *Int J Dev Neurosci*. 2017;65:29-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.006>.
- [18] Cordeiro CN, Savva Y, Vaidya D, Argani CH, Hong X, Wang X, Burd I. Mathematical modeling of the biomarker milieu to characterize to preterm birth and

predict adverse neonatal outcomes. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(5):594-601. DOI: <http://doi.org/10.1111/aji.12502>.

[19] Lou ZY, Yu WB, Chen J, Jiang LS, Xiao BG, Liu ZG. Neuroprotective effect is driven through the upregulation of CB1 receptor experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Mol Neurosci.* 2016;58(2):193-200.

[20] Stewart, A, Tekes A, Huisman TAGM, Jennings JM, Allen MC, Northington FJ, Everett AD, Graham EM. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury. *Am J Obstetr Gynecol.* 2013;209(1):1010-16.

[21] Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, Hara T.: Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2011; 87(6):439-43.

[22] Hielkema T, Hadders-Algra M. Motor and cognitive outcome after specific early lesions of the brain - a systematic review. *Dev Med Child Neurolol.* 2016;58(4)46-52. DOI: <http://doi.org/10.1111/dmcn.13047>.

[23] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7): e1000097. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>

[24] Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Available at: [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp). Accessed December/2017.

[25] Varner MW, Marshall NE, Rouse DJ, Jablonski KA, Leveno KJ, Reddy UM, Mercer BM, Iams JD, Wapner RJ, Sorokin Y, Thorp JM, Malone FD, Carpenter M, O'Sullivan MJ, Peaceman AM, Hankins GD, Dudley DJ, Caritis SN, et al. The association of cord serum cytokines with neurodevelopmental outcomes. *Am J Perinatol.* 2015;30(2):115-22. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0034-1376185>.

[26] Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Luptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr.* 2014;164(3):468-74.e1. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.067>.

- [27] Carlo WA, McDonald SA, Tyson JE, Stoll BJ, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Goldberg RN, Das A, Schendel D, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Oh W, Laptook AR, Duara S, Fanaroff AA, Donovan EF, Korones SB, Stevenson DK, Papile LA, Finer NN, O'Shea TM, Poindexter BB, Wright LL, Ambalavanan N, Higgins RD, et al. Cytokines and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *J Pediatr.* 2011; 159(6): 919-25.e3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.05.042>.
- [28] Lodha A, Asztalos E, Moore AM. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatr.* 2010;99(3):338-43. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01600.x>
- [29] Andrews WW, Cliver SP, Biasini F, Peralta-Carcelen AM, Rector R, Alriksson-Schmidt AI, Faye-Petersen O, Carlo W, Goldenberg R, Hauth JC. Early preterm birth association between in utero exposure to acute inflammation and severe neurodevelopmental disability at 6 years of age. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(4):466.e1-466.e11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.12.031>.
- [30] Bartha AI, Foster-Barber A, Miller SP, Vigneron DB, Glidden DV, Barkovich AJ, Ferriero DM. Neonatal encephalopathy Association of cytokines with MR spectroscopy and outcome. *Pediatr Res.* 2004; 56(6): 960-6. DOI: <http://doi.org/10.1203/01.PDR.0000144819.45689.BB>
- [31] Kuban KC, O'Shea TM, Allred EN, Fichorova RN, Heeren T, Paneth N, Hirtz D, Dammann O, Leviton A, et al. The Breadth and Type of Systemic Inflammation and the Risk of Adverse Neurological Outcomes in Extremely Low Gestation Newborns. *Pediatr Neurol.* 2015; 52(1):42-48. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.10.005>.
- [32] Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC. Urinary Levels of IL-1 $\beta$  and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflammation.* 2017;2017:8201423. DOI: <http://doi.org/10.1155/2017/8201423>.
- [33] Nadeau-Vallée M, Chin PY, Belarbi L, Brien MÈ, Pundir S, Berryer MH, Beaudry-Richard A, Madaan A, Sharkey DJ, Lupien-Meilleur A, Hou X, Quiniou C, Beaulac A, Boufaied I, Boudreault A, Carbonaro A, Doan ND, Joyal JS, Ludell WD, Oslon DM, Robertson SA, Girard S, Chemtob S. Antenatal suppression of IL-1 protects against inflammation-induced fetal injury and improves neonatal and developmental outcomes in

mice. *J Immunol.* 2017;198(5):2047-2062. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1601600>.

[34] Ranchhod SM, Gunn KC, Fowke TM, et al. Potential protective strategies for perinatal infection and inflammation. *Int J Dev Neurosci.* 2015;45:44-54. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.02.006>.

[35] Mallard C, Davidson JO, Tan S, et al. Astrocytes and microglia in acute cerebral injury underlying cerebral palsy associate with preterm birth. *Pediatr Res.* 2014;75(1):234-40. DOI: <http://doi.org/10.1038/pr.2013.188>

[36] Piro JR, Suidan GL, Quan J, Pi Y, O'Neill SM, Ilardi M, Pozdnyakov N, Lanz TA, Xi H, Bell RD, Samad TA. Inhibition of 2-AG hydrolysis differentially regulates blood brain barrier permeability after injury. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):142. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12974-018-1166-9>.

[37] Diaz-Cañestro C, Merlini M, Bonetti NR, Liberale L, Wüst P, Briand-Schumacher S, Klohs J, Costantino S, Miranda M, Schoedon-Geiser G, Kullak-Ublick GA, Akhmedov A, Paneni F, Beer JH, Lüscher TF, Camici GG. Sirtuin 5 as a novel target to blunt blood-brain barrier damage induced by cerebral ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2018;260:148-155. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.12.060>.

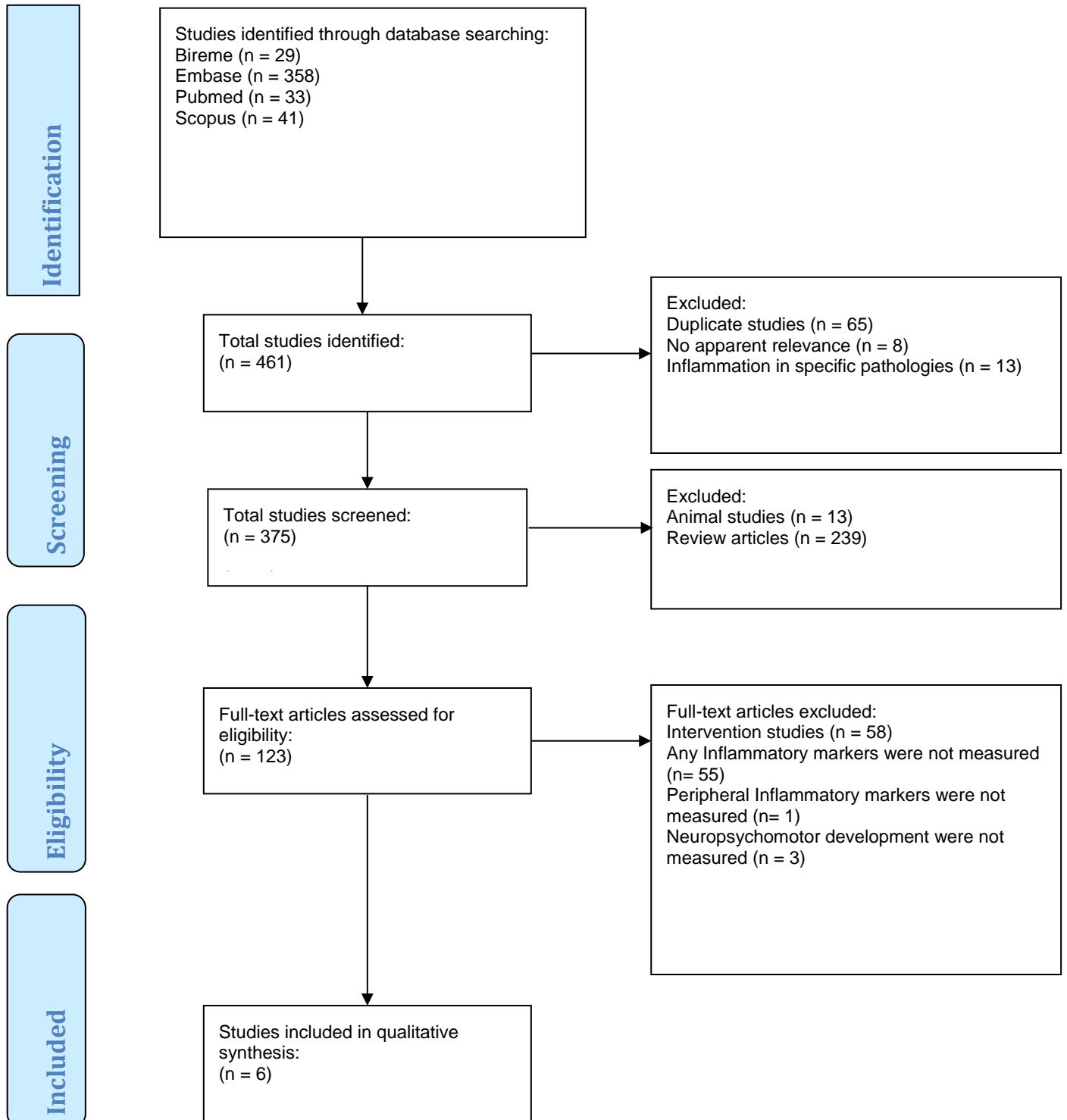
[38] Tomasoni R, Morini R, Lopez-Atalaya JP, Corradini I, Canzi A, Rasile M, Mantovani C, Pozzi D, Garlanda C, Mantovani A, Menna E, Barco A, Matteoli M. Lack of IL-1R8 in neurons causes hyperactivation of IL-1 receptor pathway and induces MECP2-dependent synaptic defects. *Elife.* 2017; 6: pii:e21735. DOI: <http://doi.org/10.7554/eLife.21735>.

[40] Coronel-Restrepo N, Posso-Osorio I, Naranjo-Escobar J, Tobón GJ. Autoimmune diseases and their relation with immunological, neurological and endocrinological axes. *Autoimmun Rev.* 2017;16(7): 684-692. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.05.002>.

[41] Jaeger HM, Pehlke JR, Kaltwasser B, Kilic E, Bähr M, Hermann DM, et al. The indirect NMDAR inhibitor flupirtine induces sustained post-ischemic recovery, neuroprotection and angiogenesis. *Oncotarget.* 2015;6(16):14033-44. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.4226>

- [42] Vinall J, Grunau RE. Impact of repeated procedural pain-related stress in infants born very preterm. *Pediatric Res.* 2014; 75(5): 584-7. DOI: <http://doi.org/10.1038/pr.2014.16>
- [43] Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. *J Neuroinflammation.* 2014;11:85. DOI: <http://doi.org/10.1186/1742-2094-11-85>
- [44] Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015; 100(6): F541–F552. DOI: <http://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306284>
- [45] O'Shea TM, Allred EN, Kuban KCK, Dammann O, Paneth N, Fichorova R, et al. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. *J Pediatr.* 2012;160(3):395-401.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.08.069>
- [46] Willianson C, Morgan L, Klein JP. Imaging in neurocritical care practice. *Semin Respir Crit Care Med.* 2017;38(6):840-852. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1608770>.
- [47] Patra A, Huang H, Bauer JA, Giannone PJ. Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate. *Neural Regen Res.* 2017;12(6):890-896. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.208547>.
- [48] Dhillon SK, Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Davidson JO, Juul S, Robertson NJ, Gunn AJ, Bennet L. The fetus at the tipping point: modifying the outcome of fetal asphyxia. *J Physiol.* 2018. DOI: <http://doi.org/10.1113/JP274949>.
- [49] Allred EN, Dammann O, Fichorova RN, Hooper SR, Hunter SJ, Joseph RM, Kuban K, Leviton A, O'Shea TM, Scott MN, et al. Systemic inflammation during the first month and the risk of attention deficit hyperactivity disorder characteristics among 10 years-old children born extremely preterm. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2017;12(3):531-543. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11481-017-9742-9>.
- [50] Talati AN, Hackney DN, Mesiano S. Pathophysiology of preterm labor with intact membranes. *Semin Perinatol.* 2017; DOI: <http://doi.org/10.1053/j.semperi.2017.07.013>.

- [51] Leviton A, Fichorova RN, Shea TM, Kuban K, Paneth N, Dammann O, et al. Two-hit model of brain damage in the very preterm newborn: small for gestational age and postnatal systemic inflammation. *Pediatr Res.* 2013;73(3):362-70. DOI: <https://doi.org/10.1038/pr.2012.188>
- [52] Tann CJ, Nakakeeto M, Willey BA, Sewegaba M, Webb EL, Oke I, Mutuuza ED, Peebles D, Musoke M, Harris KA, Sebire NJ, Klein N, Kurinczuk JJ, Elliott AM, Robertson NJ. Perinatal risk factors for neonatal encephalopathy: an unmatched case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2017;pii:fetalneonatal-2017-312744. DOI: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-312744>.
- [53] Ferreira RC, Mello RR, Silva KS. Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(3):293-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.09.006>
- [54] Tilley SK, Joseph RM, Kuban KCK, Dammann OU, O'Shea TM, Fry RC. Genomic biomarkers of prenatal intrauterine inflammation in umbilical cord tissue predict later life neurological outcomes. *Plos One.* 2017;12(5):e0176953. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176953>
- [55] Serpero LD, Bellissima V, Collivicchi M, Sabatini M, Frigioa A, Ricotti A, Ghiglione V, Strozzi MC, Li Volti G, Galvano F, Gazzolo D. Next generation for brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; suppl 2: 44-9. DOI: <http://doi.org/10.3109/14767058.2013.829688>.



**Figure 1:** PRISMA flow diagram for observational studies of correlation between inflammatory markers and neurodevelopment. (2-column fitting image)

**Table 1.** Assessment of the studies by the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non-randomized studies in meta-analyses. (2-column fitting image)

<b>Author</b>	<b>Selection</b>	<b>Comparability</b>	<b>Outcome</b>
Varner <i>et al</i> , 2015 [29]	★★★★	★★	★★★
Chalak <i>et al</i> , 2014 [30]	★★★★	★★	★★★
Carlo <i>et al</i> , 2011 [31]	★★★★★	★★	★★★
Vasiljevic <i>et al</i> , 2011 [32]	★★★★★	★★	★★★
Lodha <i>et al</i> , 2010 [33]	★★★★★	★★	★★★
Andrews <i>et al</i> , 2008 [34]	★★★★★	★★	★★★
Bartha <i>et al</i> , 2004 [35]	★★★★★	★★	★★★

Table 2. Association between inflammatory molecules and neurodevelopment outcome in cerebral palsy (2-column fitting image)

Author	Age of subjects (weeks)	Subjects/ Controls	Analyzed Material	Laboratory technique	Inflammatory markers	Development Assessment (months CA)	Neurological Assessment	Neurological outcome
Varner <i>et al</i> , 2015 [25]	24-31	339/276	Umbilical cord serum	ELISA	CXCL8/IL-8, IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$	6,12,24	BSID-II	Cord serum IL-8, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ levels in preterm infants are not associated with subsequent cerebral palsy or neurodevelopmental delay
Chalak <i>et al</i> , 2014 [26]	$\geq 36$	20/7	Umbilical arterial serum or plasma	ELISA	IL-1, IL-6, CXCL8/IL-8, VEGF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL5/RANTES, UCH-L1, GFAP	15-18	BSID-III	IL-6, IL-8 and VEGF were greater at 6-24 hours in moderate to severe versus mild hypoxic-ischemic encephalopathy. Elevated IL-1, IL-6, IL-8, VEGF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ and GFAP were associated with abnormal neurological outcomes.
Bartha <i>et al</i> , 2004 [30]	$\geq 36$	62/-	Whole blood (heel-stick)	RIC	IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$	30	BSID-II	Children with abnormal neurodevelopmental outcome had higher neonatal levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and lower levels of IL-12. Elevated inflammatory cytokines were associated with impaired cerebral oxidative metabolism.

**CA:** Correct Age; **HIE:** Hypoxic-Ischemic Encephalopathy **IL:** Interleukin; **CCL / CXCL:** Chemokines; **TNF:** Tumor Necrosis Factor; **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay **RIC:** Recycling immunoaffinity chromatography; **BSID II:** Bayley Scales of Infant Development – Second Edition: indicative of delay if score < 70. **BSID III:** Bayley Scales of Infant Development – Third Edition: indicative of delay if score < 70. **Denver II:** Denver Developmental Screening Test II

Table 3. Association between inflammatory molecules, motor and/or cognitive development, and sepsis in cerebral palsy (2-column fitting image)

Author	Gestational Age (weeks)	Patients/ Controls	Analyzed Material	Laboratory method	Development Assessment (months CA)	Inflammatory markers	Neurodevelopment Assessment	Neurodevelopmental Outcome
Carlo <i>et al</i> , 2011 [27]	Newborn (401 1000g)	755/-	Whole blood	Multiplex Luminex Assay	18-22	IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R, TNF, TNF-R1, TNF-R2, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CCL2, CCL13, CCL4, CCL5, CXCL11, CCL20, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-SEL, MMP-1, MMP-9, CRP, SAA, MPO, GUCY1A2, GUCY1A3, PPM1L, PLCE1, PRKAG2, PLCL1, CCR2, S100A8, CAV1, GUCY1A2, GUCY1A3, GAB1, PLCE1, PRKAG2, PLCL1	BSID-II	IL $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-12, IL-17, MIP-11 $\beta$ and IL-8 were altered on days 0-4 in infants who developed CP. IL-8 remained higher subsequently.
Lodha <i>et al</i> , 2010 [28]	$\leq 37$	27/13	Plasma	DPC Immulite System	24-28	TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8/IL-8	BSID-II	Elevated IL-6 was found in infants with proven necrotizing enterocolitis. Neonatal cytokines tended to be greater, with a wide variation, in infants later found to have abnormal cognitive and psychomotor outcomes.
Andrews <i>et al</i> , 2008 [29]	23-32	424/-	Umbilical cord blood	ELISA	48	IL-6	PPVT-III, WISC-IV, DAS	Neonatal complications, gestational age at delivery, and caregiver IQ, but not in utero exposure to acute inflammation, were associated with increased risk of severe adverse neurodevelopmental outcomes at age 6 years.

**CA:** Correct Age; **MSD:** Meso Scale Discovery electrochemiluminescence system; **CBA:** Cytometric Bead Array; **PCR:** Polymerase Chain Reaction; **IL:** Interleukin; **CRP:** C - reactive protein; **CCL / CXCL:** Chemokines; **TNF:** Tumor Necrosis Factor; **TNF-R1:** Tumor Necrosis Factor Receptor 1. **BSID II:** Bayley Scales of Infant Development – Second Edition: indicative of delay if score < 70; **PPVT-III:** Peabody Picture Vocabulary test 3rd edition – Third Edition, indicative of delay if score < 70; **WISC-IV:** Wechsler Intelligence Scale for Children-IV, indicative of delay if score < 70; **DAS:** Differential Ability Scales, indicative of delay if score < 70

Table 4. Association between the most studied inflammatory molecules and neurological outcome in cerebral palsy

Inflammatory markers	Studies	Conclusion
		<b>Mixed results</b>
IL-6	Chalak <i>et al</i> , 2014, Bartha <i>et al</i> , 2004, Carlo <i>et al</i> , 2011, Lodha <i>et al</i> , 2010, Andrews <i>et al</i> , 2008	Two studies: increased blood levels predicted abnormal neurological outcome Three studies: no association
		<b>Mixed results</b>
IL-1	Varner <i>et al</i> , 2015, Chalak <i>et al</i> , 2014, Bartha <i>et al</i> , 2004, Carlo <i>et al</i> , 2011	Two studies: no association Two studies: increased blood levels predicted abnormal neurological outcome
		<b>Mixed results</b>
CXCL8/IL-8	Varner <i>et al</i> , 2015, Chalak <i>et al</i> , 2014, Bartha <i>et al</i> , 2004, Carlo <i>et al</i> , 2011, Lodha <i>et al</i> , 2010	Two studies: no association Three studies: increased blood levels predicted abnormal neurological outcome
		<b>Mixed results</b>
TNF- $\alpha$	Varner <i>et al</i> , 2015, Chalak <i>et al</i> , 2014, Bartha <i>et al</i> , 2004, Lodha <i>et al</i> , 2010, Carlo <i>et al</i> , 2011	Three studies: no association One study: increased blood levels predicted poor neurological outcome One study: decreased blood levels predicted poor neurological outcomes

CCL / CXCL: Chemokines; IL: Interleukin; TNF: Tumor Necrosis Factor.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos de programa de reabilitação sobre o DNPM, marcadores inflamatórios e fatores neurotróficos em crianças com PC.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mensurar a concentração de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos em crianças com PC na primeira infância, antes e após seis meses de programa de reabilitação;
- Comparar essas medidas com as mesmas obtidas com intervalo de seis meses em crianças com PC que não foram submetidas à reabilitação (grupo controle);
- Avaliar o DNPM antes e após seis meses de reabilitação em crianças com PC;
- Comparar a avaliação do DNPM com a mesma realizada nos mesmos períodos, com intervalo de seis meses, em crianças com PC que não foram submetidas ao programa de reabilitação (grupo controle);
- Relacionar o perfil dos mediadores imuno-inflamatórios e os fatores neurotróficos com as classificações de paralisia cerebral, bem como com as aquisições no desenvolvimento neuropsicomotor;
- Compreender como os programas de reabilitação de intervenção precoce interferem na resposta imuno-inflamatória e no DNPM de crianças com PC.

## **5 PACIENTES E MÉTODOS**

### **5.1 DESENHO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, no qual amostras de sangue foram coletadas e o desenvolvimento avaliado em crianças com diagnóstico de PC, aos 18 e 24 meses de idade, submetidas ou não a intervenções sistemáticas de reabilitação.

### **5.2 ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi aprovado pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG e pelo Comitê de Ética da UFMG (COEP) sob o protocolo CAAE 56771316.7.0000.5149. Além disso, obteve anuência do Núcleo de Ensino e Pesquisa (NEP) da AMR. Os pais ou responsáveis legais das crianças leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **5.3 PERÍODO E LOCAL DE COLETA**

As avaliações ocorreram na Associação Mineira de Reabilitação (AMR), no período de agosto de 2016 a setembro de 2018. A AMR é uma instituição filantrópica especializada na reabilitação de crianças e adolescentes com transtornos neurológicos e do neurodesenvolvimento, localizada em Belo Horizonte/Brasil. A AMR é composta por uma experiente equipe multiprofissional, incluindo assistentes sociais, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, neurologista, ortopedistas, psicólogos e terapeutas ocupacionais.

### **5.4 POPULAÇÃO PARTICIPANTE**

O cálculo amostral foi baseado em um estudo anterior que investigou a associação da função cerebral com o DNPM em crianças com risco de desenvolvimento atípico<sup>1</sup>. Considerando erro amostral de 5% e 95% de confiabilidade, obtivemos o total de 60 crianças com PC submetidas ao programa de reabilitação e 30 crianças com PC não submetidas ao programa de reabilitação no grupo controle.

Participaram desse estudo um total de 90 crianças com o diagnóstico de PC, com menos de 18 meses de vida, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo. Todas as crianças foram avaliadas por neurologista pediátrico que diagnosticou o tipo de

PC de acordo com a Força Tarefa Internacional para CP<sup>2</sup>. Esse neurologista também classificou a gravidade do comprometimento motor pelo Sistema de Classificação da Função Motora Grossa (GMFCS)<sup>3</sup>. Os resultados de tomografia computadorizada (TC) foram utilizados para avaliar a topografia e extensão das lesões cerebrais.

As crianças foram divididas em dois grupos: reabilitação e sem-reabilitação. O grupo reabilitação consistiu de crianças com o diagnóstico de PC que realizaram programa de reabilitação sistemática, enquanto o grupo sem-reabilitação foi composto por crianças com o diagnóstico de PC que não foram submetidas à intervenção de reabilitação sistemática e que estavam em fila de espera para atendimento especializado. Para tanto, todas as crianças em atendimento na AMR, que atendiam ao critério de inclusão, foram convidadas a participar do estudo e os pais ou responsáveis assinaram o TCLE e constituíram o grupo reabilitação. De acordo com a inclusão das crianças no grupo reabilitação, foi feito contato telefônico com os responsáveis de crianças com PC que estavam inscritos em fila de espera. Após confirmar o diagnóstico de PC e a ausência de reabilitação foram convidados a participar do estudo, conforme o pareamento de idade e sexo.

#### **5.4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

As crianças incluídas nesse estudo no grupo reabilitação possuíam menos de 18 meses idade cronológica, com diagnóstico de PC, em acompanhamento no serviço de reabilitação de instituição filantrópica especializada no atendimento de reabilitação para crianças e adolescentes com disfunções neurológicas em Belo Horizonte – MG. Para o grupo sem-reabilitação utilizaram-se os mesmos critérios para a inclusão no estudo, exceto por não estarem em programa reabilitação. As crianças no grupo sem-reabilitação encontravam-se em fila de espera para atendimento de reabilitação e não estavam submetidas a acompanhamento sistemático. Houve concordância de todos os responsáveis em participar do estudo e assinatura do TCLE.

#### **5.4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídas as crianças que apresentaram alguma das situações/condições descritas abaixo:

- Diagnóstico de síndromes genéticas ou outras doenças associadas, tais como artrogripose, miopatias e doenças metabólicas;

- Quadros infecciosos ou inflamatórios agudos no momento da coleta ou nos 15 dias que a antecederam;
- Uso atual ou nas 4 semanas anteriores à coleta de antibióticos, anti-inflamatórios ou corticoides.

## **5.5 PROCEDIMENTO/PROTOCOLO:**

### **5.5.1 PROGRAMA DE REABILITAÇÃO**

As crianças do grupo reabilitação foram submetidas a cinco sessões de reabilitação por semana. O programa de reabilitação incluiu sessões individualizadas de fisioterapia, terapia ocupacional e fonoaudiologia, com duração de 45 minutos cada, conduzidas por profissional especializado. O programa de reabilitação teve a seguinte estrutura de sessões semanais: primeiro fisioterapia, em seguida terapia ocupacional e depois fonoaudiologia. As estratégias terapêuticas utilizadas nas sessões de reabilitação foram: (i) tratamento neuroevolutivo, (ii) treinamento funcional e (iii) programas domiciliares visando melhorar o repertório de habilidades e o DNPM<sup>4</sup>, com base no cuidado centrado na família<sup>5</sup>. O grupo de não reabilitação não foi submetido a nenhum programa de reabilitação.

### **5.5.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS**

As coletas de sangue foram realizadas no período da manhã, no mesmo dia da avaliação do desenvolvimento. As amostras de sangue periférico foram obtidas por meio de punção venosa periférica, com assepsia prévia, em tubos individualizados de 3 mL contendo EDTA. As amostras foram armazenadas e transportadas para o laboratório e processadas em seguida. O protocolo para separação do plasma consistiu em centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. As amostras de plasma, então, obtidas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

### **5.5.3 DOSAGEM DE CITOCINAS E FATORES NEUROTROFICOS**

*- Cytometric Bead Array – CBA*

As dosagens de citocinas no plasma dessas crianças foram realizadas pelo método de CBA, utilizando-se os kits da R& D Systems (BD Bioscience, San Diego, CA, USA): Human Inflammation (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  e IL-12p70) e Chemokines (CXCL8/IL-

8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG) e seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo da marca BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados em resultado gráfico e tabulados utilizando o programa BD CBA Analysis Software (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os limites mínimos de detecção para estes ensaios foram: IL-1 $\beta$  = 7,2 pg/mL, IL-6 = 2,5 pg/mL, IL-10 = 3,3 pg/mL, TNF = 3,7 pg/mL, IL-12p70 = 1,9 pg/mL, CXCL8/IL-8 = 0,2 pg/mL, CCL2/MCP-1 = 2,7 pg/mL, CCL5/RANTES = 1,0 pg/mL, CXCL10/IP-10 = 2,8 pg/mL and CXCL9/MIG = 2,5 pg/mL.

#### *Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para fatores neurotróficos*

A determinação dos fatores neurotróficos no plasma foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando Kits da R&D systems (BD Bioscience, Minneapolis, MN, USA), específicos para cada componente avaliado (BDNF e GDNF). O protocolo de ELISA utilizou um anticorpo monoclonal específico para determinação de cada fator neurotrófico de interesse, conforme recomendações do fabricante. As placas foram lidas a 492 nm em espectrofotômetro modelo E max (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os limites inferiores de detecção foram definidos como 5 pg/mL para ambas moléculas.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata num único ensaio e os resultados foram expressos como picogramas por mililitro<sup>6</sup>.

#### **5.5.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO**

Para a avaliação do desenvolvimento foi utilizada a Bayley Scales of Infant and Toddler Development – Third Edition (Bayley–III), 2006<sup>7</sup> - aplicada por profissional capacitado e treinado na utilização dessas escalas. A avaliação foi realizada em dois momentos distintos: no momento da inscrição, quando as crianças tinham cerca de 18 meses de idade e após 6 meses de intervenção, quando tinham 24 meses de idade. As crianças do grupo sem-reabilitação foram avaliadas nas mesmas idades. Para as crianças com nascimento pré-termo foi utilizada a correção da idade cronológica.

A escala de Bayley–III consiste em uma escala padronizada para avaliar o desenvolvimento infantil de crianças entre um e 42 meses, possuindo uma margem de erro na avaliação de 15 dias a mais ou a menos. O objetivo principal do instrumento é identificar crianças com atraso no desenvolvimento e fornecer informação para o

planejamento da intervenção<sup>7</sup>. A Bayley–III é composta por cinco escalas padronizadas: Escala Cognitiva; Escala Motora (subdivida em Escala Motora Fina e Escala Motora Grossa); Escala de Linguagem (composta pela Linguagem Receptiva e Linguagem Expressiva); Questionário Comportamental Adaptativo e Questionário Social-emocional. Cada escala é composta por diferentes números de itens, sendo alguns aplicados em situação de teste, mediante manobras, materiais específicos e tempo pré-determinado, e outros de observação de movimentos/attitudes realizados espontaneamente pela criança durante a avaliação<sup>7</sup>. Para o presente estudo foram aplicadas as escalas motora, de linguagem e cognitiva.

A Escala Motora, subdividida em Escala Motora Fina e Escala Motora Grossa, com 66 e 72 itens, respectivamente, totalizando 138 itens, avalia minuciosamente o comportamento motor infantil. A Escala Motora Fina investiga habilidades relacionadas à preensão, integração perceptivo-motora, planejamento motor e atividades que incluem velocidade manual. A Escala Motora Grossa mensura os movimentos dos membros superiores, inferiores e tronco, por meio da avaliação do posicionamento estático, movimentação dinâmica, incluindo locomoção e coordenação, equilíbrio e planejamento motor<sup>7</sup>.

A Escala de Linguagem é composta por Linguagem Receptiva e Linguagem Expressiva, totalizando 97 itens. A Escala de Linguagem Receptiva possui 49 itens que investigam os comportamentos pré-verbais, o desenvolvimento do vocabulário ao verificar se a criança é capaz de identificar objetos e figuras relacionadas, pronomes possessivos, preposições, plural, tempos verbais, além de itens que investigam a referência social e compreensão verbal. Já a Escala de Linguagem Expressiva, avalia, em 48 itens, a comunicação verbal, como balbúcio, risos, grunhidos e fala, o desenvolvimento do vocabulário ao verificar se a criança nomeia objetos, figuras, cores, tamanhos e se é capaz de formar sentenças de 2 ou mais palavras<sup>7</sup>.

A Escala Cognitiva inclui 91 itens que avaliam o desenvolvimento sensório motor, exploração e manipulação de objetos, formação de conceitos, memória e outros aspectos do processamento cognitivo<sup>7</sup>.

Em estudo de validação e investigação de confiabilidade da escala de Bayley–III, foram obtidos coeficientes elevados, indicando se tratar de instrumento válido e fidedigno para avaliação do neurodesenvolvimento<sup>7</sup>. É reconhecido internacionalmente como uma das ferramentas mais abrangentes para a avaliação de crianças pequenas, amplamente utilizado em pesquisas e em práticas clínicas para avaliar as intervenções<sup>8</sup>. Foi traduzida,

adaptada para o português e testada em crianças brasileiras. Dessa forma o Bayley III pode contribuir para o avanço nas pesquisas em contexto nacional na área de avaliação do desenvolvimento infantil, por apresentar adequadas propriedades psicométricas a essa população<sup>8</sup>.

Para interpretação da avaliação e análise dos dados, foram seguidas as padronizações definidas no manual, de acordo com o Index Score, no qual foram considerados os escores escalonados para as análises estatísticas.

## **5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis qualitativas foram expressas em frequências absolutas e porcentagens. A distribuição gaussiana das variáveis quantitativas foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk. As variáveis não paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (1º quartil - percentil 25 e 3º quartil - percentil 75). O teste t de Student não pareado ou Mann-Whitney foram usados para comparar dois grupos independentes, de acordo com a distribuição. O teste t de Student pareado ou o teste de Wilcoxon foram usados para comparar pré e pós-tratamento dentro do mesmo grupo. As variáveis qualitativas dos dois grupos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado de Pearson e pelo teste qui-quadrado assintótico de Pearson Exato, de acordo com a distribuição paramétrica ou não paramétrica. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para análise de correlação.

A regressão logística foi utilizada para determinar o efeito independente de cada variável associada ao DNPM. O modelo multivariado inicial incluiu todas as variáveis potencialmente associadas ao desfecho ( $p < 0,20$  na análise univariada). As variáveis com maior valor de p foram removidas do modelo. O modelo final incluiu apenas as variáveis que foram estatisticamente significativas com  $p < 0,05$ . O ajuste do modelo na regressão logística foi avaliado pelo teste de Hosmer & Lemeshow.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares IBM SPSS Statistics® versão 20.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA) e o Prism® versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] George JM, Boyd RN, Colditz PB, Rose SE, Pannek K, et al. PPREMO: a prospective cohort study of preterm infant brain structure and function to predict neurodevelopmental outcome. *BMC Pediatr.* 2015;15:123. DOI: 10.1186/s12887-015-0439-z.
- [2] Hankins GDV, Speer M. Defining the Pathogenesis and Pathophysiology of Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy. *Obstet Gynecol.* 2003;102(3):628-639.
- [3] McDowell B. The Gross Motor Function Classification System--expanded and revised. *Dev Med Child Neurol.* 2008;50(10):725. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2008.03104.x.
- [4] Novak I, McIntyre S, Morgan C, Campbell L, Dark L, Morton N, et al. A systematic review of interventions for children with cerebral palsy: state of the evidence. *Dev Med Child Neurol.* 2013;55(10):885-910. DOI: 10.1111/dmcn.12246.
- [5] Law M, Darrach J, Pollock N, King G, Rosenbaum P, et al. Family-Centred Functional Therapy for Children with Cerebral Palsy. *Physical & Occupational Therapy In Pediatrics.* 1998;18(1):83-102, DOI: 10.1080/J006v18n01\_06
- [6] Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC. Urinary Levels of IL-1 $\beta$  and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflamm.* 2017;2017:8201423. DOI: 10.1155/2017/8201423.
- [7] Bayley N. Bayley Scales of Infant and Toddler Development - Third Edition, Administration Manual. San Antonio, TX: The Psychological Corporation, 2006.
- [8] Madaschi V, Mecca TP, Macedo EC, Paula CS. Bayley-III Scales of Infant and Toddler Development: Transcultural Adaptation and Psychometric Properties. *Pandéia.* 2016;26(64):189-197. DOI: 10.1590/1982-43272664201606.

**Rehabilitation intervention improves neurodevelopment and modulates inflammatory molecules in children with cerebral palsy.**

*Short title: Rehabilitation in children with cerebral palsy*

Rafael Coelho Magalhães<sup>1</sup>, et al.

1- Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG

**ABSTRACT:**

**Objective:** Objective: To evaluate whether structured rehabilitation care improves neuropsychomotor development of children with cerebral palsy (CP) and influences peripheral markers of inflammatory/immune response and brain plasticity. **Study Design:** Sixty children were submitted to rehabilitation for six months. A comparison group consisted of 30 children waiting for rehabilitation enrollment. Peripheral biomarkers and neuropsychomotor parameters (Bayley III) were compared between intervention vs. control groups at baseline and six months later. **Results:** The groups were matched for age, sex and type of CP. After six months of rehabilitation, children in the intervention group exhibited higher scores on the Bayley III. Control children did not change their scores during the follow-up. Lower levels of IL-12p70, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8 IL-8 and CXCL9/MIG, and higher levels of BDNF and GDNF were detected in the intervention group when comparing pre- and post-treatment time points. In the non-intervention group, the levels of immune molecules did not change overtime, but BDNF levels reduced. **Conclusion:** Rehabilitation improved neurodevelopment parameters, reduced the levels of inflammatory molecules and increased neurotrophic factors in children with CP.

**Key words:** cerebral palsy, brain injury, cytokines, neurotrophic factors, rehabilitation, neuropsychomotor development

## 1- INTRODUCTION

Cerebral palsy (CP) refers to a heterogeneous group of disorders related to non-progressive conditions that affect fetal neurodevelopment. They are characterized by impaired movement and/or posture with different levels of disability<sup>1-3</sup>. Based on the predominant neuromotor impairment, CP can be categorized into spastic, dyskinetic or ataxic<sup>4</sup>. The spastic form is also further classified as unilateral or bilateral according to the extension of motor involvement<sup>4</sup>. Frequently there are associated impairments in cognition, communication, perception, behavior, and seizures<sup>2,4</sup>.

The mechanisms of brain injury related to CP are complex and multifactorial, involving the interaction among different pathophysiological and developmental processes. Several antenatal and postnatal stimuli, including placental dysfunction, fetal inflammatory response syndrome (FIRS), preterm birth<sup>5,6</sup> and hypoxia-ischemia (HI)<sup>7-9</sup> may trigger systemic perinatal inflammation and, as a consequence, contribute to brain damage and/or dysfunction<sup>10</sup>. Furthermore, a complex and dynamic balance between damage vs. protective responses influences the severity of brain injury<sup>11</sup>. The protective response involves cell and molecular mechanisms that stimulate neuroplasticity<sup>12-14</sup>, a dynamic adaptive response of the central nervous system to environmental stimuli and demands<sup>15</sup>.

Rehabilitation programs aim to promote effective interventions to increase the functional level of the child with CP and to stimulate environmental enrichment. It has been described that rehabilitation interventions have the potential to improve motor function, and neuropsychomotor development (NPMD)<sup>16</sup>. Therefore, pediatric rehabilitation programs may play an important role in the management of CP potentially through neuroplasticity<sup>15,17-19</sup>. However, the pathways by which rehabilitation might contribute to neuroplasticity are still unclear. In this study, we hypothesize that a structured rehabilitation program might positively affect NPMD of children with CP and that this effect might be associated with changes in circulating levels of inflammatory markers and neurotrophic factors.

## **2- PATIENTS AND METHODS**

### *2.1- Study Design and Ethics.*

This is a prospective cohort study that occurred at Associação Mineira de Reabilitação (AMR) from August 2016 to September 2018. AMR is a philanthropic institution specialized in the rehabilitation of children and adolescents with neurological and neurodevelopmental disorders located in Belo Horizonte/Brazil. AMR comprises a multi-professional and patient-centered team with expertise in complimentary areas, including rehabilitation medicine, occupational therapy, physiotherapy, speech therapy, psychology and social service.

The study was approved by the Ethics Committee of UFMG (COEP) under the protocol CAAE 56771316.7.0000.5149. Parents or legal guardians of all children signed a written informed consent document.

### *2.2- Subjects.*

Sample size calculations were based on a previous study investigating the association of brain function with NPMD in children at risk of abnormal development<sup>20</sup>. Considering a sample error of 5% and 95% of reliability, we obtained a number of 60 children with CP in the rehabilitation program and 30 children with CP out of a rehabilitation program in the control group.

A total of 90 children with diagnosis of CP and with almost 18 months of age participated in this study. All children were evaluated by a pediatric neurologist who diagnosed the type of CP according to the International Task Force for CP<sup>21</sup>. The neurologist also classified the motor severity by the Gross Motor Function Classification System (GMFCS)<sup>22</sup>. Computed tomography (CT) neuroimaging was used to evaluate the topography and extension of brain lesions.

Children with CP undergoing rehabilitation (rehab group) were compared to children with CP in the waiting list to be included in the rehabilitation program (non-rehab group).

Children who had one or more of the following conditions were excluded: (i) established diagnosis of genetic syndromes or other associated diseases, such as arthrogyrosis, myopathy, metabolic anomalies; (ii) acute infectious or inflammatory diseases at the time or 15 days prior to evaluation; (iii) current or within 4 weeks prior to evaluation, use of antibiotics, anti-inflammatories or corticosteroids.

### *2.3- Study Protocol.*

#### *2.3.1- Intervention Procedures*

Children in the rehab group were submitted to five sessions of rehabilitation per week. The rehabilitation program included physical, occupational and speech therapies individualized sessions, lasting 45 minutes each, conducted by an expert clinician. The rehabilitation program had the following structure: first physiotherapy, second occupational therapy and then speech therapy sessions every week. The suite of interventions options were: (i) neurodevelopmental treatment, (ii) functional training and (iii) home programs to improve developmental skills<sup>23</sup> based in family-centered care<sup>24</sup>. The non-rehab group did not engage in any rehabilitation program.

#### *2.3.2- Blood Samples.*

Blood sample collection occurred in the mornings (8 – 10 am) of the clinical assessment. Blood samples were obtained through peripheral venous puncture with all aseptic care in sterile EDTA tubes of 3mL. After blood collection, samples were centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes at 4°C to obtain plasma. Plasma samples were then transferred to 1.5mL microtubes and stored at -80°C until analysis.

#### *2.3.3- Measurement of Plasma Concentrations of Molecular Markers*

Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF), interleukins (IL)-IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, CXCL8/IL-8, CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), CCL5/regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES), CXCL10/interferon- $\gamma$ -induced protein-10 (IP-10), CXCL9/monokine-induced by interferon- $\gamma$  (MIG) were measured by cytometric bead arrays (CBAs), Human Inflammatory and Chemokines Kits, according to manufacturer's instructions (BD Biosciences). Quantitative results were generated using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary), as previously described<sup>22</sup>. The minimum detection limits for these assays were: IL-1 $\beta$  = 7.2 pg/mL, IL-6 = 2.5 pg/mL, IL-10 = 3.3 pg/mL, TNF = 3.7 pg/mL, IL-12p70 = 1.9 pg/mL, CXCL8/IL-8 = 0.2 pg/mL, CCL2/MCP-1 = 2.7 pg/mL, CCL5/RANTES = 1.0 pg/mL, CXCL10/IP-10 = 2.8 pg/mL and CXCL9/MIG = 2.5 pg/mL. The determination of neurotrophic factors (BDNF and GDNF) was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using R&D systems kits specific for each molecule, following the manufacturer's instructions (R&D Systems, MN, USA). All

samples were assayed in duplicate in a single assay and the results are expressed as picogram per milliliter<sup>25</sup>. The lower detection limits were defined as 5 pg/mL.

#### *2.3.4- Neuropsychomotor Development (NPMD) assessment.*

Bayley Scales of Infant and Toddler Development - Third Edition (BSID-III)<sup>26</sup> applied by a trained professional was used to evaluate development. The evaluation was performed at two different time-points: at enrollment, when children had around 18 months of age (baseline), and after 6 months of follow-up, when they had 24 months of age. For preterm birth children, corrected gestational age was used.

BSID-III consists of a standardized scale for assessing the development of children between 1 and 42 months<sup>26</sup>. For the present study, only motor, language and cognitive scales were applied. The scale scores were considered for the interpretation of the evaluation and statistical analysis of the data, following the standardizations defined in the manual, according to the Index Score.

#### *2.4- Statistical Analysis.*

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics<sup>®</sup> version 20.0 and Prism<sup>®</sup> version 5.0. Qualitative variables were expressed in absolute frequencies and percentages. Gaussian distribution of quantitative variables was verified using the Shapiro Wilk test. Non-parametric variables were shown as median and interquartile range (1<sup>st</sup> quartile – percentile 25 and 3<sup>rd</sup> quartile – percentile 75). Unpaired Student t test or Mann-Whitney was used to compare two independent groups, according to distribution. Paired Student t test or Wilcoxon test were used to compare pre and post-treatment within the same group. Qualitative variables of both groups were compared using chi-square test of Pearson and asymptotic chi-square test of Pearson Exact, according to parametric or non-parametric distribution. The Spearman correlation coefficient was used for correlation analysis. Logistic regression was used to determine the independent effect of each covariate associated with Neuropsychomotor Development (NPMD). The initial multivariate model included all covariates potentially associated with outcome ( $p < 0.20$  in univariate analysis). The covariates with higher p-value were removed from the model through backward elimination and the final model included only those covariates that were statistically significant at  $p < 0.05$ . Model fit in the logistic regression was evaluated with Hosmer & Lemeshow test.

### **3- RESULTS**

#### *3.1- Clinical Characteristics*

This study enrolled 90 children with a diagnosis of CP, 40 (44.4%) girls and 50 (55.6%) boys, being 60 in rehabilitation program (rehab) and 30 in the waiting list (non-rehab). Both groups were matched by age and sex, as shown in Table 1. There was no difference between the groups regarding diagnosis, CP classification, and type of injury (Table 1). In addition, both groups did not differ in relation to gestational age, birth weight and weight classifications at baseline and end of study Table 2.

#### *3.2- Neuropsychomotor development.*

After six months of rehabilitation, CP patients significantly improved their NPMD as shown by the increase of the scores obtained at Time-point 2 (in comparison to Time-point 1 (baseline)). Non-rehab group scores in BSID-III at the two time-points did not vary. The frequency of rehabilitation care was positively correlated with Motor (Gross and Fine), Receptive Communication and Cognitive scales of BSID-III.

#### *3.3- Cytokines, chemokines, and neurotrophic factors at two time points (18 and 24 months of corrected gestational age).*

Blood sampling occurred at baseline (18 months of age) and after 6 months of intervention (24 months of age).

At baseline (time point 1), there was no difference between both groups in relation to plasma concentrations of the measured molecules.

After intervention, rehab group decreased the concentrations of IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 and CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG (table 3). Furthermore, both neurotrophic factors (BDNF and GDNF) levels increased after intervention (table 3). In sharp contrast, non-rehab group had stable levels of all molecules, except BDNF, on the follow-up (table 3). BDNF levels were significantly lower at time-point 2 in comparison to time-point 1 (Figure 1).

Six months after the rehabilitation program (time-point 2) there were significant differences in the values of cytokines, chemokines and neurotrophic factors between both groups. The non-rehab group had higher concentrations of IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG and CXCL8/IL-8 than the rehab group (Figures 2 and 3). Conversely, the rehab group had higher concentration of BDNF and GDNF in

comparison to the non-rehab group at the end of the study (Figure 4). IL-1 $\beta$  concentrations negatively correlated with GDNF, while CCL2/MCP-1 negatively correlated with BDNF and GDNF.

#### *3.4 - Cytokines, chemokines, neurotrophic factors, NPMD, and rehabilitation.*

There was a positive correlation of BDNF (Time-point 2) with all domains or subscales of the BDSI-III. Conversely, inflammatory molecules correlated negatively with NPMD. There was a negative correlation of TNF with fine motor, receptive communication and cognitive BSID-III scales. IL-1 $\beta$  correlated negatively with fine motor BSID-III scale. (Table 4)

A negative correlation was also found between the frequency of rehabilitation and levels of IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8. In contrast, a positive correlation was detected between frequency of rehabilitation and levels of BDNF.

In univariate regression analysis, the variables sex, gestational age, GMFCS, Apgar 5', IL-1 $\beta$ , TNF, BDNF, GDNF and rehabilitation showed significant association with NPMD. In the multivariate logistic regression, levels of BDNF and rehabilitation were independent predictors of better NPMD, while concentrations of IL-1 $\beta$  negatively influenced NPMD. The rehabilitation program resulted in significant reduction of IL-1 $\beta$  levels and increase of BDNF concentrations.

#### 4- DISCUSSION

Inflammatory profile and neurotrophic factors levels differed significantly between children with CP after being enrolled in rehabilitation program for 6 months when compared to CP children in a waiting list and not receiving rehabilitation intervention. Reduction of the levels of IL-12p70, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8 IL-8 and CXCL9/MIG and increase of the levels of BDNF and GDNF were observed in children with CP after the intervention. Conversely, after six months inflammatory molecules levels remained stable, while BDNF concentrations decreased in those children in the waiting list (non-rehab group). The rehab group improved NPMD, as revealed by higher scores on BSID-III, and high levels of BDNF and participation in the rehabilitation program were independent predictors of improved NPMD.

In our study, children in rehabilitation care were submitted to an intensive program involving physical, occupational and speech therapy activities, five times per week. We observed that the higher the frequency, the better the NPMD outcome. In line with our findings, previous studies reported the effectiveness and benefits of rehabilitation strategies on recovery of motor and cognitive functions<sup>17,27-30,31</sup>. In addition to improving neuroplasticity, early intervention might theoretically minimize deleterious modifications to muscles and bone growth and to NPMD<sup>31</sup>. Thus, early intervention seems to be highly recommended and should be the standard of care to optimize motor, cognition, and communication outcomes, which may improve infant neuroplasticity, prevent complications, and enhance parent/caregiver well-being and quality of life<sup>31,32</sup>.

Brain development after injury is neither static nor a single event, but a dynamic process encompassing multiple cellular and molecular cascades in the central nervous system throughout life<sup>25</sup>. In response to rehabilitation and/or positive environmental stimulation, neuroplasticity enables the reorganization of the neural network, with the emergence of new synapses, dendritic spines and neuronal circuits<sup>33</sup>. Neuroimaging studies have shown structural changes in brain regions of children undergoing rehabilitation compared to control subjects<sup>34</sup>. Besides improving NPMD outcomes by the acquisition of new abilities<sup>33,35-36</sup>, rehabilitation intervention may promote functional and structural modifications in the brain associated with a greater release of neurotrophic factors<sup>33,35-36</sup>. Our finding of increased BDNF after intervention and its association with better NPMD outcome corroborate this assumption.

Previous studies in humans have also proposed that the inflammatory markers are critical in brain injury, thus probably interfering in the neuropsychomotor outcome<sup>37-44</sup>. Cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF and chemokines, as CXCL8/IL-8, have been associated with worst NPMD outcomes<sup>39-42,44</sup>. In our study, increased levels of TNF correlated with worse fine motor skills, cognitive score and scores of receptive communication, according to BSID-III. In addition, higher levels of IL-8/CXCL8 correlated with lower cognitive score, while increase concentrations of IL-1 $\beta$  correlated with lower fine motor skills. Conversely, the neurotrophic factors BDNF and GDNF have been described as endogenous protective agents, capable of improving NPMD<sup>33</sup> and reducing the extent of injury caused by the inflammatory process<sup>25,32,45,46</sup>. Our results support this hypothesis since BDNF levels positively correlated with higher scores in all BSID-III scales. Furthermore, in multivariate analysis, levels of BDNF and rehabilitation were independent predictors of better NPMD, while concentrations of IL-1 $\beta$  negatively influenced NPMD. Indeed, the rehabilitation program led to significant decrease of IL-1 $\beta$  levels and other inflammatory molecules, while increased BDNF concentrations. In contrast, non-rehab CP patients exhibited unaltered levels of cytokines on the follow-up, but reduced BDNF concentrations. These findings further support the modulatory role of rehabilitation on inflammation and neuroplasticity.

The originality and strength of this study is the longitudinal evaluation of circulating levels of inflammatory markers and neurotrophic factors in children with CP simultaneously to the evaluation of the NPMD. Moreover, in order to control the influence of confounding factors, children presenting acute disorders were excluded from the study. Also, all CP children had controlled seizures at both time-points. It is well known that CP children are prone to many types of seizures and epileptic syndromes, which can be treated with antiepileptic drugs and other strategies<sup>47</sup>. Since children enrolled in our study had controlled seizures, the changes detected in the inflammatory profile and NPMD were unlikely to be related to this comorbidity.

This study has limitations that must be acknowledged. First, the molecular changes reported in the periphery (i.e. blood) may not reflect reciprocal changes in the CNS. Cerebrospinal fluid and neuroimaging analyses could have added meaningful information in this regard. Second, socioeconomic factors might interfere in NPMD. It would be necessary multicentric or translational approaches to better understand the mechanisms beyond these associations between inflammatory molecules, neurotrophic factors,

rehabilitation and NPMD in different socioeconomic conditions. However, we controlled the study for the main factors (diagnoses, age and sex) that have been described to influence NPMD, immune mediators and neurotrophic factors. Other limitation is the non-blinded assessment of the children. However, the BSID-III is a standardized test that requires professional training which might reduce bias. There are also other molecules that can reflect neuronal death and plasticity. We assembled this panel due to the relevance of these molecules in the development and maturation of the brain, and also by the association with NPMD.

## **5- CONCLUSION**

The management of CP involves a multidisciplinary approach that aims to improve NPMD by helping children and their families to acquire new skills and to increase quality of life. In our study, an intensive rehabilitation program significantly improved NPMD and modulated cytokines and neurotrophic factors, and may play a critical role in long-term neurodevelopmental outcomes.

## 6- REFERENCES

- 1- Sarathy K, Doshi C, Aroojis A. Clinical Examination of Children with Cerebral Palsy. *Indian J Orthop.* 2019; 53(1):35-44. DOI: 10.4103/ortho.IJOrtho\_409\_17.
- 2- Nemanich ST, Rich TL, Chen CY, Menk J, Rudser K, Chen M, et al. Influence of Combined Transcranial Direct Current Stimulation and Motor Training on Corticospinal Excitability in Children With Unilateral Cerebral Palsy. *Front Hum Neurosci.* 2019;13:137. DOI: 10.3389/fnhum.2019.00137.
- 3- Fitzgerald E, Boardman JP, Drake AJ. Preterm Birth and the Risk of Neurodevelopmental Disorders - Is There a Role for Epigenetic Dysregulation?. *Curr Genomics.* 2018; 19(7):507-521. DOI:10.2174/1389202919666171229144807.
- 4- Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 2007; 49(109):8-14.
- 5- Allard MJ, Brochu ME, Bergeron JD, Segura M, Sébire G. Causal role of group B Streptococcus-induced acute chorioamnionitis in intrauterine growth retardation and cerebral palsy-like impairments. *J Dev Orig Health Dis.* 2019;1-8. DOI:10.1017/S2040174418001083.
- 6- Vik T, Redline R, Nelson KB, Bjellmo S, Vogt C, et al. The Placenta in Neonatal Encephalopathy: A Case-Control Study. *J Pediatr.* 2018; 202:77-85.e3. DOI: 10.1016/j.jpeds.2018.06.005.
- 7- Colella M, Zinni M, Pansiot J, Cassanello M, Mairesse J, Ramenghi L, et al. Modulation of Microglial Activation by Adenosine A2a Receptor in Animal Models of Perinatal Brain Injury. *Front Neurol.* 2018;9:605. DOI: 10.3389/fneur.2018.00605.
- 8- Chevin M, Guiraut C, Sébire G. Effect of hypothermia on interleukin-1 receptor antagonist pharmacodynamics in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy of term newborns. *J Neuroinflammation.* 2018; 15(1):214. DOI: 10.1186/s12974-018-1258-6.
- 9- Ellery SJ, Kelleher M, Grigsby P, Burd I, Derks JB, Hirst J, et al. Antenatal prevention of cerebral palsy and childhood disability: is the impossible possible?. *J Physiol.* 2018; 596(23):5593-5609. DOI: 10.1113/JP275595.

- 10- Yanni D, Korzeniewski SJ, Allred EN, Fichorova RN, O'Shea TM, Kuban K, et al. Both antenatal and postnatal inflammation contribute information about the risk of brain damage in extremely preterm newborns. *Pediatr Res.* 2017; 82(4):691-696. DOI: 10.1038/pr.2017.128.
- 11- Dhillon SK, Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Davidson JO, Juul S, et al. The fetus at the tipping point: modifying the outcome of fetal asphyxia. *J Physiol.* 2018; 596(23):5571-5592. DOI: 10.1113/JP274949.
- 12- Paton MCB, Allison BJ, Li J, Fahey MC, Sutherland AE, Nitsos I, et al. Human Umbilical Cord Blood Therapy Protects Cerebral White Matter from Systemic LPS Exposure in Preterm Fetal Sheep. *Dev Neurosci.* 2018; 40(3):258-270. DOI: 10.1159/000490943.
- 13- Wixey JA, Chand KK, Colditz PB, Bjorkman ST. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. *Placenta.* 2017; 54:117-124. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.11.012.
- 14- Liberman AC, Trias E, da Silva Chagas L, Trindade P, Dos Santos Pereira M, Refojo D, et al. Neuroimmune and Inflammatory Signals in Complex Disorders of the Central Nervous System. *Neuroimmunomodulation.* 2018; 25(5-6):246-270. DOI: 10.1159/000494761.
- 15- DeMaster D, Bick J, Johnson U, Montroy JJ, Landry S, Duncan AF. Nurturing the preterm infant brain: leveraging neuroplasticity to improve neurobehavioral outcomes. *Pediatr Res.* 2019; 85(2):166-175. DOI: 10.1038/s41390-018-0203-9.
- 16- Matusz PJ, Key AP, Gogliotti S, Pearson J, Auld ML, Murray MM, et al. Somatosensory Plasticity in Pediatric Cerebral Palsy following Constraint-Induced Movement Therapy. *Neural Plast.* 2018; 2018:1891978. DOI: 10.1155/2018/1891978.
- 17- Woodward KE, Carlson HL, Kuczynski A, Saunders J, Hodge J, Kirton A. Sensory-motor network functional connectivity in children with unilateral cerebral palsy secondary to perinatal stroke. *Neuroimage Clin.* 2019:101670. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.101670.

- 18- Jochumsen M, Shafique M, Hassan A, Niazi IK. Movement intention detection in adolescents with cerebral palsy from single-trial EEG. *J Neural Eng.* 2018; 15(6):066030. DOI: 10.1088/1741-2552/aae4b8.
- 19- Linke AC, Wild C, Zubiaurre-Elorza L, Herzmann C, Duffy H, Han VK, et al. Disruption to functional networks in neonates with perinatal brain injury predicts motor skills at 8 months. *Neuroimage Clin.* 2018; 18:399-406. DOI: 10.1016/j.nicl.2018.02.002.
- 20- George JM, Boyd RN, Colditz PB, Rose SE, Pannek K, et al. PPREMO: a prospective cohort study of preterm infant brain structure and function to predict neurodevelopmental outcome. *BMC Pediatr.* 2015; 15:123. DOI: 10.1186/s12887-015-0439-z.
- 21- Hankins GDV, Speer M. Defining the Pathogenesis and Pathophysiology of Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy. *Obstet Gynecol.* 2003;102(3):628-639.
- 22- McDowell B. The Gross Motor Function Classification System--expanded and revised. *Dev Med Child Neurol.* 2008; 50(10):725. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2008.03104.x.
- 23- Novak I, McIntyre S, Morgan C, Campbell L, Dark L, Morton N, et al. A systematic review of interventions for children with cerebral palsy: state of the evidence. *Dev Med Child Neurol.* 2013; 55(10):885-910. DOI: 10.1111/dmcn.12246.
- 24- Law M, Darrah J, Pollock N, King G, Rosenbaum P, et al. Family-Centred Functional Therapy for Children with Cerebral Palsy. *Physical & Occupational Therapy In Pediatrics.* 1998; 18(1):83-102, DOI: 10.1080/J006v18n01\_06
- 25- Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC. Urinary Levels of IL-1 $\beta$  and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflammation* 2017; 2017:8201423. DOI: 10.1155/2017/8201423.
- 26- Bayley N. Bayley Scales of Infant and Toddler Development - Third Edition, Administration Manual. San Antonio, TX: The Psychological Corporation, 2006.
- 27- Matusz PJ, Key AP, Gogliotti S, Pearson J, Auld ML, Murray MM, et al. Somatosensory Plasticity in Pediatric Cerebral Palsy following Constraint-Induced Movement Therapy. *Neural Plast.* 2018; 2018:1891978. doi: 10.1155/2018/1891978.

- 28- Hoare B, Ditchfield M, Thorley M, Wallen M, Bracken J, Harvey A, et al. Cognition and bimanual performance in children with unilateral cerebral palsy: protocol for a multicentre, cross-sectional study. *BMC Neurol.* 2018; 18(1):63. DOI: 10.1186/s12883-018-1070-z.
- 29- Dinomais M, Marret S, Vuillerot C. Brain plasticity and early rehabilitative care for children after neonatal arterial cerebral infarction. *Arch Pediatr.* 2017; 24(9S):9S61-9S68. doi: 10.1016/S0929-693X(17)30333-0.
- 30- Reid LB, Rose SE, Boyd RN. Rehabilitation and neuroplasticity in children with unilateral cerebral palsy. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11(7):390-400. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.97.
- 31- Novak I, Morgan C, Adde L, Blackman J, Boyd RN, Brunstrom-Hernandez J, et al. Accurate Diagnosis and Early Intervention in Cerebral Palsy: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA Pediatr.* 2017; 171(9):897-907. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2017.1689.
- 32- Leviton A, Ryan S, Allred EN, Fichorova RN, Michael O'Shea T, Kuban K, et al. Antecedents and early correlates of high and low concentrations of angiogenic proteins in extremely preterm newborns. *Clin. Chim. Acta.* 2017; 471: 1–5. DOI: 10.1016/j.cca.2017.05.014.
- 33- Mason B, Rollins LG, Asumadu E, Cange C, Walton N, Donaldson ST. Nesting Environment Provides Sex-Specific Neuroprotection in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury. *Front Behav Neurosci.* 2018; 12:221. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00221.
- 34- Reid LB, Boyd RN, Cunnington R, Rose SE. Interpreting Intervention Induced Neuroplasticity with fMRI: The Case for Multimodal Imaging Strategies. *Neural Plast.* 2016; 2016:2643491. DOI: 10.1155/2016/2643491.
- 35- Kuo HC, Zewdie E, Ciechanski P, Damji O, Kirton A. Intervention-Induced Motor Cortex Plasticity in Hemiparetic Children With Perinatal Stroke. *Neurorehabil Neural Repair.* 2018; 32(11):941-952. DOI: 10.1177/1545968318801546.
- 36- Johnston MV. Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. *Dev Disabil Res Rev.* 2009; 15(2):94-101. DOI: 10.1002/ddrr.64.

- 37- Magalhães RC, Pimenta LP, Barbosa IG, Moreira JM, de Barros JLVM, Teixeira AL, et al.. Inflammatory molecules and neurotrophic factors as biomarkers of neuropsychomotor development in preterm neonates: A Systematic Review. *Int J Dev Neurosci*. 2018; 65:29-37. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2017.10.006.
- 38- Varner MW, Marshall NE, Rouse DJ, Jablonski KA, Leveno KJ, Reddy UM, et al. The association of cord serum cytokines with neurodevelopmental outcomes. *Am J Perinatol*. 2015; 30(2):115-22. DOI: 10.1055/s-0034-1376185.
- 39- Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr*. 2014; 164(3):468-74.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.10.067.
- 40- Carlo WA, McDonald SA, Tyson JE, Stoll BJ, Ehrenkranz RA, Shankaran S, et al. Cytokines and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *J Pediatr*. 2011;159(6):919-25.e3. DOI: 10.1016/j.jpeds.2011.05.042.
- 41- Vasiljevic B, Maglajlic-Djukic S, Gojnic M, Stankovic S, Ignjatovic S, Lutovac D. New insights into the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Int*. 2011; 53(4):454-62. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2010.03290.x.
- 42- Lodha A, Asztalos E, Moore AM. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatr*. 2010; 99(3):338-43. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2009.01600.x
- 43- Andrews WW, Cliver SP, Biasini F, Peralta-Carcelen AM, Rector R, Alriksson-Schmidt AI, et al.. Early preterm birth association between in utero exposure to acute inflammation and severe neurodevelopmental disability at 6 years of age. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(4):466.e1-466.e11. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.12.031.
- 44- Bartha AI, Foster-Barber A, Miller SP, Vigneron DB, Glidden DV, Barkovich AJ, et al. Neonatal encephalopathy Association of cytokines with MR spectroscopy and outcome. *Pediatr Res*. 2004; 56(6):960-6. DOI: 10.1203/01.PDR.0000144819.45689.BB.
- 45- Xia L, Chen M, Bi D, Song J, Zhang X, Wang Y, et al. Combined Analysis of Interleukin-10 Gene Polymorphisms and Protein Expression in Children With Cerebral Palsy. *Front Neurol*. 2018; 9:182. DOI: 10.3389/fneur.2018.00182.

- 46- Allred EN, Dammann O, Fichorova RN, Hooper SR, Hunter SJ, Joseph RM, et al. Systemic inflammation during the first month and the risk of attention deficit hyperactivity disorder characteristics among 10 years-old children born extremely preterm. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2017; 12(3):531-543. DOI: 10.1007/s11481-017-9742-9.
- 47- El Tantawi NT, Abd Elmegid DS, Atef E. Seizure outcome and epilepsy patterns in patients with cerebral palsy. *Seizure.* 2019; 65:166-171. DOI: 10.1016/j.seizure.2019.01.003.

**Table 1** – Clinical characteristics of children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention.

Characteristics n(%)	Rehab group (n= 60)	Non-rehab group (n = 30)	p value
Sex			0.5517
Female	24 (40,0)	14 (46,7)	
Male	36 (60,0)	16 (53,3)	
Diagnostic			0.6955
SCP Bilateral	30 (51,0)	15 (50,0)	
SCP Unilateral	6 (10,0)	7 (23,3)	
CP Dyskinetic	22 (36,7)	7 (23,4)	
CP Ataxic	2 (3,3)	1 (3,3)	
Cause			0.3121
Hypoxia	35 (58,4)	17 (56,7)	
Preterm birth	25 (41,6)	13 (43,3)	
GMFCS			0.9600
I	4 (6,7)	5 (16,7)	
II	4 (6,7)	2 (6,7)	
III	6 (10,0)	5 (16,7)	
IV	15 (25,0)	7 (23,3)	
V	31 (51,7)	11 (36,7)	
Medication			0.2871
None	15 (25,0)	14 (46,7)	
Anti-spastic	6 (10,0)	1 (3,3)	
Antiepileptic	15 (25,0)	3 (10,0)	
Antiepileptic polypharmacy	19 (31,7)	8 (26,7)	
Anti-spastic + Antiepileptic polypharmacy	5 (8,3)	4 (13,4)	
Computed Tomography			0.1232
Occipital encephalomalacia	3 (5,0)	2 (6,7)	
Parietal encephalomalacia	4 (6,7)	3 (10,0)	
Frontal encephalomalacia	0 (0,0)	4 (13,3)	
Bilateral encephalomalacia	16 (26,7)	3 (10,0)	
Cortical hypotrophy	16 (26,7)	7 (23,3)	
Ventricular system dilatation	10 (16,7)	6 (20,0)	
Leukomalacia	10 (16,7)	3 (10,0)	
Cerebellar atrophy	1 (1,7)	2 (6,7)	

CP = Cerebral Palsy; SCP = Spastic Cerebral Palsy; GMFCS = Gross Motor Function Classification System. Values are expressed in numbers of individuals and percentage for categorical variables. Chi-square test of Pearson or asymptotic chi-square test of Pearson Exact were used for comparisons.

**Table 2** – Characteristics at birth and at two time-points for collection of biological samples and evaluation of neuropsychomotor development in children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to rehabilitation intervention.

Characteristics	Rehab group (n= 60)	Non-rehab group (n = 30)	p value
<b>At birth</b>			
Birth weight	2755 (1779;3100)	2828 (2466;3251)	0.1705
Gestational age	38 (32;39)	39 (36;40)	0.0754
Apgar 1'	6 (3;8)	6 (5;8)	0.2605
Apgar 5'	8 (5;9)	7 (6;9)	0.4858
<b>First time point</b>			
Age	18 (18;18)	18 (18;18)	1.0000
Body weight	9600 (8500;11030)	9900 (8575;10250)	0.6454
Adequate weight	36 (60,0)	22 (73,3)	
Low weight	18 (30,0)	3 (10,0)	
Very low weight	6 (10,0)	5 (6,7)	
Rehabilitation frequency	5 (4;5)	0 (0;0)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Second time point</b>			
Age	24 (24;24)	24 (24;24)	1.0000
Body weight	9800 (8800;11300)	10400 (9050;10850)	1.0000
Adequate weight	34 (56,7)	23 (76,6)	
Low weight	21 (35,0)	3 (10,0)	
Very low weight	5 (8,3)	4 (13,3)	
Rehabilitation frequency	5 (4;5)	0 (0;0)	<b>&lt;0.0001</b>

Numerical variables are expressed as medians followed by (percentile 25 – percentile 75). Values for classification of body weight are expressed in numbers and percentages. Mann-Whitney test was used for median comparisons.

**Table 3** – Comparison between plasma levels of the molecules at time-point 1 (baseline) and time-point 2 (after six months of intervention) in children with cerebral palsy submitted to early intervention of rehabilitation (rehab group) and not submitted (non-rehab group) to early intervention on rehabilitation program.

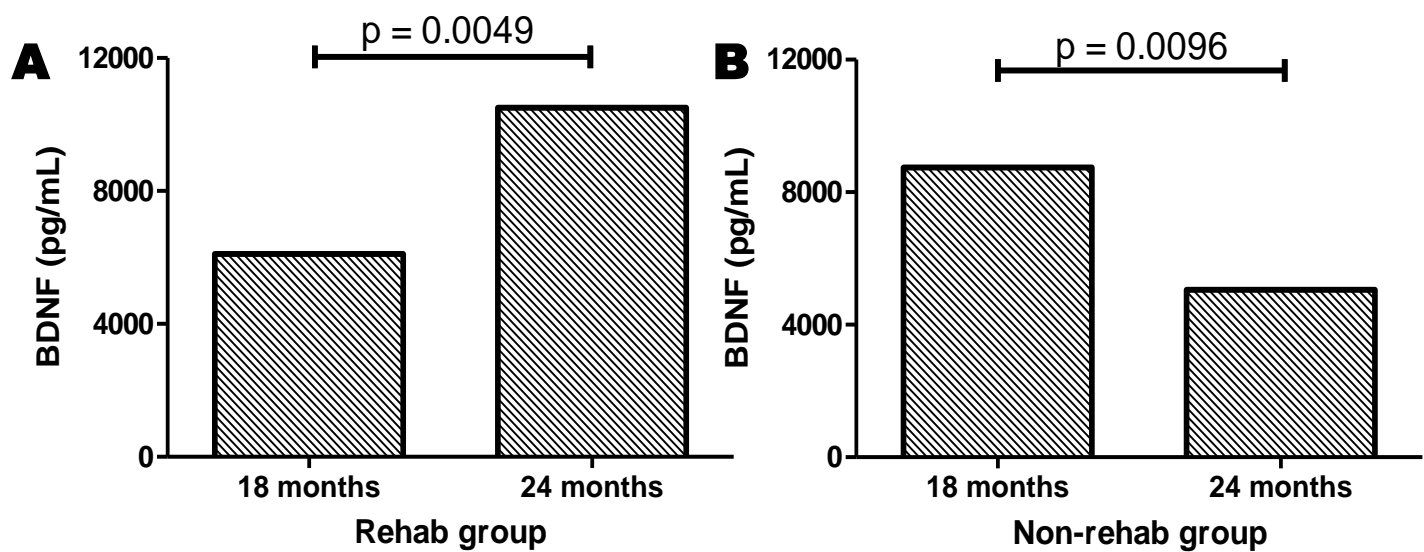
Molecules	Rehab group			Non-rehab group		
	Time-point 1	Time-point 2	p value	Time-point 1	Time-point 2	p value
IL-12p70	4.77 (4.15 ; 5.843)	2.55 (1.67 ; 4.10)	<b>0.0010</b>	4.32 (1.21 ; 6.18)	4.99 (2.93 ; 6.01)	0,4590
TNF	5.39 (4.13 ; 6.75)	2.48 (1.61 ; 4.02)	<b>&lt;0.0001</b>	4.58 (1.06 ; 8.40)	5.51 (3.24 ; 8.27)	0.4716
IL-10	7.78 (6.07 ; 11.45)	3.76 (2.860 ; 5.783)	<b>&lt;0.0001</b>	7.19 (1.63 ; 9.07)	6.50 (4.88 ; 10.43)	0.3441
IL-6	12.75 (6.49 ; 39.33)	6.740 (4.400 ; 17.48)	<b>0.0105</b>	8.33 (4.80 ; 25.06)	15.16 (8.46 ; 25.76)	0.2667
IL-1 $\beta$	13.73 (12.17 ; 16.26)	7.24 (4.780 ; 10.62)	<b>&lt;0.0001</b>	13.58 (3.52 ; 17.61)	13.58 (9.01 ; 18.65)	0.3600
IL-8/CXCL8	26.80 (15.53 ; 81.87)	12.26 (8.800 ; 21.48)	<b>0.0002</b>	20.05 (10.94 ; 52.62)	20.76 (15.39 ; 38.56)	0.7577
IP-10/CXCL10	145.3 (118.9 ; 215.9)	153.5 (134.1 ; 220.4)	0.4074	202.6 (142.8 ; 241.5)	155.7 (118.5 ; 191.6)	0.2120
MCP-1/CCL2	47.18 (34.85 ; 105.5)	92.47 (30.96 ; 265.0)	<b>0.0046</b>	52.42 (32.92 ; 131.0)	172.1 (35.79 ; 254.5)	0.4904
MIG/CXCL9	54.74 (49.59 ; 93.70)	82.68 (55.76 ; 115.3)	<b>0.0147</b>	92.17 (51.82 ; 127.5)	80.55 (60.44 ; 121.3)	0.7266
RANTES/CCL5	0.0 (0.0 ; 0.0)	0.0 (0.0 ; 67.41)	0.5273	0.0 (0.0 ; 0.0)	0.0 (0.0 ; 74.06)	0.8666
BDNF	6107 (1823 ; 14201)	10503 (4324 ; 18084)	<b>0.0049</b>	8746 (3556 ; 20921)	5053 (5053 ; 10745)	<b>0.0096</b>
GDNF	23.10 (0.0 ; 206.7)	214.4 (42.82 ; 332.9)	<b>0.0087</b>	56.97 (6.57 ; 326.0)	33.59 (3.36 ; 133.5)	0.1247

Values are expressed as medians and (percentile 25; percentile 75). Wilcoxon test was used for comparisons between values of the same individual at both time-points.

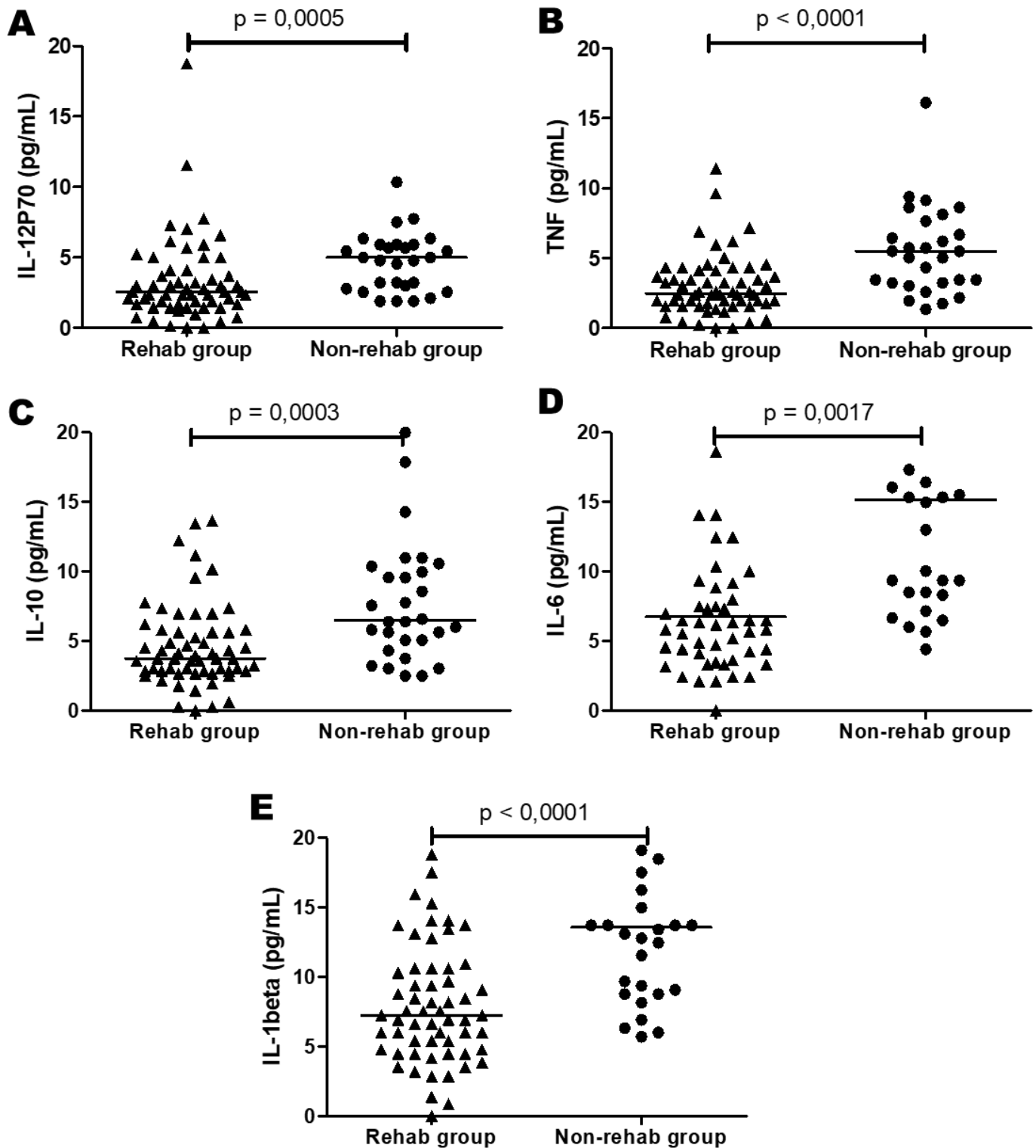
**Table 4–** Correlation of inflammatory mediators and neuropsychomotor development showed as scaled score in the five sub-scales of the BSID-III test used in the assessment of the neuropsychomotor development of children with cerebral palsy.

Molecules	NPMD	Spearman r	ICC 95%	p value
BDNF	Gross Motor	0.2705	-0.06095 - 0.4572	<b>0.005</b>
	Fine Motor	0.2188	-0.006005 - 0.4126	<b>0.0191</b>
	Expressive Communication	0.2215	-0.008819 - 0.4150	<b>0.018</b>
	Receptive Communication	0.2351	-0.02323 - 0.4268	<b>0.0128</b>
TNF	Cognitive	0.1827	-0.03156 - 0.3810	<b>0.0424</b>
	Fine Motor	-0.2421	- 0.4328 - 0.03059	<b>0.0108</b>
	Receptive Communication	-0.1787	-0.3774 - 0.03571	<b>0.0459</b>
IL-1 $\beta$	Cognitive	-0.1758	-0.3749 - 0.03869	<b>0.0487</b>
	Fine Motor	-0.1823	-0.3806 - 0.03201	<b>0.0427</b>
CXCL8/IL-8	Cognitive	-0.1839	-0.3820 - 0.03035	<b>0.0413</b>

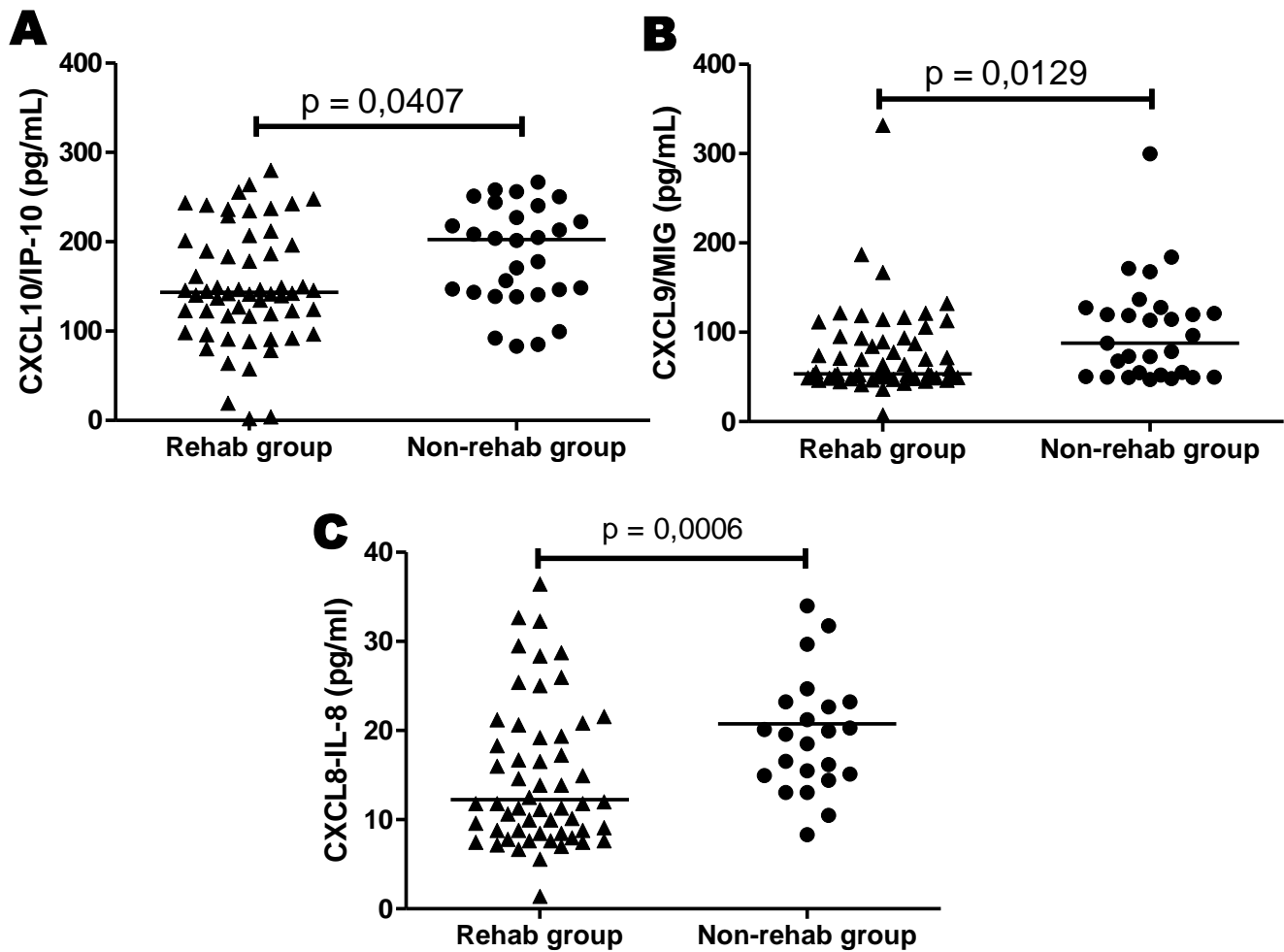
CI = confidence interval. Spearman correlation test was used for analysis.



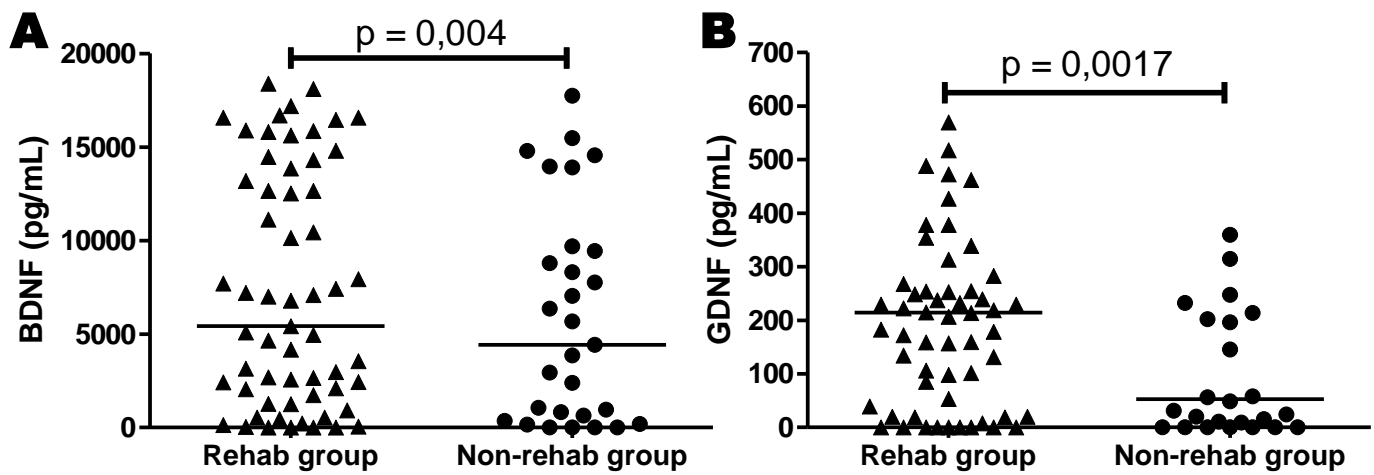
**Figure 1** - Plasma BDNF levels at Time-point 1 (baseline) and Time-point 2 (after six months of intervention) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention. (B). ELISA was used in ex vivo analysis for neurotrophic factors. Wilcoxon test was used for comparisons between medians of both groups. The difference was significant with p value < 0.05.



**Figure 2** - Plasma levels of IL-12p70 (A), TNF (B), IL-10 (C), IL-6 (D) and IL1 $\beta$  (E) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention after six months of intervention. Cytometry Bead Array was used in ex vivo analysis of cytokines. Mann–Whitney test was used for comparisons between medians of both groups. The difference was significant with p value < 0.05.



**Figure 3-** Plasma chemokine levels of CXCL10/IP-10 (A), CXCL9/MIG (B) and CXCL8/IL-8 (C) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group) (A) or not submitted (non-rehab group) to the rehabilitation intervention after six months of the intervention. Cytometry Bead Array was used in ex vivo analysis of chemokines. Mann–Whitney test was used for comparisons between medians of both groups. The difference was significant with p value < 0.05.



**Figure 4-** Plasma neurotrophic factors levels of BDNF (A) and GDNF (B) in children with cerebral palsy (n=90) submitted to early intervention of rehabilitation program (rehab group, n=60) (A) or not submitted (non-rehab group, n=30) to the rehabilitation intervention after six months of intervention. ELISA was used in ex vivo analysis for neurotrophic factors. Mann–Whitney test was used for comparisons between medians of both groups. The difference was significant with p value < 0.05.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado evidencia a importância da assistência multiprofissional à criança com paralisia cerebral. Programas de intervenção precoce reduziram as concentrações plasmáticas de moléculas inflamatórias e aumentaram os níveis circulantes de fatores neurotróficos (BDNF e GDNF). Além disso, a reabilitação ampliou o repertório de habilidades da criança e melhorou o DNPM. Tais resultados se deveram provavelmente à plasticidade cerebral<sup>1,2</sup>.

Os achados desse estudo mostraram que há correlação inversa entre as citocinas pró-inflamatórias e os fatores neurotróficos. Dessa forma, a imunomodulação ocorrida nas crianças submetidas à intervenção precoce favorece a liberação de fatores neurotróficos e diminui as concentrações plasmáticas de moléculas inflamatórias. Como esses mediadores avaliados atravessam a BHE<sup>3</sup>, podemos postular que as mudanças nas concentrações dessas moléculas podem ter favorecido a plasticidade cerebral e, conseqüente mente, melhorado o DNPM em resposta à intervenção de reabilitação. É importante ressaltar que a inflamação sistêmica, mensurada por amostras de sangue periférico, pode representar a inflamação no SNC devido a capacidade dessas moléculas de atravessarem a BHE<sup>3</sup>.

Em todas as crianças incluídas nesse estudo, a melhora do DNPM ocorreu concomitantemente à redução da resposta inflamatória e aumento na liberação de fatores neurotróficos. Quando essa resposta inflamatória elevada é mantida não há melhora no DNPM, conforme observamos nas crianças que não foram submetidas a reabilitação.

Em nosso estudo, as intervenções de reabilitação foram capazes de promover o DNPM de crianças com PC. Por outro lado, a ausência de programas sistemáticos de reabilitação foi um fator que impediu que houvesse melhora no DNPM, o que foi claramente mostrado no grupo sem-reabilitação. Nas crianças com PC que não realizaram a reabilitação não houve modificação dos escores da escala de Bayley-III no intervalo de tempo desse estudo.

Todavia, este estudo tem limitações que devem ser reconhecidas. Primeiro, as alterações moleculares relatadas na periferia (ou seja, sangue) podem não refletir com exatidão mudanças recíprocas no SNC. As análises do líquido cefalorraquidiano e da neuroimagem poderiam ter acrescentado informações significativas a esse respeito<sup>4</sup>. Segundo, fatores

socioeconômicos podem ter interferido no DNPM, apesar de termos incluído nos dois grupos crianças provenientes de famílias com níveis socioeconômicos bem semelhantes. Seriam necessárias abordagens multicêntricas para melhor compreender as associações entre moléculas inflamatórias, fatores neurotróficos, reabilitação e DNPM em diferentes condições socioeconômicas<sup>5</sup>. No entanto, nosso estudo foi controlado para os principais fatores (diagnósticos, idade e sexo), os quais poderiam influenciar o DNPM e as mensurações dos mediadores imunológicos e fatores neurotróficos. Outra limitação é a avaliação não cega das crianças incluídas nesse estudo. No entanto, o Bayley-III é um teste padronizado que requer treinamento profissional, o que pode reduzir o viés do examinador<sup>6</sup>. Obviamente, poderíamos ter mensurado outras moléculas que podem refletir a morte e a plasticidade neuronal<sup>7-9</sup>. No entanto, optamos por este painel de marcadores devido à relevância dessas moléculas no desenvolvimento e maturação do cérebro, bem como por sua associação em estudos prévios com DNPM<sup>10-15</sup>.

Entretanto, há que se ressaltar as contribuições trazidas pelo presente estudo. Pela primeira vez, foi comprovado, por meio de estudo prospectivo e de intervenção, o efeito benéfico da intervenção de reabilitação no DNPM de crianças com PC. Além disso, ficou evidente que tal intervenção modifica as concentrações plasmáticas de moléculas inflamatórias e fatores neurotróficos, que foram mensurado por meio de técnicas padronizadas, com todo rigor científico e metodológico. Dessa forma, torna-se necessário ampliar a investigação do processo inflamatório nas crianças com PC para determinar os fatores de risco e os mecanismos que interferem no neurodesenvolvimento e no processo de maturação do SNC após lesão cerebral.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Liu XH, Bi HY, Cao J, Ren S, Yue SW. Early constraint-induced movement therapy affects behavior and neuronal plasticity in ischemia-injured rat brains. *Neural Regen Res.* 2019;14(5):775-782. DOI: 10.4103/1673-5374.249225.
- 2- Matusz PJ, Key AP, Gogliotti S, Pearson J, Auld ML, Murray MM, Maitre NL. Somatosensory Plasticity in Pediatric Cerebral Palsy following Constraint-Induced Movement Therapy. *Neural Plast.* 2018;2018:1891978. DOI: 10.1155/2018/1891978.
- 3- Koh H, Hwang K, Lim HY, Kim YJ, Lee YH. Mononuclear cells from the cord blood and granulocyte colony stimulating factor-mobilized peripheral blood: is there a potential for treatment of cerebral palsy?. *Neural Regen Res.* 2015;10(12):2018-24. DOI: 10.4103/1673-5374.172321.
- 4- Kulesh A, Drobakha V, Kuklina E, Nekrasova I, Shestakov V. Cytokine Response, Tract-Specific Fractional Anisotropy, and Brain Morphometry in Post-Stroke Cognitive Impairment. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018;27(7):1752-1759. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.02.004.
- 5- Patra K, Greene MM, Patel AL, Meier P. Maternal Education Level Predicts Cognitive, Language, and Motor Outcome in Preterm Infants in the Second Year of Life. *Am J Perinatol.* 2016;33(8):738-44. DOI: 10.1055/s-0036-1572532.
- 6- Mackin R, Ben Fadel N, Feberova J, Murray L, Nair A, Kuehn S, Barrowman N, Daboval T. ASQ3 and/or the Bayley-III to support clinicians' decision making. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170171. DOI: 10.1371/journal.pone.0170171.
- 7- Chen Z, Xu N, Dai X, Zhao C, Wu X, Shankar S, Huang H, Wang Z. Interleukin-33 reduces neuronal damage and white matter injury via selective microglia M2 polarization after intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res Bull.* 2019;150:127-135. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.05.016.
- 8- Xu D, Wu D, Qin M, Nih LR, Liu C, Cao Z. Efficient Delivery of Nerve Growth Factors to the Central Nervous System for Neural Regeneration. *Adv Mater.* 2019:e1900727. DOI: 10.1002/adma.201900727.
- 9- Shigetomi E, Saito K, Sano F, Koizumi S. Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4). pii: E996. DOI: 10.3390/ijms20040996.

- 10- Varner MW, Marshall NE, Rouse DJ, Jablonski KA, Leveno KJ, Reddy UM, Mercer BM, Iams JD, Wapner RJ, Sorokin Y, Thorp JM, Malone FD, Carpenter M, O'Sullivan MJ, Peaceman AM, Hankins GD, Dudley DJ, Caritis SN, et al. The association of cord serum cytokines with neurodevelopmental outcomes. *Am J Perinatol.* 2015;30(2):115-22. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0034-1376185>.
- 11- Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr.* 2014;164(3):468-74.e1. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.067>.
- 12- Carlo WA, McDonald SA, Tyson JE, Stoll BJ, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Goldberg RN, Das A, Schendel D, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Oh W, Laptook AR, Duara S, Fanaroff AA, Donovan EF, Korones SB, Stevenson DK, Papile LA, Finer NN, O'Shea TM, Poindexter BB, Wright LL, Ambalavanan N, Higgins RD, et al. Cytokines and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *J Pediatr.* 2011;159(6):919-25.e3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.05.042>.
- 13- Lodha A, Asztalos E, Moore AM. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatr.* 2010;99(3):338-43. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01600.x>
- 14- Andrews WW, Cliver SP, Biasini F, Peralta-Carcelen AM, Rector R, Alriksson-Schmidt AI, Faye-Petersen O, Carlo W, Goldenberg R, Hauth JC. Early preterm birth association between in utero exposure to acute inflammation and severe neurodevelopmental disability at 6 years of age. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(4):466.e1-466.e11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.12.031>.
- 15- Bartha AI, Foster-Barber A, Miller SP, Vigneron DB, Glidden DV, Barkovich AJ, Ferriero DM. Neonatal encephalopathy Association of cytokines with MR spectroscopy and outcome. *Pediatr Res.* 2004;56(6):960-6. DOI: <http://doi.org/10.1203/01.PDR.0000144819.45689.BB>

## **ANEXOS**

### **ANEXO I PRODUÇÕES TÉCNICAS E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS**

#### **1 MANUSCRITOS SUBMETIDOS COM TEMA RELACIONADO À TESE**

**MAGALHÃES RC**, da SILVA FILHA R, VIEIRA ELM, TEIXEIRA AL, MOREIRA JM, SIMÕES E SILVA AC. Rehabilitation intervention improves neurodevelopment and modulates inflammatory molecules in children with cerebral palsy. Submetido ao periódico The Journal of Pediatrics. (Manuscrito original dessa tese)

**MAGALHÃES RC**, MOREIRA JM, LAUAR AO, da SILVA AAS, TEIXEIRA AL, SIMÕES E SILVA AC. Inflammatory molecules in children with cerebral palsy: a systematic review. Submetido ao periódico Research in Developmental Disabilities. (Manuscrito revisão dessa tese)

#### **2 PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO/EVENTOS COM TEMA RELACIONADO À TESE**

**MAGALHÃES RC**, da SILVA FILHA R, VIEIRA ELM, TEIXEIRA AL, MOREIRA JM, SIMÕES E SILVA AC. Rehabilitation intervention improves neurodevelopment and modulates inflammatory molecules in children with cerebral palsy. Avaliação externa do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular, 2019, Belo Horizonte.

**MAGALHÃES RC**, LAUAR AO, da SILVA AAS, MOREIRA JM, SIMÕES E SILVA AC. Inflammatory molecules in children with cerebral palsy: a systematic review. International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV, 2018, Belo Horizonte.

**MAGALHÃES RC**, LAUAR AO, da SILVA AAS, MOREIRA JM, SIMÕES E SILVA AC. Biomarcadores inflamatórios do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral: uma revisão sistemática. XV Congresso Mineiro de Pediatria, 2018, Belo Horizonte.

#### **3 CAPÍTULOS DE LIVRO COM TEMA RELACIONADO À TESE**

SIMÕES E SILVA AC, MOREIRA JM, **MAGALHÃES RC**, ZENI CP. Immune mechanisms and Central Nervous System (CNS) development. In: TEIXEIRA AL, BAUER ME. Immunopsychiatry: A Clinician's Introduction to the Immune Basis of Mental Disorders. United States of America: Oxford University Press. chap. 4.

de ARAÚJO LA, **MAGALHÃES RC**, MOREIRA JM. Métodos de avaliação do desenvolvimento do lactente e pré-escolar. In: de MIRANDA DM, MALLOY-DINIZ LF. O pré-escolar. São Paulo: Editora Hogrefe, 2018. cap. 5.

#### **4 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS À TESE**

**MAGALHÃES RC**, MOREIRA JM, VIEIRA ELM, ROCHA NP, MIRANDA DM, SILVA ACS. Urinary levels of IL-1 $\beta$  and GDNF in preterm neonates as potential biomarkers of motor development: A prospective study. Mediators of Inflamm. 2017;2017.

**MAGALHÃES RC**, PIMENTA LP, BARBOSA IG, MOREIRA JM, de BARROS JLVM, TEIXEIRA AL, SIMÕES E SILVA AC. Inflammatory molecules and neurotrophic factors as biomarkers of neuropsychomotor development in preterm neonates: A Systematic Review. Int J Dev Neurosci. v.65, p.29-37, 2017.

## ANEXO II - PARECER COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Relação da resposta imuno-inflamatória com o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral na primeira infância.

**Pesquisador:** Janaina Matos Moreira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56771316.7.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.663.092

#### Apresentação do Projeto:

A resposta inflamatória exacerbada está classicamente relacionada à morte celular no tecido nervoso, associando-se às lesões cerebrais que podem determinar, em longo prazo, limitações motoras, sensoriais e cognitivas. Todavia, células da micróglia, envolvidas na resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC), também possuem um papel fisiológico, participando do desbastamento sináptico e apoptose que ocorrem durante o desenvolvimento, além de ações na neurogênese e diferenciação neuronal. O balanço entre eventos pró-inflamatórios e imunomoduladores modula os processos de reparação/ resolução e a ocorrência de lesão. A inflamação peri/neonatal associa-se a lesão cerebral e a pior desenvolvimento neuropsicomotor aos dois anos de vida. Os recém-nascidos que possuem elevados níveis de citocinas e quimiocinas e baixos níveis de fatores neurotróficos circulantes no primeiro mês de vida apresentam pior desenvolvimento neuropsicomotor em longo prazo. Todavia, o mecanismo de plasticidade cerebral permite que o sistema nervoso central reorganize a rede neuronal, associadas a mudanças físicas em espinhas dendríticas e circuitos neuronais, com surgimento de novas sinapses em resposta à estimulação ambiental ou reabilitação. Estímulos de reabilitação, por sua vez, promovem mudanças estruturais e funcionais no cérebro, que se associam a maior liberação de fatores neurotróficos, além de favorecer o desenvolvimento neuropsicomotor com aprendizado de novas

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

habilidades. Os estudos que correlacionam inflamação, neuroplasticidade e desenvolvimento limitam-se em associar a inflamação peri/neonatal com o desenvolvimento neuropsicomotor sem descrever as mudanças possíveis no processo inflamatório e anti-inflamatório no decorrer do desenvolvimento, bem como não consideram o impacto que os estímulos de reabilitação possa ter de forma a interferir nesses processo. METODOLOGIA:

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal, prospectivo, no qual amostras de sangue e urina serão coletadas em crianças de zero a três anos de idade com paralisia cerebral, estratificadas de acordo com classificação.

- Período e local de coleta: As avaliações ocorrerão a cada seis meses, durante o período de um ano, nos dias em que as crianças comparecerem para as atividades de reabilitação na Associação Mineira de Reabilitação (AMR). Em todos os momentos de avaliação, será realizada coleta de sangue periférico e aplicada uma escala de neurodesenvolvimento: Bayley III.

- Coleta e Processamento de sangue periférico. Será realizada coleta das amostras de sangue periférico através de punção venosa periférica, resguardando-se todos os critérios de assepsia, em tubos individualizados de 3 ml de sangue com heparina sódica. As amostras serão armazenadas e transportadas para o laboratório, onde serão processadas. Será realizada centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. As amostras de plasma então obtidas serão transferidas para microtubos de 1,5mL e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

- Dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos- Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array – CBA)As dosagens de citocinas e quimiocinas no soro dos recém-nascidos serão realizadas pelo método de CBA, utilizando-se os kits da R& D Systems: Human Inflammation (IL-1, IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) e Chemokines (IL-8, MCP-1, RANTES, IP-10, MIF-1). Seguindo as recomendações do fabricante. As amostras serão lidas em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados serão gerados em resultado gráfico e tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas e fatores neurotróficos no sangue. A determinação das citocinas plasmáticas e fatores neurotróficos será realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando Kits da R&D systems, específicos para cada componente avaliado. O protocolo de ELISA utiliza um anticorpo monoclonal específico para determinação de cada citocina e fator neurotrófico de interesse fornecido pelo fabricante (kit da R&D Systems). As placas serão lidas a 492 nm em espectrofotômetro (E max – Molecular Devices). Todas as amostras serão analisadas em duplicata. Os padrões consistem em diluições 0.5-log de citocinas recombinantes em

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

concentrações que variam de 7.5 pg/ ml a 1000 pg/ ml (100 I). (100 I).

- Avaliação do Desenvolvimento: Para a avaliação do desenvolvimento será utilizada a Bayley Scales of Infant and Toddler Development – Third Edition (Bayley–III), 2006. Consiste em uma escala padronizada para avaliar o desenvolvimento infantil de crianças entre um e 42 meses, possuindo uma margem de avaliação de 15 dias a mais ou a menos. O objetivo principal do instrumento é identificar crianças com atraso no desenvolvimento e fornecer informação para o planejamento da intervenção. Apesar de não ser traduzida para o português e não ter sofrido adaptação transcultural, tornou-se consenso entre vários autores, de que esta escala está entre as melhores existentes na área, sendo considerada “padrão-ouro”, por abarcar uma avaliação completa e detalhada do desenvolvimento neuropsicomotor, sendo utilizada em diversos estudos com a população brasileira. A Bayley–III é composta por cinco escalas padronizadas: Escala Cognitiva; Escala Motora (subdivida em Escala Motora Fina e Escala Motora Grossa); Escala de Linguagem (composta pela Linguagem Receptiva e Linguagem Expressiva); Questionário Comportamental Adaptativo e Questionário Social emocional. Cada escala é composta por diferentes números de itens, sendo alguns aplicados em situação de teste, mediante manobras, materiais específicos e tempo pré-determinado, e outros de observação acidental, realizadas espontaneamente pela criança durante a avaliação.

Critério de Inclusão:

- Crianças de zero a três anos com diagnóstico de paralisia cerebral firmado através de critérios clínicos de acordo com a Força-tarefa Internacional para Paralisia Cerebral em acompanhamento no serviço de reabilitação de instituição filantrópica especializada no atendimento de reabilitação para crianças e adolescentes com disfunções neurológicas em Belo Horizonte - MG;
- Concordância dos responsáveis em participar do estudo e assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE.

Critério de Exclusão:

Serão excluídas as crianças que apresentarem alguma das situações descritas abaixo:

- Diagnóstico de má-formação congênita, síndromes ou outras doenças associadas;
- Quadros infecciosos ou inflamatórios agudos no momento da coleta ou nos 15 dias que a antecederam;
- Uso atual ou nas 4 semanas anteriores à coleta de antibióticos, anti-inflamatórios ou corticoide.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

Avaliar a associação entre a resposta inflamatória, o quadro clínico da paralisia cerebral e as aquisições no desenvolvimento neuropsicomotor durante a intervenção de reabilitação em crianças com paralisia cerebral de zero a três anos de idade.

Objetivo Secundário:

- Mensurar a concentração de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos em crianças de zero a três anos de acordo com a classificação de paralisia cerebral.
- Avaliar possíveis associações entre perfil imuno-inflamatório e fatores neurotróficos;
- Relacionar o perfil dos mediadores imuno-inflamatórios e os fatores neurotróficos com as classificações de paralisia cerebral bem como com as aquisições no desenvolvimento neuropsicomotor.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Serão cumpridos Serão cumpridos os termos da Resolução 466/12, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde garantindo a preservação da identidade integridade dos participantes sem comprometimento à assistência prestada a criança. Não haverá ônus para os mesmos e os responsáveis que aceitem participar do estudo serão informados sobre o procedimento a ser realizado e deverão assinar o TCLE, podendo desistir quando quiserem. A coleta das amostras de sangue será realizada por profissionais graduados em enfermagem ou medicina, capacitados para tal procedimento, durante a rotina da reabilitação. Assim, os riscos da coleta de amostras de sangue dos participantes são mínimos, sendo os mesmos a que já estão sujeitos durante os exames de rotina. A aplicação da Bayley III não envolvem risco considerável para os participantes por se tratar de uma escala observacional e de movimentos eliciados, que é aplicada rotineiramente no serviço. O estudo será encaminhado para avaliação da Câmara do Departamento de Pediatria e do Comitê de Ética em Pesquisa da (COEP) da UFMG.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa poderão ser diretamente beneficiados por ter seu desenvolvimento acompanhado. Caso sejam detectadas qualquer anormalidade no desenvolvimento medidas preventivas serão tomadas a fim de garantir melhor conduta no cuidado clínico com o paciente.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As solicitações do COEP foram atendidas e estas foram as mudanças realizadas pela pesquisadora no TCLE:

“Objetivo: Este estudo irá avaliar o desenvolvimento e medir algumas substâncias que podem estar

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

no sangue de sua criança. Estas podem se associar à inflamação ou à proteção do sistema nervoso e podem ter relação com problemas do desenvolvimento do cérebro na primeira infância.”

“A escala de Bayley é um instrumento de avaliação internacional, que identifica alterações do desenvolvimento em várias áreas (como motora, linguagem, social, emocional, de adaptação). Ela é composta por vários itens, sendo alguns testados pelo pesquisador, em outros o comportamento da criança será observado, e algumas perguntas serão feitas diretamente a você. O tempo gasto varia para cada criança, de 30 a 90 minutos.”

“Estas amostras serão coletadas na AMR e enviadas para o laboratório na Faculdade de Medicina da UFMG, onde serão processadas e avaliadas em conjunto com as das outras crianças participantes. Como estes exames ainda estão em fase de pesquisa, estes resultados não serão liberados individualmente.”

“Rubrica do responsável: \_\_\_\_\_”

“Riscos: A avaliação do desenvolvimento vai ocupar algum tempo seu e de sua criança, mas você é livre para parar a qualquer momento, se vocês estiverem incomodados. A interrupção não vai influenciar os cuidados oferecidos ao seu filho. Se algum item ou pergunta causar desconforto, por favor, informe o pesquisador, que estará disponível para fornecer as informações que você precisar. Se não for possível continuar a avaliação, esta será remarcada para uma data posterior.

Benefícios: A avaliação detalhada do desenvolvimento, realizada através do questionário Bayley, trará informações importantes que podem auxiliar na identificação de áreas de melhora ou necessidades específicas de sua criança, e podem ser utilizadas pela equipe de reabilitação. Os resultados desta avaliação serão entregues a você após o teste pelo pesquisador, e suas dúvidas em relação a estes resultados poderão ser tiradas a qualquer momento. Em relação aos exames laboratoriais, como estas substâncias ainda estão em estudo, estes resultados só serão avaliados em conjunto com os das outras crianças, e não haverá entrega destes resultados. Mas eles poderão ajudar a avaliar e promover o desenvolvimento de outras crianças no futuro. Se percebermos uma alteração significativa para a saúde do seu filho, ele será encaminhado para uma avaliação pela equipe de saúde.”

“Contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida em relação aos aspectos éticos da pesquisa, você pode entrar em contato com o pesquisador Rafael Magalhães (celular 98455-1767) ou com a Comissão de Ética, no telefone 3409-4592, ou no endereço abaixo.”

“e recebi uma cópia desta autorização.”

“Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.”

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

"Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_"

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Presentes:

Projeto de Pesquisa na Plataforma Brasil; Projeto Completo de Pesquisa; Folha de Rosto Assinada pelo Diretor da Faculdade de Medicina; Parecer Consubstanciado Aprovado pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG; Carta de Anuência da Sociedade Mineira de Reabilitação; Carta de Anuência do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica; TCLE para Pais ou Responsáveis corrigido, carta resposta ao COEP-UFMG.

**Recomendações:**

Tendo em vista que a palavra "cópia" refere-se a um documento não original e que não detém, portanto, o mesmo valor legal do documento original, solicita-se sua substituição pela palavra "via" no TCLE, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012 itens IV.3.f e IV.5.d.

Solicita-se a obtenção da rubrica da pesquisadora junto à do responsável na primeira página do TCLE.

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Relação da resposta imuno-inflamatória com o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral na primeira infância " da Pesquisadora Responsável Profa. Dra. Janaina Matos Moreira.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.663.092

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_726328.pdf	20/07/2016 11:52:03		Aceito
Outros	Carta_resposta_ao_cep.pdf	14/07/2016 16:45:53	Janaina Matos Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	14/07/2016 16:22:56	Janaina Matos Moreira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada_FMUFGM.pdf	06/06/2016 16:48:55	Janaina Matos Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Lab_Interdisciplinar.pdf	30/05/2016 16:54:01	Janaina Matos Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_AMR.pdf	30/05/2016 16:52:48	Janaina Matos Moreira	Aceito
Outros	Parecer.pdf	25/05/2016 16:09:53	Janaina Matos Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/05/2016 15:54:16	Janaina Matos Moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_de_Pesquisa_Departamento_de_Pediatria_Plataforma_Brasil.pdf	25/05/2016 15:53:37	Janaina Matos Moreira	Aceito
Outros	56771316parecer.pdf	04/08/2016 12:06:03	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Outros	56771316aprovacao.pdf	04/08/2016 12:06:21	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 04 de Agosto de 2016

Assinado por:

**Telma Campos Medeiros Lorentz**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

## ANEXO III – CARTA DE ANUÊNCIA DA AMR



Belo Horizonte, 10 de maio de 2016.

### CARTA DE APOIO

A Associação Mineira de Reabilitação tem interesse em colaborar com o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação longitudinal da resposta imuno-inflamatória e do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral na primeira infância”, a ser desenvolvido pelo Terapeuta Ocupacional Rafael Coelho Magalhães, sob orientação da Profa Dra Ana Cristina Simões e Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais. Tal colaboração será feita no sentido de disponibilizar informações sobre as crianças de zero a três anos com paralisia cerebral que são atendidos na instituição e ceder espaço para a coleta de dados.

O pesquisador responsável entrará em contato com os pais das crianças e deverá explicar os objetivos da pesquisa e os procedimentos de coleta de dados no ato do convite para participação. Aqueles pais que tiverem interesse em participar voluntariamente do estudo deverão assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Reitero que qualquer procedimento relacionado a essa pesquisa somente deverá ter início **após** aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP). Informo ainda que a ata de aprovação do projeto no CEP deverá ser enviada ao Núcleo de Ensino e Pesquisa da AMR tão logo o projeto seja aprovado e brevemente ao início da pesquisa. Esperamos que as evidências a serem disponibilizadas possam acrescentar informações relevantes para o processo terapêutico disponibilizado a clientela atendida na AMR. Após a finalização deste estudo, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar os resultados encontrados para os profissionais interessados da AMR.

Atenciosamente,

*Dr. Leonardo Cury Abrahão*  
CRM-MG/32435  
ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

Leonardo Cury Abrahão  
Gerente Médico - AMR

*Priscilla Rezende Pereira Figueiredo*  
FISIOTERAPEUTA  
CREFITO - 4 / Nº 118932F

## ANEXO IV – FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



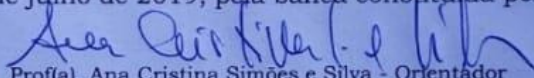
### FOLHA DE APROVAÇÃO

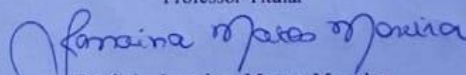
**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E DO DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR EM CRIANÇAS COM PARALISIA CEREBRAL**

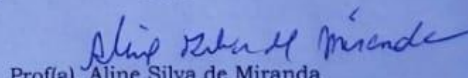
**RAFAEL COELHO MAGALHÃES**

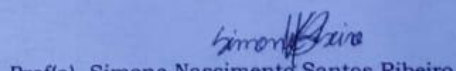
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

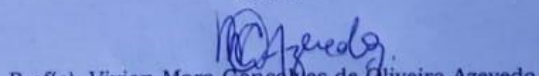
Aprovada em 12 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

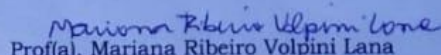
  
Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientador  
Professor Titular

  
Prof(a). Janaina Matos Moreira  
UFMG

  
Prof(a). Aline Silva de Miranda  
UFMG

  
Prof(a). Simone Nascimento Santos Ribeiro  
CMMG

  
Prof(a). Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo  
Universidade Federal de Uberlândia

  
Prof(a). Mariana Ribeiro Volpini Lana  
Associação Mineira de Reabilitação

Belo Horizonte, 12 de julho de 2019.

## APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para o responsável legal)

#### **“Relação da resposta imuno-inflamatória com o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral na primeira infância”**

Prezado, você e sua criança estão sendo convidados(as) a participar da pesquisa chamada **“Relação da resposta imuno-inflamatória com o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com paralisia cerebral na primeira infância”**. Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e entenda a explicação a seguir. Esta descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obtermos o seu consentimento.

**Objetivo:** Este estudo irá avaliar o desenvolvimento e medir algumas substâncias que podem estar no sangue de sua criança. Estas podem se associar à inflamação ou à proteção do sistema nervoso e podem ter relação com problemas do desenvolvimento do cérebro na primeira infância. Vocês foram convidados(as) a participar dessa pesquisa porque sua criança possui diagnóstico de paralisia cerebral, possui menos de três anos de idade, e está em acompanhamento na Associação Mineira de Reabilitação (AMR).

**Procedimentos:** Caso você aceite que sua criança participe deste estudo, serão feitos os seguintes procedimentos:

- Serão realizadas duas avaliações do desenvolvimento global de sua criança, através da avaliação Bayley III, com um intervalo de tempo de seis meses entre elas. A escala de Bayley é um instrumento de avaliação internacional, que identifica alterações do desenvolvimento em várias áreas (como motora, linguagem, social, emocional, de adaptação). Ela é composta por vários itens, sendo alguns testados pelo pesquisador, em outros o comportamento da criança será observado, e algumas perguntas serão feitas diretamente a você. O tempo gasto varia para cada criança, de 30 a 90 minutos.
- Serão coletadas amostras de 3 ml de sangue da veia de sua criança, em dois momentos, com intervalo de tempo de seis meses entre eles. Estas amostras servirão para tentar identificar possíveis substâncias que se modificam no sangue em crianças que sofreram

paralisia cerebral e sua possível relação com o seu desenvolvimento. Estas amostras serão coletadas na AMR e enviadas para o laboratório na faculdade de Medicina da UFMG, onde serão processadas e avaliadas em conjunto com as das outras crianças participantes. Como estes exames ainda estão em fase de pesquisa, estes resultados não serão liberados individualmente.

**Riscos:** A avaliação do desenvolvimento vai ocupar algum tempo seu e de sua criança, mas você é livre para parar a qualquer momento, se vocês estiverem incomodados. A interrupção não vai influenciar os cuidados oferecidos ao seu filho. Se algum item ou pergunta causar desconforto, por favor, informe o pesquisador, que estará disponível para fornecer as informações que você precisar. Se não for possível continuar a avaliação, esta será remarcada para uma data posterior. O procedimento de coleta de sangue pode, raramente, causar dor no local, formação de hematoma, infecção, lesão de uma artéria ou nervo. É importante ressaltar que esses riscos serão diminuídos pelo fato de as coletas serem realizadas por profissionais altamente capacitados, durante procedimentos programados para as crianças e com todos os cuidados necessários.

**Benefícios:** A avaliação detalhada do desenvolvimento, realizada através do questionário Bayley, trará informações importantes que podem auxiliar na identificação de áreas de melhora ou necessidades específicas de sua criança, e podem ser utilizadas pela equipe de reabilitação. Os resultados desta avaliação serão entregues a você após o teste pelo pesquisador, e suas dúvidas em relação a estes resultados poderão ser tiradas a qualquer momento. Em relação aos exames laboratoriais, como estas substâncias ainda estão em estudo, estes resultados só serão avaliados em conjunto com os das outras crianças, e não haverá entrega destes resultados. Mas eles poderão ajudar a avaliar e promover o desenvolvimento de outras crianças no futuro. Se percebermos uma alteração significativa para a saúde do seu filho, ele será encaminhado para uma avaliação pela equipe de saúde.

**Confidencialidade:** Os registros de participação neste estudo serão mantidos em segredo até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. O pesquisador e, em certas, circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que identificam seu filho. Após o estudo, os resultados serão divulgados apenas para fins científicos, mas qualquer publicação dos dados não o identificará.

**Desligamento:** Você tem o direito de recusar ou deixar de participar deste estudo, em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para você e/ou para sua criança, junto à Associação Mineira de Reabilitação. A participação no estudo não irá modificar o planejamento do acompanhamento de sua criança nesta unidade.

**Compensação:** Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

**Contato com a Comissão de Ética:** Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida em relação aos aspectos éticos da pesquisa, você pode entrar em contato com o pesquisador Rafael Magalhães (celular 98455-1767) ou com a Comissão de Ética, no telefone 3409-4592, ou no endereço abaixo.

**Consentimento:** Li e entendi as informações acima. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado por mim de livre vontade, indicando que meu filho poderá participar do estudo até que eu decida o contrário, e recebi uma via desta autorização.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**Assinatura do responsável:** \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Em caso de qualquer dúvida ou complicação, você poderá entrar em contato com os pesquisadores nos telefones informados a seguir.

**Pesquisadores responsáveis:**

Ana Cristina Simões e Silva – Médica: Fone: 3409-8073. Avenida Professor Alfredo Balena, 190/sala 281 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-100 – [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com)

Janaina Matos Moreira – Médica: Fone: 3409-8073. Avenida Professor Alfredo Balena, 190/sala 281 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-100 – [jajammoreira@gmail.com](mailto:jajammoreira@gmail.com)

Rafael Coelho Magalhães – Terapeuta Ocupacional – Fone: 3304-1312/98455-1767. Rua Professor Otávio Coelho de Magalhães, 111. Belo Horizonte – MG, 30210-300. E-mail: rafa\_to@hotmail.com

**COEP - Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG)** Fone: (31) 3409-4592; Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP 31270-901. E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)