

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**RAFAEL COELHO MAGALHÃES**

---

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO FATOR  
PREDITIVO DE ALTERAÇÕES NO  
DESENVOLVIMENTO MOTOR EM NEONATOS  
PRÉ-TERMOS DE 28 A 34 SEMANAS DE IDADE  
GESTACIONAL.**

---

**Belo Horizonte**

**2015**

**Rafael Coelho Magalhães**

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO FATOR  
PREDITIVO DE ALTERAÇÕES NO  
DESENVOLVIMENTO MOTOR EM NEONATOS  
PRÉ-TERMOS DE 28 A 34 SEMANAS DE IDADE  
GESTACIONAL.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Molecular da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Minas Gerais.**

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

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora  
Marques de Miranda.**

**Belo Horizonte**

**2015**

Magalhães, Rafael Coelho.

M188r Resposta inflamatória como fator preditivo de alterações no desenvolvimento motor em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional [manuscrito]: definição de caso prevalência. / Rafael Coelho Magalhães. - - Belo Horizonte: 2015.

70f.: il.

Orientador: Ana Cristina Simões e Silva.

Co-Orientador: Débora Marques de Miranda.

Área de concentração: Medicina Molecular.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Atividade Motora. 2. Inflamação. 3. Fatores de Crescimento Neural. 4. Citocinas. 5. Prematuro/crescimento & desenvolvimento. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Miranda, Débora Marques de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 103

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

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO FATOR PREDITIVO DE  
ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO MOTOR EM NEONATOS PRÉ-  
TERMOS DE 28 A 34 SEMANAS DE IDADE GESTACIONAL.**

**Rafael Coelho Magalhães**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre.

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>. Débora Marques de Miranda

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2015

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: Prof. Jairo Arturo Ramírez

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

Pró Reitor de Pós Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof<sup>a</sup>. Adelina Marta dos Reis

## **FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice Diretor: Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof<sup>a</sup>. Sandhi Maria Barreto

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.<sup>a</sup>. Ana Cristina Côrtes Gama

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof.<sup>a</sup>. Cláudia Regina Lindgren Alves

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

Coordenadora: Prof. Luíz Armando Cunha de Marco

## **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE:**

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

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

Prof. Marco Aurélio Romano Silva

Prof.<sup>a</sup>. Maria Marta Sarquis Soares

Aos meus pais, Roger e Íris, por me ensinarem o valor da educação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cristina Simões e Silva, por me introduzir no universo da pesquisa, pela amizade, presença, disponibilidade, ensinamentos e confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Débora Marques de Miranda, pelo apoio e disponibilidade.

À Érica Leandro Marciano Vieira pela grande colaboração na execução do trabalho, seu apoio constante e por fazer tudo ser mais leve.

À Izabela Guimarães Barbosa pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

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.

À Fernanda Gontijo e Lorena Filocre pela amizade, por serem sempre presentes e por toda ajuda oferecida nessa caminhada.

À equipe da Associação Mineira de Reabilitação, em especial as terapeutas ocupacionais Débora Bretz, Gabriela Melo e Vanessa Guerzoni por não medirem esforços para me ajudar.

Ao Hospital Sofia Feldman por abrir as portas para esse estudo e à sua equipe por serem fundamentais na minha coleta de dados.

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

## NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da presente dissertação foi organizada sob a forma de artigos científicos, de acordo com a resolução 03/2010, aprovada pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, disponível em [http://www.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude\\_crianca/arquivos/2010/Resolucao03-2010.pdf](http://www.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/arquivos/2010/Resolucao03-2010.pdf).

O primeiro artigo consiste em uma revisão da literatura, na qual são discutidos os principais aspectos, achados recentes e controvérsias sobre a correlação das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos com o desenvolvimento motor e cognitivo do recém-nascido pré-termo. O segundo artigo avalia os níveis plasmáticos e urinários de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos os correlacionado com o Teste do Desempenho Motor Infantil (TIMP).

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO REVISÃO

Tabela 1	Estudos que correlacionam marcadores inflamatórios com o desenvolvimento.....	29
Tabela 2	Estudos que correlacionam fatores neurotróficos com o desenvolvimento motor e/ou cognitivo.....	30

### ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1	Características clínicas dos sujeitos.....	38
Tabela 2	Avaliação das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos no plasma de recém-nascidos pré-termo em 4 diferentes tempos.....	39
Tabela 3	Evolução das proteínas inflamatórias nos 3 tempos de coleta da urina sem diferença significativa.....	42
Tabela 4	Resultados da CURVA ROC para os marcadores avaliados no plasma e urina.....	44
Tabela 5	Associação entre os mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos em recém-nascidos pré-termo.....	45
Tabela 6	Modelo de regressão logística multivariado do desenvolvimento neuropsicomotor e proteínas inflamatórias e fatores neurotróficos.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Diferença na concentração de IL-1 $\beta$ nos dois grupos em relação ao desenvolvimento motor.....	44
Gráfico 2 – Diferença na concentração de GDNF nos dois grupos em relação ao desenvolvimento motor.....	44

## **LISTA DE FIGURAS**

### **ARTIGO REVISÃO**

Figura 1 – Fluxograma da busca em base de dados.....18

### **ARTIGO ORIGINAL**

Figura 1 – Dosagem plasmática de citocinas e fator neurotrófico em recém nascidos pré-  
termos em quatro deferentes momentos. .... 38

Figura 2 – Dosagem plasmática de quimiocinas em recém nascidos pré-termos em  
quatro deferentes momentos. .... 39

Figura 3 – Dosagem urinária de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos em recém  
nascidos pré-termos em quatro deferentes momentos. .... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CBA	Cytometric Bead Array
CCL2/MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos – 1
CCL4/MIP- $\beta$	Proteína Inflamatória de Macrófagos
CCL5/RANTES	Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais
CCL9	Quimiocina de ligação CC 9
CCL10	Quimiocina de ligação CC 10
CCL13/MCP-4	Proteína Quimiotática de Monócitos – 4
CD50/ICAM-3	Molécula de Adesão Intercelular – 3
CD54/ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular – 1
CD62E/E-SEL	Selectina Endotelial
CD106/VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular – 1
COEP/CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CXCL8/IL-8	Interleucina 8
CXCL11/I-TAC	Quimiocina Alfa de Célula T Induzida por Interferon
CRP	Proteína C Reativa
DP	Desvio Padrão
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FM	Faculdade de Medicina
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais
HSF	Hospital Sofia Feldman
IG	Idade Gestacional
IGC	Idade Gestacional Corrigida
IGFBP-1	Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
MMP-1	Matriz Metaloproteinase – 1

MMP-9	Matriz Metaloproteinase – 9
MPO	Mieloperoxidase
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
PE	Pré-eclâmpsia
Q1 e Q3	Quartil 1 e 3 respectivamente
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido Pré-termo
SAA	Soro Amiloide A
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório
TIMP	Teste de Desempenho Motor Infantil
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-R1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral – 1
TNF-R2	Receptor do Fator de Necrose Tumoral – 2
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGF-R1/Flt-1	Receptor - 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGF-R2/KDR	Receptor – 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## SUMÁRIO

1	ARTIGO REVISÃO .....	12
2	ARTIGO ORIGINAL .....	29
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
	ANEXOS.....	55
	ANEXO 1 - PARECER DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA FM/UFMG.....	55
	ANEXO 2 – PARECER COEP/UFMG .....	57
	ANEXO 3 – PARECER CEP/HSF.....	61
	ANEXO 4 – ATA DE DEFESA .....	64
	APÊNDICE.....	66
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	66

## 1 ARTIGO REVISÃO

### **Moléculas inflamatórias como potenciais biomarcadores para alterações no desenvolvimento neuropsicomotor do pré-termo.**

Rafael Coelho Magalhães et al.

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

#### **Resumo:**

**Objetivo:** Reunir as evidências das alterações neuroinflamatórias e o desenvolvimento neuropsicomotor em pré-termos. **Método:** A partir das bases de dados PUBMED e BIREME, foi feita uma busca de artigos nas línguas inglesa, espanhola e portuguesa, no período de 1990 a abril de 2015, com combinação das palavras-chave “inflammation”, “cytokines”, “neurotrophic factors”, “motor development”, “cognitive development”, “preterm”, em humanos. Os artigos foram selecionados por dois revisores que analisaram as características, qualidade e acurácia dos estudos. **Resultados:** Foram identificados seis trabalhos que estudaram inflamação, o desenvolvimento motor e cognitivo em pré-termos. Os estudos avaliaram níveis circulantes de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos. As proteínas mais analisadas foram IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, IGFBP-1 e VEGF. Cinco estudos demonstraram que níveis plasmáticos de IL-6 apresenta correlação positiva com o atraso no desenvolvimento global. Dois estudos demonstraram que níveis plasmáticos de CXCL8/IL-8 apresentou correlação positiva com atraso motor e cognitivo; e um apontou que CCL5/RANTES é associada com melhor desfecho motor cognitivo. **Conclusões:** A inflamação no recém-nascido pré-termo está associada a alterações no desenvolvimento cognitivo e motor podendo ocasionar sequelas e limitações funcionais para toda vida.

## **1 -Introdução**

O parto prematuro caracteriza-se quando ocorre em idades gestacionais menores de 37 semanas <sup>1</sup>. Intercorre em até 12% de todos os nascimentos <sup>1</sup>, sendo que 40% dos recém-nascidos pré-terms apresentam risco elevado de mortalidade perinatal e outras complicações <sup>2-5</sup>. A lesão cerebral precoce é uma das principais complicações do período perinatal e também contribui para alterações neurodesenvolvimentais a longo prazo <sup>4-9</sup>. O nascido pré-termo enfrenta, além de problemas clínicos durante sua internação na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), experiências estressantes e dolorosas que podem contribuir para alterações neurodesenvolvimentais <sup>10</sup>.

### **1.2- Neurodesenvolvimento típico**

Durante a gestação, o meio ambiente intrauterino oferece estímulos graduais e progressivos, de forma a viabilizar o desenvolvimento neuropsicomotor <sup>10</sup>. O desenvolvimento intrauterino pode ser dividido em três fases: germinal, embrionária e fetal <sup>11</sup>.

A fase germinal é caracterizada pela fecundação do óvulo e implantação na parede uterina. Durante o período embrionário há o crescimento ordenado e diferenciado do embrião. Os folhetos germinativos diferenciam-se e tem início a formação de todas as estruturas do corpo. Ao término desse período, na oitava semana de gestação, as estruturas primárias do sistema nervoso estão estabelecidas, o tubo neural fechado e há formação sinapses e dos nervos periféricos <sup>11-13</sup>.

O período fetal corresponde desde a nona semana de gestação até o nascimento. Nesse período há o maior crescimento corporal e desenvolvimento do SNC <sup>11,14</sup>. A matriz germinal tem sua origem em torno de dez semanas de idade gestacional a partir de células endimárias. Trata-se de uma região com neuroblastos e glioblastos ricamente suprida de vasos capilares a partir dos quais as células migram durante o desenvolvimento do cérebro, permitindo a organização da arquitetura cerebral. A matriz germinal é uma porção frágil que se encontra em processo contínuo de involução até a 36ª semana de idade gestacional <sup>11</sup>. A hemorragia da matriz germinal constitui uma das principais afecções perinatais. Dentre as causas dessa afecção, pode-se elencar: (i) atividade fibrinolítica aumentada, (ii) pressão tissular diminuída e (iii) aumento ou diminuição do

fluxo sanguíneo com consequente reperfusão decorrente de asfixia perinatal <sup>13</sup>. A hemorragia da matriz germinal pode cursar com transtornos neurológicos permanentes incluindo paralisia cerebral e deficiência intelectual <sup>13</sup>.

O cérebro primitivo pode ser dividido em três principais componentes: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O prosencéfalo dá origem ao telencéfalo e ao diencéfalo. O mesencéfalo se diferencia posteriormente em ponte e cerebelo, e o rombencéfalo origina o metencéfalo e o mielencéfalo. O telencéfalo e o diencéfalo originam o cérebro; e o mielencéfalo origina o bulbo. As estruturas do SNC estão completamente formadas em torno da 15ª semana <sup>11,14</sup>. Com 19 semanas de idade gestacional as células do SNC se encontram-se em período de rápido crescimento, aprimoramento, maturação, refinamento de suas conexões e contínua plasticidade. Os eventos mais importantes nesse período constituem alinhamento e orientação dos neurônios, sinaptogênese, ramificações dendríticas e axonais, eliminação seletiva de algumas sinapses, proliferação e diferenciação glial <sup>11,14,15</sup>.

Ao final da gestação, o SNC está completamente formado com suas estruturas em plena atividade funcional. Após o nascimento, praticamente não há o surgimento de novas células neurais, porém a formação de sinapses permanece durante toda a vida, fato que permite o desenvolvimento gradual de habilidades <sup>14</sup>.

O desenvolvimento motor está diretamente ligado ao desenvolvimento do SNC. Os primeiros indícios de atividade motoras são percebidos por volta de cinco semanas de gestação e consistem em movimentos de extensão ou flexão do colo e da região torácica <sup>16</sup>. Há um desenvolvimento gradual e todos os padrões motores já estão presentes no início do segundo trimestre <sup>17</sup>. Há um contínuo processo de evolução e aperfeiçoamento de habilidades motoras tais como movimentar-se de forma mais refinada, perceber e reagir aos diferentes estímulos e realizar explorações no ambiente intrauterino <sup>14,17</sup>. No terceiro trimestre há crescimento corporal pronunciado e consequente diminuição do espaço livre para movimentação favorecendo o desenvolvimento da postura flexora do neonato <sup>17</sup>.

O desenvolvimento do SNC é sensível à qualidade e quantidade dos estímulos recebidos. O útero funciona como um filtro capaz de "graduar" esses estímulos, de forma a garantir o desenvolvimento encefálico adequado <sup>10,14</sup>. Cada fase do crescimento e desenvolvimento cerebral tem seu tempo e se sobrepõe à evolução da gestação <sup>16-18</sup>. Portanto, há evolução, organização, especialização graduais do SNC durante a gestação,

que permite a aquisição de novas habilidades e aprimoramento constante do desenvolvimento motor, sensorial e cognitivo <sup>14,17</sup>.

### **1.3. Neurodesenvolvimento na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN)**

A evolução do recém-nascido pré-termo diferencia-se da evolução do recém-nascido a termo em dois aspectos principais: seu padrão de crescimento e seu desenvolvimento pós-natal <sup>18</sup>. O parto pré-termo coincide com o período de maior crescimento e desenvolvimento do SNC <sup>15</sup>. Os estímulos que usualmente ocorreriam em ambiente intrauterino passam a ocorrer, associados a estímulos dolorosos e estressantes, em ambiente de UTIN, podendo interferir no processo de crescimento, ramificação, mielinização e formação de sinapses <sup>17,18</sup>. Há uma maior vulnerabilidade do SNC, podendo ocorrer alterações no volume da substância branca, substância cinzenta e cerebelo, afilamento do corpo caloso e atraso no desenvolvimento dos giros cerebrais, alterações eletrofisiológicas e hemorragia peri e intraventricular. Essas alterações podem interferir nas capacidades funcionais, motoras, sensoriais, cognitivas e comportamentais, causando déficits permanentes <sup>15,17-20</sup>. No comprometimento da função motora destacam-se déficit no planejamento motor, coordenação viso-motora, equilíbrio, alteração do tônus muscular e atraso do desenvolvimento neuromotor. Em relação às funções cognitivas são apontadas alterações de quociente de inteligência (QI), função cognitiva global, memória, atenção, dificuldades de aprendizagem, alterações de linguagem, formação de conceitos verbais e numéricos, além de dificuldades no pensamento lógico e associativo. Podem ocorrer redução na capacidade de síntese, escassez de organização perceptiva e orientação espacial. Esses déficits podem interferir nas atividades de vida diária e no desenvolvimento escolar/acadêmico e impactar na aquisição de independência e autonomia <sup>15</sup>.

O avanço tecnológico e científico em neonatologia favoreceu o aumento da sobrevivência dos recém-nascidos pré-termos mesmo em idades gestacionais cada vez menores <sup>18,20</sup>. Apesar de nas últimas décadas haver um aumento na sobrevivência dos recém-nascidos pré-termos, esta não tem sido acompanhada de redução do atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e de melhoria no prognóstico das alterações comportamentais <sup>13,15</sup>.

#### **1.4- Relação entre as moléculas inflamatórias e fatores neurotróficos com a injúria cerebral**

A neuroinflamação é um dos principais fatores elencados como contribuinte para as alterações neurodesenvolvimentais em pré-termos <sup>15</sup>. A melhor compreensão das diferentes fases da neuroinflamação pode auxiliar na identificação de potenciais riscos para atraso no neurodesenvolvimento.

As principais hipóteses acerca da etiologia do atraso no neurodesenvolvimento em pré-termos envolvem uma maior inflamação sistêmica, presença de hipóxia e/ou isquemia cerebral. Há aumento da liberação de citocinas inflamatórias e de radicais livres, ocasionando dano à substância cerebral branca com astrogliose e perda de oligodendrócitos <sup>8,17-20</sup>. A inflamação resulta na alteração da proliferação e diferenciação celular e aumento de morte celular, ocasionando distúrbios sensoriais, limitações cognitivas, convulsões e paralisia cerebral <sup>6,9</sup>.

Os principais mecanismos pelos quais a inflamação se relaciona a intensificação da lesão cerebral precoce são: (i) diminuição do fluxo sanguíneo cerebral e redução do aporte de oxigênio e de glicose; (ii) ruptura da barreira hemato encefálica; (iii) aumento do acesso de moléculas inflamatórias, leucócitos e monócitos ao SNC; (iv) aumento da produção e liberação de citocinas e quimiocinas no parênquima cerebral; (v) falha nos mecanismos de produção de energia com disfunção mitocondrial; (vi) maior influxo de cálcio, liberação de neurotoxinas, formação de radicais livres de oxigênio e óxido nítrico; (viii) edema cerebral. Todos esses mecanismos estão associados a apoptose neuronal e de células da glia <sup>21,22</sup>.

Para melhor compreensão da associação entre mediadores inflamatórios, fatores neurotróficos e alterações do desenvolvimento motor e cognitivo realizamos uma revisão sistemática com o objetivo de reunir as evidências da relação entre as alterações inflamatórias e o desenvolvimento neuropsicomotor em pré-termos.

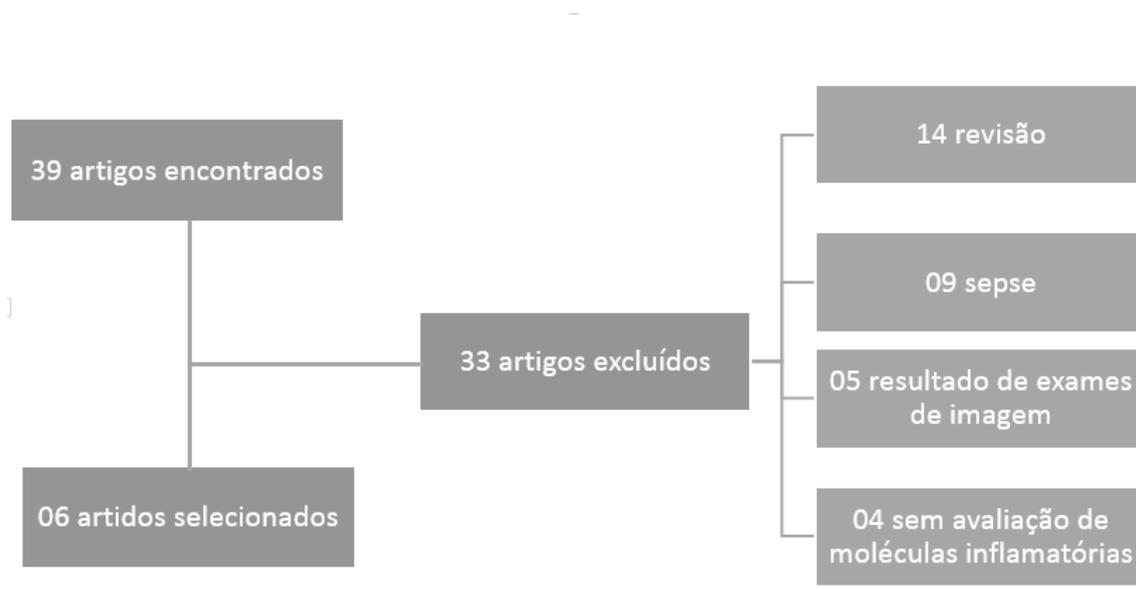
## 2- Método

A partir das bases de dados PUBMED e BIREME, foi feita uma busca dos artigos nas línguas inglesa, espanhola e portuguesa, no período de 1990 a julho de 2015, com combinação das palavras-chave “inflammation” OR “cytokines”, OR “neurotrophic factors” AND “motor development” AND “cognitive development” AND “preterm”, em humanos. Os artigos foram selecionados por dois revisores que analisaram as características, qualidade e acurácia dos estudos.

## 3- Resultados

Foram encontrados 39 artigos. Após a leitura dos resumos 33 artigos foram excluídos por não atenderem o critério da revisão. Nove estudos correlacionaram a presença de sepse com atraso no neurodesenvolvimento. Cinco estudos avaliaram os achados em imagens de ressonância nuclear magnética com o desenvolvimento motor e cognitivo, mas sem correlacioná-los com moléculas inflamatórias. Quatro estudos não incluíram a avaliação de moléculas inflamatórias, tendo o primeiro deles avaliado tratamento dentário materno com o desenvolvimento infantil, o segundo avaliou o desenvolvimento motor e cognitivo em recém-nascidos pré-termo com enterocolite necrotizante; o terceiro avaliou a reposição de ferro na nutrição neonatal e o quarto avaliou os efeitos cirúrgicos em prevenção de dilatação ventricular). Quinze estudos eram de revisão de literatura. Seis estudos originais foram elegíveis para essa revisão.

Figura 1 – Fluxograma da busca em base de dados



Dentre os estudos originais elegíveis para essa revisão apenas um trabalho incluiu grupo controle <sup>23</sup>. Os demais caracterizam-se por possuírem apenas um grupo, no qual foram avaliadas moléculas relacionadas com a inflamação medidas um, oito, quinze ou trinta dias após o nascimento <sup>24-28</sup>. A avaliação de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos foi realizada por sangue coletado em papel filtro ou plasma. Em todos os estudos a coleta de material biológico para mensuração dos marcadores inflamatórios não foram simultâneas à avaliação do desenvolvimento motor e cognitivo. O protocolo de cada estudo difere em relação a idade gestacional corrigida (IGC) para a avaliação do desenvolvimento, sendo realizada uma única vez em um dos seguintes tempos: 18, 24 ou 36 meses de IGC. Difere também pela escolha dos testes de desenvolvimento utilizados para mensurar as habilidades motoras e cognitivas das crianças, sendo eles a escala de Bayley II <sup>23,24-26</sup> ou a escala de Britânica de Habilidade <sup>28</sup> ou a escala de Kyoto <sup>27</sup>.

Um dos estudos citados avaliou a variação genética da região promotora do gene que codifica Interleucina (IL)-6 (posição 174 genótipo CC) <sup>28</sup>. Tal estudo mostrou que os recém-nascidos que apresentaram o referido polimorfismo produziam maiores quantidades de IL-6. No entanto, a produção aumentada dessa citocina não se correlacionou com o atraso cognitivo, mas associou-se à lesão cerebral caracterizada por redução de substância branca <sup>28</sup>.

Quatro dos estudos avaliaram moléculas relacionadas à resposta imune em sangue total ou plasma (tabela 1) <sup>24-27</sup>. Todos os quatro estudos mensuraram os níveis circulantes de IL-6. Desses, dois estudos demonstraram que maiores concentrações de IL-6 estão associadas a pior desenvolvimento motor <sup>24,27</sup>. Por outro lado, os outros dois correlacionaram maiores concentrações de IL-6 com desenvolvimento global usual <sup>25,26</sup>.

Quatro trabalhos avaliaram concentrações circulantes de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) <sup>24-27</sup>. Desses, três verificaram que maiores concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF correlacionam com atraso no desenvolvimento motor e cognitivo <sup>24,25,27</sup>. Em contrapartida, um deles não detectou correlações entre as concentrações de IL-10, TNF, IL-12p70 e desenvolvimento global <sup>27</sup>.

Quatro estudos avaliaram a relação das quimiocinas (CL, CXCL) com o desenvolvimento motor e cognitivo <sup>24-27</sup>. Dois estudos mostraram que a maior concentração de CXCL8/IL-

8 correlacionou-se tanto com atraso no desenvolvimento motor <sup>27</sup> quanto cognitivo <sup>25-27</sup>. Outro estudo detectou correlação positiva de CCL4/MIP- $\beta$  com o atraso no desenvolvimento cognitivo <sup>25</sup>. Foi relatada correlação negativa entre as concentrações da quimiocina CCL5/RANTES e o atraso no desenvolvimento motor e cognitivo <sup>27</sup>. Esses autores sugeriram que a maior concentração de CCL5/RANTES possa favorecer a maturação e desenvolvimento neurológico, tendo em vista que os recém-nascidos com níveis mais elevados dessa quimiocina apresentaram desenvolvimento motor e cognitivo adequado para a faixa etária segundo a escala Bayley II <sup>27</sup>.

Quatro estudos correlacionaram os níveis dos fatores tróficos e neurotróficos com o desenvolvimento motor e cognitivo (tabela 2) <sup>23,24-26</sup>. Desses estudos três avaliaram o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), o Receptor - 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1), o Receptor - 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R2) e a Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGFBP-1) <sup>24-26</sup>. Um estudo apontou que a maior concentração de VEGF-R2 correlacionou positivamente com atraso cognitivo e a maior concentração de IGFBP-1 correlacionou negativamente com atraso motor <sup>24</sup>. Um estudo demonstrou que níveis elevados de IGFBP-1 apresentaram correlação positiva com atraso motor e cognitivo <sup>25</sup>. Um correlacionou a maior concentração de VEGF com ausência de comprometimento motor e cognitivo <sup>26</sup>. Os autores que estudaram Darbepoetina e Eritropoietina demonstraram correlação negativa com o atraso no desenvolvimento cognitivo <sup>23</sup>.

## 6- Discussão

Todos os artigos originais incluídos nessa revisão mensuraram níveis periféricos de citocinas, quimiocinas e fatores tróficos e neurotróficos. Há concordância sobre a possível relação da inflamação com a lesão endotelial da substância branca, mas em relação as alterações no desenvolvimento motor e cognitivo ainda há controvérsia em relação a associação dessas moléculas com tal desfecho.

Os artigos apontam que maiores concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 e CXCL8/IL-8 correlacionam positivamente com pior desfecho motor e cognitivo. Esse achado é corroborado por outros referenciais teóricos, os quais descrevem que a maior liberação e concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8 e INF

no parênquima cerebral ocasiona lesão endotelial na substância branca, favorecendo o aumento de apoptose neuronal e de células gliais. Há interferência com o crescimento dos axônios e na formação da bainha de mielina<sup>29-32</sup>. Dessa forma, podem ocorrer problemas na migração neuronal e na divisão, organização e desenvolvimento de sinapses, resultando na lesão cerebral precoce com alterações no neurodesenvolvimento<sup>33,34</sup>.

De forma geral, a maior concentração de citocinas pró-inflamatórias correlaciona-se com atrasos no desenvolvimento motor e cognitivo da criança pré-termo. A maior concentração de TNF e IL-6 tem correlação positiva com atraso cognitivo e motor, respectivamente, conforme mostraram as mensurações obtidas em testes de desenvolvimento como o Bayley<sup>24</sup>. Níveis elevados de CCL5/RANTES e VEGF circulantes podem também estar associados a menor risco de alteração no desenvolvimento, por também desempenharem ação protetora durante a inflamação<sup>26</sup>. IL-6 parece desempenhar um papel duplo, pois correlaciona com atraso no desenvolvimento motor e cognitivo, mas sua maior concentração favorece a liberação de fatores neurotróficos e, assim, favorece a recuperação nervosa<sup>35,36</sup>.

O aumento de citocinas inflamatórias desencadeia o aumento da concentração de fatores neurotróficos no tecido cerebral e induzem uma resposta anti-inflamatória secundária a esse processo<sup>37-40</sup>. Essa resposta fundamenta-se em mecanismos de *feedback* negativos que reduzem a progressão da inflamação e "protegem" o SNC de uma lesão de maior intensidade<sup>41,42</sup>. A neuroproteção também está relacionada ao aumento da liberação e concentração de fatores neurotróficos como NGF, BDNF e GDNF, reduzindo apoptose neuronal e de células da glia<sup>38,41,42</sup>. Entretanto, nessa revisão não foram encontrados trabalhos que estudassem os fatores supracitados. Houve correlação de VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGFBP-1 com o desenvolvimento motor e cognitivo, sendo que alguns estudos correlacionaram os fatores neurotróficos com pior desfecho motor e cognitivo no pré-termo, com exceção de VEGF<sup>29-31</sup>.

## **6- Considerações Finais**

Essa revisão demonstrou que inflamação sistêmica no RNPT está relacionada à lesão cerebral precoce e pode promover alterações no neurodesenvolvimento a longo prazo.

O aumento de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF e da quimiocina CXCL8/IL-8 estão intimamente ligadas ao pior desfecho motor e cognitivo. Em contrapartida a quimiocina

CCL5/RANTES correlaciona-se positivamente com melhor desenvolvimento motor e cognitivo.

A associação das moléculas inflamatórias e fatores neurotróficos com o desenvolvimento motor e cognitivo ainda precisa ser mais bem estudada de forma a viabilizar melhor compreensão da acerca do impacto desse processo no neurodesenvolvimento do RNPT.

## 6- Referências:

- 1- OMS: Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>
- 2- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; CHOU, D.; OESTERGAARD, M.; SAY, L.; MOLLER, A.; KINNEY, M.; LAWN, J. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, v.10, n.1, 2013.
- 3- HOWSN, C.P.; KINNEY, M.V.; McDOUGALL, L.; LAWN, J.E. Born too soon: preterm birth matters. *Reproductive Health*, v.10, n.1, 2013.
- 4- SELIP, D.B.; JANTIZIE, L.L.; CHANG, M.; FITZGERALD, E.C.; BOLL G.; MURPHY, A.; JENSEN, F.E. Regional differences in susceptibility to hypoxic-ischemic injury in the preterm brain: exploring the spectrum from white matter loss to selective grey matter injury in a rat model. *Neurol ResT Int*, v.7, n.2, p.51-84, 2012.
- 5- RISSO, F.M.; SANNIA, A.; GAVILANES, D.A.W.; VLES, H.J.; COLIVICCHI, M.; RICOTTI, A.; VOLTIG.L.; GAZZOLO, D. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v.25, n.4, p. 101-104, 2012.
- 6- WOODWARD, L.J.; EDJIN, J.O.; THOMPSON, D.; INDER, T.E. Object working memory deficits predicted by early brain injury and development in the preterm infant. *Brain*, v.12, n.8, p. 2578-2587, 2005.
- 7- HOLSTI, L.; GRUNAU, R.V.; WHITFIELD, M.F. Development coordination disorder in extremely low birth weight children at nine years. *Journal of Development Behavior Pediatric*, v.2, n.3, p.9-15, 2002.
- 8- BERGER, I.; PRELEG, O.; OFEK-SHLOMAI, N. Inflammation and early brain injury in term and preterm infants. *The Israel Medical Association Journal*, v.14, p.318-323, 2012.
- 9- TARDIEU, M. Brain development and the immune system: an introduction to inflammatory and infectious disease of the child's brain. *Handbook of Clinical Neurology*, v.112, n.3, p.1087-1089, 2013.
- 10- RYSAVY, M.A.; LI, L.; DAS, A.; HINTZ, S.R.; STOLL, B.J.; VOHR, B.R.; CARLO, W.A.; SHANKARAN, S.; WALSH, M.C.; TYSON, J.E.; COTTEN, C.M.; SMITH, P.B.; MURRAY, J.C.; COLAIZY, T.T.; BRUNBAUG, J.E.; HIGGINS, R.D.

Between-hospital variation in treatment and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med*, n. 372, v.19, 2015

11- SARNAT, H.B.; FLORES-SARNT, L. Neuroembriology and brain malformations. *Handb Clin neurol.*, 2013, 111:117-28.

12- COPP, A.J.; GREENE, N.D.E. Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic process. *Ver Dev Biol.*, 2013, 2(2): 213-227.

13- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview structure, regulation, and clinical implications. *Neurology of Science*, v.16, p. 1-13, 2004.

14- FILHO, H.A.G.; JÚNIOR, E.A.; JÚNIOR, C.F.M.; NARDOZZA, L.M.M.; MORON, A.F. *Rev Assoc Med bras.*, v.59, n. 5, 2013.

15- ZOMIGNANI, A.P.; ZAMBELLI, H.J.L.; ANTONIO, M.A.R.G.M. Desenvolvimento cerebral em recém-nascidos prematuros. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 27, n. 2, p. 198-203, 2009.

16- HENTGES, C.R.; SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S.; CARVALHO, C.G.; FILIPOUSKI, G.R.; FUENTEFRIA, R.N.; MARQUEZOTTI, F.; TERRAZAN, A.C. Association of late-onset neonatal sepsis with late neurodevelopment in the first two years of life of preterm infants with very low birth weight. *Jornal de Pediatria*, v. 90, n.1, p.50-57, 2014.

17- STEWART, A.; TEKES, A.; HUISMAN, T.A.G.M.; JENNINGS, J.M.; ALLEN, M.C.; NORTHINGTON, F.J.; EVERETT, A.D.; GRAHAM, E.M. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.209, n.1, p.1010-1016, 2013.

18- MOLNÁR, Z.; RUTHERFORD, M. Brain Maturation after preterm birth. *Science Translational Medicine*, v. 5, n. 168, 2013.

19- VINALL, J.; GRUNAU, R.E. Impact of repeated procedural pain-related stress in infants born very preterm. *Pediatrics Research*, v. 75, n. 5, p. 584-587, 2014.

20- STEPHENS, B.E.; VOHR, B.R. Neurodevelopment outcome of premature infant. *Pediatrics Clinic of North America*, v. 56, n. 3, p. 631-646, 2009.

21- VASCONCELOS, A.R.; YSHII, L.M.; VIEL, T.A.; BUCK, H.S.; MATTSON, M.P.; SCAVONE, C.; KAWAMOTO, E.M. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-

induced neuroinflammation and memory impairment. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 85, 2014.

22- WIKSTRÖM, S.; LEY, D.; HANSEN-PUPP, I.; ROSÉN, I.; HELLSTRÖM-WESTAS. Early amplitude-integrated EEG correlates with cord TNF- $\alpha$  and brain injury in very preterm infants. *Acta Paediatrica*, v.97, n.7, p. 915-919, 2008.

23- - OHLS, R.K.; KAMATH-RAYNE, B.D.; CHRISTENSEN, R.D.; WIEDMIER, S.E.; ROSEMBERG, A.; FULLER, J.; LACY, C.B.; ROOHI, B.; LAMBERT, D.K.; BURNETT, J.J.; PRUCKLER, B.; PECENY, H.; CANNON, D.C.; LOWE, J.R. Cognitive outcomes of preterm infants randomized to darbepoetin, erythropoietin, or placebo. *Pediatrics*, v. 133, n.6, p. 1023-1030, 2014.

24- KORSENIIEWSKI, S.J.; SOTO-RIVERA, C.L.; FICHOROVA, R.N.; ALLRED, E.; KUBAN, K.C.K.; O'SHEA, T.M.; PANETH, N.; AGUS, M.; DAMMANN, O.; LEVITON, A. Are preterm newborns who have relative hyperthyrotropinemia at increased risk of brain damage? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v. 27, n. 0, p. 1077-1088, 2014.

25- O'SHEA, T.M.; SHAH, B.; ALLRED, E.; FICHOROVA, R.N.; KUBAN, K.C.K.; DAMMANN, O.; LEVITON, A. Inflammation-initiating illnesses, inflammation-related proteins, and cognitive impairment in extremely preterm infants. *Brain Behavior and Immunity*, v. 29, p. 104-112, 2013.

26- O'SHEA, T.M.; ALLRED, E.; KUBAN, K.C.K.; DAMMANN, O.; PANETH, N.; FICHOROVA, R.; HIRTZ, D.; LEVITON, A. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at two years in extremely preterm infants. *Journal of Pediatrics*, v.160, n. 3, p. 395-401, 2012.

27- 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 Human Development*, v. 87, n. 6, p. 439-443, 2011.

28- HARDING, D.R.; DHAMRAIT, S.; WHITELAW, A.; HUMPHRIES, S.E.; MARLOW, N.; MONTGOMERY, H.E. Does Interleukin-6 Genotype Influence Cerebral Injury or Developmental Progress After Preterm Birth? *Pediatrics*, v. 114, n. 4, p. 941-947, 2004.

29- JENSTER, M.; BONIFACIO, S.L.; RUEL, T.; ROGERS, E.E.; TAM, E.W.; PARTRIDGE, J.C.; BARKOVICH, A.J.; FERRIERO, D.M.; GLASS, H.C. maternal or

neonatal infection: association with neonatal encephalopathy outcomes. *Pediatric research*, v.76, n. 1, p. 93-99, 2014.

30- FERREIRA, R.C.; MELLO, R.R.; SILVA, K.S. Neonatal sepsis as a risk for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. *Jornal de Pediatria*, v. 90, n. 3, p. 293-299, 2014.

31- BURD, I.; BALAKRISHNAN, B.; KANNAN, S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 67, p. 287-295, 2012.

32- GUO, R.; HOU, W.; DONG, Y.; YU, Z.; STITES, J.; WEINER, C.P. Brain injury caused by chronic fetal hypoxemia is mediate by inflammatory cascade activation. *Reproductive Science*, v. 17, n. 6, p. 540-548, 2010.

33- JENSTER, M.; BONIFACIO, S.L.; RUEL, T.; ROGERS, E.E.; TAM, E.W.; PARTRIDGE, J.C.; BARCOVICH, A.J.; FERREIRO, D.M.; GLASS, H.C. Maternal or neonatal infection: association with neonatal encephalopathy outcomes. *Pediatrics Research*, v. 76, n. 1, p. 93-99, 2014.

34- MALEB, S.; DAMMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *Journal of Child Neurology*, v. 24, n. 9, p. 1119-1126, 2009.

35- BURD, I.; BALAKRISHNAN, B.; KANNAN, S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *American journal of Reproductive Immunology*, v. 67, p. 287-295, 2012.

36- SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v.29, p. 464-479, 2009.

37- JAEGER, H.M.; PEHLKE, J.R.; KALTWASSER, B.; KILIC, E.; BÄHR, M.; HERMANN, D.M.; DOEPPNER, T.R. The indirect NMDAR inhibitor flupirtine induces sustained post-ischemic recovery, neuroprotection and angioneurogenesis. *Oncotarget*, v. 6, n. 16, p. 14033-14044, 2015

38- PAJENDA, G.; HERCKER, D.; ÁRTON, G.; PAJER, K.; FEICHTINGER, G.A.; MALÉTH, J.; REDL, H.; NÓGRÁDI, A. Spatiotemporally limited BDNF and GDNF over expression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth. *Experimental neurology*, v. 261, p. 367-376, 2014.

- 39- PAPPAS, A.; KENDRICK, D.E.; SHANKARAN, S.; STOLL, B.J.; BELL, E.F.; LAPTOOK, A.R.; WALSH, M.C.; DAS, A.; HALE, E.C.; NEWMAN, N.S.; HIGGINS, R.D. Chorioamnionitis and Early Childhood Outcomes among Extremely Low-Gestational-Age Neonates. *JAMA Pediatrics*, v.168, n.2, p. 137-147, 2014.
- 40-ADÉN, U.; FAVRAIS, G.; PLAISANT, F. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNF-alpha pathway and protection by etanercept. *Brain Behavior and Immunity*, v.24, n.1, p.747-758, 2010.
- 41- KINGHAM, P.J.; KOLAR, M.K.; NOVIKOVA, L.N.; NOVIKOV, L.N.; WIBERG, M. Stimulating the neurotrophic and antigenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells and Development*, v.23, n.7, p. 741-754, 2014.
- 42- HENTGES, C.R.; SILVEIRA, R.C.; PONCIANOY, R.S.; CARVALHO, C.G.; FILIPOUSKI, G.R.; FUENTEFRIA, R.N.; MARQUEZOTTI, F.; TERRAZAN, A.C. Association of late-onset neonatal sepsis with late neurodevelopment in the first two years of life of preterm infants with very low birth weight. *Jornal de Pediatria*, v. 90, n. 1, p. 50-57, 2014
- 43- GIRARD, S.; KADHIM, H.; ROU, M.; LAVOIE, K.; BROUCHU, M.E.; LAROCHE, A.SÉBIRRE, G. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatric Neurology*, v.40, n.3, p.168-174, 2009.

Tabela 1- Estudos que correlacionam marcadores inflamatórios com o desenvolvimento motor e/ou cognitivo.

<b>Autor</b>	<b>IG (semanas)</b>	<b>Sujeitos/ Controles</b>	<b>Material analisado</b>	<b>Método Laboratorial</b>	<b>Marcadores inflamatórios</b>	<b>Atraso motor</b>	<b>Atraso cognitivo</b>
Korseniewski et al, 2014 <sup>24</sup>	≤ 28	939/ -	Sangue total	MSD Multiplex	IL-1β, IL-6, IL-6R, TNF, TNF-R1, TNF-R2, CXCL8, CCL2, CCL13, CCL4, CCL5, CXCL11, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-SEL, MMP-1, MMP-9, CRP, SAA, MPO	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de CRP, SAA, IL-6, TNF e correlação negativa de CCL5 e IL-6R *	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de IL-1β, TNF, VCAM-1, E-SEL e correlação negativa de CCL5 e IL-6R *
O'Shea et al 2013 <sup>25</sup>	≤ 28	800/ -	Sangue total	MSD Multiplex	IL-1β, IL-6, IL-6R, TNF, TNF-R1, TNF-R2, CXCL8, CCL2, CCL13, CCL4, CCL5, CXCL11, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-SEL, MMP-1, MMP-9, CRP, SAA, MPO	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de CRP, SAA, IL-6, TNF, CXCL8, MIP-1β, ICAM-1, E-SEL e correlação negativa de CCL5 e IL-6R *	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de CRP, SAA, IL-6, TNF, CXCL8, CCL4, ICAM-1, E-SEL e correlação negativa de CCL5 e IL-6R *
O'Shea et al, 2012 <sup>26</sup>	≤ 28	939/ -	Sangue total	MSD Multiplex	IL-1β, IL-6, IL-6R, TNF, TNF-R1, TNF-R2, CXCL8, CCL2, CCL13, CCL4, CCL5, CXCL11, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-SEL, MMP-1, MMP-9, CRP, SAA, MPO	Correlação positiva com escore da escala BDI II dos níveis de CCL5, IL-6. Sem correlação de IL-6R *	Correlação positiva com escore da escala BDI II dos níveis de CCL5, IL-6. Sem correlação de IL-6R *
Kinjo et al, 2011 <sup>27</sup>	24-32	29/ -	Plasma	CBA	CXCL8, CCL9, CCL10, CCL2, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70.	Correlação negativa com escore da escala KDP dos níveis de CXCL8, IL-1β, IL-6, CCL2. IL-10, TNF, IL-12p70 não se correlacionaram com o desenvolvimento **	Correlação negativa com escore da escala KDP dos níveis de CXCL8, IL-1β e IL-6. IL-10, TNF, IL-12p70 não se correlacionaram com o desenvolvimento **

**IG:** Idade Gestacional; **CBA:** Cytometric Bead Array; **PCR:** Reação em Cadeia Polimerase; **IL:** Interleucina; **IL-6R:** Receptor de Interleucina 6; **CRP:** Proteína C Reativa; **SEL:** Selectina; **ICAM:** Molécula de Adesão Intercelular ; **CCL / CXCL:** Quimiocinas ; **SAA:** Soro Amiloide A; **TNF:** Fator de Necrose Tumoral; **TNF-R1:** Receptor do Fator de Necrose Tumoral.

**\*BDI II:** Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil II: atraso se pontuação < 55. **\*\*KDP:** Escala Kyoto de Desenvolvimento Psicológico: atraso se pontuação < 85.

Tabela 2 - Estudos que correlacionam fatores neurotróficos com o desenvolvimento motor e/ou cognitivo.

<b>Autor</b>	<b>IG (semanas)</b>	<b>Pacientes/C ontroles</b>	<b>Material Analisado</b>	<b>Método laboratorial</b>	<b>Neurotrofinas analisadas</b>	<b>Atraso motor</b>	<b>Atraso cognitivo</b>
Korseniewski et al, 2014 <sup>24</sup>	≤ 28	939/ -	Sangue total	MSD Multiplex	VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGFBP-1.	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de IGFBP *	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de VEGF-R2 *
Ohls et al, 2014 <sup>23</sup>	≤ 30	22/22	Plasma	ELISA	Darbepoetina, Eritropoietina	-	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de Darbepoetina e Eritropoietina *
O'Shea et al 2013 <sup>25</sup>	≤ 28	800/ -	Sangue total	MSD Multiplex	VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGFBP-1.	Correlação negativa com escore da escala BDI II dos níveis de IGFBP-1 *	Correlação negativa dos níveis de IGFBP-1 *
O'Shea et al, 2012 <sup>26</sup>	≤ 28	939/ -	Sangue total	MSD Multiplex	VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGFBP-1.	Correlação positiva com escore da escala BDI II dos níveis de VEGF *	Correlação positiva com escore da escala BDI II dos níveis de VEGF *

IG: Idade Gestacional; **ELISA**: Imunoensaio Enzimático **IGFBP-1**: Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina; **VEGF**: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; **VEGF-R1/Flt-1**: Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular- 1; **VEGF-R2/KDR**: Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular- 2.

\* **BDI II**: Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil II: atraso se pontuação < 55.

## 2 ARTIGO ORIGINAL

### Níveis urinários de IL-1 $\beta$ e GDNF como preditores de alterações do desenvolvimento motor em neonatos pré-termo

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

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

#### Resumo:

**Objetivo:** Avaliar a associação entre marcadores de inflamação, fatores neurotróficos, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor. **Métodos:** Foram analisados os níveis plasmáticos e urinários de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70), quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG) e fatores neurotróficos (BDNF e GDNF) em 40 neonatos pré-termos de 28 a 32 semanas incompletas de idade gestacional em quatro momentos distintos: (i) ao nascimento - sangue de cordão umbilical, (ii) com 48 horas, (iii) com 72 horas e (iv) com 3 semanas após o nascimento. Os resultados foram correlacionados com o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP). **Resultados:** As variáveis gênero, APGAR 5', e os níveis urinários de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-12p70 e GDNF tiveram diferença significativa entre os neonatos com desenvolvimento motor típico e abaixo do esperado. A maior concentração dessas moléculas inflamatórias, o sexo masculino e notas mais baixas no APGAR de 5' apresentaram associação significativa com desenvolvimento motor abaixo do esperado. Para a população estudada, IL-1 $\beta$  é um preditor independente para alteração no desenvolvimento motor, uma vez que os recém-nascidos com maior concentração urinária dessa citocina apresentaram o resultado do TIMP abaixo do esperado. Por outro lado, concentrações urinárias aumentadas de GDNF associaram com melhores resultados no TIMP, sugerindo um papel protetor para este fator neurotrófico. **Conclusões:** Os resultados desse estudo sugerem que o perfil de moléculas inflamatórias e fatores neurotróficos podem se associar ao desenvolvimento motor de recém-nascidos pré-termos.

## 1- Introdução

O parto prematuro é definido quando ocorre em idade gestacional menor que 37 semanas<sup>1</sup>. Pode ser classificado como moderado ou tardio (33-36 semanas), precoce (28-32 semanas) ou extremo (abaixo de 28 semanas) de acordo com a idade gestacional ao nascimento<sup>1</sup>. Todavia os partos que ocorrem em idades gestacionais mais precoces são responsáveis por maior mortalidade e morbidade<sup>2-5</sup>.

O processo inflamatório é um dos fatores que pode ocorrer no trabalho de parto prematuro e na hipóxia<sup>3</sup>. Esse processo pode resultar em lesão cerebral precoce, que é uma das principais complicações do período perinatal e fator potencial para as alterações no desenvolvimento neuropsicomotor a longo prazo<sup>6-8</sup>.

O cérebro nos períodos fetal e neonatal possui sensibilidade acentuada à inflamação<sup>8,10,11</sup>. Na maioria dos recém-nascidos, a resposta inflamatória exacerbada resulta na morte celular no tecido nervoso, causando lesões cerebrais que podem determinar, em longo prazo, paralisia cerebral, convulsões, distúrbios sensoriais e limitações cognitivas<sup>2,7,9</sup>. Recém-nascidos pré-terms apresentam frequentemente alterações nas habilidades motoras, indo desde anormalidades da postura e movimento até restrições de habilidades motoras finas<sup>2</sup>.

As lesões neuronais relacionadas à inflamação podem induzir uma cascata de respostas imunes que participam do estabelecimento da lesão cerebral precoce<sup>7,10,11</sup>. Neste contexto, a resposta inflamatória é caracterizada pelo elevado nível de citocinas e quimiocinas circulantes<sup>2,13</sup>. A maioria das interações celulares desse processo é mediada por citocinas, que são liberadas sob ação de diferentes estímulos. Citocinas tais como as interleucinas (IL) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) estão envolvidas no controle de várias funções celulares, desde desenvolvimento e diferenciação até a morte celular<sup>14</sup>.

Por outro lado, tais moléculas podem também exercer efeitos benéficos e neuroprotetores sobre o tecido cerebral por favorecerem a liberação de fatores neurotróficos, tais como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e o Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais (GDNF)<sup>13</sup>. A neuroinflamação pode ativar alguns mecanismos neuroprotetores endógenos capazes de reduzir a extensão do dano causado pelo processo

inflamatório <sup>15</sup>. Assim, interações mútuas entre citocinas e fatores neurotróficos auxiliam na diferenciação entre processos fisiológicos e mecanismos patológicos <sup>14</sup>.

No entanto, cabe ressaltar que o desenvolvimento cerebral após a lesão associada à inflamação neonatal não é estático, nem é decorrente de evento único. Tal processo decorre de uma gama de cascatas celulares e moleculares desencadeadas no cérebro ao longo da vida, e que interagem com fatores neurotróficos endógenos <sup>3,15</sup>.

A hipótese desse estudo é que o processo inflamatório decorrente da prematuridade correlaciona-se com o desenvolvimento motor do recém-nascido pré-termo. Com o objetivo de avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor, foram analisados os níveis plasmáticos e urinários das citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70), das quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG), bem como dos fatores neurotróficos (BDNF e GDNF) em neonatos pré-termo de 28 a 32 semanas incompletas de idade gestacional. Os níveis dessas moléculas foram correlacionados aos resultados do Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP).

## **2- Pacientes e Métodos**

### **2.1- Desenho do estudo e Sujeitos**

Trata-se de um estudo observacional prospectivo com recém-nascidos pré-termos (RNPT) com idade gestacional entre 28 e 32 semanas incompletas. Foram incluídos no estudo os RNPT entre 28 e 32 semanas incompletas, nascidos em um hospital filantrópico de Minas Gerais/Brasil, cujos pais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram excluídos os recém-nascidos que (i) possuísem má-formação congênita, síndromes e/ou patologias associadas; (ii) apresentassem distúrbios agudos, tais como sepse, no momento da coleta; (iii) evoluíram para óbito em três semanas.

Para caracterização da população estudada foram coletados dados referentes à idade gestacional e peso ao nascimento, gênero, APGAR, diagnóstico inicial, diagnóstico materno e medicação materna utilizada.

### **2.2- Protocolo do estudo**

Todos os participantes do estudo tiveram amostras de sangue e urina coletados nos seguintes momentos: ao nascimento (sangue de cordão umbilical), com 48 horas de vida, com 72 horas de vida e 3 semanas após o nascimento. Ao atingirem 34 semanas de idade gestacional, os recém-nascidos foram submetidos ao Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP).

### **2.3- Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Sofia Feldman (vide ANEXO 1). Todos os participantes foram esclarecidos e consentiram na participação do estudo, mediante assinatura do TCLE (vide ANEXO 1). O protocolo da pesquisa não interferiu nas recomendações médicas e as coletas foram associadas à coleta para exames rotineiros durante a internação da criança na UTIN.

### **2.4- Amostras de Sangue**

Após o consentimento, foram coletadas amostras de 5mL de sangue de cordão umbilical em tubos de heparina sódica. Durante os exames de rotina da UTI neonatal, nos tempos

de 48 horas, 72 horas e 3 semanas após o nascimento, foram coletadas amostras de 1mL de sangue periférico em tubos contendo heparina sódica. Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas (5000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). Após a centrifugação, as amostras de plasma foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

## **2.5- Amostras de Urina**

Na busca por biomarcadores possíveis de serem detectados através de métodos menos invasivos, optou-se coletar amostras de urina dos RNPT. Essas amostras foram obtidas nos mesmos dias da coleta de sangue, sendo a primeira coleta com 48 horas de vida após o nascimento. Utilizou-se o coletor de urina para recém-nascidos. As amostras foram transferidas para tubos plásticos de 15 mL e imediatamente centrifugadas (3800 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenados em freezer a -80°C até o momento da análise.

## **2.6- Dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos**

### **2.6.1- Quantificação das Citocinas e Quimiocinas por microesferas (Cytometric Bead Array – CBA)**

As dosagens de citocinas e quimiocinas do plasma e urina dos RNPT foram realizadas pelo método de CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Utilizou-se os kits para quantificação de proteínas inflamatórias (*Human Inflammation* - IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) e quimiocinas (*Human Chemokines* – CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG). Brevemente, as amostras de plasma e urina foram incubadas em microesferas de captura recobertas por anticorpos específicos para as respectivas citocinas e quimiocinas, assim como as proteínas da curva padrão. Adicionou-se em seguida o reagente de cor (Ficoeritrina - PE) e as amostras foram incubadas por 3 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas (Wash buffer®) e centrifugadas (200rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspensionado com 300 $\mu$ L de Wash buffer. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados pelo software FCAP (BD Bioscience) e representados em pg/mL.

## **2.6.2- Quantificação dos Fatores Neurotróficos por Imunoensaio Enzimático (ELISA)**

A determinação dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF foi realizada pela técnica de imunoensaio enzimático (ELISA). Seguindo as recomendações do fabricante, utilizaram-se os kits Human BDNF Duo Set, com diluição 1:2 de zero até sete, e Human GDNF Duo Set ELISA Development (R&D Systems, MN, USA). Brevemente, anticorpos monoclonais específicos para cada fator neurotrófico foram incubados em placas de 96 poços por 12-18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 µL de solução de lavagem (solução salina-fosfato (PBS, pH 7.4), contendo 0.05% do detergente Tween 20). Sítios de ligação não específica foram bloqueados com 200 µL/poço da solução de PBS contendo albumina do soro bovina (BSA) a 1% e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem e as amostras, apropriadamente diluídas, e as proteínas para curva padrão, foram adicionadas à placa, que foi incubada por 18 horas a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas e adicionou-se, em cada poço, o anticorpo de detecção, permanecendo por 2 horas. As placas foram lavadas mais uma vez, adicionando-se solução de estreptavidina-peroxidase, com posterior incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e adicionou-se o substrato cromógeno OPD (o-phenyldiamine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em tampão citrato (pH 5.0) contendo 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes (Sigma-Aldrich). As placas foram, então, incubadas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi finalizada com solução de ácido sulfúrico a 1 molar. As placas foram lidas a 492 nm em espectrofotômetro (Emax – Molecular Devices). Os limites de detecção foram 11.75 pg/ml para BDNF e 15,62 pg/mL para GDNF.

## **2.7 – Avaliação do desenvolvimento motor**

O Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP) é uma avaliação de postura e do movimento infantil que pode ser utilizada em RN ao atingir a idade gestacional de 32 semanas até quatro meses de idade corrigida <sup>16</sup>. Além disso, o TIMP é sensível às mudanças na coordenação motora, conforme a idade, e discrimina crianças com comorbidades, que, em geral, apresentam escores mais baixos que as crianças saudáveis <sup>16</sup>. O TIMP foi aplicado em todos RNPT participantes da pesquisa ao atingirem, no mínimo,

34 semanas de idade gestacional corrigida (IGC) e os resultados foram divididos em abaixo do esperado (percentil  $< 5$ ) e desenvolvimento típico (percentil  $\geq 5$ ).

## **2.8- Análise estatística**

A análise descritiva das variáveis quantitativas contínuas foi realizada através de média  $\pm$  desvio padrão quando tinha distribuição normal e mediana (Q1; Q3) quando não tinha distribuição normal. As variáveis qualitativas foram expressas em frequências absoluta e porcentagem.

Na análise da evolução entre os momentos foi utilizado o teste de Friedman e para as variáveis que tiveram valores- $p \leq 0,05$  foram realizados os testes 2 a 2 Wilcoxon com correção de Bon Ferroni.

Na análise de concordância entre plasma e urina foram utilizados três métodos: ICC, correlação de Spearman e o gráfico de Bland Altman. Para a escolha dos métodos de plasma e urina que seriam utilizados no modelo de associação foram ajustadas as curvas ROCs dos dois métodos. Aqueles que tiveram os melhores resultados foram utilizados na análise de associação com a variável desenvolvimento motor. Nas comparações das variáveis do estudo com os dois grupos de desenvolvimento motor foram utilizados teste t, teste Kruskal-Wallis, teste Qui-quadrado de Pearson assintótico e Teste Qui-quadrado de Pearson exato.

Na correlação entre as variáveis mediadores imuno-inflamatórios e fatores neurotróficos foram utilizados a correlação de Spearman.

Para encontrar as variáveis que tinham associação com o desenvolvimento motor foi ajustado o modelo de regressão logística das variáveis do estudo. Inicialmente de forma univariada e para aqueles que eram significativos ao nível de 0,20 foram considerados candidatos ao multivariado. Foram ajustados todas as variáveis candidatas sendo retiradas passo-a-passo as menos significativas até todas as variáveis do modelo serem significativas ao nível de 0,05.

O teste de qualidade de ajuste utilizado foi o de Hosmer & Lemeshow. Os softwares utilizados foram: SPSS versão 20.0 e Medcalc versão 12.2.1.0.

### 3- Resultados

#### 3.1- Características clínicas gerais

Participaram do estudo 40 recém-nascidos, sendo 18 (45%) do sexo feminino e 22 (55%) do sexo masculino. Foram coletados dados relativos ao período pré-natal e do nascimento como descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas dos sujeitos

Características	Sujeitos (n=40)
<b>IGC (semanas)</b>	30 ± 1
<b>Sexo - n (%)</b>	
Feminino	18 (45,0)
Masculino	22 (55,0)
<b>Peso ao nascer</b>	1476,75 ± 428,01
<b>APGAR 1'</b>	7 ± 1
<b>APGAR 5'</b>	9 ± 1
<b>Diagnóstico inicial (RN) - n (%)</b>	
RNPT	16 (40,0)
RNPT + SDR	24 (60,0)
<b>Diagnóstico materno - n (%)</b>	
PE	32 (80,0)
Outros	8 (20,0)
<b>Medicação materna - n (%)</b>	
Sulfato + Corticoide	20 (50,0)
Corticoide	17 (42,5)
Nenhuma	3 (7,5)

Valores expressos em média e desvio padrão para as variáveis contínuas. Número de indivíduos e porcentagens para as variáveis categóricas.

IGC = Idade Gestacional Corrigida; RNPT = recém-nascido pré-termo; SDR = síndrome do desconforto respiratório; PE = pré-eclâmpsia

### 3.2- Perfil inflamatório nas três primeiras semanas de vida após o nascimento

As análises para caracterização do perfil inflamatório utilizado nesse estudo avaliaram citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos presentes no plasma e urina do RNPT, em momentos distintos, após o nascimento. No plasma esses momentos referem-se ao sangue de cordão umbilical (Tempo 1), coleta de sangue com 48 e 72 horas (Tempo 2 e 3, respectivamente), e com 3 semanas após o nascimento (Tempo 4). Na urina, avaliou-se os tempos de 48 e 72 horas (Tempo 1 e 2, respectivamente) e 3 semanas após o nascimento (Tempo 3).

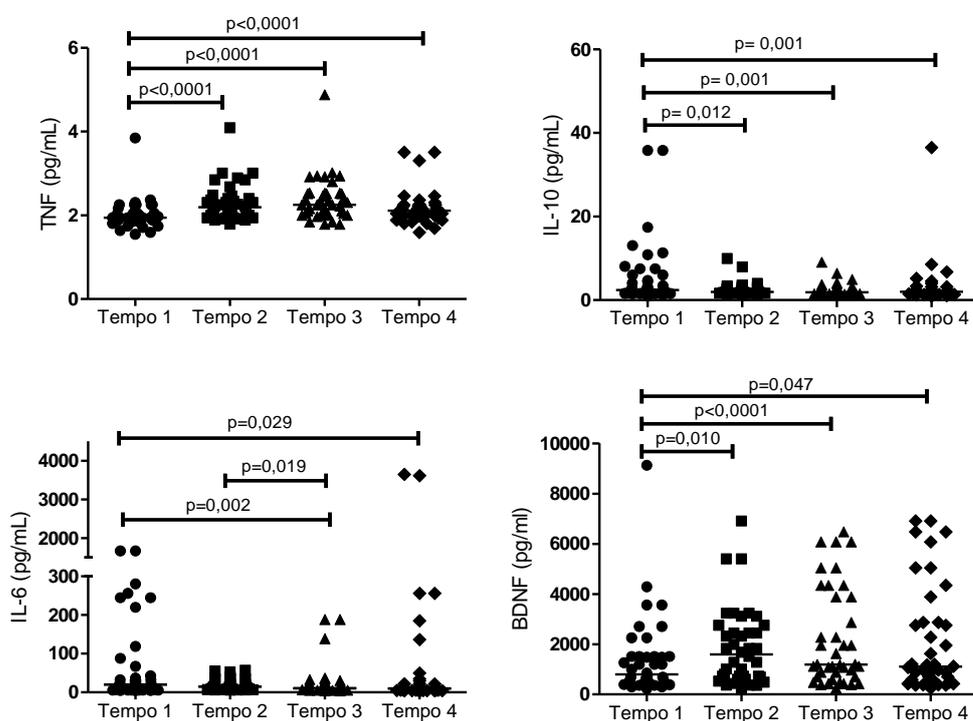
As análises do plasma, os parâmetros inflamatórios IL-6, IL-10, CXCL8/IL-8, e CXCL10/IP-10 decresceram nas três primeiras semanas. O oposto foi demonstrado para as proteínas IL-12p70, TNF, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e BDNF, sendo que logo após o nascimento (Tempo 2 – 48 horas), houve um aumento de TNF e BDNF. Com relação a IL-12p70, IL-1 $\beta$  e CXCL9/MIG e GDNF, não foram encontradas nenhuma diferença entre os diferentes momentos da coleta (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos no plasma de recém-nascidos pré-termo em 4 diferentes tempos

Variável	Ao nascimento	48 horas	72 horas	3 semanas	Valor-p
IL-12P70	461,86 (260,63 ; 570,12)	346,50 (261,50 ; 432,00)	418,01 (301,57 ; 636,48)	531,58 (251,22;759,82)	0,066
TNF	2,00 (1,96 ; 2,00)	2,19 (2,00 ; 2,40)	2,11 (1,94 ; 2,25)	2,11 (1,94 ; 2,25)	<0,0001
IL-10	2,50 (2,00 ; 6,00)	1,94 (1,74 ; 2,85)	1,89 (1,59 ; 2,84)	1,94 (1,61 ; 2,46)	0,005
IL-6	20,00 (7,00 ; 61,75)	14,98 (8,90;32,84)	10,04 (7,28 ; 14,68)	8,92 (5,44 ; 21,98)	0,001
IL-1 $\beta$	4,00 (4,00 ; 5,00)	4,03 (4,00 ; 4,23)	4,15 (4,00 ; 4,38)	4,19 (4,00 ; 4,97)	0,400
IL-8	24,50 (12,75 ; 98,00)	22,82 (15,02 ; 48,95)	16,15 (14,26 ; 31,94)	15,85 (11,63 ; 38,77)	0,632
IP-10	76,00 (47,00;132,00)	59,56 (37,97 ; 87,03)	41,17 (28,69 ; 69,10)	46,09 (22,29 ; 92,06)	0,005
MCP-1	138,50 (45,50 ; 266,00)	112,42 (42,41 ; 246,68)	109,40 (40,42 ; 206,21)	198,89 (52,38 ; 354,11)	0,020
MIG	12,00 (9,25 ; 18,75)	11,75 (8,47 ; 14,54)	12,10 (8,47 ; 16,00)	12,95 (6,64 ; 18,11)	0,282
RANTES	3870,50 (2968,00 ; 4913,00)	3234,79 (1714,44 ; 4957,65)	3703,37 (981,65 ; 4244,54)	4463,94 (4140,78;4879,67)	0,003
IL-8	203,50 (74,25 ; 609,00)	169,89 (96,80 ; 258,20)	98,77 (79,85 ; 297,52)	103,48 (62,87 ; 552,36)	<0,0001
BDNF	73,00 (43,00 ; 151,00)	159,50 (70,00 ; 268,25)	118,50 (71,00;389,00)	110,00 (51,75 ; 287,00)	0,008
GDNF	234,00 (143,00 ; 286,00)	188,50 (62,00 ; 312,00)	162,00 (114,00 ; 208,75)	116,00 (29,00 ; 362,00)	0,119

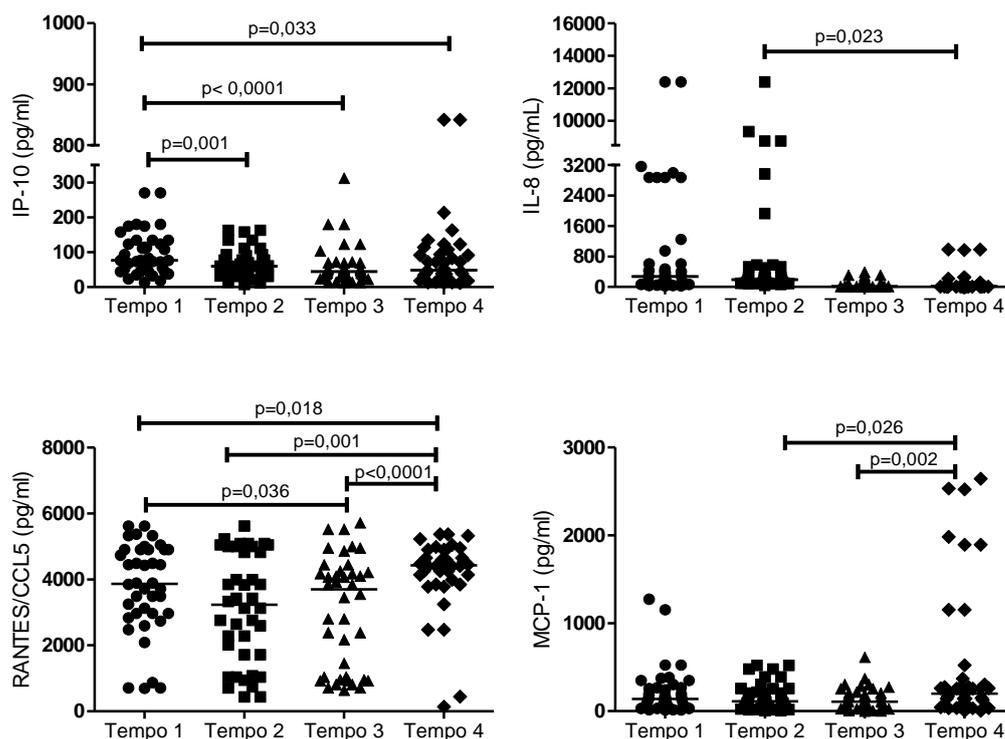
Valores expressos em mediana, Q1 e Q3. Teste Kruskal-Wallis para a comparação das medianas.

O perfil inflamatório apresentou diferenças durante as três primeiras semanas de vida do pré-termo. Dado os momentos de coleta, pode-se observar que houve um aumento dos níveis no plasma com 48 horas de vida e na urina com 72 horas de vida. Ao se analisar os quatro momentos de coleta do plasma verifica-se diferença significativa entre os tempos das citocinas TNF, IL-10 entre os tempos 1x2, 1x3 e 1x4, IL-6 entre 1x3, 1x4 e 2x3 e do fator neurotrófico BDNF entre 1x3 (Figura 1). Houve diferença significativa entre os tempos das quimiocinas CXCL8/IL-8 entre 2x4, CXCL10/IP-10 entre 1x2, 1x3 e 1x4, MCP-1 entre 2x4 e 3x4 e CCL5/RANTES entre 1x3, 1x4, 2x4 e 3x4 (Figura 2).



**Figura 1** – Dosagem plasmática de citocinas e fator neurotrófico em recém nascidos pré-termos em quatro diferentes momentos.

Plasma de recém nascidos pré-termos (n=40) foi coletado em quatro diferentes momentos (Tempo 1- sangue de cordão umbilical, Tempo 2- 48 horas, Tempo 3- 72 horas e tempo 4-3 semanas após o nascimento), e analisado ex vivo para quantificação das citocinas TNF, IL-10, IL-6 utilizando a técnica de CBA. Para a dosagem de BDNF utilizou-se a técnica de ELISA. Os resultados foram mostrados como mediana. A diferença foi significativa e determinada por teste Kruskal-Wallis com um valor de  $p \leq 0,05$ .



**Figura 2** – Dosagem plasmática de quimiocinas em recém nascidos pré-termos em quatro diferentes momentos.

Plasma de recém nascidos pré-termos ( $n=40$ ) foi coletado em quatro diferentes momentos (Tempo 1- sangue de cordão umbilical, Tempo 2- 48 horas, Tempo 3- 72 horas e Tempo 4- 3 semanas após o nascimento), e analisado *ex vivo* para quantificação das quimiocinas IP-10, IL-8, RANTES/CCL5 e MCP-1 utilizando a técnica de CBA. Os resultados foram mostrados como mediana. A diferença foi significativa e determinada por teste Kruskal-Wallis com um valor de  $p \leq 0,05$ .

Na urina as moléculas se comportam de forma distinta ao plasma. Há um aumento nos níveis de IL-10, IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, MCP-1, CXCL9/MIG, BDNF e GDNF no Tempo 2 (72 horas após o nascimento) em relação ao Tempo 1 (48 horas após o nascimento). Esse aumento é mantido até a 3 semana após o nascimento para as proteínas CXCL8/IL-8, MCP-1 e GDNF. As demais proteínas apresentam-se com valores reduzidos, semelhantes ao Tempo 1.

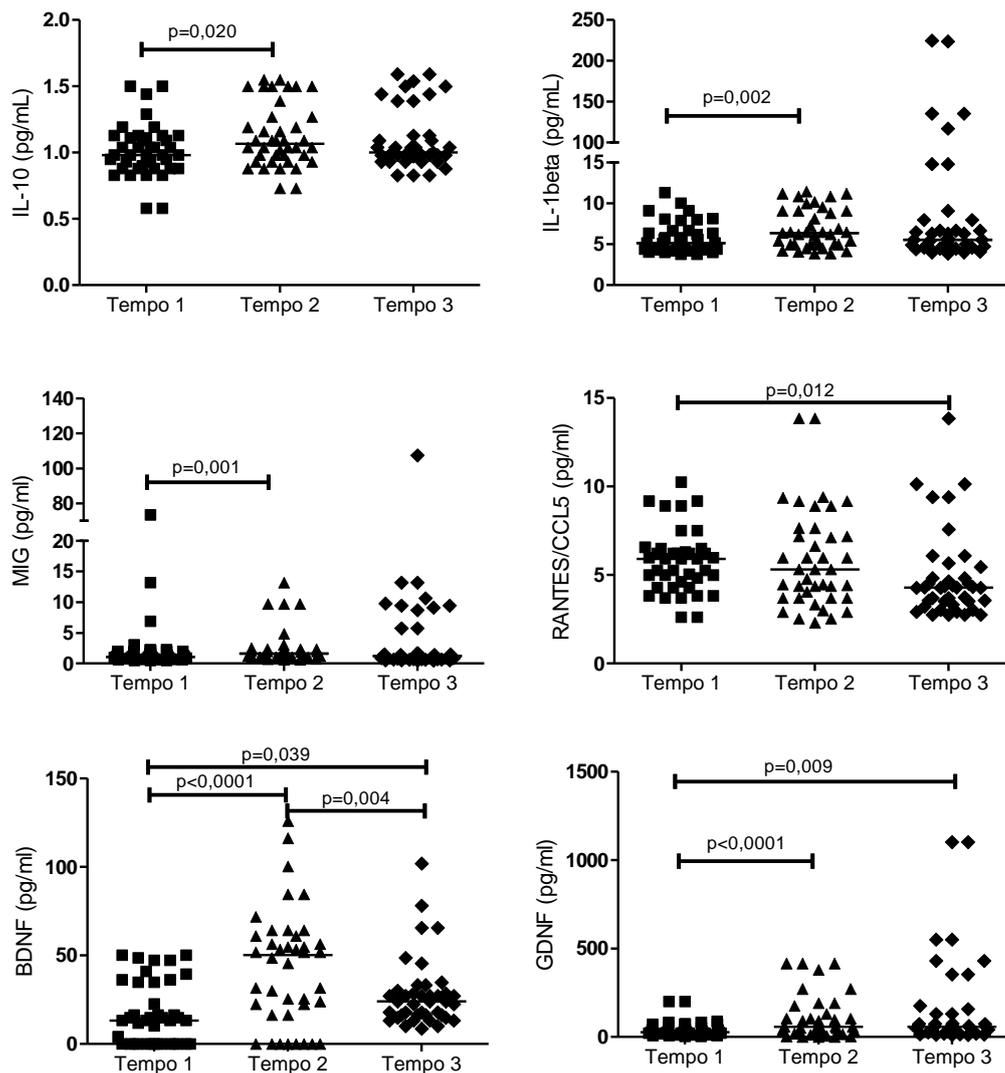
A diferença encontrada para as proteínas IL-12p70, TNF, IL-6, CXCL10/IP-10, MCP-1 e CXCL8/IL8 não foram significativa entre os tempos da coleta de urina (Tabela 3).

Tabela 3 – Evolução das proteínas inflamatórias nos 3 tempos de coleta da urina sem diferença significativa.

<b>Variável</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>3 semanas</b>	<b>Valor-p</b>
<b>IL-12P70</b>	2,52 (2,40 ; 2,65)	2,50 (2,40 ; 2,65)	2,43 (2,37 ; 2,52)	0,085
<b>TNF</b>	1,74 (1,59 ; 1,93)	1,74 (1,55 ; 1,84)	1,61 (1,59 ; 1,79)	0,066
<b>IL-6</b>	4,14 (3,83 ; 5,38)	4,12 (3,76 ; 5,26)	4,10 (3,64 ; 5,67)	0,869
<b>CXCL10/IP-10</b>	3,15 (0,68 ; 5,32)	3,57 (1,94 ; 11,49)	2,05 (0,68 ; 11,41)	0,247
<b>MCP-1</b>	28,51 (18,03 ; 101,97)	58,49 (31,66 ; 95,03)	41,55 (19,79 ; 76,64)	0,112
<b>CXCL8/IL-8</b>	27,28 (9,46 ; 294,12)	71,76 (17,30 ; 154,28)	87,52 (21,44 ; 248,35)	0,184

Valores expressos em mediana, Q1 e Q3. Teste Kruskal-Wallis para a comparação das medianas.

Os resultados da comparação nos três momentos de coleta da urina demonstram que há diferença significativa entre os tempos das citocinas IL-10 e IL-1 $\beta$  entre 1x2, das quimiocinas CXCL9/MIG entre 1x2, CCL5/RANTES 1x4, e nos fatores neurotróficos no BDNF entre 1x2, 1x3 e 2x3 e GDNF entre 1x2 e 1x3 (Figura 3).



**Figura 3** – Dosagem urinária de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos em recém nascidos pré-termos em três diferentes momentos.

A urina de recém nascidos pré-termos ( $n=40$ ) foi coletada em três diferentes momentos (Tempo 1- 48 horas, Tempo 2- 72 horas e Tempo 3- 3 semanas após o nascimento) foi analisado para quantificação das citocinas IL-10 e IL-1 $\beta$ , das quimiocinas MIG e RANTES/CCL5 utilizando a técnica de CBA. Para a dosagem de BDNF e GDNF utilizou-se a técnica de ELISA. Os resultados foram mostrados como mediana. A diferença foi significativa e determinada por teste Kruskal-Wallis com um valor de  $p \leq 0,05$ .

### 3.3- Comparação entre as análises de plasma e urina

Para determinar a relação entre a sensibilidade e a especificidade dos resultados das dosagens moleculares no plasma e urina, utilizou-se a curva ROC. Em relação aos dois métodos plasma e urina, os resultados da curva ROC não mostraram nenhum marcador com área superior a 0,9 (Tabela 4). Os resultados com valor de área superior a 0.8 foram

para GDNF no plasma e IL-1 $\beta$  na urina. Na maioria dos resultados, a estimativa da área parece maior da urina quando comparada ao plasma. Os intervalos de confiança demonstram que há interseções entre todos os intervalos (Tabela 4), indicando que as áreas das curvas são iguais. Dessa forma, a escolha dos dados obtidos no plasma ou na urina pode ser arbitrária para a análise de associação com desenvolvimento motor.

Tabela 4 - Resultados da CURVA ROC para os marcadores avaliados no plasma e urina.

Variáveis	Plasma		Urina	
	ÁREA CURVA ROC	IC95% ÁREA CURVA ROC	ÁREA CURVA ROC	IC95% ÁREA CURVA ROC
<b>TNF</b>	0,534	0,327 ; 0,741	<b>0,620</b>	0,438 ; 0,802
<b>IL-12P70</b>	0,378	0,195 ; 0,561	0,351	0,179 ; 0,523
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0,561	0,373 ; 0,749	0,853	0,722 ; 0,984
<b>IP-10</b>	0,443	0,246 ; 0,641	0,520	0,322 ; 0,718
<b>MCP-1</b>	0,353	0,168 ; 0,538	0,603	0,415 ; 0,791
<b>MIG</b>	0,458	0,270 ; 0,645	0,559	0,364 ; 0,753
<b>RANTES</b>	0,278	0,115 ; 0,442	0,568	0,388 ; 0,748
<b>IL-8</b>	0,556	0,356 ; 0,755	0,567	0,384 ; 0,749
<b>BDNF</b>	0,668	0,498 ; 0,839	0,418	0,230 ; 0,607
<b>GDNF</b>	0,853	0,723 ; 0,983	0,392	0,195 ; 0,589

Valor das variáveis considerado em média de todos os períodos do plasma e todos os períodos da urina.

### 3.4- Correlação entre mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos

Com o intuito de detectar uma possível associação entre a produção de citocinas e quimiocinas com a concentração de fatores neurotróficos, realizou-se a análise de correlação. Para as análises que se seguiram, utilizou-se os resultados obtidos das análises da urina considerado a média de todos os períodos. Com nível de significância de 0,05 observa-se que há correlação positiva entre CXCL8/IL-8 e BDNF e CXCL10/IP-10 e BDNF. Há correlação negativa entre MCP-1 e GDNF e CCL5/RANTES e GDNF (Tabela 5).

Tabela 5 - Associação entre os mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos em recém-nascidos pré-termo

	<b>Correlação Spearman (<math>r_s</math>)</b>	<b>Valor p</b>
<b>IL-8 x BDNF</b>	<b>0,366</b>	<b>0,046</b>
<b>IP-10 x BDNF</b>	<b>0,338</b>	<b>0,050</b>
<b>MCP-1 x GDNF</b>	<b>-0,410</b>	<b>0,010</b>
<b>RANTES x GDNF</b>	<b>-0,544</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Valor das variáveis considerado em média de todos os períodos da urina.

### 3.5- Associação das variáveis do estudo com o desenvolvimento motor

Para associar as variáveis estudadas com o desenvolvimento motor, o resultado do TIMP foi estratificado em dois grupos: abaixo do esperado (percentil foi <5) e desenvolvimento típico (percentil  $\geq$ 5). As variáveis gênero, APGAR 5', IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, CXCL8/IL-8 e GDNF tiveram diferença significativa entre os dois grupos.

Em seguida foi realizado ajuste do modelo de regressão logística univariado do desenvolvimento motor. As variáveis selecionadas para o modelo de regressão logística multivariado obtiveram  $p \leq 0,20$ . Assim, para a população estudada, IL-1 $\beta$  é um possível fator de risco para alteração no desenvolvimento motor enquanto GDNF apresenta-se nesse estudo como um fator protetor (Tabela 6).

Tabela 6 – - Modelo de regressão logística binária do desenvolvimento motor e proteínas inflamatórias e fatores neurotróficos

<b>Variável</b>	<b>Modelo1</b>	<b>Modelo2</b>	<b>Modelo3</b>	<b>Modelo4</b>	<b>Modelo5</b>
APGAR 5'	0,697	0,690	-	-	-
Gênero	0,618	0,604	0,610	-	-
IL1b	0,157	0,112	0,109	0,052	0,011
IL8	0,132	0,060	0,111	0,114	-
MIG	0,923	-	-	-	-
GDNF	0,078	0,112	0,062	0,060	0,031
<b>Teste de Hosmer &amp; Lemeshow</b>	<b>0,305</b>	<b>0,633</b>	<b>0,517</b>	<b>0,902</b>	<b>0,288</b>

Valor das variáveis considerado em média de todos os períodos da urina. Variável dependente = Desenvolvimento motor.

Gráfico 1 – Diferença na concentração de IL-1  $\beta$  nos dois grupos em relação ao desenvolvimento motor.

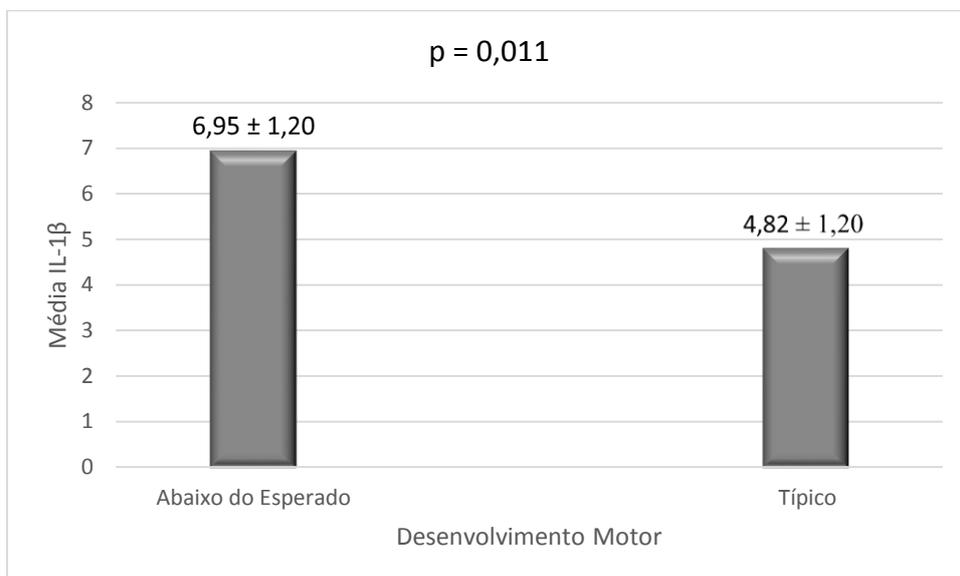
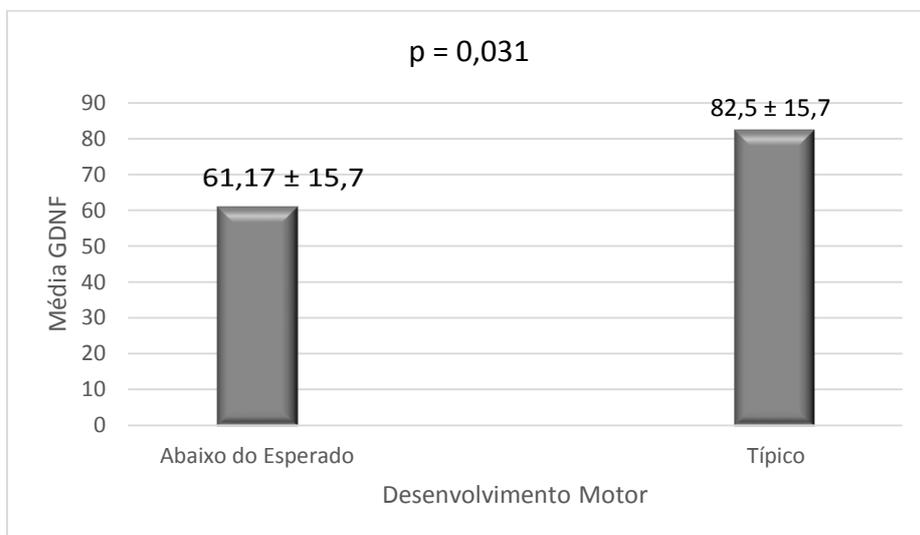


Gráfico 2 - Diferença na concentração de GDNF nos dois grupos em relação ao desenvolvimento motor.



#### 4- Discussão

Os resultados obtidos na análise dos valores das moléculas presentes no plasma e na urina demonstram que não houve correlação entre si. Todavia, pelo intervalo de confiança ter pontos de interseção no cálculo da curva ROC, optou-se por trabalhar com os dados encontrados na urina.

O sexo masculino e notas mais baixas do APGAR de 5' correlacionaram com pior desenvolvimento motor. As moléculas inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, CXCL8/IL-8, e o fator neurotrófico GDNF, também mostraram diferenças significativas entre os dois grupos. Sendo IL-1 $\beta$  e GDNF as moléculas com associação com o desenvolvimento motor pelo modelo de regressão logística multivariada.

Estudos recentes evidenciam a associação de níveis periféricos elevados de citocinas e quimiocinas com pior neurodesenvolvimento<sup>16-19</sup>. A maior concentração de citocinas inflamatórias ocasiona lesão endotelial na substância branca favorecendo o aumento de apoptose neuronal e de células gliais. Há uma interferência no crescimento dos axônios e na formação da bainha de mielina<sup>20-23</sup>. Dessa forma pode haver problemas na migração neuronal e na divisão, organização e desenvolvimento de sinapses<sup>21</sup>.

A inflamação do sistema nervoso central é caracterizada pelo aumento de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF e INF<sup>2,24-28</sup>. Estudos apontam correlação de IL-6 com desenvolvimento motor abaixo do esperado, mas em nosso estudo não encontramos essa relação. Entretanto a citocina IL-1 $\beta$  apresentou associação com escores mais baixos obtidos no TIMP. Em síntese, os RNPT que apresentaram níveis elevados de IL-1 $\beta$  foram classificados com o desenvolvimento motor abaixo do esperado.

Em seu estudo Girard et al<sup>14</sup> argumenta que a citocina IL-1 $\beta$  pode estar associada ao recrutamento de macrófagos ou pode ser produzida por células gliais e recrutar a infiltração de monócitos no cérebro, sendo essa interação entre a citocina e o tecido cerebral causar efeitos deletérios ou lesivos. IL-1 $\beta$  é associada com desintegração de estruturas teciduais, lesão da substância branca, ruptura da Barreira Hemato Encefálica (BHE) e morte celular<sup>29-35</sup>. Em relação ao desenvolvimento, há estudos que demonstram correlação de IL-1 $\beta$  com baixos escores em relação à função cognitiva, mensurada por testes de desenvolvimento<sup>24,26</sup>. O resultado desse estudo sugere que IL-1 $\beta$  possivelmente também se associa com o desenvolvimento motor, sendo que sua maior concentração correlaciona com desenvolvimento motor abaixo do esperado para a idade gestacional no RNPT.

O aumento da concentração de citocinas inflamatórias também desencadeia liberação de fatores endógenos para reparação do tecido cerebral, no qual há interações mútuas entre citocinas e fatores neurotróficos<sup>36,37</sup>. IL-1 $\beta$  e TNF estão relacionados com a liberação dos

fatores neurotróficos BDNF e GDNF<sup>13</sup>. A liberação dessas neurotrofinas no parênquima cerebral ocorre como uma resposta anti-inflamatória secundária com objetivo de proteger o SNC de lesão de maior intensidade<sup>38-44</sup>. O aumento da concentração de fatores neurotróficos como Fator de Crescimento Nervoso (NGF), BDNF e GDNF reduz a apoptose neuronal e de células da glia<sup>45-48</sup>.

É evidente na literatura a interação entre citocinas inflamatórias e fatores neurotróficos<sup>25-27</sup>. No entanto, no presente estudo não foram detectadas correlações significativas entre citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotróficos. Por outro lado, houve correlação entre as quimiocinas e fatores neurotróficos, observando-se correlação positiva entre CXCL8/IL-8 e CXCL10/IP-10 com o BDNF e correlação negativa de MCP-1 e CCL5/RANTES com GDNF.

A associação entre quimiocinas e fatores neurotróficos ainda é pouco explorada, sobretudo em RNPT. Alguns trabalhos corroboram com o achado desse estudo em relação ao fato de que a concentração de quimiocinas pode-se correlacionar positiva ou negativamente com a concentração de neurotrofinas<sup>24-27</sup>.

Os mecanismos mais estudados se referem ao BDNF. O BDNF, membro da família do NGF, é apontado como essencial para a sobrevivência e diferenciação neuronal, por ação na fisiologia e plasticidade do SNC<sup>49</sup>. Sua expressão pode ser reduzida quando há aumento de expressão de quimiocinas no parênquima cerebral<sup>50</sup>. Tal aspecto justificaria a baixa concentração de BDNF detectada nas amostras analisadas, considerando que as concentrações periféricas tem associação com as concentrações no cérebro.

Os achados desse estudo sugerem que o GDNF atua como um fator de proteção para o desenvolvimento motor. Os neonatos que obtiveram resultado no teste com desenvolvimento motor típico apresentaram níveis mais elevados dessa neurotrofina.

O GDNF possui ação desde a migração e diferenciação neuronal até a proteção de neurônios dopaminérgicos e motores<sup>51</sup>. De forma conjunta, o BDNF e o GDNF favorecem a recuperação após a lesão derivada da inflamação. Todavia os maiores níveis de expressão do GDNF podem estar associados a maior migração e proteção neuronal que o BDNF<sup>51</sup>.

Trata-se de um estudo pioneiro que se propôs analisar proteínas inflamatórias e fatores neurotróficos em recém-nascidos pré-termo durante as três primeiras semanas de vida após o nascimento, correlacionando-os com o desenvolvimento motor. A proposta de analisar o processo inflamatório por métodos não invasivos de coleta como a urina também foi outro aspecto original nesse estudo. Os resultados demonstraram associação entre inflamação e atraso no desenvolvimento motor.

Os sujeitos do estudo foram 40 neonatos pré-termos tendo como base cálculo amostral, levando em consideração o alto índice de sepse precoce entre os RNPT no hospital onde foram coletados os dados. Dessa forma, para evitar a possibilidade de associação da inflamação à sepse, os neonatos com distúrbios agudos no momento das coletas foram excluídos desse estudo. O uso de corticoide também foi uma limitação do estudo, porque o uso desse medicamento pode interferir no processo inflamatório do RNPT. Entretanto, essa medicação é indicada quando há probabilidade que o parto prematuro ocorra, sendo antiético a eliminação desse fator para a realização do estudo.

## **5- Considerações finais**

Os resultados desse estudo sugerem que o perfil de moléculas inflamatórias e fatores neurotróficos associam com o desenvolvimento motor de recém-nascidos pré-termos. Entretanto a relação das quimiocinas e fatores neurotróficos precisa ser mais estudada.

O processo inflamatório está intimamente ligado com a lesão cerebral. A análise da urina mostrou-se como um recurso eficiente para avaliar esse processo. Assim, pode-se tornar uma estratégia promissora para acompanhar o perfil inflamatório de RNPT por ser um método não invasivo de coleta.

## 6- Referências

- 1- OMS: Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>
- 2- Chang, E. Preterm birth and the role of neuroprotection. *BMJ*. 350: 6661. 2015
- 3- KEMP, M.W. Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation. *Frontiers in Immunology*, v.5. 2014.
- 4- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; CHOU, D.; OESTERGAARD, M.; SAY, L.; MOLLER, A.; KINNEY, M.; LAWN, J. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, v.10, n.1, 2013.
- 5- HOWSN, C.P.; KINNEY, M.V.; McDOUGALL, L.; LAWN, J.E. Born too soon: preterm birth matters. *Reproductive Health*, v.10, n.1, 2013.
- 6- SELIP, B.D.; JANTIZIE, L.L.; CHANG, M.; FITZGERALD, E.C.; BOLL, G.; MURPHY, A.; JENSEN, F.E. Regional differences in susceptibility to hypoxic-ischemic injury in the preterm brain: exploring the spectrum from white matter loss to selective grey matter injury in a rat model. *Neurol Res Int*, v.7, n.2, p.51-84, 2012.
- 7- RISSO, F.M.; SANNIA, A.; GAVILANES, D.A.W.; VLES, H.J.; COLIVICCHI, M.; RICOTTI, A.; VOLTI, G.L.; GAZZOLO, D. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v.25, n.4, p. 101-104, 2012.
- 8- BERGUER, I.; PRELEG, O.; OFEK-SHLOMAI, N. Inflammation and early brain injury in term and preterm infants. *The Israel Medical Association Journal*, v.14, p. 318-323, 2012.
- 9- KHWAJA, O.; VOLP, J.J. Pathogenesis of cerebral White matter injury of prematurity. *Archives of disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, v.93, n.1, p. 53-61, 2008.
- 10- DEGOS, V.; FAVRAIS, G.; KAINDL, A.M. Inflammation process in perinatal brain damage. *Journal of Neural Transmission*, v.117, n.1, p.1009-1017, 2010.

- 11- ALVAREZ-DIAZ, A.; HILARIO, E.; de CERIO, F.G.; VALLIS-I-SOLER, A.; ALVAREZ-DIAZ, F.J. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain: key vascular and cellular players. *Neonatology*, v.92, n.1, p. 227-235, 2007.
- 12- STRIZ, I.; BRABCOVA, E.; KOLESAR, L.; SKERKOVA, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science*, v.126, p. 593-612, 2014.
- 13- GIRARD, S.; KADHIM, H.; ROU, M.; LAVOIE, K.; BROUCHU, M.E.; LAROUCHE, A.; SÉBIRRE, G. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatric Neurology*, v.40, n.3, p.168-174, 2009.
- 14- MALEB, S.; DAMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *Journal of Child Neurology*, v.24, n.9, p.1119-1126, 2009.
- 15- STEWART, A.; TEKES, A.; HUISMAN, T.A.G.M.; JENNINGS, J.M.; ALLEN, M.C.; NORTHINGTON, F.J.; EVERETT, A.D.; GRAHAM, E.M. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.209, n.1, p.1010-1016, 2013.
- 16- KIM, S.A.; LEE, Y.J.; LEE, Y.G. Predictive value of test of motor performance for infants based on correlation between TIMP and Bayley Scales of infant development. *Annals of Rehabilitation Medicine*, v. 35, n. 6, p. 860-866, 2011.
- 17- de KIEVIET, J.F.; ZOETEBIER, L.; ELBURG, R.M.V.; VERMEULEN, R.J. Brain development of very preterm and very low-birthweight children in childhood and adolescence: a meta analysis. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 54, p. 313-323, 2012.
- 18- SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. High plasma cytokine levels, with matter injury and neurodevelopment of high risk preterm infants: Assessment at two years. *Early Human Development*, v.87, p. 433-437, 2011.
- 19- LODHA, A.; ASZTALOS, E.; MOORE, A.M. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatrica*, v.99, p. 338-349, 2010

- 20- HEEP, A.; BEHRENDT, D.; NITSCH, P.; FIMMERS, R.; BARTMANN, P.; DEMBINSKI, J. Increased serum levels of the interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Ed.*, v. 88, p. 501-504, 2003.
- 21- GUO, R.; HOU, W.; DONG, Y.; YU, Z.; STITES, J.; WEINER, C.P. Brain injury caused by chronic fetal hypoxemia is mediated by inflammatory cascade activation. *Reproductive Science*, v. 17, n. 6, p. 540-548, 2010.
- 22- DENG, W. Neurobiology of injury to the developing brain. *Nature Reviews Neurology*, v. 6, p. 328-336, 2010.
- 23- SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v.29, p. 464-479, 2009.
- 24- KORSENIIEWSKI, S.J.; SOTO-RIVERA, C.L.; FICHOROVA, R.N.; ALLRED, E.; KUBAN, K.C.K.; O'SHEA, T.M.; PANETH, N.; AGUS, M.; DAMMANN, O.; LEVITON, A. Are preterm newborns who have relative hyperthyrotropinemia at increased risk of brain damage? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v. 27, n. 0, p. 1077-1088, 2014.
- 25- O'SHEA, T.M.; SHAH, B.; ALLRED, E.; FICHOROVA, R.N.; KUBAN, K.C.K.; DAMMANN, O.; LEVITON, A. Inflammation-initiating illnesses, inflammation-related proteins, and cognitive impairment in extremely preterm infants. *Brain Behavior and Immunity*, v. 29, p. 104-112, 2013.
- 26- O'SHEA, T.M.; ALLRED, E.; KUBAN, K.C.K.; DAMMANN, O.; PANETH, N.; FICHOROVA, R.; HIRTZ, D.; LEVITON, A. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at two years in extremely preterm infants. *Journal of Pediatrics*, v.160, n. 3, p. 395-401, 2012.
- 27- 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 Human Development*, v. 87, n. 6, p. 439-443, 2011.

- 28- HARDING, D.R.; DHAMRAIT, S.; WHITELAW, A.; HUMPHRIES, S.E.; MARLOW, N.; MONTGOMERY, H.E. Does Interleukin-6 Genotype Influence Cerebral Injury or Developmental Progress After Preterm Birth? *Pediatrics*, v. 114, n. 4, p. 941-947, 2004.
- 29- GRAM, M.; SVEINSDOTTIR, S.; CINTHIO, M.; SVEINSDOTTIR, K.; HANSSON, S.R.; MÖRGELIN, M.; ÅKERSTRÖM, B.; LEY, D. Extracellular hemoglobin - mediator of inflammation and cell death in the choroid plexus following preterm intraventricular hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*, v. 11, n. 200, 2014.
- 30- LEITNER, K.; SHAMMARY, M.A.; MCLANE, M.; JOHNSTON, M.V.; ELOVITZ, M.A.; BURD, I. IL-1 Receptor Blockade Prevents Fetal Cortical Brain Injury But Not Preterm Birth in a Mouse Model of Inflammation-Induced Preterm Birth and Perinatal Brain Injury. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 71, n. 5, p. 418-426, 2014.
- 31- LEVITON, A.; FICHOVA, R.N.; O'SHEA, M.; KUBAN, K.; PANETH, N.; DAMMANN, O.; ALLRED, E.N. Two-hit model of brain damage in the very preterm newborn: small for gestational age and postnatal systemic inflammation. *Pediatric Research*, v. 73, n. 3, p. 362-370, 2013.
- 32- BROCHU, M.E.; GIRARD, S.; LAVOIE, K.; SÉBIRE, G. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. *Journal of Neuroinflammation*, v.8, n. 55, 2011.
- 33- GIRARD, S.; SÉBIRE, G.; KADHIM, H. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 69, n. 11, p. 1116-1129, 2010.
- 34- VISCARDI, R.M.; MUHUMUZA, C.K.; RODRIGUEZ, A.; FAIRCHILD, K.D.; SUN, C.C.J.; GROSS, G.W.; CAMPBELL, A.B.; WILSON, P.D.; HESTER, L.; HASDAY, J.D. Inflammatory Markers in Intrauterine and Fetal Blood and Cerebrospinal Fluid Compartments Are Associated with Adverse Pulmonary and Neurologic Outcomes in Preterm Infants. *Pediatric Research*, v. 55, n. 6, p. 1009-1017, 2004.

- 35- DUGGAN, P.J.; MAALOUF, E.F.; WATTS, T.L.; COUNSELL, S.J.; ALLSOP, J.; AL-NAKIB, L.; RUTHERFORD, M.A.; BATTIN, M.; ROBERTS, I.; EDWARDS, A.D. Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet*, v.358, n. 9294, p. 1699-1700, 2001.
- 36- SHADI, M.; DAMMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *Journal of Child Neurology*, v.24, n.9, p. 1119-1126, 2009.
- 37- OTTEN, U.; MARZ, P.; HEESE, K.; HOCK, C.; KUNZ, D.; ROSE-JHON, S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states, *New York Academic of Science*, v.917, p. 322-330, 2000.
- 38-HANSEN-PUPP, I.; HELLSTRÖM-WESTAS.; CILIO, C.M.; ANDERSON, S.; FELLMAN, V.; LEY, D. Inflammation at birth and the insulin-like growth factor system in very preterm infants. *Acta Paediatrica*, v.96, n.6, p. 803-806, 2007.
- 39- ADÉN, U.; FAVRAIS, G.; PLAISANT, F. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNF-alpha pathway and protection by etanercept. *Brain Behavior and Immunity*, v.24, n.1, p.747-758, 2010.
- 40- SKIHAR, V.; SILVA, C.; CHOJNACKI, A.; DÖRING, A.; STALLCUP, W.B.; WEISS, S.; YONG, V.W. Promoting oligodendrogenesis and myelin repair using the multiple sclerosis medication glatiramer acetate. *Neuroscience*, v.106, n. 42, p. 17992-17997, 2009.
- 41- PAJENDA, G.; HERCKER, D.; ÁRTON, G.; PAJER, K.; FEICHTINGER, G.A.; MALÉTH, J.; REDL, H.; NÓGRÁDI, A. Spatiotemporally limited BDNF and GDNF over expression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth. *Experimental neurology*, v. 261, p. 367-376, 2014.
- 42- KINGHAM, P.J.; KOLAR, M.K.; NOVIKOVA, L.N.; NOVIKOV, L.N.; WIBERG, M. Stimulating the neurotrophic and antigenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells and Development*, v.23, n.7, p. 741-754, 2014.
- 43- KERSCHENSTEINER, M.; MEINL, E.; HOHLFELD, R. Neuro-immune crosswalk in CNS disease. *Neuroscience*, v.158, n.3, p.1122-1132, 2009.

- 44- KHWAJA, O.; VOLP, J.J. Pathogenesis of cerebral White matter injury of prematurity. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, v.93, n.1, p.53-61, 2008.
- 45- BORDIE, C. Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *Febs letters*, 394(2), p. 117-120, 1996.
- 46- VILLOSLADA, P.; GENAIN, C.P. Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. *Progress in Brain Research*, n.146, p. 403-414, 2004.
- 47- MALAEB, S.; DAMMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *Journal of Child Neurology*, v.24, n.9, p.1119-1126, 2009.
- 48- CHIARETTI, A.; ANTONELLI, A.; RICCARDI, R.; GENOVESE, O.; PEZZOTI, P.; Di ROCCO, C.; TORTOROLO, L.; PIEDIMONTE, G. Nerve growth factor expression correlates with severity and outcome of traumatic brain injury in children. *European Journal of Pediatric Neurology*, v.12, n. 3, p. 195-204, 2008.
- 49- SPULBER, S.; RANTAMÄKI, T.; NIKKILÄ, O.; CASTRÉN, E.; WEIHE, P.; GRANDJEAN, P.; CECCATELLI, S. Effects of Maternal Smoking and Exposure to Methylmercury on Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations in Umbilical Cord Serum. *Toxicological sciences*, v. 117, n. 2, p. 263–269, 2010.
- 50- AVDOSHINA, V.; BECKER, J.; CAMPBELL, L.A.; PARSADANIAN, M.; MHYRE, T.; TESSAROLLO, L.; MOCHETTI, I. Neurotrophins modulate the expression of chemokine receptors in brain. *Journal of NeuroVirology*, v. 17, n.1, p. 58-62, 2011.
- 51- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; ROSSIGNOL, C.; STEINDLER, D.; ZHENG, T.; WEISS, M.D. Neurotrophin-induced migration and neuronal differentiation of multipotent astrocytic stem cells *in vitro*. *Plos One*, v. 7, n. 12, 2012.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A inflamação sistêmica no pré-termo pode representar a inflamação no SNC devido sua forte correlação com o desenvolvimento motor.

Torna-se necessário maior investigação do processo inflamatório nos pré-termos de forma a mensurar a concentração de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos para determinar os fatores de risco e os mecanismos desse processo que interferem no neurodesenvolvimento e na lesão cerebral.

A revisão sistemática da literatura apresentou dados correlacionando o processo inflamatório com o desenvolvimento. Entretanto algumas moléculas, como BDNF e GDNF, não foram discutidas no primeiro estudo, porque os trabalhos que abordavam essa análise correlacionaram a inflamação secundária a sepse neonatal.

Através da pesquisa realizada podem ser levantado novos questionamentos elegíveis de serem tratados em estudos futuros abordando o processo inflamatório e o desenvolvimento em diferentes períodos de tempo para maior compreensão da correlação entre processo inflamatório e desenvolvimento neuropsicomotor.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - PARECER DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA FM/UFMG

Departamento de Pediatria  
Faculdade de Medicina da UFMG

Parecer – 04/2014

**Pesquisador:**

Ana Cristina Simões e Silva – Orientadora e Rafael Coelho Magalhães – Aluno de mestrado.

**Título do Projeto:**

Avaliação da asfixia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor.

**Mérito:**

O parto prematuro ocorre em 12,5% de todos os nascimentos e 40% desses recém-nascidos são de risco para mortalidade perinatal e alterações do neurodesenvolvimento em longo prazo. Uma multiplicidade de causas potenciais, com complexos mecanismos de interação, parecem estar envolvidos com a lesão cerebral precoce e ainda não são completamente conhecidos. Várias linhas de evidência sugerem que as lesões neuronais relacionadas com a inflamação podem induzir uma cascata de respostas imunes que estão envolvidos na patogênese. Os principais mecanismos patogênicos são a hipóxia/isquemia e a inflamação. São crescentes as evidências da utilidade de biomarcadores na detecção precoce de risco para lesão cerebral em recém-nascidos pré-termos, de forma que mediadores imuno-inflamatórios podem se mostrar preditivos da alteração do desenvolvimento motor.

O presente estudo observacional testará a hipótese de que a asfixia perinatal desencadeia uma resposta imuno-inflamatória, a qual pode ser mensurada por citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos e que essas substâncias são preditoras de alteração no desenvolvimento motor.

O estudo tem como objetivo primário avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional. Os objetivos secundários são: 1) Comparar o nível de citocinas presentes nos fluidos corporais de recém-nascido com APGAR de 5'  $\leq 6$  e  $\geq 7$ ; 2) Estudar o processo inflamatório do nascimento até a terceira semana de vida do bebê por meio da mensuração de mediadores imuno-inflamatórios e fatores neurotróficos; 3) Avaliar possíveis associações entre perfil imuno-inflamatório e fatores neurotróficos; 4) Relacionar o perfil dos mediadores imuno-inflamatórios e os fatores neurotróficos com as condições de nascimento e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor.

Os critérios de elegibilidade de asfixia perinatal incluem um pH  $\leq 7,0$  ou um déficit de base de 16 mmol por litro ou mais, em uma amostra de sangue do cordão umbilical ou qualquer sangue durante a primeira hora após o parto.

Amostras de 1 ml de sangue e urina serão coletadas nos recém-nascidos pré-termo, de 28 a 34 semanas de idade gestacional, divididos em dois grupos (APGAR de 5'  $\leq$ 6 e  $\geq$ 7). As coletas ocorrerão no momento do nascimento (sangue do cordão umbilical) e com 48 horas, 72 horas e 3 semanas após o nascimento. Nos RN's, ao atingirem 34 semanas de IGC após a coleta dos fluidos, será aplicado o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP). Os recém-nascidos prematuros serão provenientes do Hospital Sofia Feldman que apresenta média de 925 partos/mês dos quais 99,3% são de recém-nascidos vivos. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital Sofia Feldman. Os pesquisadores consideram que os riscos da coleta de amostras ao RN's são os mesmos que os da assistência prestada uma vez que a coleta desses materiais já fazem parte da rotina da UTI Neonatal. O TCLE está adequado ao esclarecer sobre os riscos da coleta aos responsáveis pelo RN.

O projeto já dispõe de todos os equipamentos, recursos materiais e humanos necessários para sua realização. Os equipamentos necessários para dosagem de citocinas e fatores neurotróficos encontram-se disponíveis no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM). O material de consumo para coleta de amostras de urina e sangue bem como os kits necessários para determinação das citocinas e fatores neurotróficos serão obtidos pela Profª Ana Cristina Simões e Silva, orientadora do Projeto, por meio de recursos junto ao Edital 16/2012 – Programa Hiperdia Minas da FAPEMIG no valor total de R\$ 111.247,05. Não haverá nenhum tipo de pagamento aos pesquisadores envolvidos no projeto. O kit para aplicação do TIMP já foi adquirido pelo pesquisador desse projeto.

O projeto apresenta cronograma de execução viável.

**Mérito do estudo:** Trata-se de um projeto de mestrado que poderá contribuir para a detecção precoce de alterações do desenvolvimento motor dos RN prematuros, ajudando a melhorar o atendimento a estes pacientes e a definir a melhor conduta clínica.

**Voto:**

O estudo é de relevância e exequível. Sou pela sua aprovação sem ressalvas.

APROVADO EM REUNIÃO DE  
CÂMARA DEPARTAMENTAL  
07/03/2014

  
Prof. Benigna Maria de Oliveira  
Chefe do Departamento de Pediatria  
Faculdade de Medicina - UFMG

## ANEXO 2 – PARECER COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da asfíxia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor.

**Pesquisador:** Ana Cristina Simões e Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30382114.9.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 656.859

**Data da Relatoria:** 23/05/2014

#### Apresentação do Projeto:

De acordo com o projeto em tela, o parto prematuro ocorre em 12,5% de todos os nascimentos e 40% desses recém-nascidos são de risco para mortalidade perinatal e morbidades. A lesão cerebral precoce é uma das principais complicações do período perinatal e possui também um potencial para alterações do neurodesenvolvimento em longo prazo. Não há uma etiologia única para a lesão cerebral precoce, mas uma multiplicidade de causas potenciais com complexos mecanismos de interação que ainda não são completamente conhecidos. Os principais mecanismos patogênicos são a hipóxia/isquemia e a infamação. Várias linhas de evidência sugerem que as lesões neuronais relacionadas com a inflamação podem induzir uma cascata de respostas imunes que estão envolvidos na patogênese da lesão cerebral precoce. Entretanto, até recentemente, o cérebro no período fetal-neonatal era visto como um órgão que apresentava até certo resistência aos mecanismos de agressão imune.

O presente estudo pretende avaliar o impacto de intervenções terapêuticas no sentido de minimizar complicações e reduzir morbi-mortalidade. Visa avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional. As amostras de sangue e urina coletadas serão analisadas por citometria de fluxo através da técnica

**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: 656.859

de cytometric bead array (CBA) e por meio de Ensaio imuno-enzimático (ELISA). Serão analisados os níveis das citocinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, das quimiocinas IL-8, MCP-1, RANTES e dos fatores neurotróficos NT3, NT4/5, BDNF e NGF. Tais mensurações serão realizadas e comparadas nos dois grupos de pacientes (APGAR de 5, 6 e 7) e nos quatro tempos de coleta (nascimento, 48 horas, 72 horas, 3 semanas). Para mensurar o desenvolvimento motor será aplicado o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP) em todos RNs participantes da pesquisa ao atingirem, no mínimo, 34 semanas de IGC e já terem as amostras de fluidos coletadas.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

**Objetivo Secundário:**

- Comparar o nível de citocinas presentes nos fluidos corporais de recém-nascido com APGAR de 5' 6 e >7;
- Estudar o processo inflamatório do nascimento até a terceira semana de vida do bebê por meio da mensuração de mediadores imuno-inflamatórios e fatores neurotróficos;
- Avaliar possíveis associações entre perfil imuno-inflamatório e fatores neurotróficos; -Relacionar o perfil dos mediadores imuno-inflamatórios e os fatores neurotróficos com as condições de nascimento e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Segundo os pesquisadores em tela, será garantida a preservação da identidade e integridade dos participantes sem comprometimento à assistência ao recém-nascido. Não haverá ônus para os mesmos e os responsáveis que aceitarem participar do estudo serão informados sobre o procedimento a ser realizado e deverão assinar o TCLE, podendo desistir quando quiserem. A coleta dos fluidos será realizada por profissionais graduados em enfermagem ou medicina, capacitados para tal procedimento, durante a rotina de assistência da UTIN. Assim, os riscos da coleta de amostras ao RN's são os mesmos que os da assistência prestada uma vez que a coleta desses materiais já fazem parte da rotina da UTIN. A aplicação do TIMP não envolve risco considerável para o RN por se tratar de uma escala observacional e de movimentos eliciados.

**Benefícios:**

**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: 656.859

De acordo com os pesquisadores, 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:**

O trabalho é exequível, está bem fundamentado e bem delineado. Poderá contribuir para avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

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

Foram apresentados:

- Folha de rosto.
- Parecer consubstanciado com aprovação do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG.
- Anuência do Hospital Sofia Feldman, onde pretende-se realizar a pesquisa.
- Anuência do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (Faculdade de Medicina da UFMG).
- TCLE.

**Recomendações:**

No TCLE:

- Consta os nomes e sobrenomes dos pesquisadores, com telefones e endereço dos mesmos (físico e eletrônico).
- Informado que não haverá ressarcimento pela participação no estudo.
- Linguagem adequada para os responsáveis legais pelos participantes da pesquisa, o que é a escala APGAR.

Explicitado quais os riscos pertinentes à presente pesquisa no TCLE.

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

Somos pela aprovação do projeto "Avaliação da asfixia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor." da pesquisadora Ana Cristina Simões e Silva

**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: 656.859

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 22 de Maio de 2014

---

Assinado por:  
Maria Teresa Marques Amaral  
(Coordenador)

## ANEXO 3 – PARECER CEP/HSF

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/  
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL  
INTEGRAL À SAÚDE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da asfixia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor.

**Pesquisador:** Ana Cristina Simões e Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30382114.9.3001.5132

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 670.318

**Data da Relatoria:** 29/05/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa para obtenção do título de Mestre que se propõe a avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional. Serão utilizadas amostras de sangue e urina dos recém-nascidos participantes do estudo que serão analisadas por citometria de fluxo através da técnica de de cytometric bead array (CBA) e por meio de Ensaio imunoenzimático (ELISA). Serão analisados os níveis das citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70), das quimiocinas (IL-8, MCP-1, RANTES, IP-10, MIF-1) e dos fatores neurotróficos (NT3, NT4/5, BDNF e NGF). Tais mensurações serão realizadas e comparadas nos dois grupos de pacientes (APGAR de 5' 6 e 7) e nos quatro tempos de coleta (nascimento, 48 horas, 72 horas, 3 semanas). Além disso, nos RN's, ao atingirem 34 semanas de IGC após a coleta dos fluidos corporais, será aplicado o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP). Participarão do estudo as crianças nascidas com idade gestacional de 28 a 34 semanas, após os responsáveis concordarem em participar deste estudo. Serão excluídas os recém-nascidos que apresentarem alguma das situações a seguir: possuir má-formação congênita, síndromes e patologias associadas; distúrbios agudos no momento da coleta; neonatos que evoluam para óbito em três semanas. Os dados obtidos serão digitados em banco de

**Endereço:** Rua Antônio Bandeira, 1060

**Bairro:** Tupi

**CEP:** 31.844-130

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3408-2249

**Fax:** (31)3408-2218

**E-mail:** lep@sofiinfeldman.org.br

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/  
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL  
INTEGRAL À SAÚDE



Continuação do Parecer: 670.318

dados desenvolvido no programa SPSS versão 18.0 e os resultados descritivos serão obtidos através da listagem e frequência das características das diversas variáveis e do cruzamento de algumas características através de tabelas de contingência. Serão obtidos dados demográficos e clínicos dos recém-nascidos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Será assegurada a garantia do anonimato e a decisão de participar ou não do estudo sem prejuízo para a assistência recebida na instituição. Os riscos para a coleta de material serão os mesmos aos quais os recém-nascidos estarão sujeitos na assistência. Em relação à escala não há risco uma vez que envolve observação e manuseios específicos realizados por profissional capacitado e treinado para tal.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O trabalho encontra-se bem fundamentado e com metodologia adequada ao objetivo do estudo. O delineamento da pesquisa permite a sua execução conforme previsto pelos pesquisadores

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

O TCLE encontra-se adequado conforme a legislação que regulamenta a pesquisa com seres humanos.

**Recomendações:**

não se aplica

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

Projeto em condições de ser aprovado pelo CEP/ HSF

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer de Relator 26/2014 CAAE: 30382114.9.3001.5132

**Endereço:** Rua Antônio Bandeira, 1060

**Bairro:** Tupi

**CEP:** 31.844-130

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3408-2249

**Fax:** (31)3408-2218

**E-mail:** lep@sofiinfeldman.org.br

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/  
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL  
INTEGRAL À SAÚDE



Continuação do Parecer: 670.318

(favor citar esse número em suas comunicações com o CEP/HSF)

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sofia Feldman (CEP/HSF) analisou em plenária realizada no dia 29 de maio de 2014, o Projeto de Pesquisa intitulado: "Avaliação da asfixia perinatal e da resposta imunoinflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor" dos Pesquisadores Ana Cristina Simões e Silva e Rafael Coelho Magalhães e o considerou APROVADO como Insituição Co-participante.

Reafirmamos que o relatório final deverá ser encaminhado ao CEP/HSF ao término do estudo, para fins de conclusão do processo.

Atenciosamente.

Atenciosamente.

Dra. Tatiana Coelho Lopes  
Coordenadora do CEP/HSF

Belo Horizonte, 02 de Junho de 2014.

**Endereço:** Rua Antônio Bandeira, 1060  
**Bairro:** Tupi **CEP:** 31.844-130  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3408-2249 **Fax:** (31)3408-2218 **E-mail:** lep@sofiinfeldman.org.br

## ANEXO 4 – ATA DE DEFESA

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR</p>	
---	--	---

### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO RAFAEL COELHO MAGALHÃES - 2014651080

Realizou-se, no dia 23 de julho de 2015, às 09:00 horas, Faculdade de Medicina, sala 062, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Resposta inflamatória como fator preditivo de alterações no desenvolvimento motor em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional.*, apresentada por RAFAEL COELHO MAGALHÃES, número de registro 2014651080, graduado no curso de TERAPIA OCUPACIONAL, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Natália Pessoa Rocha (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo (Universidade Federal de Uberlândia).

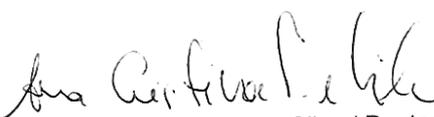
A Comissão considerou a dissertação:

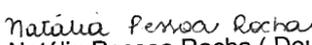
Aprovada

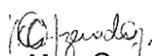
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de julho de 2015.

  
Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva (Doutora)

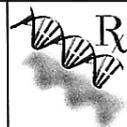
  
Prof(a). Natália Pessoa Rocha (Doutora)

  
Prof(a). Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo (Doutora)

## ANEXO 5 – FOLHA DE APROVAÇÃO



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



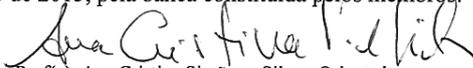
### FOLHA DE APROVAÇÃO

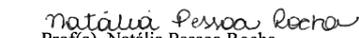
**Resposta inflamatória como fator preditivo de alterações no desenvolvimento motor em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional.**

### RAFAEL COELHO MAGALHÃES

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

Aprovada em 23 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof(a). Natália Pessoa Rocha  
Universidade Federal de Minas Gerais

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

Belo Horizonte, 23 de julho de 2015.

## APÊNDICE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS LEGAIS

Você está sendo convidada a participar do trabalho de pesquisa denominado **“Avaliação da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor”**, conduzido pela Dra Ana Cristina Simões e Silva e pelo terapeuta ocupacional Rafael Coelho Magalhães.

Este estudo quer medir algumas substâncias que podem estar no sangue de seu (ua) filho (a) e podem ter relação com problemas do desenvolvimento do cérebro após o nascimento. Para realizar este estudo serão avaliadas crianças nascidas no Hospital Sofia Feldman com idade gestacional entre 28 e 34 semanas e divididas em dois grupos de acordo com as condições de nascimento e a pontuação obtida em uma escala chamada de APGAR. Esta escala de APGAR mostra a avaliação feita pelo pediatra logo após o nascimento de seu (ua) filho (a) ainda na sala de parto. A escala de APGAR indica como seu (ua) filho (a) nasceu, ou seja, se estava passando bem, com a pele rosada, ativo, se chorou rapidamente ou estava com dificuldade de respirar, com a pele muito branca ou de cor roxa e mexendo muito pouco.

Caso você aceite que seu (ua) filho (a) participe deste estudo serão feitos os seguintes procedimentos:

- 1 – Será coletado sangue do cordão umbilical após o nascimento;
- 2- Serão coletadas amostras de 1 ml de sangue da veia quando seu (ua) filho (a) completar um dia de vida, 3 dias de vida e três semanas de vida. Estas coletas serão feitas juntamente com outras coletas de sangue que são feitas de rotina em bebês prematuros.
- 3- Serão realizados exames de rotina para avaliação do desenvolvimento de seu (ua) filho (a) que incluem: Ultrassom Transfontanela, Ecocardiograma, Exame de Fundo de Olho, Triagem Auditiva e Teste de Desenvolvimento Motor (TIMP).

Você foi convidada para participar dessa pesquisa porque o seu filho nasceu com idade gestacional entre 28 e 34 semanas, está em acompanhamento no Hospital Sofia Feldman e a sua participação só poderá acontecer de forma voluntária sem nenhuma compensação financeira. Você tem o direito de recusar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, sem prejuízo para você e/ou para seu filho, junto ao Hospital Sofia Feldman.

Todas as informações da pesquisa são confidenciais, não havendo nenhuma identificação sua e/ou de seu (ua) filho (a). Seu nome não será escrito em nenhum protocolo. Para identificação de cada bebê que participará do estudo será utilizado um número entre 0 e 100. Após o estudo os resultados serão divulgados para fins científicos. . .

Há riscos mínimos para seu filho que são relacionados à coleta de sangue, sendo eles dor durante a coleta e hematomas após as mesmas. É importante ressaltar que esses riscos serão minimizados, pois as coletas serão realizadas por profissionais devidamente capacitados, durante procedimentos rotineiros com as crianças internadas e com todos os cuidados necessários.

Se tiver alguma dúvida, você poderá esclarecê-la com um dos pesquisadores responsáveis ou junto ao comitê de ética da UFMG ou do Hospital Sofia Feldman a qualquer momento.

Assinei e recebi uma cópia desta autorização.

Belo Horizonte, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Nome**

**(Responsável):** \_\_\_\_\_

**Assinatura**

**(responsável):** \_\_\_\_\_

**Pesquisadores responsáveis:**

Ana Cristina Simões e Silva – Médica: Avenida Professor Alfredo Balena, 190/sala 281 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-100 – [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com)  
Fone: (31) 34098073

Rafael Coelho Magalhães – Terapeuta Ocupacional – Rua Industrial José Costa 261/204, Nova Granada, Belo Horizonte – MG, 30431-330. E-mail: [rafa\\_to@hotmail.com](mailto:rafa_to@hotmail.com) Fone: (31) 84551767

**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)

**CEP - Comitê de Ética em Pesquisa (HSF)** Fone: (31)3408-2242; Endereço: Rua Antônio Bandeira 1060, Tupi – Belo Horizonte/MG; CEP:31844-130. E-mail: [lep@sofiafeldman.org.br](mailto:lep@sofiafeldman.org.br)