



## ARTIGO ORIGINAL

## Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa no liquor de recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica

*Levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in the cerebrospinal fluid of full-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy*

Rita de Cássia Silveira<sup>1</sup>, Renato S. Prociandy<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** avaliar os níveis líquóricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  em recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), comparando-os com os de recém-nascidos controles.

**Metodologia:** estudo caso-controle realizado no período de julho de 1999 a outubro de 2001, incluindo dois grupos de recém-nascidos a termo: *controle*, com 20 recém-nascidos sem sepse e/ou meningite e com escore de Apgar  $\geq 9$  no primeiro e quinto minutos de vida; e *casos*, com 15 recém-nascidos asfíxiados, caracterizados pelo escore de Apgar  $\leq 4$  e  $\leq 6$  no primeiro e quinto minutos de vida, respectivamente, pH umbilical  $< 7,20$  e/ou lactato arterial umbilical  $> 3,0$  mmol/l e necessidade de ventilação com pressão positiva pelo menos durante 2 minutos após o nascimento. Foram coletadas amostras de liquor nas primeiras 48 horas de vida, para determinação dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  pelo método de enzimoimunoensaio.

**Resultados:** os grupos não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, classificação quanto ao peso e idade gestacional, tipo de parto e tempo médio de obtenção do liquor; seus exames foram obtidos em média com 17 horas de vida. Nos recém-nascidos asfíxiados, as medianas dos níveis líquóricos foram: 157,5 pg/ml para IL-6 e 14,7 pg/ml para TNF- $\alpha$ , significativamente mais elevadas que nos controles (IL-6: 4,1 pg/ml e TNF- $\alpha$ : 0,16 pg/ml).

**Conclusões:** recém-nascidos a termo com EHI apresentaram níveis líquóricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  mais elevados que controles, possivelmente devido à produção local cerebral dessas citocinas, especialmente o TNF- $\alpha$ . Estes achados estimulam estudos futuros, utilizando bloqueadores cerebrais das ações dessas citocinas como estratégia de neuroproteção.

*J Pediatr (Rio J) 2003;79(4):297-302:* encefalopatia hipóxico-isquêmica, asfixia perinatal, interleucina-6, fator de necrose tumoral-alfa, citocinas.

### Abstract

**Objective:** to determine cerebrospinal fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in full-term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy, comparing with control infants.

**Methods:** controlled, prospective study, performed between July 1999 and October 2001 with two groups of full-term newborns: 20 controls with no sepsis and/or meningitis and Apgar score  $\geq 9$  at first and fifth minutes; and cases, 15 asphyxiated full-term newborns with Apgar  $\leq 4$  and  $\leq 6$  at first and fifth minutes, umbilical blood cord pH  $< 7.20$  and/or umbilical arterial blood lactate  $> 3.0$  mmol/L, and requiring positive pressure ventilation for at least 2 minutes after birth. Cerebrospinal fluid samples were collected within 48 hours of birth for determination of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by enzyme immunoassay.

**Results:** groups were similar concerning birthweight, gestational age, type of delivery and mean time required for cerebrospinal fluid sample collection. The samples were collected at mean with 17 hours of life. The medians cerebrospinal fluid levels in asphyxiated newborn infants were: 157.5 pg/ml for interleukin-6 and 14.7 pg/ml for tumor necrosis factor-alpha, significantly higher than the controls (interleukin-6: 4.1 pg/ml and tumor necrosis factor-alpha: 0.16 pg/ml).

**Conclusions:** full-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy present higher cerebrospinal fluid interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels than the controls, possibly because of the local cerebral production of these cytokines, especially tumor necrosis factor-alpha. These results support a recommendation for future studies with brain blockers of the actions of these cytokines for neuroprotective strategies.

*J Pediatr (Rio J) 2003;79(4):297-302:* hypoxic-ischemic encephalopathy, perinatal asphyxia, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, cytokines.

1. Doutora em Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, médica Neonatologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. Professor Titular de Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Chefe do Serviço de Neonatologia do HCPA, pesquisador 1A CNPq.

Fontes financiadoras: CNPq e FIPE-HCPA.

Artigo submetido em 12.02.03, aceito em 31.03.03.

## Introdução

Apesar dos recentes avanços na monitorização biofísica e bioquímica do feto no trabalho de parto e no parto, a asfixia perinatal ainda contribui intensamente na morbidade e mortalidade neonatal, ocorrendo em dois a cinco recém-nascidos para cada 1.000 nascimentos vivos<sup>1,2</sup>. É o resultado de diversas condições que podem interferir com a troca de gases feto-placentária, levando à hipoxemia progressiva, hipercapnia e acidose metabólica; como consequência clínica da lesão hipóxico-isquêmica no cérebro do recém-nascido, desenvolve-se a encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), manifestação clínica da asfixia perinatal mais descrita e conhecida<sup>3,4</sup>. Os mecanismos fisiopatológicos da EHI têm sido objeto de interesse recente, com a finalidade principal de desenvolver estratégias de neuroproteção a partir do conhecimento bioquímico e celular-humoral das lesões cerebrais.

Diversas evidências indicam o envolvimento da cascata inflamatória na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A reação inflamatória, acionada pela isquemia no sistema nervoso central (SNC), caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares seguidos pelos monócitos, e pela ativação da microglia. Para tanto, é necessário a expressão de moléculas de adesão específicas, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e, no SNC, são produzidas e secretadas pela microglia e pelos astrócitos<sup>5-7</sup>.

Modelos experimentais sugerem o envolvimento de diversas citocinas, principalmente interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no dano isquêmico cerebral<sup>8-12</sup>. O TNF- $\alpha$  e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) encontram-se elevados após isquemia cerebral, podendo induzir uma reação inflamatória no SNC, juntamente com a IL-6. Além disso, parecem modular diretamente o processo de apoptose das células no SNC, promovendo diferenciação, proliferação e subsequente infiltração leucocitária<sup>13,14</sup>. Em adultos, tem sido demonstrada a correlação direta entre os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no liquor e o prognóstico neurológico após isquemia cerebral aguda<sup>15</sup>.

Em recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), os níveis líquóricos de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  foram mais elevados naqueles com alterações neurológicas aos 12 meses de idade<sup>16</sup>. Martín-Ancel e colaboradores encontraram níveis de IL-6 no liquor de recém-nascidos com manifestações neurológicas graves significativamente mais elevados que nos com encefalopatia moderada ou leve, no entanto estes autores não avaliaram a concentração do TNF- $\alpha$  líquórico<sup>17</sup>. A maioria dos estudos que investigaram os mecanismos de lesão cerebral após asfixia perinatal são experimentais, sendo necessário estudos clínicos de recém-nascidos com EHI avaliando o comportamento da IL-6 e do TNF- $\alpha$  no SNC, uma vez que se acredita que essas duas citocinas sejam as mais identificadas com o processo inflamatório de hipóxia-isquemia no período neonatal.

A proposta deste estudo foi avaliar se a concentração de IL-6 e de TNF- $\alpha$  no liquor é mais elevada em recém-nascidos a termo com EHI, comparando-os com recém-nascidos normais (controles).

## Pacientes e métodos

Foi realizado um estudo caso-controle, incluindo todos os recém-nascidos a termo nascidos no centro obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e admitidos na UTI neonatal, com diagnóstico de asfixia perinatal ou com necessidade de realização de punção lombar nas primeiras 48 horas de vida, para investigação de sepse neonatal precoce, durante o período de julho de 1999 a outubro de 2001.

O diagnóstico de asfixia perinatal foi dado pela presença de no mínimo três critérios dentre os referidos abaixo; sendo obrigatória a presença dos critérios 3 ou 4<sup>1,18,19</sup>:

- 1) sinais de sofrimento fetal documentado pela monitorização intraparto (MAP), como desacelerações persistentes, bradicardia fetal sustentada ou “MAP silente”;
- 2) escores de Apgar inferior ou igual a 4 no primeiro minuto e inferior ou igual a 6 no quinto minuto;
- 3) valor de pH umbilical inferior a 7,20;
- 4) lactato de sangue arterial umbilical superior a 3,0 mmol/l;
- 5) necessidade de ventilação, com pressão positiva no mínimo durante dois minutos, para iniciar esforço respiratório. O diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica foi estabelecido pela presença de asfixia perinatal associada a manifestações neurológicas decorrentes da hipoxemia e isquemia<sup>16</sup>. EHI foi classificada de acordo com os critérios de Sarnat e Sarnat<sup>20</sup>.

O grupo controle foi constituído de recém-nascidos não-asfíxiados, com escore de Apgar  $\geq 9$  no primeiro e quinto minutos de vida, e que tiveram necessidade de exame de liquor como parte da investigação para sepse neonatal, sendo a antibioticoterapia, nestes casos, suspensa em menos de 48 horas, com boa evolução clínica. Este grupo teve hemograma e hemocultura coletados pelo médico-assistente antes de iniciar antibioticoterapia, com resultado normal, e coletaram-se exames laboratoriais, devido a uma suspeita inicial de sepse neonatal precoce.

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

Os recém-nascidos do grupo controle e os casos foram acompanhados durante a internação até o momento da alta

hospitalar, e nos casos foram realizados acompanhamento neuropediátrico, eletroencefalograma e ultra-sonografia cerebral transfontanelar.

A partir de uma amostra solicitada pela equipe assistencial, como parte da investigação rotineira do paciente, foi obtido um volume adicional de líquido, não implicando em coleta exclusivamente para a pesquisa. O líquido foi obtido pela punção lombar (500 ml de volume total) e em seguida congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram coletadas nas primeiras 48 horas de vida do recém-nascido, para dosagem posterior de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Todas as amostras foram testadas em duplicata. A técnica empregada para as dosagens de IL-6 e TNF- $\alpha$  foi ensaio imunoenzimático (Quantikine Human IL-6 e TNF- $\alpha$ , R&D Systems, Inc. MN, USA). O limite de detecção para IL-6 foi 0,7 pg/ml e para TNF- $\alpha$  0,1 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios para IL-6 e TNF- $\alpha$  inferiores a 5%. A leitura foi realizada no leitor óptico automático *Spectramax* no comprimento de onda de 570 nm.

#### Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado para um poder de 0,97 e significância de 0,05. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana e variação. Foram empregados teste de qui-quadrado na análise das variáveis categóricas, teste *t* de Student na comparação de dados paramétricos e teste de Mann-Whitney na comparação entre os níveis líquidos de ambos os grupos. O nível de significância mínima aceito foi  $p < 0,05$ .

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

#### Resultados

Foram incluídos no estudo trinta e cinco recém-nascidos ( $n=35$ ), sendo quinze casos e vinte controles. Os casos e controles não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, classificação quanto ao peso e idade gestacional, tipo de parto e tempo médio de obtenção do líquido. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao tempo de vida dos recém-nascidos, quando da realização da punção lombar para obtenção do líquido. Os dois grupos tiveram seus exames obtidos em média com 17 horas de vida, e as medianas das horas de vida dos recém-nascidos foram 8 (2-25) nos asfixiados com EHI e 10 (3-26) nos controles. Os escores de Apgar foram significativamente mais baixos nos recém-nascidos asfixiados (Tabela 1).

A coleta do líquido no grupo controle deveu-se às seguintes situações: infecção urinária materna não tratada ou tratamento incompleto em 4 recém-nascidos; ruptura prematura das membranas ovulares (tempo superior a 24 horas) em 8 recém-nascidos; febre no recém-nascido em 5 destes; e desconforto respiratório, com diagnóstico de taquipnéia transitória na evolução clínica, em 3 recém-nascidos.

**Tabela 1** - Características da população estudada

Grupo	EHI	Controle
N	15	20
Peso de nascimento (g)	$3.439 \pm 320$	$3.046 \pm 118$
Idade gestacional (semanas)	$39,6 \pm 0,9$	$38,1 \pm 0,4$
Apgar 1 minuto*	1 (0-4)	9 (9-10)
Apgar 5 minuto*	5 (0-6)	9 (9-10)
Parto vaginal	12 (80%)	14 (70%)
AIG	11 (73%)	14 (70%)
Momento da coleta (horas de vida)	8 (2-25)	10 (3-26)

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e variação.

\* $p < 0,00001$ .

AIG: adequado para idade gestacional.

Os recém-nascidos asfixiados foram classificados em três estágios da EHI, conforme critérios de Sarnat e Sarnat; encontrando EHI grau I em 8 recém-nascidos (53%), EHI grau II em 3 (20%), e EHI grau III em 4 recém-nascidos (27%). A ultra-sonografia cerebral foi realizada em todos os recém-nascidos asfixiados, evidenciando-se alteração em cinco casos (33%), e edema cerebral difuso e hipercogenicidade talâmica foram as alterações mais frequentes. Dos 14 pacientes que fizeram eletroencefalograma, seis apresentaram alterações significativas atribuíveis à EHI (43%), e o exame neurológico encontrava-se alterado na alta hospitalar ou momentos anteriores ao óbito em seis recém-nascidos. Ocorreram três óbitos, todos recém-nascidos com EHI grave. Os dados avaliados exclusivamente nos recém-nascidos com EHI encontram-se sumarizados na Tabela 2.

Os níveis de IL-6 no líquido foram significativamente mais elevados nos recém-nascidos asfixiados, quando comparados com recém-nascidos controles. Com relação a TNF- $\alpha$ , a diferença nos níveis líquidos foi ainda mais evidente, com concentrações significativamente mais elevadas nos recém-nascidos asfixiados e praticamente indetectáveis no líquido de recém-nascidos controles (Tabela 3).

#### Discussão

As citocinas têm sido implicadas em diversos mecanismos, que podem potencializar a lesão isquêmica cerebral, tais como a liberação da forma induzível da enzima óxido nítrico sintetase pelos astrócitos; o recrutamento, a ativação e a adesão leucocitárias ao endotélio; a promoção do estado pró-coagulante endotelial e a regulação do processo da apoptose. A interleucina-6 e o TNF- $\alpha$  são citocinas que participam ativamente dos mecanismos de lesão cerebral que ocorrem na asfíxia perinatal<sup>16,17,21</sup>. Os resultados do nosso estudo demonstram esses achados em recém-nascidos humanos com EHI e permitem comparar as suas concentrações líquidas com as de recém-nascidos controles. As citocinas, principalmente a IL-6, afetam a diferenciação, o crescimento e a sobrevivência *in vitro* das células neuronais,

**Tabela 2** - Características dos recém-nascidos asfisiados

Paciente	Ultra-som	EEG*	Exame <sup>†</sup>	EHI <sup>‡</sup>	pH cordão umbilical	Lac (mmol/L) cordão umbilical	Ocorrência de óbito
1	N	A	N	2	6,78		Não
2	N	N	N	1	6,99	13,9	Não
3	N		N	1	7,04	4,18	Não
4	A	A	A	3	7,08	4,61	Sim
5	N	N	A	2	6,73	4,09	Não
6	A	N	N	1	6,95	4,50	Não
7	N	N	N	1	7,05	4,81	Não
8	N	N	N	1	6,87	4,80	Não
9	A	A	A	3		8,17	Sim
10	N	N	N	1		3,87	Não
11	N	A	A	2	6,83	5,39	Não
12	N	N	N	1	7,02	4,60	Não
13	N	N	N	1	6,87	8,41	Não
14	A	A	A	3	6,64	7,47	Não
15	A	A	A	3	7,01	9,02	Sim

\* Eletroencefalograma, † Exame neurológico na alta/óbito, ‡ Grau de encefalopatia hipóxico-isquêmica, A= alterado, N= normal.

e em consequência, o cérebro do recém-nascido torna-se particularmente suscetível a alterações nas concentrações de citocinas<sup>22</sup>.

As nossas amostras foram obtidas em média com 17 horas de vida, fato de extrema relevância para o estudo porque a meia-vida das citocinas no plasma é muito curta, são produzidas e secretadas em resposta a diversos estímulos, com um pico de nível sérico muito precoce, já a meia-vida das citocinas no liquor é pouco conhecida, mas acredita-se que apresente comportamento semelhante<sup>5,6</sup>. Em adultos com acidente vascular isquêmico, foram encontrados níveis de IL-6 mais elevados no liquor que no sangue nos primeiros 2 a 3 dias após o insulto, com o tempo estes níveis se equilibraram, sugerindo produção intratecal precoce de IL-6<sup>23</sup>. A meia-vida da IL-6 no recém-nascido asfisiado é muito menor que no adulto com lesão isquêmica cerebral, provavelmente em função de diferenças nos está-

gios de maturação do sistema imune<sup>17</sup>. O TNF- $\alpha$ , por sua vez, começa a elevar-se na primeira hora após a oclusão da artéria cerebral média, com pico de resposta à isquemia em 6 a 12 horas<sup>24,25</sup>. Portanto, a preocupação de coletarmos as amostras de liquor o mais precocemente possível foi fundamental para a adequada análise dos resultados.

Nossos resultados demonstraram níveis elevados de IL-6 no liquor de recém-nascidos que sofreram asfisia perinatal, quando comparados com recém-nascidos controles. Tivemos o cuidado de excluir do grupo controle qualquer situação patológica que pudesse propiciar reação inflamatória com conseqüente elevação de citocinas no SNC. A origem exata da IL-6 na asfisia perinatal ainda permanece a definir, também não está claro onde a IL-6 participa, na degeneração ou no reparo dos neurônios após asfisia perinatal. Astrócito e microglia são possíveis fontes de IL-6 no SNC<sup>26</sup>. Os monócitos e neutrófilos, recrutados na isquemia cerebral, são capazes de produzir IL-6 em resposta ao estímulo do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ <sup>5,27</sup>. O que explica também a elevação muito significativa do TNF- $\alpha$  no liquor dos nossos recém-nascidos asfisiados.

Os recém-nascidos sujeitos à hipóxia-isquemia transitória, durante um episódio de asfisia ao nascimento, podem parecer relativamente normais logo após a reanimação na sala de parto, e apresentar evidências de lesão cerebral retardada algumas horas mais tarde, como as convulsões que ocorrem, caracteristicamente, nas primeiras 24 horas de vida<sup>28,29</sup>. Esse mecanismo de lesão cerebral retardado

**Tabela 3** - Níveis liquóricos de IL-6 e TNF- $\alpha$ 

Grupo	EHI	Controle	p
N	15	20	
IL-6 (pg/ml)	157,5 (66,8-288)	4,1 (2,5-5,8)	< 0,00001
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	14,7 (13,8-15,3)	0,16 (0-0,25)	<0,000001

Dados expressos em mediana e variação. Teste Mann-Whitney.

ainda não foi esclarecido, mas nas necropsias cerebrais de recém-nascidos que morreram por asfíxia perinatal, foram encontradas células apoptóticas. É provável que o processo bifásico da fisiopatologia da asfíxia perinatal esteja muito relacionado com os mecanismos de apoptose<sup>30</sup>. O TNF- $\alpha$  pode ser potente indutor da apoptose através da ativação da esfingomielinase, proporcionando um aumento das concentrações citosólicas de ceramida, que é potencializadora da apoptose<sup>30</sup>. Oygür e colaboradores avaliaram o valor preditivo dos níveis plasmáticos e líquóricos do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  no prognóstico de recém-nascidos a termo com EHI e ambos são bons preditores de seqüelas precoces. As concentrações do TNF- $\alpha$  no liquor logo após o insulto hipóxico foram muito elevadas nos recém-nascidos que morreram, reforçando o papel do TNF- $\alpha$  como responsável pelo processo bifásico da lesão cerebral e pelo prognóstico desfavorável, devido à sua ação indutora da apoptose em células neuronais<sup>16</sup>.

A associação entre a gravidade e frequência de óbitos com os níveis líquóricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  não foi observada porque somente três recém-nascidos evoluíram para óbito, não permitindo análise estatística. No entanto, todos óbitos apresentaram EHI grau III e níveis mais elevados desses marcadores, demonstrando uma tendência possível de ser demonstrada com um número maior de casos. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado para analisar a diferença nos níveis líquóricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  entre asfíxiados e controles, e não para estabelecer essa associação.

Interleucina-6 e TNF- $\alpha$  parecem representar um papel importante na cascata de eventos inflamatórios da asfíxia perinatal. Recém-nascidos a termo com EHI apresentaram níveis mais elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$  no liquor, atribuíveis a uma ação direta do estímulo asfíxico sobre o sistema nervoso central. A produção local cerebral do TNF- $\alpha$  e da IL-6 nos recém-nascidos que sofreram insulto hipóxico-isquêmico é provável, possibilitando estudos futuros com a finalidade de instituir novas modalidades terapêuticas, como bloqueadores cerebrais das ações dessas citocinas. Acreditamos, portanto, que este estudo contribuirá para sugerir o desenvolvimento de novas estratégias de neuroproteção em recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica.

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos professores e doutores da UFRGS: Célia Carlini e Mário Wagner, e à médica neonatologista, Clarissa Miura.

### Referências bibliográficas

- Chou YH, Tsou Yau KI, Wang PJ. Clinical application of the measurement of cord plasma lactate and pyruvate in the assessment of high-risk neonates. *Acta Paediatr* 1998;87:764-8.
- Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PA, MacDonald HM, Allan AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.
- Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: pathogenesis and outcome. *Pediatrics* 1988;82:139-46.
- Williams CE, Mallard C, Tan W, Gluckman PD. Pathophysiology of perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20(2):305-25.
- Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1997;49(5 Suppl 4):10-4.
- Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996;105:589-98.
- Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 1992;51:153-80.
- Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-100.
- Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson LA, Hahin-Zoric M, Blennow M. Enhanced expression of Interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40:603-9.
- Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of the ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1b in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:833-9.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral Interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:176-9.
- Dihne M, Block F. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 2001;889(1-2):165-73.
- Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, et al. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998;29:2622-30.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999;30:321-7.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:2325-9.
- Oygür N, Sönmez O, Saka O, Yegin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1b concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:190-3.
- Martín-Ancel A, García-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabanäs F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatrics* 1997;100:789-94.
- Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20:287-98.
- Shirey T, Pierre JS, Winkelman J. Cord lactate, pH, and blood gases from healthy neonates. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:15-9.
- Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696.
- Shalak LF, Lupton AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics* 2002;110:673-80.
- Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 2000;136:433-8.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-8.

24. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  - a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-44.
25. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676-81.
26. Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD, et al. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994;180:2297-308
27. Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
28. Rivkin MJ, Volpe JJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Semin Neurol* 1993;13:30-9.
29. Ahn OM, Korst LM, Phelan JP, Martin GI. Does the onset of neonatal seizures correlate with the timing of fetal neurologic injury? *Clin Pediatr (Phila)* 1998;37:673-6.
30. Mehmet H, Edwards AD. Hypoxia, ischaemia, and apoptosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;75:F73-5.

Endereço para correspondência:

Dra. Rita de Cássia Silveira

Rua General João Telles, 542/ 601

CEP 90035-121 – Porto Alegre, RS

E-mail: rita.c.s@terra.com.br