



Leucomalácia periventricular e correlação com citocinas pro e antiinflamatórias

Marta Lúcia Gabriel¹, Mariana Prodóssimo Sant'Anna¹, Ana Cláudia Polli Lopes¹, Vânia Belintani Piatto¹, Antônio Soares Souza¹

Resumo

Introdução: Polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e antiinflamatórias (IL-10) intensificam a resposta inflamatória, após anóxia, aumentando as afecções decorrentes da síndrome hipóxico-isquêmica como a leucomalácia periventricular (LPV). **Objetivos:** Investigar a associação entre ambos os polimorfismos inflamatórios (-1031T/C no gene TNF- α e -511C/T no gene IL-1 β) e o antiinflamatório (-1082G/A no gene IL-10) e a etiopatogênese/risco da LPV em neonatos com esta afecção. **Material e Métodos:** Estudo prospectivo de casos-controle em 50 neonatos prematuros e a termo (Grupo Casos) e em 50 neonatos a termo (Grupo Controle), de ambos os sexos. DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico e a análise molecular realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase/Análise de Restrição Enzimática (PCR/RFLP). **Resultados:** A idade gestacional média entre casos e controles foi, respectivamente, de 31,0 semanas e 39,4 semanas ($p < 0,0001$). O peso médio, em gramas, foi de 1561,1 para os casos e 3509,9 para controles ($p < 0,0001$). Foi encontrada associação entre o genótipo TC (produtor intermediário de citocina inflamatória) (OR: 2,495; IC95%: 1,10-5,63; $p = 0,043$) assim como entre os genótipos TC+CC (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR: 2,471; IC95%: 1,10-5,55; $p = 0,044$) no gene TNF- α e o risco de LPV. Estatisticamente significativa associação foi encontrada entre os genótipos (CT+TT) (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR: 23,120; IC95%: 1,31-409,4; $p = 0,003$) no gene IL-1 β e o risco de LPV. No gene IL-10, foi encontrada redução significativa do risco de LPV para o genótipo GG (alto produtor antiinflamatório) (OR: 0,07407; IC95%: 0,02-0,34; $p < 0,0001$) assim como para o alelo G (OR: 0,5098; IC95%: 0,29-0,91; $p = 0,030$). **Conclusão:** há associação entre os polimorfismos inflamatórios (-1031T/C no gene TNF- α e -511C/T no gene IL-1 β) e o risco de desenvolvimento de LPV e associação entre o polimorfismo antiinflamatório (-1082G/A no gene IL-10) na proteção ao desenvolvimento da LPV, na população estudada.

Descritores: Leucomalácia periventricular; Citocinas; Encefalopatia Hipóxico-isquêmica; Polimorfismo.

Introdução

A Leucomalácia Periventricular (LPV) é a principal lesão isquêmica cerebral não hemorrágica do prematuro, sendo o infarto e a necrose da substância branca periventricular as mais frequentes. Os principais fatores para o desenvolvimento da LPV incluem vascularização imatura no limite periventricular, ausência de auto-regulação vascular em lactentes prematuros (principalmente da substância branca) e vulnerabilidade da célula precursora oligodendroglial dependente de maturação, que é lesionada na LPV por radicais livres produzidos durante o processo de isquemia e reperfusão.^{1,3}

Recentemente foi demonstrado que polimorfismos em genes de citocinas que aumentam a intensidade da resposta inflamatória, como o -1031T/C no gene *TNF- α* e o -511C/T no gene *IL-1 β* , ou que diminuam a produção de citocinas antiinflamatórias, como o -1082G/A no gene *IL-10*, também estão associados ao aumento do risco de nascimento prematuro e todas as afecções decorrentes da síndrome hipóxico-isquêmica como a LPV.^{4,5,6}

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi investigar a associação entre os polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* , -511C/T no gene *IL-1 β* e -1082G/A no gene *IL-10* e a etiopatogênese da LPV em recém-nascidos com e sem esta afecção.

Casuística e Métodos

Foi realizado estudo de caso-controle em corte transversal

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

Os pais e/ou responsáveis foram informados sobre o estudo mediante termo de consentimento, após aprovação do Comitê de Ética (Parecer N° 216.753/2013).

O grupo com LPV foi denominado Grupo Casos e, para a seleção, foram considerados os seguintes critérios de inclusão, sendo obrigatória a presença dos critérios quatro e cinco: 1) sinais de sofrimento fetal documentado pela monitorização intraparto (MAP), como desacelerações persistentes e /ou bradicardia fetal sustentada; 2) escores de Apgar inferior ou igual a 4 no primeiro minuto e inferior ou igual a 6 no quinto minuto; 3) necessidade de ventilação, com pressão positiva no mínimo durante dois minutos, para iniciar esforço respiratório; 4) diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica estabelecido pela presença de asfixia perinatal associada a manifestações neurológicas decorrentes da hipoxemia e isquemia e, 5) diagnóstico LPV obtido por neuroimagens (US transfontanela e RM), de acordo com o protocolo de classificação.⁷

O Grupo Controle foi constituído por 50 RN a Termo, de ambos os sexos, sem quadro de encefalopatia hipóxico-

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto(FAMERP)-São José do Rio Preto-SP-Brasil.

isquêmica, Apgar maior ou igual a sete no primeiro minuto e com US transfontanela sem alterações, nascidos no mesmo período.

Para a classificação da LPV, foi utilizado o protocolo de De Vries⁷: Grau I: Hiperecogenicidade periventricular persistindo >7 dias; Grau II: Cistos localizados nos ângulos externos dos ventrículos laterais; Grau III: Cistos em toda a extensão da substância branca periventricular; Grau IV: Extensivo à substância branca subcortical.

Foram excluídos os recém-nascidos de ambos os grupos 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, presença de crises convulsivas sem relação com evento hipóxico e de etiologia não esclarecida, toxicod dependência 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 RN de ambos os grupos foram classificados, de acordo com a idade gestacional, em RN Pós-Termo (≥ 42 sem), RN Termo (38 sem a 41 sem e 6 dias), RNPT Limitrofe (36 sem a 37 sem e 6 dias), RNPT Moderado (31 sem a 35 sem e 6 dias), RNPT Extremo (22 sem a 30 sem e 6 dias).^{8,9}

Investigação molecular

Foram coletados 1,0mL de sangue total em um tubo Vacutainer[®] contendo anticoagulante (EDTA). O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue usando o *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)*TM, de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a detecção dos três polimorfismos, fragmento do DNA nuclear, que abrange a região polimórfica específica em cada gene analisado, foi submetido à técnica da PCR. Os respectivos fragmentos amplificados, posteriormente, foram submetidos à análise de restrição (RFLP). Os produtos de cada uma das seis reações da PCR-RFLP foram adicionados ao corante de frente de corrida FlashGelTM Loading Dye 5x e submetidos à eletroforese em cassetes de gel de agarose 2% no FlashGelTM DNA System para confirmar o sucesso das mesmas e o gel fotodocumentado pela FlashGelTM Camera (Lonza Group Ltd Muenchensteinerstrasse 38 CH-4002 Basel Switzerland).

Resultados

Resultados Demográficos

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

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

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

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

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

Resultados Clínicos

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

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

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

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

Resultados Ultrassonográficos

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

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

Resultados Genotípicos

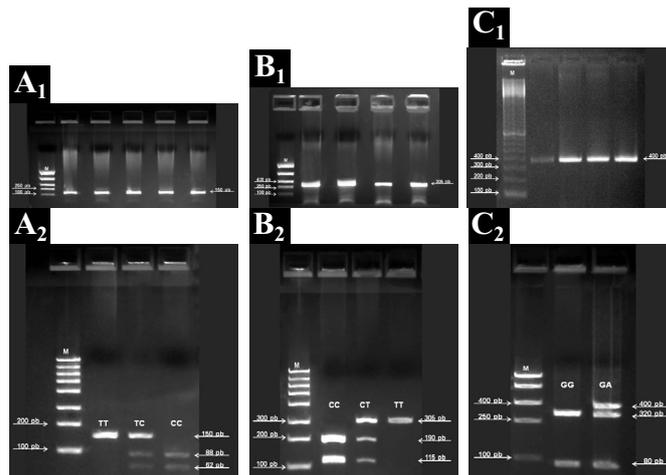


Figura 1. Imagens do produto da PCR (A₁, B₁ e C₁) e da RFLP (Digestão enzimática: A₂, B₂ e C₂) dos genes *TNF-α* (A₁, A₂), *IL-1β* (B₁, B₂) e *IL-10* (C₁, C₂). Os fragmentos amplificados são de 150, 305 e 400 pb dos genes *TNF-α*, *IL-1β* e *IL-10*, respectivamente. A reação de RPFL foi realizada dos fragmentos da região promotora dos genes *TNF-α*: 150, 88 e 62 pb; *IL-1β*: 305, 190 e 115 pb; e, *IL-10*: 400, 320 e 80 pb. As reações foram realizadas em gel de agarose 2%. As abreviações indicam: A₂- TT, homocigoto selvagem; TC, heterocigoto; CC, homocigoto polimórfico. B₂- CC, homocigoto selvagem; CT, heterocigoto; TT, homocigoto polimórfico. C₂- GG, homocigoto selvagem; GA, heterocigoto.

O risco de LPV foi significativamente associado: no gene *TNF-α* - ao genótipo TC (produtor intermediário de citocina inflamatória) (OR: 2,495; IC95%: 1,10-5,63; $p=0,043$) assim como aos genótipos TC+CC (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR: 2,471; IC95%: 1,10-5,55; $p=0,044$). No gene *IL-1β* - aos genótipos (CT+TT) (produtores inflamatórios intermediário+alto) (OR: 23,120; IC95%: 1,31-409,4; $p=0,003$). A Redução significativa ao risco de LPV foi associada: no gene *IL-10* - ao genótipo GG (alto produtor antiinflama-tório) (OR: 0,07407; IC95%: 0,02-0,34; $p<0,0001$) assim como ao alelo G (OR: 0,5098; IC95%: 0,29-0,91; $p=0,030$).

Conclusão

A análise molecular em RNPT e RNT permitiu verificar que, nesta população: 1) os polimorfismos -1031T/C no gene *TNF- α* e -511C/T no gene *IL-1 β* estão associados ao risco de LP; e, 2) o polimorfismo -1082G/A no gene *IL-10* está associado ao fator de proteção ao desenvolvimento de LPV.

Referências

1. Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rodees PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res*. 2001;898:126-35.
2. Procyanoy RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-iscêmica. *J Pediatr* 2001. 77 Supl 1:63-70.
3. Distefano G, Praticò AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr* 2010;16;36:63. doi:10.1186/1824-7288-36-63.
4. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet* 2006;15:519-29.
5. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation - the role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;141:3-9.
6. Vidak HK, Ivkovic TC, Jokic M, Spaventi R, Kapitanovic S. The association between proinflammatory cytokine polymorphisms and cerebral palsy in very preterm infants. *Cytokine* 2012;58:57-64.
7. de Vries LS, Eken P, Dubowitz LM. The spectrum of leukomalacia using cranial ultrasound. *Behav Brain Res* 1992;49:1-6.
8. Adcock K, Hedberg C, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. The TNF-alpha -308, MCP-1 -2518 and TGF-beta1 +915 polymorphisms are not associated with the development of chronic lung disease in very low birth weight infants. *Genes Immun* 2003;4:420-6.
9. Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. WHO Media Centre. [homepage na internet] Preterm birth. 2014; [acesso em set 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>.