

## ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZMA U GENU ZA INTERLEUKIN 6 SA NASTANKOM CEREBRALNE PARALIZE KOD DECE SA HIPOKSIČNO-ISHEMIJSKOM ENCEFALOPATIJOM NA ROĐENJU

## ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS IN INTERLEUKIN-6 WITH THE OCCURRENCE OF CEREBRAL PALSY IN CHILDREN WITH HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY ON BIRTH

Dunja Putniković<sup>1</sup>, Aleksandra Pančurov<sup>1</sup>, Matija Radojević<sup>1</sup>, Nataša Cerovac<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd, Srbija

**Correspondence:** putnikovicc@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** Hypoxic-ischemic Encephalopathy (HIE) is one of the most common neurologic diseases in children and an important cause of cerebral palsy (CP). It is a permanent, non-progressive motor disorder that results in a delay in psychomotor development. Brain damage is followed by the activation of the immune system, and increased cytokine concentration in the plasma. Cytokines are circulating soluble proteins, mediators of communication for immune cells. The main biological activity of interleukin-6 (IL-6) is the stimulation of the liver to produce acute-phase proteins.

**Aim:** The frequency of genotypes and alleles of the *IL-6* gene polymorphism will be determined, analyzing the possible connection between *IL-6* gene polymorphism and the onset of CP.

**Material and methods:** This study involved 117 newborns who were treated in the Clinic of Neurology and Psychiatry for Children and Youth and the Clinic for Gynecology and Obstetrics of the University Clinical Centre of Serbia in Belgrade. Data was collected for each patient regarding their gender, gestational age, birth weight and Apgar score. Genotyping of rs1800795 in the *IL-6* gene was performed by real-time PCR using a standardized TaqMan SNP assay. The difference in frequency of genotypes and alleles was analyzed by the  $X^2$  test.

**Results:** The frequencies of genotypes in patients with CP were: 86.5% for GC + GG and 13.5% for CC, and in patients without CP were: 84.6% for GG + GC and 15.4% for CC. The frequency of alleles in patients with CP for G allele was 63.5% and for C allele 36.5%. In the group without CP, 56.2% had G allele and 43.8% C allele. No statistical significance has been demonstrated.

**Conclusion:** No connection between *IL-6* gene polymorphism with the development of cerebral palsy in newborns diagnosed with HIE at birth was demonstrated.

### Keywords:

hypoxic-ischemic encephalopathy, cerebral palsy, interleukin-6

## Sažetak

**Uvod:** Hipoksično-ishemijska encefalopatija (HIE) ubraja se u najčešće neurološke poremećaje novorođenčadi i važan je uzrok cerebralne paralize (CP). Cerebralna paraliza je trajni neprogresivni poremećaj motoričkih funkcija i dovodi do poremećaja u usvajanju miljokaza psihomotornog razvoja. Aktivacija imunskog sistema prati moždano oštećenje, što rezultira rastom vrednosti citokina u plazmi ovih pacijenata. Citokini su cirkulišući solubilni proteini, medijatori komunikacije ćelija imunskog sistema. Glavni biološki efekat interleukina 6 (IL-6) jeste stimulacija jetre da sintetiše proteine akutne faze zapaljenja.

**Cilj:** U našem radu ćemo u ispitivanoj grupi novorođenčadi odrediti učestalost genotipova i alela *IL-6* polimorfizma i ispitati moguću povezanost ovog polimorfizma sa razvojem CP.

**Materijal i metode:** U studiji je učestvovalo 117 dece. Pacijenti su se lečili u Klinici za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu i Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Prikupljeni su podaci o polu, nedelji gestacije, porođajnoj telesnoj masi i vrednosti Apgar skrora. Genotipizacija rs1800795, u genu za *IL-6*, izvršena je metodom polimerazne lančane reakcije (PCR) u realnom vremenu korišćenjem standardizovanog *TaqMan SNP* eseja. Razlika u učestalosti genotipova i alela analizirana je  $X^2$  testom.

**Rezultati:** Učestalosti genotipova kod pacijenata sa CP su 86,5% za GC + GG i 13,5% za CC, a bez CP iznosi 84,6% za GG + GC i 15,4% za CC. Učestalost alela kod dece sa CP za G-alel iznosi 63,5%, a za C-alel 36,5%. Kod pacijenata bez CP učestalosti su 56,2% za G-alel i 43,8% za C-alel. Nije dokazana statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između ispitivanih grupa.

**Zaključak:** U našoj studiji nije pokazana statistička značajnost u povezanosti rs1800795 polimorfizma *IL-6* gena sa nastankom CP kod dece sa HIE.

### Ključne reči:

hipoksično-ishemijska encefalopatija, cerebralna paraliza, interleukin 6

## Uvod

Cerebralna paraliza (CP) je neprogresivno trajno oštećenje nezrelog mozga deteta do koga dolazi u toku trudnoće, porođaja ili nakon njega. Uzrokovano je poremećenom razmenom gasova, kiseonika i ugljen-dioksida između majke i fetusa. Posledično se ispoljava usporenim usvajanjem miljokaza psihomotornog razvoja kod deteta (1).

Prevalencija oboljenja u razvijenim zemljama iznosi 2,1 na 1.000 živorođene dece (2). S obzirom na ograničenje u motornom i mentalnom funkcionisanju dece sa CP, ova bolest predstavlja važan zdravstveni, socijalni i društveni problem. Najčešće je uzrokovana prematuritetom (usled intraventrikularne hemoragije - IVH) ili hipoksično-ishemijskom encefalopatijom (HIE) (1). Hipoksično-ishemijska encefalopatija predstavlja oštećenje perinatalnog mozga usled nedostatka kiseonika u tkivu do koga dolazi ili usled hipoksemije (smanjene koncentracije kiseonika) i/ili ishemije (smanjene perfuzije krvi) u mozgu (3). Perinatalna asfiksija je u većini slučajeva uzrok nastanka hipoksije ili ishemije (1). Perinatalno moždano oštećenje aktivira imunski sistem i medijatore inflamacije, poput citokina i hemokina, koji zajedno sa slobodnim kiseoničkim radikalima i azot-monoksidom doprinose ekscitotoksičnoj kaskadi (4, 5). Njihove vrednosti u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti kod novorođenčadi sa asfiksijom ukazuju da je oštećen mozak izvor značajno povišenih nivoa citokina. Navedenoj grupi pripada i interleukin 6 (*IL-6*) (5). Polimorfizmi u genima za proinflamatorne citokine, uključujući i *IL-6*, mogu

uticati na njihovu koncentraciju u krvi i drugim telesnim tečnostima i biti povezani sa neurodegenerativnim ili neuroprotektivnim efektom nakon moždane asfiksije (6), tj. mogu biti povezani sa pojavom CP.

Interleukin 6 je sagrađen od 212 aminokiselina i njegov gen se nalazi na hromozomu 7 u regionu 7p21 (7). Produkuju ga makrofagi, T-ćelije, endotelne ćelije, fibroblasti, mezenhimalne ćelije i mnoge druge, kao odgovor na specifične stimulse (8).

Cilj ovog rada je analiziranje povezanosti pojedinih genotipova i alela *IL-6* polimorfizma sa nastankom CP kod dece koja su pretrpela HIE.

## Materijal i metode

U studiji je učestvovalo 117 dece sa dijagnozom HIE. Pacijenti su se lečili u Klinici za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu i Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Uz neurološki pregled, prikupljeni su podaci o polu, gestacijskoj starosti izraženoj u nedeljama gestacije (NG), porođajnoj telesnoj masi (PTM) i vrednosti Apgar skrora u petom minutu života (AS5').

Pacijentima je takođe urađen neuroimidžing koji je obuhvatao ultrazvuk (UZ), kompjuterizovanu tomografiju (CT) i magnetnu rezonancu (MR), na osnovu kojih je postavljena dijagnoza HIE ili IVH. Blaži oblik odstupanja su činili HIE I stepena i IVH I i II stepena, dok su teži oblici patološkog nalaza bili HIE II i III stepena i IVH III i IV stepena.

Sva deca su na rođenju imala biohemijske parametre

za hipoksiju-ishemiju u smislu postojanja umbilikalne arterijske acidemije koja je podrazumevala pH manji od 7 i/ili bazni deficit veći od 12 mmol/L. Takođe su kod svih ispitanika isključeni drugi potencijalni uzroci neonatalne encefalopatije poput neonatalne sepse, intrauterinog zastoja u rastu ili hroničnih oštećenja placente.

Sva deca su praćena do uzrasta između 3 i 7 godina, kada su na osnovu neurološkog pregleda podeljena u dve grupe – decu sa urednim neurološkim razvojem i onu sa pojavom CP. U okviru grupe dece sa cerebralnom paralizom bili su prisutni sledeći oblici bolesti: 1) spastični; 2) diskinetički; 3) ataksični i 4) hipotonični.

Molekularno-genetička ispitivanja realizovana su u Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uzorak za studiju je bila periferna krv, iz čijih limfocita je izolovana genomska DNK pacijenta standardnom metodom izolovanja po Mileru (*Miller*).

Metodom polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (engl. *real time PCR* - RT-PCR) urađena je genotipizacija na lokusu rs1800795, uz upotrebu komercijalnog *TaqMan* eseja. Navedena metoda je zasnovana na standardnoj PCR metodi. Posle svakog PCR ciklusa merena je dinamika amplifikacije, čime je obezbeđena pouzdana kvantifikacija. Detekcija je omogućena upotrebom fluorescentno obeleženih proba koje emituju fluorescenciju. Za detekciju polimorfizma koji potiče od razlike u jednom nukleotidu koristile su se dve *TaqMan* probe, koje su na 5' kraju obeležene različitim reporterskim bojama (VIC i FAM), a na njihovom 3' kraju se nalazio prigušivač koji sprečava fluorescenciju. Jedna od proba se po principu komplementarnosti vezuje za ciljnu DNK sekvencu. Istovremeno dok Taq polimeraza dodaje nukleotide, sa DNK matrice se uklanja *TaqMan* proba, što dovodi do udaljavanja prigušivača i reportera i, posledično, do registrowanja fluorescencije odgovarajuće boje. Aparat detektuje jednu boju, što ukazuje na homozigotno stanje ili smešu dve boje što ukazuje na heterozigotno stanje analiziranog alela. Polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu sprovedena je na uređaju *ABI Prism 7500 Real-Time PCR system* (*Applied Biosystems, U.S.A.*). Statistička obrada podataka učinjena je u SPSS programu (softver 21). Atributivne varijable prikazane su brojevima i procentima, dok su kontinuirane varijable prikazane srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. Razlika učestalosti genotipova i alela obrađena je  $X^2$  testom. Statistička značajnost definisana je kao p-vrednost manja od 0,05.

## Rezultati

U našem istraživanju učestvovalo je 117 pacijenata, 52 (44,4%) ženskog i 65 (55,6%) muškog pola. Kliničke karakteristike pacijenata prikazane su u **tabeli 1**. Cerebralnu paralizu je ispoljilo ukupno 52 (44,4%) dece. Pacijenti sa CP su imali statistički značajno veću PTM ( $p=0,023$ ), kao i NG ( $p=0,006$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

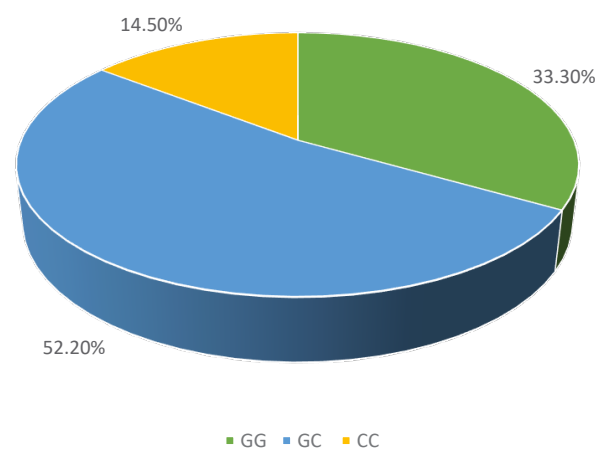
Genotip GG je detektovan kod 39 ispitanika (33,3%), GC kod 61 (52,2%) i CC kod 17 (14,5%). Učestalost genotipova je formirana po recesivnom modelu.

**Tabela 1.** Kliničke karakteristike ispitanika.

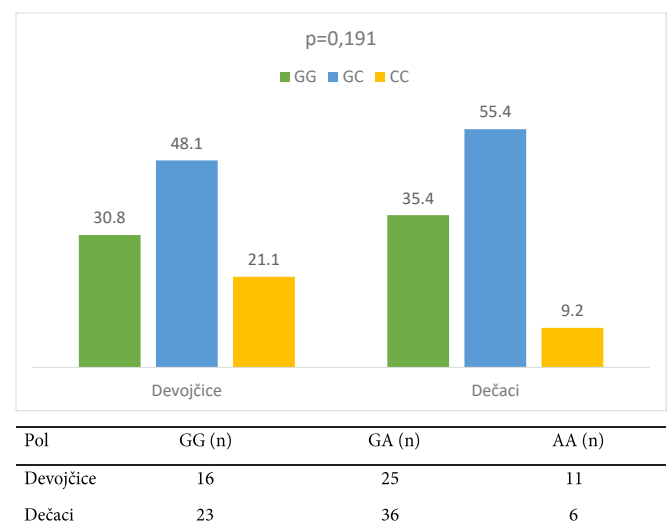
Kliničke karakteristike	Sa CP n = 52	Bez CP n = 65	p-vrednost
Pol m/ž	30/22	35/30	0,677
NG (nedelje)*	35,26 ± 4,65	32,77 ± 4,79	<b>0,006</b>
PTM (g)*	2571,32 ± 1040,34	2162,31 ± 968,18	<b>0,023</b>
AS5*	6,24 ± 2,42	5,93 ± 2,33	0,501

\*srednja vrednost ± standardna devijacija.

Učestalost G-alela bila je 59,4%, dok je učestalost C-alela iznosila 40,6%. Distribucija genotipova rs1800795 *IL-6* gena je prikazana na **grafikonu 1 i 2**.



**Grafikon 1.** Učestalost genotipova *IL-6-174 G/C* polimorfizma kod svih ispitanika.



**Grafikon 2.** Učestalosti genotipova *IL-6-174 G/C* polimorfizma po polovima.

Nema statistički značajne razlike u učestalosti genotipova *IL-6-174 G/C* polimorfizma između dečaka i devojčica ( $p=0,191$ ). Nije dokazana ni statistički značajna razlika u učestalosti udruženih genotipova po recesivnom modelu *IL-6-174 G/C* polimorfizma između dečaka i devojčica ( $p=0,069$ ).

**Tabela 2.** Kliničke karakteristike sve ispitivane dece u zavisnosti od IL6-174 G/C genotipova i udruženih genotipova po recesivnom modelu.

Kliničke karakteristike	GG	GC	CC	p-vrednost	GG + GC	CC	p-vrednost
NG (nedelje)	34,01 ± 4,71	33,94 ± 5,04	33,53 ± 5,07	0,986	33,97 ± 4,8	33,53 ± 5,07	0,896
PTM (g)	2440,77 ± 1109,10	2301,47 ± 980,16	2335,29 ± 989,39	0,887	2355,80 ± 1029,11	2335,29 ± 989,39	0,905
AS5'	6,16 ± 2,47	6,11 ± 2,44	5,76 ± 1,95	0,676	6,13 ± 2,44	5,76 ± 1,95	0,066

**Tabela 3.** Ispitivanje razlike učestalosti genotipova, udruženih genotipova po recesivnom modelu i alela *IL-6-174 G/C* polimorfizma između grupa sa i bez CP.

<i>IL-6-174 G/C</i>	Sa CP n = 52	Bez CP n = 65	p-vrednost
GG	21	18	
%	40,4	27,7	
GC	24	37	0,348
%	46,2	56,9	
CC	7	10	
%	13,5	15,4	
GG + GC	45	55	
%	86,5	84,6	0,769
CC	7	10	
%	13,5	15,4	
G	66	73	
%	63,5	56,2	0,285
C	38	57	
%	36,5	43,8	

Ispitanici GG genotipa imaju veće vrednosti NG ( $p=0,896$ ), PTM ( $p=0,905$ ) i AS5' ( $p=0,066$ ) od nosilaca C-alela, ali ove razlike nisu bile statistički značajne (tabela 2).

Učestalost alela kod pacijenata sa CP za G-alel iznosi 63,5% i za C-alel 36,5%. Kod pacijenata bez CP učestalosti su 56,2% za G-alel i 43,8% za C-alel. Učestalosti genotipova kod pacijenata sa CP su 86,5% za GC+GG i 13,5% za CC, a bez CP učestalost genotipova iznosi 84,6% za GG+GC i 15,4% za CC. Neurološke komplikacije, u zavisnosti od *IL-6* genotipa i alela, prikazane su u tabeli 3. Nije uočena statistički značajna povezanost između neuroloških komplikacija i određenog *IL-6* genotipa/alela (tabela 3).

## Diskusija

Incidencija CP se ne smanjuje poslednjih nekoliko decenija. Uloga medijatora inflamacije u patogenezi nastanka moždanog oštećenja koje je u osnovi cerebralne paralize ukazuje na postojanje genetičke predispozicije ka nastanku ovog oboljenja kod novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom. Posledično je i genska regulacija neuroinflamacije važan biološki faktor rizika za nastanak oštećenja mozga i CP tokom asfiksije, mada i dalje nedovoljno istražena (9). Cerebralna paraliza je kompleksna bolest kojoj doprinosi i interakcija između gena koji nose rizik za CP i faktora sredine (10).

Glavni citokini koji učestvuju u inflamatornom odgovoru u sklopu HIE su IL-1, IL-6, IL-10, faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ), a visok nivo ovih citokina u oksidativnom stresu korelira sa težinom oboljenja (11).

Interleukin 6 je identifikovan kao važan činilac u tkivnoj regeneraciji, inflamaciji i odbrani od patogena. Značajno povećanje u ekspresiji i sekreciji je zapaženo u različitim neurološkim oboljenjima, poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti, tumora mozga, multiple skleroze i cerebralne ishemijske. Nedostatak IL-6 igra bitnu ulogu u inflamaciji i neuroprotekciji (6).

U našem istraživanju, ispitivali smo povezanost polimorfizma za IL-6 sa nastankom CP kod dece sa HIE. Takođe smo ispitivali kliničke karakteristike dece (pol, NG, PTM i AS5'). U istraživanju je učestvovalo 117 ispitanika, 52 ženskog i 65 muškog pola. Upoređivanjem kliničkih karakteristika pacijenata sa CP i kontrolne grupe dobijena je statistička značajnost u pogledu NG i PTM. Ispitanici sa CP su rođeni u kasnijoj NG ( $p=0,006$ ) i imali su veću PTM ( $p=0,023$ ) u odnosu na ispitanike bez CP.

U studiji Jeuda (Joud) et al (12) 70,3% ispitivane dece sa CP je rođeno u terminu ( $\geq 37$  NG) a 29,7% je rođeno pre termina. U grupi terminske novorođenčadi, smanjena PTM je identifikovana kao faktor rizika za nastanak CP, kao i manji AS5'. S druge strane, u grupi prevremeno rođene dece samo je PTM identifikovan kao faktor rizika (12). Prematuritet i manja PTM su i u drugim studijama

bile potvrđeni faktori rizika za CP, a učestalost i težina oboljenja su bili u korelaciji sa NG, tj. što je ona manja, neurološki poremećaji su bili teži (13). U našem istraživanju, deca sa CP su, u odnosu na decu bez CP, imala veću PTM i rođena su u kasnijoj NG, što je u suprotnosti sa većinom studija (12). Međutim, pojedini radovi navode veću učestalost CP kod dece rođene u terminu ili malo pre termina, kao i kod dece sa većom PTM (14). Objašnjenje za ova-ke zaključke, koji se podudaraju i sa našim rezultatima, moglo bi se naći u fenomenu plastičnosti nezrelog mozga koji ima veću sposobnost oporavka nakon dejstva štetnih agensa, tj. u ovom slučaju hipoksije i ishemije. Nismo dokazali statistički značajnu vezu CP i AS, što je razumljivo s obzirom na subjektivnost i individualne razlike u davanju ove ocene od strane različitih ispitivača.

Pojedine studije su pokazale veću učestalost razvoja CP kod dece muškog pola, pogotovo ako su rođeni u rani-joj NG (16). Naša studija nije pokazala statističku značaj-nost između polova ispitivane dece.

Supstitucija G u C na mestu -174 u promotorskoj re-giji u genu za IL-6 smanjuje *in-vitro* transkripciju navede-nog interleukina i povezana je sa brojnim inflamatornim oboljenjima (15). Kod naših pacijenata, kao najučestaliji genotip pokazao se GC (52,2%), zatim GG (33,3%) i najre-đi CC (14,5%). Nije uočena statistička značajnost u distri-buciji ovih genotipova kod dece sa i bez CP.

Dalje smo analizirali učestalost pojedinačnih alela (G-alel 59,4% i C-alel 40,6%) u grupi ispitanika, bez do-kazane statističke značajnosti pri poređenju posmatrane i kontrolne grupe. Nije uočena ni statistički značajna po-vezanost kliničkih karakteristika i određenog genotipa ili alela.

Studija Silveire (*Silveira*) i Proćanoja (*Proćanoy*) (16) vršila je procenu koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u cere-brospinalnoj tečnosti novorođenčadi sa HIE, a rezultati su pokazali povećane nivoe ovih medijatora u odnosu na kontrole. *Ancl et al.* (16) su 1997. godine, posmatranjem 20 novorođenčadi sa HIE i merenjem koncentracije IL-6, ustanovili da je veličina odgovora IL-6 srazmerna težini bolesti i udružena je sa lošijom prognozom (16).

Razumevanje dinamike odnosa između gena i fak-tora sredine u nastanku CP predstavlja jedan od nedovolj-no razjašnjenih problema u savremenoj medicini.

## Zaključak

U našoj studiji nije pokazana statistička značajnost u povezanosti polimorfizma u genu za IL-6 sa nastankom CP kod dece sa HIE. Budući da je ispitivanje vršeno na malom broju ispitanika, predlažemo dalje ispitivanje na većem uzorku.

## Literatura

1. Apostolski A, Bulat P, Bumbaširević Lj, Cerovac N, Dragašević N, Jančić J, et al., urednici. Neurologija: za studente medicine. 3. izd. Beograd:Medicinski fakultet u Beogradu; 2020.
2. Novak I, Morgan C, Adde L, Blackman J, Boyd RN, Brunstrom-Hernandez J, et al. Early, Accurate Diagnosis and Early

- Intervention in Cerebral Palsy: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA Pediatr.* 2017; 171(9):897-907.
3. Zhu Y, Yun Y, Jin M, Li G, Li H, Miao P, et al. Identification of novel biomarkers for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using iTRAQ. *Ital J Pediatr.* 2020; 46(1):67.
4. Al Mamun A, Yu H, Romana S, Liu F. Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Cell Transplant.* 2018; 27(9):1328-39.
5. Papazian O. [Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy]. *Medicina (B Aires).* 2018; 78(Suppl 2):36-41.
6. Rothaug M, Becker-Paully C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863(6 Pt A):1218-27.
7. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(10):a016295.
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S, editors. *Cellular and Molecular Immunology.* 9th ed. Philadelphia:Elsevier; 2016.
9. Wachtel EV, Verma S, Mally PV. Update on the current management of newborns with neonatal encephalopathy. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2019; 49(7):100636.
10. Esih K, Goričar K, Dolžan V, Renner-Primec Z. The association between antioxidant enzyme polymorphisms and cerebral palsy after perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2016; 20(5):704-8.
11. Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh I, et al. Oxidative Stress in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12):2078.
12. Jöud A, Sehlstedt A, Källén K, Westbom L, Rylander L. Associations between antenatal and perinatal risk factors and cerebral palsy: a Swedish cohort study. *BMJ Open.* 2020; 10(8):e038453.
13. Sadowska M, Sarecka-Hujar B, Kopyta I. Cerebral Palsy: Current Opinions on Definition, Epidemiology, Risk Factors, Classification and Treatment Options. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020; 16:1505-18.
14. Nelson KB, Bingham P, Edwards EM, Horbar JD, Kenny MJ, Inder T, et al. Antecedens of neonatal encephalopathy in the Vermont Oxford Network Encephalopathy Registry. *Pediatrics.* 2012; 130(5):878-86.
15. Kuzmanić Šamija R, Primorac D, Rešić B, Pavlov V, Čapkun V, Punda H, et al. Association of NOS3 gene variants and clinical contributors of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2014; 47(10):869-75.
16. Ceccon MEJR. Interleucinasna encefalopatía hipoxico-isquemi-ca. *JPediatr (Rio J).* 2003; 79(4):280-1.