

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**USO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS HUMANOS – rhG-CSF – NO
TRATAMENTO DA SEPSE NEONATAL PRECOCE
EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS: UM
ESTUDO DUPLO-CEGO, RANDOMIZADO E
CONTROLADO POR PLACEBO**

ERNANI MIURA

Orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Medicina: Pediatria para obtenção do título
de Doutor em Medicina.

Porto Alegre, Brasil

1998

Ficha Catalográfica

M685u Miura, Ermani

Uso do fator estimulador de colônias de granulócitos - rhG-CSF - no tratamento da sepse neonatal precoce em recém-nascidos prematuros: um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo/ Ermani Miura; orient. Renato Soibermann Procianoy. – Porto Alegre : UFRGS, 1998.
109 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria.

1. Fator estimulador de colônias de granulócitos humanos. 2. Sepses : Terapia. 3. Recém-nascido. 4. Doenças do prematuro. I. Procianoy, Renato Soibermann. II. Título.

NLM: WH 200

Catlogação na fonte: Biblioteca FAMED/HCPA

*Dedico este trabalho a minha família: minha esposa
Elisabete que, com seu amor incondicional, propo-
cionou a coragem para enfrentar mais este desafio;
aos meus filhos Clarissa e Maurício, companheiros
e incansáveis colaboradores.*

Agradecimentos

- Dr. Renato Soibelman Procianoy, orientador e amigo, pela competência e objetividade;
- Dr. Robert Christensen, da Universidade de Flórida, Gainesville, pela colaboração para a realização dos testes ELISA;
- Dr. Pablo Sanchez, da Universidade de Texas - Dallas, por suas idéias e sugestões para a realização deste estudo;
- Dra. Cristina Bittar, pela inestimável e espontânea colaboração na realização das punções de medula óssea e leitura dos valores hematológicos;
- Clarissa Schreiner Miura, Maurício Schreiner Miura e Cíntia Melo, pela inestimável colaboração na coleta e armazenamento do material para as dosagens das citocinas;
- Dr. Jarbas de Oliveira, que permitiu meu contato com análises laboratoriais;
- Núcleo de Assessoria Estatística do Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do HCPA, particularmente à bióloga Dra. Luciana Bertoldi Nocchi, ao Dr. Mário Wagner e ao Prof. José Roberto Goldin;
- Colegas professores, médicos contratados, médicos residentes e grupo de enfermagem da Unidade de Neonatologia do HCPA;
- Equipe de coletadores do laboratório de análises do HCPA;
- Dras. Lisiane Dalle Mulle e Helen Zatti, ex-residentes de 3^o ano em Neonatologia da Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

1 - INTRODUÇÃO / 1

1.1 - Sepses / 2

1.1.1 - Conceito / 2

1.1.2 - Fisiopatologia / 5

1.1.3 - Clínica e Diagnóstico / 9

1.2 - Imunidade do Recém-Nascido / 10

1.2.1 - Sistema Imunológico Celular / 11

1.2.2 - Sistema Imunológico Humoral / 11

1.2.3 - Sistema Complemento / 12

1.2.4 - Sistema Fagocítico dos Granulócitos / 13

1.3 - Citocina G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos / 17

1.4 - Aplicação Terapêutica do rhG-CSF na Sepses Neonatal / 22

2 - JUSTIFICATIVA / 27

3 - OBJETIVOS / 31

3.1 - Objetivo Geral / 32

3.2 - Objetivos Específicos	/	32
4 - PACIENTES E MÉTODOS	/	33
4.1 - Delineamento do Estudo	/	34
4.2 - População	/	34
4.3 - Amostra e Amostragem	/	34
4.3.1 - Critérios de Inclusão	/	34
4.3.2 - Critérios de Exclusão	/	35
4.4 - Estudo Inicial	/	35
4.5 - Cálculo do Tamanho da Amostra	/	36
4.6 - Coleta do Material	/	36
4.6.1 - Dosagens das Citocinas	/	37
4.6.2 - Dosagens dos Neutrófilos Circulantes	/	40
4.6.3 - Dosagens dos Neutrófilos na Medula Óssea	/	40
4.7 - Produto rhG-CSF ou Placebo	/	41
4.8 - Logística	/	41
4.8.1 - Pacientes	/	41
4.8.2 - Randomização	/	42
4.8.3 - Administração do Medicamento rhG-CSF ou Placebo	/	43
4.9 - Análise Estatística	/	44
5 - RESULTADOS	/	45
6 - DISCUSSÃO	/	70
6.1 - Introdução	/	71
6.2 - Metodologia do Estudo	/	74
6.2.1 - Definição de Sepsis	/	74
6.2.2 - Objetivos	/	74
6.3 - Tamanho da Amostra	/	75

6.4 - Características Demográficas	/	76
6.5 - Efeitos do rhG-CSF sobre a Mortalidade	/	77
6.6 - Efeitos do rhG-CSF sobre a Infecção Hospitalar e Outras Complicações	/	81
6.7 - Efeitos do rhG-CSF sobre as Citocinas Hematopoéticas	/	83
6.8 - Efeitos do rhG-CSF sobre os Componentes Hematológicos	/	85
7 - CONCLUSÕES	/	91
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	/	93
ANEXOS		

Lista de Abreviaturas

GM-CSF -	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HCPA -	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IC -	Intervalo de confiança
IL-6 -	Interleucina-6
IL-1 -	Interleucina-1
IL-8 -	Interleucina-8
IgG -	Imunoglobulina G
I/T -	Relação entre neutrófilos imaturos e número total de neutrófilos
PCR -	Proteína C reativa
rhG-CSF -	Fator estimulador recombinante humano de colônias de granulócitos
RN -	Recém-nascido
RNT -	Recém-nascido a termo
RNPT -	Recém-nascido prematuro
SIRS -	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
SNC -	Sistema nervoso central
TNF- α -	Fator de necrose tumoral

Lista de Figuras

- Figura 1** - Fisiopatogenia da sepse / 9
- Figura 2** - Curva de sobrevivência dos pacientes estudados / 52
- Figura 3** - Mediana dos níveis plasmáticos do G-CSF antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo / 55
- Figura 4** - Mediana dos níveis dos leucócitos antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo / 62
- Figura 5** - Mediana dos níveis da contagem absoluta de neutrófilos antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo / 64

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Características Demográficas dos Pacientes Estudados / 46
- Tabela 2** - Fatores de Risco Materno e Manifestações Clínicas dos Pacientes Estudados / 48
- Tabela 3** - Patologias Presentes Iniciais e Complicações Posteriores dos Pacientes Estudados / 49
- Tabela 4** - Microrganismos Detectados na Sepse Precoce Inicial e Hospitalar dos Pacientes Estudados / 50
- Tabela 5** - Mortalidade até 7 Dias e 8 a 28 Dias de Vida / 51
- Tabela 6** - Causas de Óbitos / 53
- Tabela 7** - Microrganismos Detectados na Sepse Hospitalar e Patologias Predominantes / 53
- Tabela 8** - Níveis Plasmáticos do G-CSF (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 54
- Tabela 9** - Níveis Plasmáticos do GM-CSF (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 56
- Tabela 10** - Níveis Plasmáticos de TNF- α (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 57
- Tabela 11** - Níveis Plasmáticos de IL-6 antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 58
- Tabela 12** - Relação NI/NT (Neutrófilos Imaturos/Neutrófilos Totais) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 59
- Tabela 13** - Valores Hematológicos do NSP, NPP, Relação NSP/NPP e Relação M/E no 7^o Dia após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 60

- Tabela 14** - Níveis de Leucócitos Periféricos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 61
- Tabela 15** - Níveis da Contagem Absoluta dos Neutrófilos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 63
- Tabela 16** - Níveis de Eosinófilos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 65
- Tabela 17** - Níveis de Hemoglobina antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 66
- Tabela 18** - Níveis de Linfócitos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 67
- Tabela 19** - Níveis dos Monócitos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 68
- Tabela 20** - Níveis das Plaquetas antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração do rhG-CSF ou Placebo / 69

Lista de Quadros

- Quadro 1** -Terminologia para Seps e Síndrome Séptica para Lactentes e Crianças / 3
- Quadro 2** -Função dos Neutrófilos do Recém-Nascido a Termo e do Adulto Normais / 16
- Quadro 3** -Comparação entre a Expressão Gênica e Produção do Multi-CSF Neonatal e a do Adulto / 19

RESUMO

RESUMO

Objetivos: Avaliar a eficácia do uso do rhG-CSF no tratamento da sepse neonatal precoce em recém-nascidos prematuros bem como a resposta das citocinas hematopoéticas e do sistema hematológico.

Material e Métodos: Foi realizado um estudo randomizado duplo-cego. Foram incluídos recém-nascidos prematuros com menos de 5 dias de vida com diagnóstico de sepse clínica. O grupo tratamento (GT) recebeu 10 µg/kg/d de rhG-CSF, por via intravenosa, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos, e o grupo placebo (GB) recebeu o mesmo volume de placebo, também por via intravenosa, por 3 dias consecutivos. Todos os recém-nascidos foram acompanhados até o óbito ou alta hospitalar. TNF-α, IL-6, GM-CSF, G-CSF, contagem de leucócitos (CL), contagem absoluta de neutrófilos (ANC), relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais (I/T), contagem de plaquetas (CP) e concentração de hemoglobina (Hb) foram estudadas inicialmente antes da administração da primeira dose, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a primeira dose do tratamento e do placebo. Foi feita aspiração da medula óssea 7 dias após a primeira dose. A relação NSP/NPP (NSP = estoque de reserva medular de neutrófilos; NPP = estoque proliferativo medular de neutrófilos) e NSP foram avaliados. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foi obtido consentimento escrito dos pais dos pacientes.

Resultados: Quarenta e quatro recém-nascidos prematuros foram incluídos no estudo, 22 em cada grupo. Não houve diferenças entre ambos os grupos em relação a: idade gestacional média (GT: 29,4 ± 3,1; GP: 30,7 ± 2,9 semanas); média do peso ao nascer (GT:

1376 ± 491 ; GP: 1404 ± 508 g); mediana do escore de Apgar no quinto minuto de vida; mediana do escore SNAP (escore fisiológico agudo neonatal) nas primeiras 24 horas de vida (GT: 8, variação: 3 - 28; GP: 9,5, variação: 0 - 23); média do tempo de hospitalização (GT: 40; GP: 35 dias); mediana dos níveis de TNF- α , IL-6, GM-CSF, I/T, CP e Hb em todos os momentos estudados. Apesar da taxa de mortalidade nos primeiros 7 dias de vida ter sido 13,6% menor no GT (mortalidade nos primeiros 7 dias de vida = GT: 0; GP: 3) (mortalidade dos 8 aos 28 dias de vida GT: 5; GP: 3), não houve diferenças estatisticamente significativa. A incidência de infecção hospitalar durante todo o tempo de internação foi significativamente menor no GT do que no GP (GT: 2; GP: 9; p < 0,03). As medianas dos níveis de G-CSF, CL e ANC foram significativamente maiores no GT do que no GP com 24 horas (GCS = GT: 2568 pg/ml; GP: 56 pg/ml, p < 0,0001; CL = GT: 15200 mm³; GP: 8100 mm³ p < 0,005; ANC = GT: 9522 mm³; GP: 4526 mm³ p < 0,005) e 72 horas após o início do tratamento (G-CSF = GT: 129 pg/ml; GP: 37,5 pg/ml p < 0,007; CL = GT: 23100 mm³; GP: 9250 mm³ p < 0,00002; ANC = GT: 16843 mm³; GP: 4703 mm³ p < 0,00002). A média NSP e a relação NSP/NPP foi significativamente maior no GT do que no GP (NSP = GT: 58,4 ± 8%; GP: 47,8 ± 11,2% p < 0,003; NSP/NPP = GT: 4,2 ± 2,5; GP: 2,6 ± 1,2 p < 0,05).

Conclusões: A administração de rhG-CSF no tratamento da sepse neonatal precoce em recém-nascidos prematuros pode reduzir a mortalidade nos primeiros 7 dias de vida e principalmente, a incidência de infecção hospitalar. Provoca ainda um aumento na contagem de leucócitos e na contagem absoluta de neutrófilos 24 e 72 horas após o início do tratamento, e um aumento na NSP e na relação NSP/NPP 7 dias após o início do tratamento.

SUMMARY

SUMMARY

Objectives: To evaluate the efficacy of the use of rhG-CSF in the treatment of early neonatal sepsis in premature infants and to assess cytokine and hematologic values in septic premature newborn infants after treatment with rhG-CSF

Methods: A double blind randomized study was performed. Premature newborn infants were included in the study if they had a clinical diagnosis of sepsis in the first 5 days of life. Treatment group (TG) received 10 µg/kg/day of the rhG-CSF IV once a day for 3 consecutive days, and the placebo group (PG) received the same volume of placebo IV as the TG for 3 consecutive days. All the included newborns were followed up to death or hospital discharge. TNF-α, IL-6, GM-CSF, G-CSF, leucocyte count (LC), absolute neutrophil count (ANC), immature/total neutrophil ratio (I/T), platelet count (PC), and hemoglobin concentration (Hb) were studied just before administration of the first dose, 24 hours, 72 hours and 10 days after the first dose of treatment. Bone marrow aspiration was performed 7 days after the first dose of treatment. NSP (neutrophil storage pool) and NSP/NPP (neutrophil proliferative pool) ratio were evaluated. The study was approved by the ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent of the parents were obtained.

Results: Forty-four premature newborn infants were included in the study, twenty two in each group. Mean gestational ages (TG: 29.4 ± 3.1; PG: 30.7 ± 2.9 weeks), mean birth weights (TG: 1376 ± 491; PG: 1404 ± 508 grams), median Apgar scores in the fifth minutes of life, median SNAP (score for neonatal acute physiology) scores in the first 24 hours of life (TG: 8, range: 3-28; PG: 9.5, range: 0 - 23), and mean length of hospital stay (TG: 40; PG: 35) were

similar in both groups. Median TNF- α , IL-6, GM-CSF, I/T ratio, PC and Hb in all studied moments were similar in both groups. Although the survival rate in the first 7 days of life was 13.6% higher in the TG than in the PG, there was no significant statistical difference (mortality in the first 7 days of life TG = 0; PG: 3), (mortality from 8 to 28 days of life TG: 5; PG: 3). The occurrence of nosocomial infection during the whole hospital stay was significant lower in the TG than in the PG (TG: 2; PG: 9, $p < 0.03$). Median G-CSF levels, LC, and ANC were significantly higher in the TG than in PG at 24 hours (G-CSF = TG: 2568 pg/ml; PG: 56 pg/ml, $p < 0.00001$; LC = TG: 15200 mm³; PG: 8100 mm³, $p < 0.005$; ANC = TG: 9522; PG: 4526, $p < 0.005$) and 72 hours after onset of treatment (G-CSF = TG: 129 pg/ml; PG: 37.5, $p < 0.007$; LC = TG: 23100 mm³; PG: 9250 mm³, $p < 0.00002$; ANC = TG: 16843 mm³; PG: 4703 mm³, $p < 0.00002$). Mean NSP and NSP/NPP ratio were significantly higher in TG than in PG (NSP = TG: 58.4% \pm 8%; PG: 47.8 \pm 11.2%, $p < 0.003$; NSP/NPP ratio = TG: 4.2 \pm 2.5; PG: 2.6 \pm 1.2, $p < 0.05$).

Conclusions: Administration of rhG-CSF to a septic premature newborn infants may decrease the mortality in the first 7 days of life, and mainly the incidence of nosocomial infection. Also rhG-CSF administration causes an increase of LC and ANC 24 and 72 hours after onset of treatment, and an increase in NSP and NSP/NPP ratio 7 days after treatment.

INTRODUÇÃO

1

INTRODUÇÃO

1.1 - Sepses

1.1.1 - Conceito

Sepses passou a ser considerada como uma das manifestações da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) a partir da conferência da *Society of Critical Care Medicine and American College of Chest Physicians Consensus Committee*. Este novo termo é definido pelos quatro critérios clínicos maiores e que são: instabilidade térmica, taquicardia, taquipnéia e alterações significativas na contagem de leucócitos (BONE, 1991a). O termo sepses ou síndrome séptica, em seu conceito atual, é usado para descrever qualquer infecção bacteriana que apresenta um conjunto de manifestações sistêmicas de sepses clínica e que não requer a presença de hemocultura positiva (CLEMMER, 1989; BONE, 1991c; BONADIO, HENNES, SMITH, 1993; BONE, FISCHER Jr., SCCM, 1992).

No recém-nascido (RN), ainda se define a sepses como um conjunto de manifestações sistêmicas de infecção, acompanhadas de hemocultura positiva. Entretanto, como é frequente a hemocultura ser negativa na evidência desses sinais clínicos, vários autores definem a sepses clínica quando um ou mais sinais de pelo menos três das categorias a seguir descritas estão presentes:

- a) fatores de risco materno: febre, ruptura prolongada de membranas, trabalho de parto prematuro, corioamnionite ou infecção urinária;
- b) apnéia, taquipnéia, batimentos de asas de nariz, retração intercostal, cianose ou sofrimento respiratório;

- c) taquicardia, bradicardia, má perfusão periférica ou choque;
- d) irritabilidade ou letargia;
- e) hipotonia ou convulsão;
- f) distensão abdominal, vômitos, diarreia, intolerância alimentar, resíduo gástrico ou hepatomegalia;
- g) instabilidade térmica: hipertermia ou hipotermia;
- h) icterícia inexplicável;
- i) petéquias ou púrpuras (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; LLORENS-SÁEZ & McCRACKEN, 1993; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; ST GEME III & POLIN, 1996; AAP, 1997; HICKEY & McCRACKEN, 1997; REREZ & WEISSMAN, 1997; WOLACH, 1997).

As diferentes terminologias para a sepse encontram-se listadas no quadro 1.

Quadro 1 – Terminologia para Sepse e Síndrome Séptica para Lactentes e Crianças (LLORENS-SÁEZ & McCRACKEN, 1993)

TERMINOLOGIA	DEFINIÇÃO
Bacteremia	Presença de bactéria no sangue circulante confirmado por hemocultura
Sepse	Suspeita clínica de infecção e evidências de resposta sistêmica à infecção: taquicardia, taquipnéia, hipertermia ou hipotermia
Síndrome séptica	Sepse e evidências de alteração da perfusão de órgãos com pelo menos de uma das seguintes características: modificação aguda do estado mental, oligúria, aumento do lactato e hipoxemia
Choque séptico	Síndrome séptica com hipotensão responsiva à infusão intravenosa de fluidos ou intervenção farmacológica
Choque séptico refratário	Síndrome séptica com hipotensão por uma hora e que não responde à infusão intravenosa de fluidos ou intervenção farmacológica, necessitando de vasopressores
Falência multiorgânica	Qualquer combinação de coagulação intravascular disseminada (CIVD), síndrome da distrição respiratória do adulto, insuficiência renal aguda, disfunção hepatobiliar e disfunção do SNC, todas associadas com o processo séptico

A sepse neonatal pode ser classificada em duas enfermidades relativamente distintas com base no tempo de aparecimento da idade pós-natal.

A sepse neonatal de início precoce ocorre nos primeiros cinco dias de vida, é fulminante, multissistêmica, adquirida por transmissão vertical materna, e está relacionada a fatores de risco materno como febre, ruptura de membranas por mais de 24 horas, trabalho de parto prematuro e parto prematuro. As infecções na gravidez que podem levar à sepse no RN são: infecção do trato urinário, infecção intra-amniótica e vaginose bacteriana. Também contribui de forma importante a colonização vaginal pela bactéria *Streptococcus agalactiae* grupo B (GBS). Quando um recém-nascido prématuro (RNPT) adquire sepse, a taxa de mortalidade é elevada, sendo muito maior quando comparada com a mortalidade na sepse de início tardio (SIEGEL & McCracken, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCracken, 1992; MUSTAFA & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a; HICKEY & McCracken, 1997).

A sepse neonatal de início tardio ocorre após seis dias de vida, é usualmente de evolução lenta e acompanhada de infecção focal, sendo a meningite uma das mais frequentes. Sua etiologia provém da flora vaginal materna ou do ambiente hospitalar. A infecção hospitalar vem aumentando, principalmente devido ao maior tempo de sobrevivência dos RNPTs, sendo mais frequentes as várias espécies de *Candida* e germes comensais como o *Staphylococcus coagulase negativo*. A infecção está usualmente associada com o emprego de instrumentos invasivos como cateteres intravasculares e tubo endotraqueal, nutrição parenteral e uso indiscriminado de antibióticos (SIEGEL & McCracken, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCracken, 1992; MUSTAFA & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a, 1996b; HICKEY & McCracken, 1997).

A incidência da sepse neonatal varia de 1 a 20 casos por 1.000 nascidos vivos. Na era pré-antibiótica, quase todos os pacientes morriam. A mortalidade caiu significativamente

com o advento dos antibióticos e com os avanços tecnológicos e humanos de atendimento perinatal, atingindo cifras em torno de 20% a 50%. Nos últimos 15 anos, paralelamente à queda da mortalidade por enfermidades neonatais de causa não-infecciosa, houve também uma redução gradual na mortalidade por sepse, mas que estacionou num platô de aproximadamente 15% para a sepse de início tardio e de 15% a 50% para a sepse de início precoce. Esses índices são considerados intoleráveis por todos os autores (SIEGEL & McCracken, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCracken, 1992; MUSTAFA & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a, 1996b; HICKEY & McCracken, 1997).

1.1.2 - Fisiopatologia

Os achados histológicos podem ser mínimos nos casos de sepse fulminante. Quando presentes, freqüentemente refletem a existência concomitante de choque séptico. Tais achados podem incluir hemorragia medular renal, necrose cortical renal ou necrose tubular renal, hemorragia medular ou cortical adrenal, necrose hepática, hemorragia intraventricular e leucomalácia periventricular. Evidências de coagulação intravascular disseminada podem ser observadas. Na sepse de início tardio, as alterações patológicas são consistentes com achados de infecção focal como meningite, pneumonia, abscesso hepático, artrite e/ou osteomielite (KLEIN & MARCY, 1995; HICKEY & McCracken, 1997).

A vulnerabilidade do RN à infecção é facilitada por fatores como prematuridade, imaturidade do sistema imunológico, exposição a múltiplos germes no canal de parto, estresse periparto, procedimentos invasivos, patologias próprias da prematuridade e ainda exposição a microrganismos hospitalares. A mortalidade por sepse é diretamente proporcional ao grau de prematuridade, isto é, quanto maior for a prematuridade maior é a mortalidade. Deve-se considerar também a virulência do germe, que provoca uma mortalidade de 40% na sepse por

bacilo gram-negativo, 28% por fungo e em torno de 10% por cocos gram-positivos (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995). A morte ocorre em geral por insuficiência respiratória, coagulação intravascular disseminada, choque e falência de múltiplos órgãos. Quanto ao prognóstico, em um estudo foram seguidos por 2 a 6 anos os RNs sobreviventes de um episódio de sepse, o qual mostrou 22% deles com seqüelas (KLEIN & MARCY, 1995).

Dentre os fatores de risco perinatal mais importantes, ruptura prolongada de membranas associada ao trabalho de parto prematuro aumenta o risco de sepse em 7 vezes, febre materna e corioamnionite, em 4 vezes, e asfixia perinatal, em 4 vezes. Esses riscos são maiores quando o parto está associado a ausência de tratamento pré-natal, colocação de monitores invasivos e falta de assepsia. Além disso, outros fatores aumentam a incidência de sepse: sexo masculino, recente colonização vaginal materna por GBS ou herpes, gestação múltipla, uso de tubo endotraqueal e nutrição parenteral (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996).

Nos Estados Unidos está ocorrendo aumento nas taxas de mortalidade por infecção nos RNs de muito baixo peso (RNMBP) devido ao aumento do tempo de vida desses prematuros (GIBBS et al., 1992; SALZMAN et al., 1993; STOLL et al., 1996a, 1996b).

Estudos fisiopatogênicos da sepse mostram que, à semelhança do que se verifica no adulto, ocorre, no RN, SIRS que pode variar desde uma bacteremia ou síndrome séptica até um quadro mortal com choque séptico irreversível ou falência de múltiplos órgãos (JAFARI & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HICKEY & McCRACKEN, 1997). As bactérias gram-negativas, ao serem combatidas por anticorpos ou por antibióticos, desprendem endotoxinas ou produtos de parede celular que estimulam a liberação, em maior ou menor intensidade, de citocinas inflamatórias e de citocinas e enzimas ativadoras dos sistemas imunológicos celular e humoral. As células endoteliais, os macrófagos e os

monócitos geram a cascata inflamatória. As citocinas secretadas regulam a intensidade e a duração da resposta imunológica. As principais citocinas pró-inflamatórias são fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6); as estimuladoras do sistema granulopoiético, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF); e as citocinas antiinflamatórias interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e antagonista de receptor IL-1.

Clinicamente, a resposta inflamatória é caracterizada por febre, taquicardia, taquipnéia, aumento do número de leucócitos polimorfonucleares e aumento de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa, fibronectina, fibrinogênio e globulina, entre outros (CAIRO, 1993; CAIRO, 1989a; HICKEY & McCracken, 1997). Disfunções cardiorrespiratórias (taquicardia e taquipnéia), febre e/ou hipotermia e hipotensão arterial são efeitos do TNF- α , IL-1 e IL-6 (MUSTAFA & McCracken, 1992); proliferação, diferenciação, desenvolvimento e função dos neutrófilos são regulados por G-CSF e GM-CSF (CAIRO, 1989a; CAIRO, 1993).

Os neutrófilos são atraídos para os sítios de infecção através do processo de quimiotaxia para realizarem a tarefa final que é a fagocitose bacteriana. Inicialmente devem se aderir às células endoteliais e deformarem-se antes da transmigração para os sítios inflamados. Esse processo envolve uma série de complexas interações entre os vários grupos de receptores e suas ligandinas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais (CAIRO, 1993; WARDROP & HOLLAND, 1995). Há uma interação entre citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), fatores quimiotáxicos e alterações funcionais e citoesqueléticas nos neutrófilos que ocorrem no endotélio vascular, promovida por uma proteína chamada ligandina ou molécula 1 de adesão intercelular endotelial (ICAM-1). Seguem-se vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial com injúria endotelial e tecidual. Um dos locais que pode ser profundamente afetado é o miocárdio, com severa depressão miocárdica e hipotensão arterial. A abertura e a ruptura das junções celulares endoteliais atraem a migração dos granulócitos e,

sob a ação das citocinas, opsoninas e outras substâncias inflamatórias vasoativas (prostaglandinas, leucotrienes e fator de ativação plaquetária), promovem a fagocitose e a morte bacteriana. Concomitantemente, há ainda destruição dos tecidos envolvidos (CAIRO, 1989a; RODWELL et al., 1993; WARDROP & HOLLAND, 1995).

Quando ocorre um aumento exagerado nos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α , há também elevada mortalidade. As citocinas TNF- α e IL-6 mostraram ser excelentes marcadores para o diagnóstico de fase aguda na sepse neonatal devido a sua elevada sensibilidade e especificidade numa recente pesquisa realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (SILVEIRA, 1997).

Na figura 1, esquematizamos a fisiopatogenia da sepse que, inicialmente, é uma infecção localizada e para onde são atraídos os mediadores pró-inflamatórios para combater a infecção, remover os tecidos danificados e promover a reparação tecidual. Os mediadores anti-inflamatórios então apagam a resposta pró-inflamatória. Se a homeostase não é restabelecida, os mediadores são lançados na circulação, o que pode ocorrer se a infecção é severa, pois localmente, por inadequada produção de mediadores, promovem as manifestações clínicas de sepse e, eventualmente, choque e falência de órgãos. Níveis persistentes de mediadores anti-inflamatórios poderão causar anergia ou disfunção imunológica. Alguns casos têm uma reação mista, com uma flutuação entre os pró-inflamatórios e os anti-inflamatórios. Agentes anti-inflamatórios, como anticorpos monoclonais para o fator de necrose tumoral (anti-TNF), antagonista de receptor de interleucina-1 (rhIL-1ra) e fator ativador antiplaquetário (anti-PAF), são provavelmente ativos em pacientes com resposta pró-inflamatória maciça ou persistente. Agentes que estimulam o sistema imunológico, como o G-CSF e interferon (IFN), podem auxiliar nos casos de reação anti-inflamatória maciça ou persistente (BONE, 1996b; HICKEY & McCracken, 1997).

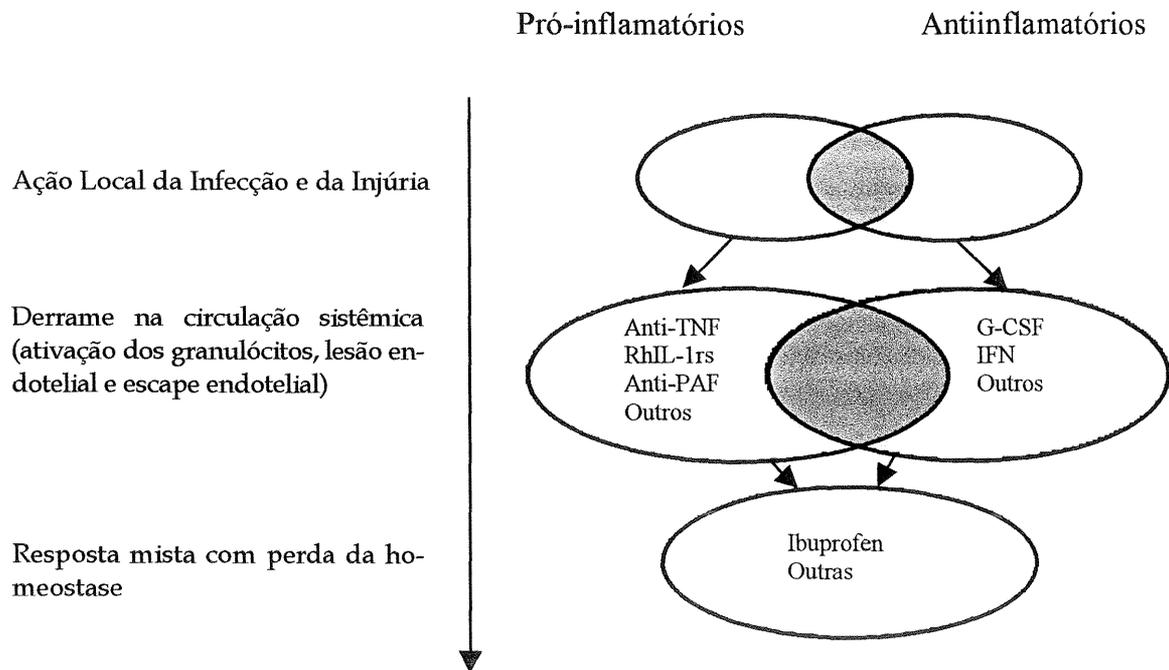


Fig. 1 - Fisiopatogenia da sepse (BONE, 1996b)

1.1.3 - Clínica e Diagnóstico

A percepção da sepse neonatal pode ser resumida como “o bebê que não respira bem, não se alimenta bem e parece que não vai bem”. O critério utilizado para o diagnóstico de sepse clínica se encontra definido nas páginas 2 e 3.

Os exames a serem solicitados para o diagnóstico laboratorial de sepse neonatal são: hemocultura, cultura de aspirado traqueal (em pacientes intubados), de líquor, de urina por aspiração suprapúbica, de fezes (em pacientes com diarreia) e radiografia de tórax e abdome. Os outros testes laboratoriais, embora inespecíficos, podem detectar a fase aguda da sepse, e são: leucograma, contagem de plaquetas, exame qualitativo e quantitativo do líquor, dosagem da proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação, contagem do tempo de formação de protrombina (TP) e contagem do tempo de formação parcial da tromboplastina

(KTPP). O leucograma pode ser repetido a cada 8 a 12 horas nas primeiras 24 horas da infecção. Deve-se acompanhar a resposta do hospedeiro, sendo importantes a neutropenia, que é uma contagem absoluta de neutrófilos totais inferior a 1.500/c (ANC = contagem absoluta de neutrófilos, isto é, soma dos neutrófilos metamielócitos, bastonados e segmentados), a relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais superior a 0,2, leucopenia (contagem de leucócitos < 5.000/c) ou leucocitose (contagem de leucócitos > 25.000/c). Em relação à contagem de plaquetas, pode ocorrer plaquetopenia ou trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100.000 /c). O líquido do sistema nervoso central pode mostrar meningite com a presença de bactérias no esfregaço, aumento da contagem de células (> 32 células/c com mais de 60% de neutrófilos), alterações bioquímicas (glicorraquia/glicemia < 50% e proteínas > 150 mg%) e bacteriologia positiva. Os demais testes podem demonstrar aumento da proteína C reativa, da velocidade da hemossedimentação, TP e KTTT (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a; HICKEY & McCRACKEN, 1997).

1.2 - Imunidade do Recém-Nascido

O sistema imunológico do RN é constituído por quatro principais componentes: imunidade celular (células T), sistema complemento, imunidade humoral ou mediada por anticorpo (células B) e sistema fagocítico dos neutrófilos. Atribui-se a grande incidência de sepsé bacteriana neonatal à imaturidade de pelo menos dois ou mais componentes do sistema imunológico do RN. Os dois mais importantes déficits no RN são os decorrentes de deficiências qualitativas e quantitativas no sistema fagocítico dos neutrófilos e de defeitos na imunidade mediada por anticorpos (WILSON, 1986, 1996).

1.2.1 – Sistema Imunológico Celular

O sistema imunológico celular tem como células principais os linfócitos T. Esses linfócitos são derivados do timo e têm uma ação direta e crítica na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, incluindo a maioria dos vírus, certos parasitas, fungos, e bactérias intracelulares. São patógenos que produzem infecções severas no feto, no neonato e nos imunocomprometidos. Desempenham um importante papel na ativação dos linfócitos B.

As principais funções dos linfócitos T são a proliferação e produção de interleucina-2 (IL-2) e, em menor proporção, TNF- α , interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IFN, G-CSF e GM-CSF. Também produzem células *natural killers* (NK). Além de sua atividade citotóxica, são importantes produtoras de IFN e TNF nas fases iniciais da resposta imunológica e inflamatória. Cerca de 50% dessas NK são imaturas e, portanto, deficientes no RN (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1984; WILSON, 1986; WILSON, 1995; SHERIDAN et al., 1997).

1.2.2 – Sistema Imunológico Humoral

A imunidade humoral é aquela exercida pelos linfócitos B que possuem, em sua superfície, moléculas de imunoglobulinas (Ig). A principal função das Ig é a produção de anticorpos (Ac). A primeira Ig de superfície a ser expressa é a IgM, sendo detectada em torno da 10^ª semana de gestação; já as demais, IgA, IgD e IgG, aparecem duas semanas após. O neonato apresenta uma deficiente capacidade na produção de Acs contra certos antígenos (Ag)(MIURA & MIURA, 1997).

Em geral, os linfócitos B neonatais diferenciam-se numa célula plasmática secretora de IgM, o plasmócito, com a mesma eficiência que a célula de um adulto. O mesmo não

ocorre, contudo, na produção de IgA ou IgG. Apesar de a síntese de Acs específicos pelo feto ser detectável em torno da 20^a a 24^a semana de gestação, pequenas quantidades de IgM e IgA estão presentes ao nascimento de crianças saudáveis. Assim, o RN depende largamente de passagem transplacentária de IgG da mãe para a aquisição de Acs específicos contra qualquer agente invasor. Das Igs, apenas a IgG tem a capacidade de atravessar a placenta, atingindo níveis detectáveis entre a 17^a e a 20^a semana. Somente após a 32^a semana é que esses níveis se elevam consideravelmente, excedendo em 5% a 10% os níveis materno no nascimento a termo. Anticorpos produzidos pelo feto são quase que apenas IgMs que podem ainda estar deficientes ou ausentes em relação à infecção intra-uterina. Os déficits de citocinas podem ser responsáveis pela demora na produção de Acs da classe IgM e IgG porque dependem de uma cooperação entre os linfócitos B e T (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1984; WILSON, 1986; WILSON, 1995).

1.2.3 – Sistema Complemento

O sistema complemento pode ser ativado por duas vias, a clássica e a alternativa, que convergem para uma via efetora comum, cujos componentes realizarão a lise celular do microrganismo. A via clássica é ativada por um complexo Ag-Ac (patógeno + IgM ou IgG, que são os Acs capazes de fixar componentes do sistema complemento). Essa ligação ao Ag, que ativa a via clássica, também pode ser feita pela proteína C reativa, uma proteína de fase aguda, que se liga ao carboidrato C encontrado na membrana de certas bactérias. A partir dessa ligação, várias proteínas do sistema complemento se ligarão a esse complexo (C1, C2a, C4b, C3b), atraindo C5b e iniciando a via efetora, onde a proteína C reativa se ligará a um complexo terminal C6, 7, 8, 9 o qual, por sua vez, formará poros na membrana do patógeno, causando, conseqüentemente sua lise. A via alternativa se diferencia por não necessitar da presença de Ac para sua ativação, bastando que o patógeno se ligue a uma molécula de C3b

produzida no humano. Após a ativação, outras substâncias participarão da reação (fator B, fator D e properdina) a fim de ativar a via efetora comum e, pela ligação com seus componentes, levar à destruição do patógeno. Além da ação final e principal desse sistema, a lise celular, muitos mediadores derivados da clivagem de seus produtos têm importantes funções. Os principais são o C3a e o C5a que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (anafilaxia). Além disso, o C5a é um potente fator quimiotático para os neutrófilos, eosinófilos e monócitos. O C3b, além de ter uma importante função na ativação das vias do sistema complemento, é uma opsonina, facilitando a fagocitose de partículas estranhas ao organismo.

Pouco complemento é transferido da mãe para o feto. A produção fetal do sistema complemento pode ser detectada entre a 6^a e a 14^a semana de gestação. O RNPT tem uma clara diminuição na atividade do sistema complemento tanto da via clássica como da alternativa.

A fibronectina é uma glicoproteína que tem um papel fundamental na aderência dos neutrófilos e monócitos no endotélio, necessária para sua migração do sangue para os tecidos. Há dois tipos de fibronectina, a plasmática, produzida no fígado, e a celular, produzida por fibroblastos e células endoteliais. A primeira está diminuída nos neonatos, sobretudo em prematuros, sendo mais reduzida ainda em pacientes com sepse e asfixia. Da mesma forma, a proteína C reativa age como uma opsonina auxiliando na fagocitose bacteriana (WILSON, 1986; MUSTAFA & McCracken, 1992; Klein & Marcy, 1995; Harris, 1996; Sheridan et al., 1997).

1.2.4 - Sistema Fagocítico de Granulócitos

CHRISTENSEN e ROTHSTEIN (1984) documentaram significativa deficiência quantitativa nas células mielóides e respostas ineficientes à infecção bacteriana em RNPT de ratos e humanos; além disso, mostraram que somente estão presentes 10% a 20% do estoque

proliferativo medular de neutrófilos (NPP = soma dos pró-mielócitos, mielócitos e mieloblastos) também chamado de CFU-GM (unidade de colônias formadoras de granulocito-macrófago) em ratos RNs comparados com ratos adultos. O estoque de reserva medular de neutrófilos (NSP = soma dos metamielócitos, bastonados e segmentados) do RNPT está também comprometido com uma redução significativa de 75% do rato adulto. Como consequência dessa desregulação ocorre o desenvolvimento de citopenias, em especial a neutropenia (CAIRO, 1989a, 1993).

As células hematopoéticas derivam de uma célula-tronco ou célula-mãe que se origina no saco vitelino o qual, a partir do quinto mês de gestação, é substituído pela medula óssea. As células fagocitárias – neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos – derivam de uma mesma célula precursora na medula óssea, conhecida como célula-tronco (*stem cell*). Trata-se de uma célula pluripotente, isto é, com a capacidade de originar diferentes linhagens celulares. O desenvolvimento dessas células depende de uma série de fatores estimuladores conhecidos como citocinas estimuladoras de colônias. As citocinas hematopoéticas atualmente conhecidas são: IL-3 ou multifator estimulador de colônias – multi-CSF, G-CSF, GM-CSF, fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), eritropoetina e trombopoetina, colaborando ainda as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12), TNF- α e os interferons (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1984; CAIRO, 1993; SHERIDAN et al., 1997).

Os neutrófilos fornecem a defesa fundamental contra a infecção bacteriana. A limitada capacidade do feto e do neonato em acelerar a produção de neutrófilos em resposta a uma infecção parece ser a deficiência mais importante na defesa fagocitária nessa fase da vida. Horas após o nascimento, o número de neutrófilos aumenta rapidamente, tanto no recém-nascido a termo (RNT) como no RNPT, embora cerca de 15% dessas células sejam imaturas. A quantidade de neutrófilos circulantes pode diminuir de forma significativa principalmente sob as seguintes condições: infecções graves como sepse e asfixia severa. Essa neutro-

penia ocorre inicialmente devido à migração dos neutrófilos circulantes para o compartimento de marginação, que são os capilares colabados em resposta à infecção. Se for persistente, também refletirá uma depleção dos neutrófilos armazenados na medula óssea e que foram mobilizados a fim de rapidamente combater o agente agressor. Além disso, experimentos *in vitro* mostraram uma redução de sua sobrevivência e uma substancial disfunção funcional. A neutropenia é encontrada em até 35% dos RNPTs, o que contribui de forma significativa para sua susceptibilidade à infecção (MIURA & MIURA, 1997; SHERIDAN et al., 1997). O número de neutrófilos fetais aumenta progressivamente de $200/\text{mm}^3$ com 18 semanas de gestação para $800/\text{mm}^3$ com 31 semanas de gestação, atingindo até $8.500/\text{mm}^3$ no RNT (MANROE et al., 1979, 1992). Nos adultos, o NSP contém mais de 14 vezes o número de neutrófilos no sangue (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1984). Em RN animais essa reserva corresponde a somente 2 vezes o número de neutrófilos circulantes (MANROE et al., 1992). Além disso, as células-tronco (*stem cells*) do RN podem ser incapazes de aumentar o número de neutrófilos durante a infecção. A depleção do NSP é também um sinal de mau prognóstico, indicativo de elevada mortalidade (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1980).

A neutropenia neonatal não se deve somente à infecção. Foi mostrado que menos da metade dos episódios neutropênicos puderam ser atribuídos a ela. A maioria dos episódios de causa não-infecciosa foi relacionada à hipertensão materna da gravidez. Em adição, os RNs pesando menos de 2.500 g tiveram mais neutropenia do que os RNTs (CARTWRIGHT, ATHENS, WINTROBE, 1964; CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1980; CHRISTENSEN et al., 1982a, 1982b; ERDMAN et al., 1982; WHEELER et al., 1984; MANROE et al., 1992).

Durante a sepse neonatal, mesmo um número adequado de polimorfonucleares pode ser insuficiente porque ocorre uma significativa disfunção dos neutrófilos com propriedades fagocíticas diminuídas. A fagocitose dos neutrófilos do RN é tão eficaz quanto a do adulto, porém a reduzida atividade opsônica leva a uma deficiente fagocitose (CHRISTENSEN et al., 1982a; WHEELER et al., 1984). Apesar do pequeno número de casos

relatados de RNs com sepse e neutropenia, a transfusão de granulócitos reduziu expressivamente a elevada mortalidade por choque séptico, com uma taxa de mortalidade de 10% vs 90% no grupo controle (CHRISTENSEN et al., 1982a; BAILEY et al., 1988).

O quadro 2 apresenta a deficiência funcional dos neutrófilos do RN em relação a do adulto (MIURA & MIURA, 1997).

Quadro 2 - Função dos Neutrófilos do Recém-Nascido a Termo e do Adulto Normais (SHERIDAN et al., 1997)

FUNÇÕES	RNT	ADULTO	P
Quimiotaxia (nº de células)	55 ± 18	108 ± 19	< 0,001
Migração aleatória (nº de células)	0 ± 14	34 ± 14	NS
Sistemas de quimiotaxia (nº de células)	5 ± 11	70 ± 14	< 0,001
Produção de superóxido estimulado por FMLP	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,4	< 0,01
Atividade bactericida com soro autólogo	0,7 ± 0,2	2,3 ± 0,6	< 0,001
Atividade bactericida com soro homólogo	1,3 ± 0,6	0,3 ± 0,3	< 0,001

A mobilização dos neutrófilos da circulação envolve aderência ao endotélio através da endotelina e da ação de moléculas chamadas de selectinas que respondem ao estímulo quimiotáxico. Chama-se quimiotaxia essa atração dos neutrófilos circulantes ao sítio infectado (HILL, 1991). Ocorre concomitantemente aumento do fluxo sangüíneo em direção a essa área, aderência dessas células ao endotélio e diapedese dos neutrófilos pela sua passagem da circulação para o interior dos tecidos devido ao aumento da permeabilidade capilar, chamada de anafilaxia (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989). Observou-se que a atividade quimiotáxica do RN é deficiente em relação à do adulto. Isto pode ser decorrente de anormalidades nas ICAMs-1 (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989), de reduzida polimerização actínica dos neu-

trófilos (HARRIS, SHALIT, SOUTHWICK, 1993), de aumento da rigidez esquelética celular (MILLER, 1979) e de alterações da fluidez da membrana (WOLACH et al., 1992). Na sepse neonatal, ocorre importante redução de neutrófilos periféricos circulantes juntamente com a redução do NSP e do NPP, tornando ineficientes a quimiotaxia, a opsonização e a fagocitose bacteriana. Como consequência, ocorre elevada mortalidade na sepse do RNPT (KEMP & CAMPBELL, 1996).

Os eosinófilos podem estar mais elevados na presença de exsudatos inflamatórios, representando um terço dos granulócitos até o primeiro mês de vida. A base dessa tendência eosinofílica ainda não está bem estabelecida (KEMP & CAMPBELL, 1996).

Chama-se de monócito a forma circulante no plasma e de macrófago quando presente nos tecidos. A capacidade do RN de produzir monócitos parece ser igual ou até maior que a dos adultos. Entretanto, a monocitopenia pode ocorrer na doença da membrana hialina por baixa produção pulmonar, talvez devido à ausência de surfactante. Também sua migração para o sítio inflamado está diminuída por redução do sistema complemento ativado (C5a) e de leucotrienos. Os monócitos e macrófagos têm importante função no combate a patógenos intracelulares, como vírus, bem como a bactérias intracelulares que necessitam das células do hospedeiro para sua replicação ou sobrevivência (MILLER, 1979; KEMP & CAMPBELL, 1996; MIURA & MIURA, 1997).

1.3 - Citocina G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

As citocinas são proteínas tipo-hormônios produzidas por células monócito-macrófago em resposta ao estímulo infeccioso e atuam como mediadores da resposta sistêmica à infecção bacteriana e/ou a estados de intensa demanda. O excesso ou a falta de resposta dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios é que vai determinar o melhor ou pior prog-

nóstico do paciente séptico. Entre as citocinas pró-inflamatórias, as mais importantes são: TNF- α , IL-1, IL-6, fator antiplaquetário (PAF) e IL-8. Os antiinflamatórios mais importantes são: IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, receptor solúvel TNF, antagonistas de receptores da IL-1 e transformador de fator de crescimento- β e estimuladores do sistema imunológico como o G-CSF e o GM-CSF, produzidos para controlar a inflamação e restaurar a homeostase. A falta de equilíbrio lança esses mediadores na circulação sistêmica. Se os níveis de pró-inflamatórios forem excessivamente elevados, o paciente desenvolve sinais clínicos de sepse, seguidos de choque ou falência de múltiplos órgãos (WATARI et al., 1989; WOLACH et al., 1992; GALLAGHER & EHRENKRANTZ, 1993; MORSTYN & DEXTER, 1995; BONE, 1996b; KEMP & CAMPBELL, 1996; STOLL et al., 1996a). Níveis elevados de mediadores antiinflamatórios resultam em anergia ou supressão imunológica que são lançadas em resposta aos pró-inflamatórios para restabelecer a homeostase. E, se isso ocorrer, o paciente deve sobreviver; no entanto alguns pacientes produzem, em resposta à infecção, excessiva quantidade de pró-inflamatórios ou reduzida quantidade de antiinflamatórios, explicando por que esses níveis estão relacionados ao mau prognóstico (BONILLA et al., 1989; WATARI et al., 1989; BONE, 1996b).

A hematopoiese tem seu início no saco vitelino fetal. Durante o desenvolvimento embrionário, o fígado fetal é o principal local de produção de células sangüíneas e, a partir daí, essas células hematopoiéticas migram para os ossos em desenvolvimento, que passam, então, a ser o principal centro de hematopoiese durante toda a vida adulta. Na medula óssea são encontradas células sangüíneas, em vários estágios de desenvolvimento, bem como células mais primitivas, que funcionam como precursoras das várias linhagens de células maduras. Sabe-se agora que todas essas células precursoras derivam de um núcleo comum, as *stem cells* ou pluripotentes. Elas produzem pelo menos 9 tipos altamente especializados de células maduras: eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monócitos/macrófagos, osteoclastos e linfócitos T e B (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; MORSTYN & DEXTER,

1995). Com o advento de uma melhor purificação e análise das proteínas, juntamente com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, tornaram-se disponíveis grandes quantidades dos fatores estimulantes de colônias. A G-CSF é liberada pelos monócitos e macrófagos em resposta aos mediadores inflamatórios como a IL-1 e endotoxinas (MORSTYN & DEXTER, 1995; HICKEY & McCRACKEN, 1997). Os níveis endógenos de G-CSF e GM-CSF estão elevados na sepse do RN e na hipertensão e infecção maternas. Há uma relação inversa dos níveis de G-CSF com a idade do prematuro. A alta incidência de neutropenia no RN durante a sepse pode ser em parte secundária à deficiente produção e expressão gênica do multi-CSF (quadro 3). Tais limitações parecem predispor o RN infectado à neutropenia a partir da exaustão da reserva de neutrófilos. Foi identificada uma falha dos monócitos de expressar o G-CSF após a estimulação (ERDMAN et al., 1982; CAIRO, 1989a; KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; CAIRO, 1993; GALLAGHER & EHRENKRANTZ, 1993).

Quadro 3 -Comparação entre a Expressão Gênica e Produção do multi-CSF Neonatal e a do Adulto (CAIRO, 1993)

FATOR DE CRESCIMENTO HEMATOPOIÉTICO	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS	EXPRESSÃO GÊNICA	FONTE CELULAR
G-CSF	Diminuída	Diminuída	MNC (macrófagos) e Monócitos
GM-CSF	Diminuída	Diminuída	MNC
IL-3	Diminuída	Diminuída	MNC
IL-6	Diminuída	Diminuída	Monócitos
SCF	Aumentada	Aumentada	Células endoteliais
IL-11	Não disponível	Aumentada	Fibroblastos

O G-CSF humano foi purificado até a homogeneidade a partir do sobrenadante da cultura de células de carcinoma de bexiga linhagem 5637. O loco genético do G-CSF humano natural localiza-se no cromossoma 17. Uma cópia sintética do gene humano dessa citocina foi construída e inserida num sistema de alta expressividade na *Escherichia coli*. O uso do gene sintético contribui para um maior nível de expressão gênica, evitando, também, qualquer risco de introdução de um DNA estranho humano e/ou viral no sistema de produção. As células da *Escherichia coli* em cultura formam uma pasta a partir da qual o G-CSF humano-metionil recombinante (r-metHuG-CSF) é purificado por um processo cuidadosamente controlado e escalonado que inclui a ruptura da célula hospedeira, solubilização das proteínas de inclusão, lavagem e renaturação da proteína e remoção das proteínas estranhas por filtração em cromatografia de troca. A solução r-metHuG-CSF é uma proteína hidrofóbica contendo 175 aminoácidos. A proteína recombinante difere do G-CSF humano natural apenas pela adição do resíduo de metionina no terminal amino e ausência de O-glicosilação. Não ocorrem sítios potenciais de N-glicosilação no G-CSF natural humano ou em sua molécula recombinante. O r-metHuG-CSF tem um resíduo de cisteína livre e um peso molecular de 18.800 Dáltons. Os G-CSFs naturais e recombinantes apresentam efeitos farmacológicos semelhantes *in vitro* e *in vivo*. A concentração de r-metHuG-CSF, ou rhG-CSF, ou filgrastima ou GRANULOKINE® é de 30 milhões de unidades (300 µg por ml) (MORSTYN & DEXTER, 1995).

O G-CSF atua especificamente no estímulo ao crescimento e desenvolvimento dos neutrófilos nos seguintes locais: nas células do estroma da medula óssea, nas células endoteliais e nos fibroblastos, sendo produzido por monócitos e macrófagos. A ação do rhG-CSF se dá pela interação com os receptores de membrana das células-alvo. Os receptores são específicos, têm afinidade única e ocorrem em todas as células da série de neutrófilos granulócitos. Estão também presentes nos monócitos e em seus precursores, mas não nos linfócitos, em outros granulócitos (eosinófilos e basófilos), nos megacariócitos e em seus progenitores (MORSTYN & DEXTER, 1995). A ligação, a internalização e a degradação são necessárias

para que o G-CSF possa exercer seus efeitos sobre a proliferação das células progenitoras, a diferenciação e a restrição de linhagem. No estroma da medula óssea, a ação do G-CSF se faz sobre as células progenitoras hematopoiéticas. Há um aumento significativo no número de neutrófilos do sangue periférico com reflexos mais limitados sobre os monócitos. Os efeitos imediatos da filgrastima (até 6 horas) são de marginação (neutropenia), provavelmente mediados por alterações de distribuição dos neutrófilos no sangue periférico. Os neutrófilos maduros, de produção mais recente, são liberados na circulação dentro de um dia da marcação, quando o tempo normal é de aproximadamente 5 dias. Também há evidências de que essa citocina não esgota o sistema hematopoiético. Seu estudo farmacodinâmico mostra um aumento importante dos neutrófilos, havendo nos primeiros 60 minutos uma queda transitória de neutrófilos no sangue periférico por marginação dos neutrófilos para as células endoteliais, seguida de uma elevação rápida e substancial dentro de 4 a 5 horas, com marcado desvio à esquerda, com aumento de metamielócitos e bastonetes e com alterações morfológicas como granulações densamente coradas, vacuolização citoplasmática e corpos de Dohle citoplasmáticos. Ocorre também aumento da fagocitose, da atividade mitocondrial e da quimiotaxia dos neutrófilos. Apesar de não elevar o risco dos pacientes, foram observados, em pacientes em quimioterapia, alguns casos de trombocitopenia e queda no hematócrito (BONILLA et al., 1989; WATARI et al., 1989; CAIRO, 1993; MORSTYN & DEXTER, 1995).

É possível que, em indivíduos normais, o G-CSF funcione principalmente como modulador da função dos neutrófilos maduros circulantes e como importante molécula efetora durante a resposta à infecção. O G-CSF humano é indetectável no sangue quando não está se processando nenhuma forma de resposta à infecção. No entanto sua concentração plasmática natural aumenta de 0,05 para 2 ng/l em pacientes com infecção (BONILLA et al., 1989; MORSTYN & DEXTER, 1995). O rhG-CSF tem sido usado com efetivo sucesso em diversas situações clínicas, incluindo doenças hematológicas e oncológicas e síndromes de

imunodeficiências. Mostrou-se capaz de reverter neutropenia cíclica, neutropenia induzida em crianças com agranulocitose congênita (síndrome de Kostman) e neutropenia crônica severa e de induzir neutrofilia em síndromes de insuficiência de medula óssea como a anemia aplástica (BONILLA et al., 1989; BOXER, HUTCHINSON, EMERSON, 1992). Também tem sido usado com sucesso para reduzir os períodos de neutropenia, febre e sepse após a administração de agentes quimioterápicos para leucemia aguda e tumores sólidos (BOXER, HUTCHINSON, EMERSON, 1992). O G-CSF promove a aceleração na recuperação mielóide após terapia mielossupressiva em transplante de medula óssea e redução da neutropenia em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida. Apesar de ocorrer uma notável hiperplasia mielóide num nível maturacional de neutrófilos amadurecidos, não há um aumento no número de precursores mielóides (GABRILOVE et al., 1988a).

1.4 - Aplicação Terapêutica do rhG-CSF na Sepse Neonatal

Em RN, os estudos iniciais são de CAIRO (1993) que administraram rhG-CSF em dose única ou continuada em ratos com sepse por GBS. Houve neutrofilia aguda e redução da mortalidade. Na dose única, como resposta secundária, o NSP diminuiu em tamanho e o NPP aumentou. A administração contínua por um período de 7 dias aumentou o número, a função, o NSP e o NPP e reduziu a mortalidade. Os autores também concluíram que a melhora da função dos neutrófilos é tão importante quanto os efeitos mielopoiéticos, considerando as deficiências das funções dos neutrófilos no período neonatal (CAIRO et al., 1990a, 1990b).

No estudo de WHEELER & GIVNER (1992), o efeito terapêutico mais importante sugeriu que as CSFs possam ser efetivas mesmo após o estabelecimento da infecção. GIVNER & NAGARAJ (1993) demonstraram que ainda ocorreria um efeito terapêutico se o G-CSF ou o GM-CSF, em adição com a penicilina, fossem administrados 12 horas após o animal ser inoculado com as bactérias.

KENNON et al. (1996) mostraram que a citocina G-CSF está significativamente elevada na sepse neonatal, sendo, portanto, um marcador confiável de infecção. Esse estudo comparou os níveis médios de G-CSF em RNs com infecção e sem infecção, e seus resultados mostraram que, em 17 RNs com sepse comprovada, o nível médio foi de 1780 ng/l, em 57 RNs com sepse presumível, o nível foi de 1304 ng/l e, em 62 RNs sem infecção, o nível médio foi 330 ng/l ($p < 0,01$).

Até o momento, os estudos com a aplicação de rhG-CSF na sepse neonatal foram realizados em 110 neonatos, e são assim sumarizados:

ROBERTS et al., em 1991, administraram rhG-CSF em um RNPT com 3 meses de idade que tinha apresentado 5 episódios de infecção. A contagem de ANC era baixa ($< 1 \times 10^9/l$); o rhG-CSF foi administrado subcutaneamente na dose de 10 $\mu\text{g/kg/d}$ com aumento da contagem de ANC para $30 \times 10^9/l$ dentro de 2 semanas. A dose então foi reduzida para 1 $\mu\text{g/kg/d}$ e a contagem de ANC foi mantida entre 8 a $12 \times 10^9/l$. Não houve novos episódios de sepse. Essa terapia foi mantida até o sétimo mês de idade, e o paciente sempre se mostrou saudável.

Em 1994, GILLAN et al. (1992) coordenaram um estudo duplo-cego, randomizado e controlado com placebo usando rhG-CSF, fase II/III em RNs entre 26 e 40 semanas de idade gestacional com sepse presumível. Os resultados mostraram ausência de toxicidade com a administração de rhG-CSF. Trinta e seis RNs receberam placebo ou rhG-CSF nas doses de 1, 5 ou 10 $\mu\text{g/kg/dia}$ a cada 24 horas nos dias 1, 2 e 3, e 6 RNs receberam filgrastima nas doses de 5 ou 10 $\mu\text{g/kg/d}$ a cada 12 horas nos dias 1, 2 e 3. Ocorreu um aumento significativo dose-dependente na contagem de neutrófilos periféricos 24 horas após a dose de 5 a 10 $\mu\text{g/kg/d}$ a cada 12 ou 24 horas. A expressão C3bi neutrofilica aumentou significativamente após 24 horas na dose de 10 $\mu\text{g/k/d}$ e houve um aumento na reserva medular de neutrófilos.

Nesse mesmo ano, BEDFORD-RUSSEL et al. (1995) administraram rhG-CSF em 12 prematuros neutropênicos. Todos receberam antibióticos e necessitaram de suporte

ventilatório. Em 7 a sepse foi confirmada, 2 ficaram com diagnóstico de provável infecção e em 3 casos não houve evidências de infecção. Foram administrados 5 µg/kg/d de rhG-CSF por via intravenosa durante 5 dias até a contagem de ANC atingir 5.000/mm³. Se esse valor não fosse alcançada no 5º dia, a dose era elevada para 10 µg/kg/d por mais 5 dias. A contagem ANC aumentou em todas os casos. Seis crianças morreram, 2 com sepse e 4 com doença respiratória pré-existente. Não houve evidências de reações de toxicidade e de efeitos adversos nos problemas respiratórios. Foram constatados 3 casos de trombocitopenia como uma possível complicação do tratamento.

Também em 1994, GILMORE, STRONCEK, KORONES (1994) administraram rhG-CSF em 2 lactentes com neutropenia aloimune. A primeira criança iniciou o tratamento com dois meses de idade para reduzir os efeitos de uma cirurgia, na dose de 5 µg/kg/d por via subcutânea durante 3 dias. A contagem de ANC aumentou de $0,4 \times 10^9 /l$ para $3,6 \times 10^9 /l$ após as 2 primeiras doses e atingiu um pico de $14,4 \times 10^9 /l$ após a terceira dose. Aos 7 meses de idade a contagem de leucócitos e o diferencial estavam normais. A segunda criança recebeu 6 doses de rhG-CSF por complicações de otite média, na dose de 5 µg/kg/d por via subcutânea. A contagem de ANC aumentou de $0,5 \times 10^9 /l$ para $4,3 \times 10^9 /l$ após o quarto dia e com um pico de $16,8 \times 10^9 /l$ aos 6 dias. Não houve sinais de toxicidade.

MURRAY, McCLAIN, WEARDEN, ainda em 1994, administraram rhG-CSF num RN com 1 dia de vida, pesando 1.580 g, neutropênico e com sepse por *Escherichia coli*. A dose, por via subcutânea, foi de 5 µg/kg/d por 5 dias. A contagem de ANC aumentou de $5 \times 10^9 /l$ 6 horas após a administração, com um pico de $60 \times 10^9 /l$ 6 dias após a suspensão do rhG-CSF. O bebê sobreviveu e não se observaram sinais de toxicidade. Houve fatores que dificultaram a interpretação por terem sido administradas concomitantemente gamaglobulina e transfusão de granulócitos após a primeira dose de rhG-CSF.

Em 1995, CAIRO et al., publicaram um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo no qual procuraram determinar a segurança e a resposta biológica à

citocina rhGM-CSF administrada por 2 horas por via intravenosa a 20 RNMBP durante 7 dias, na dose de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$. Em 48 horas houve um expressiva elevação na contagem de neutrófilos circulantes que continuou até 24 horas após a suspensão do medicamento. O NSP e a expressão C3bi também aumentaram de forma significativa. Houve ainda um aumento dos monócitos e das plaquetas, sugerindo seu possível efeito. Não se observaram paraefeitos.

LEIBOVITZ et al., em 1995, mostraram que 13 de 14 RNs com sepse presumível e neutropenia responderam favoravelmente à aplicação de rhG-CSF na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$. Ocorreu aumento significativo na contagem absoluta de neutrófilos e do NSP. A média da ANC foi de 1.190/ mm^3 no dia 0 e de 12.970/ mm^3 no dia 5. A fração do NSP aumentou de 18,9% no dia 0 para 71,8% no dia 5. Duas crianças morreram, uma devido a sepse e outra por falência de múltiplos órgãos. Não houve reações adversas atribuíveis ao rhG-CSF por um período de 1 a 12 meses que se seguiram ao estudo.

MAKHLOUF et al., em 1995, administraram rhG-CSF para 9 RNs de baixo peso (< 2.500 g), neutropênicos, nascidos de grávidas com hipertensão arterial, na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ dentro de 24 horas após o nascimento por um máximo de 3 dias se persistisse a neutropenia. A ANC aumentou significativamente em 8 dos RNs dentro de 6 horas e foi sustentada por pelo menos 72 horas após a primeira dose. O grupo controle (n = 16) não atingiu seus níveis normais até após 60 horas de vida. A concentração média sanguínea de linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas permaneceu com níveis de referência 72 a 120 horas após a primeira dose de rhG-CSF. Não houve sinais de intoxicação aguda. Entretanto um RN que recebeu 3 doses de rhG-CSF teve aumento dos monócitos acima dos níveis normais ($4,5 \times 10^9/\text{l}$).

Nesse mesmo ano, LA GAMMA, ALPAN, KOCHERLAKOTA (1995) administraram rhG-CSF em 4 RNMBP neutropênicos sem sepse e com história materna de hipertensão da gravidez. A administração do medicamento teve início nos dias 3 ou 4, em três doses de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$. Em todos os casos a contagem absoluta de neutrófilos aumentou em menos de 48 horas para aproximadamente 4 vezes os níveis iniciais e atingiu um pico em

torno de 15 vezes os níveis iniciais em menos de 1 semana após completar-se a terapêutica. Houve aumento transitório da contagem absoluta de monócitos, sem alteração na contagem absoluta de linfócitos. Não se registraram casos atribuíveis de intoxicação clínica ou laboratorial.

NANKERVIS & SEGUIN, também em 1995, administraram rhG-CSF para um RNMBP com 12 dias de vida, em razão de sepse por *Klebsiella* e enterocolite necrosante. A contagem de ANC caiu de $4,48 \times 10^9/l$ para $0,11 \times 10^9/l$ em 24 horas, e a neutropenia persistiu a despeito da antibioticoterapia e da administração de gamaglobulina intravenosa. Diariamente, durante 3 dias, foram administrados, por via intravenosa, $5 \mu g/kg/d$ de rhG-CSF. Transcorridas 9 horas da primeira dose, a ANC era de $3,48 \times 10^9/l$ e atingiu um pico de $38 \times 10^9/l$ após a última dose. Três dias após, caiu para níveis de 10 a $12 \times 10^9/l$. Também não houve evidências de toxicidade seguindo-se ao tratamento.

Ainda em 1995, BARAK et al. utilizaram rhG-CSF intravenosamente, na dose de $5 \mu g/kg/d$, por 5 dias, em 14 RNs com 26 a 38 semanas de idade com sepse presumível e neutropenia ($< 2.000/mm$) e os compararam com uma série anterior de 24 RNs com as mesmas características. Houve aumento da ANC e do NSP em 13 RNs ($p < 0,02$). Ocorreu somente um caso de trombocitopenia transitória. No grupo avaliado, houve 12/14 sobreviventes (86%) enquanto nos controles históricos essa relação foi 15/24 (62%).

Em 1997, KOCHERLAKOTA & LA GAMMA administraram rhG-CSF na dose de $10 \mu g/kg/d$ por 3 dias consecutivos em 14 RNs com sepse comprovada e fizeram uma comparação histórica com 11 casos semelhantes. Houve elevação significativa na contagem total de neutrófilos. A mortalidade no grupo tratado com G-CSF foi de 8% comparada com uma mortalidade de 45% no grupo-controle histórico.

JUSTIFICATIVA

2

JUSTIFICATIVA

A sepse neonatal é a maior causa de mortalidade no período neonatal em nosso meio, apesar do advento de novos e potentes antibióticos. Na Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período compreendido entre 1984 e 1990, entre 20.280 nascimentos houve 258 óbitos. A maior causa de morte foram as infecções com um total de 83 óbitos (32%). A sepse de início precoce, isto é, a que acomete RN com menos de 5 dias de vida, foi responsável por 22% do total de óbitos no período neonatal, e a sepse de início tardio, por 10% (MENEGAZ, MULLER, SHUMACHER, 1995). A sepse neonatal também é a patologia mais freqüente em nosso hospital, sendo diagnosticada numa proporção de 20 casos para cada 1.000 RNs nascidos vivo (MENEGAZ, MULLER, SHUMACHER, 1995).

Apesar da disponibilidade de potentes antibióticos e de notáveis recursos humanos e tecnológicos nas unidades de terapia intensiva neonatais, os índices de morbi-mortalidade por sepse neonatal são elevadas. Para reduzir essa mortalidade, os novos direcionamentos terapêuticos estão voltados para a correção do sistema imunológico do RN. Os imunoterápicos mais testados até o momento são: imunoglobulina intravenosa, transfusão de granulócitos, antiinflamatórios hormonais e não hormonais, bloqueadores das citocinas pró-inflamatórias e estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos (BALEY et al., 1988; KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; BONE, 1996a).

As intervenções experimentais com variadas substâncias antiinflamatórias ainda são inconclusivas. Esses medicamentos compreendem anticorpos monoclonais contra endoto-

xinas (anti-LPS); anticorpos monoclonais e policlonais contra TNF- α ; anticorpos monoclonais contra receptores de TNF- α ; antagonistas de receptor IL-1; receptores solúveis de IL-1; antiinflamatórios hormonais, os corticosteróides; antiinflamatórios não-hormonais inibidores da prostaglandina, como o ibuprofen e a pentoxifilina. Num recente estudo de metanálise em adultos foram incluídos 18 trabalhos, todos duplo-cegos, randomizados e controlados por placebo. Não houve nenhuma vantagem com o uso desses medicamentos em relação ao tratamento convencional. As razões de chance (OR) foram de 1,1, portanto sem significância estatística no tratamento do choque séptico. Os autores calculam que, para provocar uma redução em 10% na mortalidade por choque séptico, são necessários 6.000 casos avaliados com a mesma metodologia. O número expressivamente elevado e seus custos constituem, sem dúvida, as grandes dificuldades para a realização desse projeto (GOLDIE et al., 1995; BONE, 1996a; BONE; GRODZIN; BALK, 1997).

A imunoglobulina intravenosa na prevenção e tratamento da sepse neonatal foi submetida recentemente a um estudo de metanálise que mostrou poucas vantagens sobre o tratamento convencional. Vários estudos não foram incluídos devido a diferenças metodológicas. O RN necessita manter níveis protetores de IgG acima de 400 mg/dl no combate à infecção, além de possuir imunoglobulina G com anticorpos específicos contra os patógenos mais comumente encontrados no período neonatal. Espera-se, em futuro próximo, a descoberta de uma imunoglobulina específica para RN (LACY & OHLSON, 1997)

A neutropenia na sepse é uma característica presente no RNPT, podendo ser encontrada em até 62% dos casos. Para revertê-la foram propostas duas abordagens terapêuticas: (1) transfusão de preparados purificados de granulócitos (CHRISTENSEN et al., 1982a; CHRISTENSEN, HARPER, ROTHSTEIN, 1986; CAIRO, 1989a) e (2) administração de fator recombinante humano estimulante de colônias de granulócitos e de granulócitos-macrófagos (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; CAIRO, 1989b; CAIRO, 1993).

A transfusão de granulócitos, apesar de ter provocado uma redução na mortalidade por sepse em dois estudos, ambos duplo-cego, randomizados e controlados por placebo, não é aplicável na maioria dos centros médicos, devido a dificuldades técnicas (CHRISTENSEN et al., 1982a; CAIRO, 1989a). WHEELER et al., em 1984 e BALEY et al., em 1988, em dois estudos, controlados por placebo, não encontraram aumento da sobrevivência em RNs neutropênicos com sepse. Devido às diferentes técnicas de obtenção do concentrado de granulócitos, é necessário seguir as orientações quanto aos cuidados nesse tipo de transfusão para evitar potenciais complicações da transfusão de componentes do sangue.

Em poucos trabalhos publicados, a administração de rh-G-CSF em RNs com sepse produziu neutrofilia e proliferação do NSP em neonatos não-neutropênicos (CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1984) e neutropênicos (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; GÖRGEN et al., 1992; GESSLER et al., 1993) e um aumento na sobrevivência dos RNs, além de não provocar parafeitos (CAIRO, 1989b; GÖRGEN et al., 1992; GESSLER et al., 1993). Entretanto, como o número de RNs submetidos a essa nova modalidade terapêutica é pequeno, faz-se necessário um número maior de estudos clínicos com a administração de rhG-CSF, duplo-cegos, randomizados e controlados por placebo (GILLAN et al., 1992; CAIRO et al., 1995; KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a).

3

OBJETIVOS

3

OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico do rhG-CSF e a segurança de seu emprego em recém-nascidos prematuros com sepse precoce.

3.2 - Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do rhG-CSF sobre:

- a mortalidade por sepse neonatal precoce;
- a incidência de infecção hospitalar;
- o nível de leucócitos totais circulantes;
- a contagem total de neutrófilos;
- a contagem total de linfócitos, monócitos, eosinófilos, hemoglobina e plaquetas;
- as citocinas hematopoiéticas G-CSF, GM-CSF, TNF- α , e IL-6;
- o estoque de reserva medular de neutrófilos, o estoque proliferativo medular de neutrófilos e a relação NSP/NPP;
- os sistemas respiratório e hematológico.

PACIENTES E MÉTODOS

4

PACIENTES E MÉTODOS

4.1 - Delineamento do Estudo

O delineamento da pesquisa é um ensaio clínico, experimental, com o medicamento rhG-CSF, filgrastima, “Granulokine®”, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo.

4.2 - População

A população objeto deste estudo é o recém-nascido. A amostra foi obtida dos pacientes que são internados na Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.3 - Amostra e Amostragem

4.3.1 - Critérios de Inclusão

Foram incluídos RNPTs com menos de 37 semanas de idade gestacional, com menos de 5 dias de vida e com suspeita de sepse, definida pelos critérios diagnósticos de sepse clínica, conforme apresentado em 1.1.1.

Foi considerado haver **sepse comprovada** quando ocorreu a presença dos critérios estabelecidos para a sepse clínica associada a bactérias na hemocultura, líquido, aspirado traqueal ou urina. Considerou-se **sepse presumível** todos os demais casos que não preencheram os critérios de sepse comprovada (SIEGEL & McCracken, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCracken, 1992; MUSTAFA & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a; HICKEY & McCracken, 1997).

Foi considerado **sepse hospitalar** quando houve a presença de crescimento bacteriano em hemocultura, líquido ou aspirado traqueal ou achados de infecção à necropsia em associação com os critérios clínicos de sepse após 8 dias de vida (SIEGEL & McCracken, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCracken, 1992; MUSTAFA & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a; HICKEY & McCracken, 1997).

4.3.2 - Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram: RNs de mães que estivessem fazendo uso de duas ou mais doses de antibióticos antes do parto, portadores de malformações graves ou com asfixia grave sem resposta à reanimação e evidência de infecção congênita (sífilis, rubéola, citomegalovírus, herpes simples e toxoplasmose).

4.4 - Estudo Inicial

O estudo inicial foi realizado no período de 1º de agosto de 1996 a 31 de janeiro de 1997 um estudo piloto que envolveu 26 RNPTs com sepse de início precoce. O estudo

clínico com rhG-CSF foi randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. O sorteio foi feito na unidade de quimioterapia do HCPA pela farmacêutica responsável. Dentro de uma caixa fechada havia 26 envelopes distribuídos da seguinte forma: 13 com a sigla M (medicamento objeto do estudo) e 13 com a sigla P (placebo). Cada novo caso recebia por sorteio um envelope que continha essa informação e que era do conhecimento exclusivo da farmacêutica que, por sua vez, desconhecia os resultados do estudo.

4.5 - Cálculo do Tamanho da Amostra

Os resultados em relação à mortalidade, obtidos no estudo inicial com 26 casos, distribuídos em 13 casos em cada grupo, mostraram 3/13 (23%) óbitos no grupo medicamento e 6/13 (46%) óbitos no grupo placebo. A análise estatística interina mostrou que para detectar uma diferença estatisticamente significativa nessas proporções entre o grupo tratado com rhG-CSF e o grupo controle, o efeito protetor do medicamento aferido pelo RR (risco relativo) de 0,5 (0,2-1,0) com um IC (intervalo de confiança de 90%), o número mínimo de pacientes em cada grupo do estudo foi estimado em 21, totalizando 42 pacientes. Os dados coletados foram armazenados e analisados em EPI-INFO v. 603be SSSP (*Statistical Package for Social Science*).

4.6 - Coleta do Material

Inicialmente todo paciente que preenchia as condições de diagnóstico de sepse clínica era incluído no estudo. Após esclarecimentos aos pais ou responsáveis sobre os objetivos do estudo e o consentimento autorizado por escrito dos mesmos (ver anexo), o paciente era investigado para o diagnóstico laboratorial de sepse. Todo paciente era submetido a coleta de

sangue, num volume de 3 ml de sangue venoso para hemograma, leucograma, hemocultura e outros exames de acordo com a gravidade do caso. A punção lombar para exame de líquido e cultural era realizada em todos os RNs, exceto nos casos com gravidade e que tinham risco de morte. Para as dosagens das citocinas, retiravam-se cerca de 2 ml de sangue venoso em cada caso; esse material era colocado em tubo com heparina e centrifugado em baixa rotação (4.000 rpm) por 5 minutos para a separação do plasma. Após, o soro era pipetado e aliqotado em tubo tipo Eppendorf, etiquetado para identificação e armazenado em *freezer* a uma temperatura de -70°C . Esse procedimento foi considerado como o momento 0.

Novas dosagens eram feitas para a realização do hemograma e das citocinas 24 horas após o início do tratamento e imediatamente antes da 2^a dose do medicamento, chamado momento 1; 72 horas após a primeira dose do tratamento, momento 2, e 10 dias após a primeira dose do tratamento, momento 3.

4.6.1 - Dosagens das Citocinas

O princípio dessa dosagem é uma técnica de “sanduíche” quantitativa por enzimoimunoensaio. A placa com micropoços vem recoberta com anticorpo monoclonal específico para a citocina desejada. O preparado padrão e as amostras do paciente são pipetadas nos micropoços, e qualquer quantidade de citocina presente é imobilizada pelo anticorpo específico. Fazem-se várias lavagens para remover substâncias livres. Adiciona-se, a seguir, o anticorpo específico ligado à enzima para a citocina desejada. Faz-se nova lavagem para a remoção de anticorpo ligado a enzimas livres e adiciona-se um substrato que cora com uma coloração de acordo com a quantidade da citocina ligada à enzima. Interrompe-se a reação colorimétrica e faz-se a leitura pela densidade ótica num espectrofotômetro.

Preparado Padrão - para a realização do preparado padrão das citocinas hemato-poéticas G-CSF, GM-CSF, IL-6 e TNF- α utilizou-se o método de ELISA (Ouantikine®

R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place N.E. Minneapolis, MN 55413 United States of America) da seguinte forma: para cada citocina foi estabelecida uma curva padrão em cada placa. Cada placa contém 96 micropoços de polistireno, divididos em 12 colunas cada uma contendo 8 micropoços. A primeira coluna foi utilizada para se determinar a curva padrão de cada citocina. Inicialmente reconstituiu-se a padronização da citocina estudada diluindo-se o preparado padrão (G-CSF, GM-CSF, TNF- α e IL-6) com 5 ml da solução diluente (RD6) em 8 tubos. A primeira diluição é com a solução padrão e, portanto, a mais elevada. Após, de forma consecutiva, adicionaram-se 500 μ l desse primeiro tubo no segundo tubo com a solução diluente, reduzindo-se a concentração anterior pela metade. Após, retiraram-se 500 μ l do segundo tubo e adicionaram-se no terceiro tubo já com a solução diluente, reduzindo pela metade a concentração anterior. O mesmo procedimento foi repetido de forma consecutiva até completar-se o sétimo tubo. O oitavo tubo ficava somente com o diluente calibrador e servia como o padrão zero (0 pg/ml). Desta forma, cada placa permitiu a leitura de 88 amostras de plasma de 22 pacientes. Foram utilizados no total 8 *kits* para a leitura das citocinas. O tempo gasto para a leitura da dosagem por ELISA é de aproximadamente 4h30 min a 5 h.

Dosagem do TNF- α - fator de necrose tumoral, aferida por método ELISA. Inicialmente adicionavam-se-se 50 μ l do diluente em cada micropoço coberto com anticorpo monoplo anti-TNF- α ; após, acrescentavam-se 200 μ l do plasma em cada micropoço; incubando-se por 2 horas em temperatura ambiente. Por três vezes consecutivas todos os micropoços eram aspirados e lavados. Após, adicionavam-se 200 μ l do conjugado de anticorpo policlonal anti-TNF- α e incubava-se por 2 horas em temperatura ambiente. Repetia-se por três vezes, de forma consecutiva, o processo de aspiração e lavagem. Para a provocação da reação colorimétrica adicionavam-se 200 μ l de uma solução substrato que é uma mistura de dois reagentes colorimétricos em cada micropoço e incubava-se por 20 minutos em temperatura ambiente. Adicionavam-se 50 μ l de uma solução *stop* em cada reação. Após 30 minutos era

efetuada a leitura em comprimento de onda de densidade ótica de 450 nm de cada micropoço em um aparelho de leitura ELISA BioRad (Richmond, CA). A sensibilidade do ensaio variou de 11 a 62 pg/ml de TNF- α .

Interleucina-6 – aferida por método ELISA. Adicionavam-se inicialmente 100 μ l do diluente RD 1A em cada micropoço coberto de anticorpo monoclonal anti IL-6; após, cobria-se com 100 μ l de plasma em cada micropoço e incubava-se à temperatura ambiente por 2 horas. Aspirava-se e lavava-se de forma consecutiva por 4 vezes. A seguir, colocavam-se 200 μ l do conjugado de anticorpos policlonal anti IL-6 em cada micropoço e incubava-se por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente aspirava-se e lavava-se 4 vezes de forma consecutiva. Adicionavam-se 200 μ l de um substrato de reação colorimétrica em cada reação e incubava-se por 20 minutos. Interrompia-se a reação com 50 μ l de uma solução *stop*. Fez-se a leitura da densidade ótica da IL-6 num comprimento de onda de 450 nm dentro de 30 minutos. A sensibilidade da leitura da IL-6 variou de 1 a 1437 pg/ml.

G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos, aferido por método ELISA. Adicionavam-se inicialmente em cada micropoço coberto de anticorpo monoclonal anti-G-CSF 50 μ l de uma solução diluente, colocavam-se 100 μ l de plasma e incubava-se por 2 horas à temperatura ambiente. Após, lavava-se e aspirava-se três vezes de forma consecutiva. Adicionavam-se 200 μ l de um conjugado de anticorpo policlonal anti-G-CSF e incubava-se por 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, lavava-se e aspirava-se por três vezes de forma consecutiva. Adicionavam-se 200 μ l de um substrato de reação colorimétrica em cada micropoço e incubava-se por 20 minutos à temperatura ambiente. Preparava-se, então, a reação com 50 μ l de uma solução *stop*. A leitura da densidade ótica do G-CSF era feita dentro de 30 minutos no aparelho de leitura ótica no comprimento de onda de 450 nm. A sensibilidade de leitura do G-CSF variou de 20 a 6.000 pg/ml.

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, aferido pelo método ELISA. Inicialmente cada micropoço contendo anticorpo monoclonal anti-GM-CSF era coberto com 50 µl de uma solução diluente RD1. Após, adicionavam-se 200 µl de plasma e incubava por 2 horas à temperatura ambiente. Aspirava-se e lavava-se consecutivamente por quatro vezes. Acrescentavam-se 200 µl do conjugado de anticorpo policlonal anti GM-CSF em cada micropoço e incubava-se por 2 horas à temperatura ambiente. Aspirava-se e lavava-se 4 vezes de forma consecutiva. Adicionava-se uma solução de um substrato de reação colorimétrica em cada micropoço e incubava-se por 20 minutos à temperatura ambiente. Interrompia-se a reação com 50 µl de uma solução *stop*. A placa era levada para a leitura da densidade ótica de cada amostra do GM-CSF num comprimento de onda de 450 nm. A sensibilidade alcançada para o GM-CSF foi de 3 a 13 pg/ml.

4.6.2 - Dosagens dos Neutrófilos Circulantes

O sangue obtido por punção venosa para a contagem de neutrófilos circulantes era verificado através da contagem de leucócitos em contador eletrônico Cobas Minus. Fazia-se a contagem diferencial de 200 leucócitos no sangue da mesma amostra distendido em lâmina e corado com May-Grumwald-Giemsa, obtendo-se o número total de neutrófilos.

4.6.3 - Dosagens dos Neutrófilos na Medula Óssea

Sete dias após a primeira administração do medicamento/placebo, realizava-se a punção aspirativa da medula óssea da região anterior da tíbia. Esse aspirado de sangue era despejado inicialmente em dois frascos com heparina. Ao mesmo tempo realizavam-se três lâminas com o esfregaço desse aspirado. O número total de células era determinado pelo con-

tador eletrônico Cobas Minus. Fazia-se a contagem diferencial em 500 células nucleadas dessa amostra processada em centrífuga e corada com May-Grumwald-Giemsa. O NPP é a soma de mielóblastos, pró-mielócitos e mielócitos; e o NSP, a soma de metamielócitos, bastonados e segmentados.

4.7 - Produto: rhG-CSF ou Placebo

O rhG-CSF administrado foi o Granulokine ® (filgrastima) do Laboratório Roche (São Paulo), produzido pela Amgen Inc & F. Hoffmann-La Roche Ltda. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos. Um frasco-ampola de 1 ml de rhG-CSF ou filgrastima ou granulokine® contém 30 milhões de unidades (300 µg) de G-CSF. É um líquido estéril e incolor. A dose utilizada foi de 10 µg/kg/dose (33,2 µl de solução injetável). Esse medicamento era diluído em 5 ml de soro glicosado a 5% para serem administrados em 30 minutos. A solução placebo constituiu-se de soro glicosado a 5%, incolor, na mesma quantidade da solução medicamento.

4.8 - Logística

4.8.1 - Pacientes

No período de 1º de agosto de 1996 a 31 de julho de 1997 foram selecionados, de forma consecutiva, 44 RNPTs com idade gestacional entre 23 e 35 semanas de vida, cujo peso de nascimento variou entre 700 g a 2.450 g, com menos de 5 dias de vida e com o diagnóstico clínico de sepse. O local do estudo foi a Unidade de Neonatologia do HCPA. Cada caso com o diagnóstico clínico de sepse, de acordo com os critérios de inclusão, era avaliado pelo inves-

tigador. Após o consentimento do médico assistente e o consentimento por escrito dos familiares do paciente, o RN era incluído no estudo.

A idade gestacional dos RNPTs era avaliada através do exame físico pelo método de Ballard e Ballard modificado e ampliado (BALLARD, NOVAK, DIRVER, 1979, 1991).

Cada paciente era avaliado por um escore de gravidade clínica. Foi utilizado um escore chamado de *Score for Neonatal Acute Physiology* (SNAP) que avalia o estado agudo do RN e que corresponde à soma dos piores escores de transtornos bioquímicos e de vários órgãos do RN nas primeiras 24 horas. Isso foi feito pela avaliação clínica das principais funções do RN. São analisados 26 itens (ver anexo). Para 8 desses itens (como o sódio sérico) um RN pode receber pontos tanto para valores tanto anormalmente altos como baixos. Essa aferição gasta um tempo variável de 5 a 15 minutos, dependendo da complexidade do caso. A soma dessas características resulta em um valor numérico altamente preditivo da mortalidade neonatal (RICHARDSON et al., 1992, 1993; BARD, 1993).

A investigação laboratorial da sepse consistiu dos seguintes exames: hemograma, leucometria, líquor, exame de cultura do sangue, urina, fezes, secreção traqueal de pacientes intubados ou outra secreção purulenta e raio X do tórax.

4.8.2 - Randomização

Cada caso era distribuído por sorteio simples para receber o medicamento 1 (placebo) ou o medicamento 2 (rhG-CSF). Assim, todos os 44 casos tiveram igual probabilidade de uso da droga em estudo.

4.8.3 - Administração do Medicamento rhG-CSF ou Placebo

A administração de rhG-CSF foi feita da seguinte forma: inicialmente uma dose de 10 µg/kg/uma vez por dia, por três dias consecutivos, por via intravenosa, diluída em 5 ml SG a 5%, durante 30 minutos. Cada 1 ml do produto tem 300 µg. Adicionou-se albumina ao preparado: 0,2 ml de albumina humana em 20 ml de SG a 5% mais o volume de G-CSF, na dose de 10 µg/kg, multiplicado por 4. A albumina atua como uma molécula carreadora para prevenção de absorção da droga pelo equipo. Dessa solução de 20 ml administravam-se 5 ml ao paciente. A solução placebo constituía-se de 5 ml de SG a 5%. Ambas as soluções eram incolores na sua visualização. Durante a aplicação do medicamento, monitorizavam-se os sinais vitais e a atividade do bebê através da frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, tensão arterial, movimentação e cor. Esse mesmo procedimento era repetido 24 horas após a primeira aplicação, correspondente à segunda dose, e 48 horas após a primeira aplicação. Era coletado sangue venoso para a aferição dos níveis hematológicos e das citocinas 24 horas imediatamente antes da 2ª dose do medicamento, 72 horas e 10 dias após a primeira aplicação do medicamento, sendo avaliados: G-CSF, GM-CSF, TNF, IL-6, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, plaquetas e hemoglobina. Mediam-se os níveis de NSP e NPP, através de uma aspiração da medula óssea da tíbia anterior, no 7º dias após o início do medicamento. Esse procedimento foi sempre realizado pela mesma médica hematologista. O RN era previamente sedado com citrato de fentanil na dose de 1 µg/kg por via intravenosa. Após, procedia-se à assepsia do local com álcool iodado a 1% e anestesia local e óssea com xilocaína, seguida da aspiração da medula óssea. Todos os pacientes receberam os cuidados específicos de terapia intensiva e de acordo com a orientação de seu médico assistente.

Adotaram-se os seguintes critérios de suspensão: contagem de leucócitos superior a 100 000/c, reações adversas graves segundo o pesquisador, ausência de evidências de infec-

ção, ou ainda a retirada do consentimento pelos pais ou responsáveis. Três pacientes não foram incluídos por falta de autorização dos pais.

A eficácia do medicamento foi aferida em todos os RNs comparando-se a taxa de mortalidade na 1ª semana e do 8º ao 28º dia de vida. Mediram-se também a taxa de infecção hospitalar, complicações hematológicas, respiratórias, gastrointestinais, renais, neurológicas e, ainda, o tempo de internação hospitalar.

Este projeto foi registrado com o número 96114 do GPPG – Grupo de Pesquisa e de Pós-Graduação, e registro 96063 do FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA. O estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e pelo Comitê de Ética do HCPA.

Cada caso estudado foi submetido a um consentimento informado e assinado pelos pais do RN (anexo).

4.9 - Análise Estatística

Inicialmente foi realizado o cálculo das médias e dos desvios padrões de todos os dados obtidos a partir da amostra. Em várias situações a mediana representa a melhor distribuição dos dados, devido à assimetria da variável considerada.

Para a análise dos níveis das citocinas (G-CSF, GM-CSF, IL-6, e TNF- α), níveis de leucócitos, de neutrófilos totais circulantes, relação NI/NT, NSP e NPP, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação dos dois grupos em cada momento. As taxas de mortalidade e morbidade foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

5

RESULTADOS

5

RESULTADOS

Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo I, que recebeu placebo, e grupo II, que recebeu medicamento. Na tabela 1 estão apresentadas as características demográficas da população avaliada.

Tabela 1 - Características Demográficas dos Pacientes Estudados

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	GRUPO I - PLACEBO (n = 22)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22)
Peso ao nascer (gramas) Média ± DP	1.404 ± 508	1.376 ± 491
Idade gestacional pediátrica Média ± DP (semanas)	31±3	29±3
Sexo masculino (39%)	8 (36%)	9 (41%)
feminino (61%)	14 (64%)	13 (59%)
Apgar 5º minuto		
Mediana	8	7
Variação	1 - 10	3 - 10
SNAP, dia 0		
Mediana	9,5	8
Variação	0 - 23	3 - 28
O ₂		
Número de pacientes	20	17
Mediana (dias)	7	7
Variação	2 - 34	2 - 60
Ventilação mecânica		
Número de pacientes	14	12
Mediana (dias)	7	7
Variação	3-25	1-17
Tempo de hospitalização (total de dias) Média ± DP	770 35 ± 27	879 40 ± 27
Neutropenia (< 1.500 mm ³) (66%)	15 (68%)	14 (64%)

Todas as características distribuíram-se de forma semelhante, sem diferenças estatisticamente significativas com $p > 0,05$.

Foi estudado um total de 44 casos de RNs com sepse, todos prematuros, e cujo peso médio ao nascer foi, respectivamente, de 1.404 ± 508 g (variação entre 755 - 2.460 g) no grupo I e de 1.376 ± 491 g (variação entre 700 - 2.335 g) no grupo II. A idade gestacional pediátrica média no grupo I foi de 31 ± 3 semanas e, no grupo II foi de 29 ± 3 semanas.

A gravidade dos casos estudados foi avaliada pelo índice do Apgar ao 5º minuto e pelo escore SNAP. O escore de Apgar no 5º minuto apresentou a mesma mediana entre os dois grupos: 7 (1 - 10) e 8 (3 - 10); e a mediana do SNAP foi de 9,5 (0 - 23) para o grupo I e de 8 (3 - 28) para o grupo II. A neutropenia ($< 1.500 \text{ mm}^3$) esteve presente em 29 pacientes (66%), sendo 15 no grupo I e 14 no grupo II.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com rhG-CSF e grupo placebo quanto ao tempo de hospitalização, de permanência em oxigenioterapia e de ventilação mecânica, sendo a média e as medianas, respectivamente, para o grupo I (placebo) de 35 ± 27 dias, 7 (2 - 34) e 7 (2 - 34) dias e, para o grupo II (rhG-CSF), de 40 ± 27 dias, 7 (2 - 60) e 7 (1 - 17) dias respectivamente.

Na tabela 2 estão contidos os fatores de risco materno e as manifestações clínicas dos pacientes.

Tabela 2 - Fatores de Risco Materno e Manifestações Clínicas dos Pacientes Estudados

FATORES DE RISCO MATERNO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS RNs	GRUPO I – PLACEBO (n = 22)	GRUPO II – rhG-CSF (n = 22)
Fatores de Risco Materno		
Bolsa rota > 24 horas	10 (45%)	13 (59%)
Corioamnionite	8 (36%)	6 (27%)
Infecção urinária	4 (18%)	4 (18%)
Corticosteroides	6 (27%)	6 (27%)
Hipertensão na gravidez	5 (23%)	1 (4%)
Ruptura prematura de membranas	8 (36%)	9 (41%)
Manifestações Clínicas nos RNs		
Acidose metabólica	11 (50%)	11 (50%)
Apnéia	10 (45%)	6 (27%)
Asfíxia (Apgar < 5 no 5º min)	5 (23%)	6 (27%)
Cianose	11 (50%)	12 (54%)
Hipoglicemia	6 (27%)	11 (50%)
Icterícia	15 (68%)	17 (77%)
Taquicardia > 160 bpm	9 (41%)	9 (41%)
Taquipnéia > 60 mm	20 (91%)	20 (91%)
Broncopneumonia	4 (18%)	10 (45%)
Saturação da oxiemoglobina < 85%	11 (50%)	12 (54%)

Todos os fatores de risco materno distribuíram-se de forma semelhante entre os dois grupos, assim como as manifestações clínicas iniciais dos RNs, não havendo diferenças estatisticamente significativas.

Na avaliação clínica dos pacientes estudados, houve a presença de fatores de risco materno em todos os casos, assim como de sinais clínicos que evidenciaram o quadro de sepse neonatal. Uma ou mais destas alterações estavam presentes em todos os casos estudados: bolsa rota há mais de 24 horas, ruptura prematura de membranas, corioamnionite, infecção urinária próxima ao nascimento e hipertensão da gravidez. Todos os casos apresentaram uma ou mais das seguintes manifestações no momento da inclusão no estudo: acidose metabólica, apnéia, asfixia, cianose, hipoglicemia, icterícia precoce, cianose, taquicardia e taquipnéia persistente em pelo menos duas tomadas e crises de desaturação do oxigênio em pelo menos duas tomadas num intervalo de 30 minutos.

As patologias presentes no início do estudo e as complicações posteriores avaliadas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Patologias Presentes Iniciais e Complicações Posteriores dos Pacientes Estudados

PATOLOGIAS INICIAIS E POSTERIORES	GRUPO I - PLACEBO (n = 22)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22)
Pneumonia congênita	4	10
Doença da membrana hialina	4	2
Meningite	1	5
Ducto arterioso patente	4	3
Nutrição parenteral	14	18
Broncopneumonia pós-natal	6	2
Enterocolite necrosante	2	0

Estas características apresentaram distribuição semelhante em ambos os grupos, portanto sem diferenças estatisticamente significativas.

Pneumonia congênita e meningite estiveram associadas no início do quadro de sepse e se distribuíram em ambos os grupos sem evidenciar diferenças estatisticamente significativas: no grupo I, 4 casos de pneumonia congênita e 1 caso de meningite e, no grupo II, 10

casos de pneumonia congênita e 5 de meningite. As complicações pós-natais foram as seguintes: broncopneumonia foi diagnosticada em 6 pacientes do grupo placebo e em 2 do grupo rhG-CSF, enterocolite necrosante foi detectada em 2 casos no grupo placebo; além disso, um fator de risco, a nutrição parenteral, foi administrada em 32/44 (73%) pacientes.

Os diferentes microrganismos detectados na sepse inicial e hospitalar encontram-se listados na tabela 4.

Tabela 4 - Microrganismos Detectados na Sepse Precoce Inicial e Hospitalar dos Pacientes Estudados

MICROORGANISMOS	GRUPO I – PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II – rhG-CSF (n = 22 CASOS)
Bactérias na sepse inicial	4	2
<i>Streptococcus</i> grupo B	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	1
<i>Escherichia coli</i>	1	-
Gram-negativo	1	-
Bactérias na sepse hospitalar	7	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	-
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	1	-

Na sepse precoce comprovada foram identificados 6 casos com microrganismos: no sangue, *Streptococcus* do grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e gram-negativo; no líquido, *Streptococcus* do grupo B (num mesmo paciente) e *E. coli* e, na

secreção traqueal, *Staphylococcus aureus*. Em 38 pacientes com quadro de sepse presumível não foram identificados germes, sendo, portanto, o exame de cultura negativo.

Após o tratamento com antibióticos mais rhG-CSF ou placebo, foram identificados 9 casos de infecção hospitalar ou sepse de início tardio, sendo 4 casos de *Staphylococcus aureus*, 4 de *Staphylococcus epidermidis* e 1 de *Staphylococcus hemolyticus*.

Em todos os pacientes foi coletado material para hemocultura e, em 40 pacientes, a cultura do líquido foi realizada no momento da inclusão no estudo, seguindo a rotina do serviço. Dos 44 casos, 30 passaram a integrar o estudo nas primeiras 24 horas de vida, 10 nas primeiras 48 horas de vida e 4 nas primeiras 96 horas de vida.

Os índices de mortalidade encontram-se expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Mortalidade até 7 Dias e 8 a 28 Dias de Vida

TEMPO DE VIDA	GRUPO PLACEBO (n = 22)		GRUPO rhG-CSF (n = 22)		
	Nº	(%)	Nº	(%)	
0 - 7 dias	3	(13,6%)	0	(0%)	p < 0,2
8 - 28 dias	3	(16%)	5	(23%)	p < 0,7
Total	6	(27%)	5	(23%)	

Não houve diferenças estatisticamente significativas em ambos os períodos estudados, embora a sobrevivência no grupo tratado com rhG-CSF fosse maior (teste exato de Fisher).

A mortalidade nos primeiros 7 dias do início do tratamento mostrou uma tendência de ser menor no grupo tratado com rhG-CSF (0% contra 13,6%). E, até o final do estudo,

do, a mortalidade foi semelhante, sendo de 27% no grupo I e de 23% no grupo II. Todos os óbitos ocorreram antes do 28º dia de vida.

A figura 2 indica a curva de sobrevivência dos pacientes tratados com placebo (azul) ou rhG-CSF (verde).

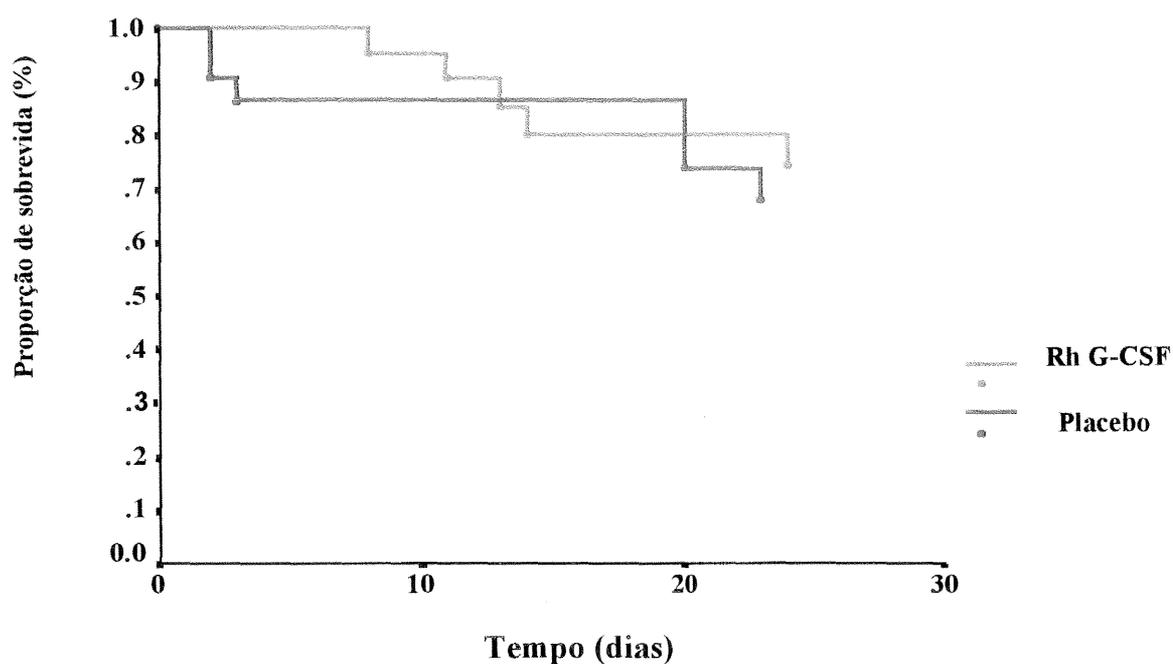


Fig. 2 - Curva de sobrevivência imediata (7 dias) e tardia (8-29 dias) entre 44 RNPT

A curva de sobrevivência mostrou uma tendência de menor mortalidade nos primeiros 7 dias de vida com o início de tratamento com rhG-CSF do que o tratamento convencional, apesar de não terem ocorrido diferenças estatisticamente significativas.

Na tabela 6 estão arroladas as causas de óbitos ocorridos.

Tabela 6 - Causas de Óbitos

TEMPO DE VIDA	GRUPO I – PLACEBO (n = 22)	GRUPO II – rhG-CSF (n = 22)
0 – 7 dias	Hemorragia intracraniana grau IV – 3 casos	-
8 – 28 dias	Pâncreas anular + obstrução intestinal – 1 caso	Hemorragia pulmonar, membrana hialina – 2 casos
	Enterocolite necrosante + peritonite – 1 caso	Hemorragia intracraniana grau IV – 2 casos
	Enterocolite necrosante + microabscessos pulmonares – 1 caso	Insuficiência renal – 1 caso

Os achados de necropsia revelaram que os 3 óbitos ocorridos nos primeiros 7 dias após o início do tratamento foram por hemorragia intracraniana com lesões de grau IV, tendo sido todos no grupo placebo. Após o 7º dia, se registraram mais 8 óbitos: no grupo I, um caso com obstrução intestinal por pâncreas anular que foi a óbito no pós-operatório e 2 casos de enterocolite necrosante, associada com peritonite num caso e com microabscessos pulmonares no outro; no grupo II, 2 casos faleceram por insuficiência respiratória progressiva, 2 casos por hemorragia intracraniana grau IV e um por insuficiência renal aguda.

A tabela 7 indica os agentes etiológicos da sepse de origem hospitalar e a patologia predominante.

Tabela 7 – Microrganismos Detectados na Sepse Hospitalar e Patologias Predominantes

MICROORGANISMOS E PATOLOGIAS PREDOMINANTES	GRUPO I – PLACEBO (n = 19)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	1	
Enterocolite necrosante	2	

Teste exato de Fisher p= 0,03

Infecção hospitalar foi caracterizada pela presença de bactérias identificadas por hemocultura ou pelo diagnóstico anatomopatológico de infecção secundária. No grupo I (placebo) ocorreram 9 casos (47,4%) de infecção hospitalar, sendo 7 por infecção bacteriologicamente comprovada e 2 por abscessos no peritônio e no pulmão associados a enterocolite necrosante, enquanto no grupo II (rhG-CSF) foram identificados 2 casos (9,1%) de infecção hospitalar bacteriologicamente comprovada ($p = 0,03$).

A tabela 8 contém as medianas dos níveis plasmáticos do G-CSF antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose de rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 8 - Níveis Plasmáticos do G-CSF (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após o Início da Administração de rhG-CSF ou Placebo

TEMPO DE MENSURAÇÃO	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	141	154	0,9
Variação	18 - 4.985	23 - 4.047	
24 horas após			
Mediana	56	2.568	0,00001
Variação	19 - 2.289	30 - 6.000	
72 horas após			
Mediana	37	129	0,007
Variação	19 - 1.608	28 - 6.000	
10 dias após			
Mediana	29	39	0,7
Variação	23 - 355	20 - 4.258	

A citocina granulopoética G-CSF foi medida quatro vezes, e seus valores são apresentados em mediana e amplitude de variação: antes da administração do rhG-CSF ou placebo, com mediana semelhante em ambos os grupos (154 pg/ml *versus* 141 pg/ml com $p = 0,9$); 24 horas após a primeira dose do rhG-CSF, cuja mediana aumentou 45 vezes em relação ao grupo placebo (2.568 pg/ml *versus* 56 pg/ml; $p = 0,00001$); com 72 horas após a primeira dose e 24 horas após a última/terceira dose de rhG-CSF, tendo sido a mediana G-CSF 3,5 vezes maior em relação ao grupo placebo (129 pg/ml *versus* 37 pg/ml; $p = 0,007$). Dez dias após o início do tratamento as medianas foram semelhantes (39 pg/ml *versus* 29 pg/ml; $p = 0,7$).

A figura 3 representa as variações da citocina G-CSF contidas no gráfico abaixo.

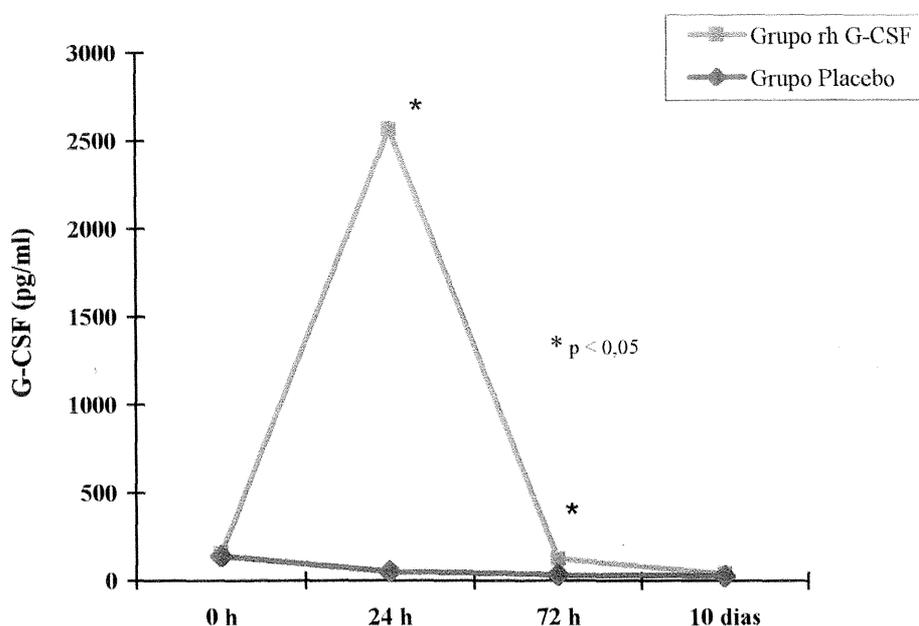


Fig. 3 - Mediana dos níveis plasmáticos do G-CSF antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo

A tabela 9 contém os níveis plasmáticos do GM-CSF (pg/ml) antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a administração da primeira dose de rhG-CSF ou placebo e imediatamente antes da administração da segunda dose de rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 9 - Níveis Plasmáticos do GM-CSF (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

TEMPO DE MENSURACAO	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	5,5	5	
Variacão	4 - 12	4 - 13	0,08
24 horas após			
Mediana	5	5	
Variacão	4 - 10	4 - 13	0,7
72 horas após			
Mediana	5	5	
Variacão	3 - 8	4 - 8	0,2
10 dias após			
Mediana	5	5	
Variacão	3 - 11	4 - 9	0,9

A citocina hematopoética GM-CSF não sofreu nenhuma alteração durante o tratamento da sepse neonatal com ou sem rhG-CSF, mantendo-se as medianas semelhantes em ambos os grupos e em todos os momentos.

A tabela 10 contém as medianas dos níveis plasmáticos do TNF- α antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose de rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 10 - Níveis Plasmáticos de TNF- α (pg/ml) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

TEMPO DE MENSURAÇÃO	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	14	13	0,5
Varição	11 - 23	11 - 29	
24 horas após			
Mediana	14	14	0,3
Varição	12 - 18	12 - 23	
72 horas após			
Mediana	14	14	0,5
Varição	12 - 17	12 - 20	
10 dias após			
Mediana	14,5	14	0,4
Varição	12 - 21	12 - 62	

A citocina TNF- α distribuiu-se de forma semelhante na evolução da sepse neonatal em ambos os grupos, não sofrendo alterações independentemente da administração de rhG-CSF em todos os momentos.

A tabela 11 contém as medianas dos níveis plasmáticos da IL-6 antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda administração do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a primeira administração e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 11 - Níveis Plasmáticos de IL-6 antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

TEMPO DE MENSURAÇÃO	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22 casos)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	27,5	20,5	0,6
Varição	1 - 1453	6 - 1500	
24 horas após			
Mediana	12	15	0,7
Varição	5 - 1295	5 - 363	
72 horas após			
Mediana	11	11	0,8
Varição	3 - 867	3 - 104	
10 dias após			
Mediana	11,5	6	0,2
Varição	3 - 620	4 - 1034	

A citocina IL-6 não variou de forma significativa durante a evolução da sepse em ambos os grupos e em todos os momentos, nem tampouco sofreu influência da administração do rhG-CSF.

A tabela 12 mostra a relação NI/NT no sangue periférico antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 12 – Relação NI/NT (Neutrófilos Imaturos/Neutrófilos Totais) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

TEMPO DE MENSURAÇÃO	GRUPO I – PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 22 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	0,18	0,18	0,5
Varição	0,03 - 0,76	0,1 - 0,82	
24 horas após			
Mediana	0,14	0,19	0,4
Varição	0,01 - 0,49	0,07 - 0,43	
72 horas após			
Mediana	0,13	0,13	0,5
Varição	0,03 - 0,32	0,04 - 0,46	
10 dias após			
Mediana	0,09	0,07	0,6
Varição	0,02 - 0,3	0,01 - 0,31	

A relação NI/NT não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos e em todos os momentos.

A tabela 13 contém os níveis de NSP, NPP, a relação NSP/NPP e a relação M/E no 7º dia após a administração de rhG-CSF ou placebo.

Tabela 13 - Valores Hematológicos de NSP, NPP, Relação NSP/NPP e Relação M/E no 7º Dia após a Administração do rhG-CSF ou Placebo

VALORES HEMATOLÓGICOS (%)	GRUPO I - PLACEBO (n = 18 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 18 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
NSP			
Mediana	51,5	61	0,003
Variação	19 - 62	43 - 70	
NPP			
Mediana	17,5	16	0,3
Variação	12 - 57	7 - 48	
NSP/NPP			
Mediana	2,9	3,7	0,05
Variação	0,3 - 4,5	0,9 - 9,4	
M/E			
Mediana	11	19,5	0,06
Variação	2 - 44	7 - 80	

Trinta e seis RNs foram submetidos a punção medular da tíbia anterior no terço distal no 7º dia após a entrada no estudo, ou seja, 4 dias após o término da administração de rhG-CSF ou placebo. Observou-se um aumento no NSP, com uma mediana de 61% no grupo II (43-70) *versus* 51,5% no grupo I (19-62) e um $p = 0,003$, ao passo que não houve mudanças significativas no número do NPP, sendo 16% no grupo II *versus* 17,5% no grupo I, com $p = 0,3$. A relação NSP/NPP foi significativamente maior no grupo que recebeu rhG-CSF, com uma mediana de 3,7 *versus* 2,9 e com $p = 0,05$. A hiperplasia mielóide que ocorre por ação do rhG-CSF é medida pela elevação da relação M/E. Ela se mostrou com uma média, no

grupo II, duas vezes maior em relação ao grupo placebo, mas cuja diferença não alcançou significância estatística ($p = 0,06$).

A tabela 14 contém as medianas dos níveis de leucócitos antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 14 - Níveis de Leucócitos Periféricos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

LEUCÓCITOS	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 21 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	8.750	11.300	0,4
Varição	1.900 - 34.000	2.700 - 29.600	
24 horas após			
Mediana	8.100	15.200	0,006
Varição	1.400 - 27.100	4.400 - 65.300	
72 horas após			
Mediana	9.250	23.100	0,00002
Varição	2.000 - 21.000	9.500 - 48.100	
10 dias após			
Mediana	12.000	13.050	0,2
Varição	7.000 - 32.900	9.100 - 30.200	

A mediana da contagem de leucócitos 24 horas e 72 horas após a administração de rhG-CSF ou placebo mostrou diferenças significativas no grupo II em relação ao grupo I: 15.200 (4.400 - 65.300) *versus* 8.100 (1.400 - 27.100) com $p = 0,006$ e 23.100 (9.500 - 48.100) *versus* 9.250 (2.000 - 21.000) com $p = 0,00002$. Dez dias após o início do tratamento, ambos os grupos mostraram contagens de leucócitos semelhantes.

A figura 4 contém a distribuição gráfica dos leucócitos antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo.

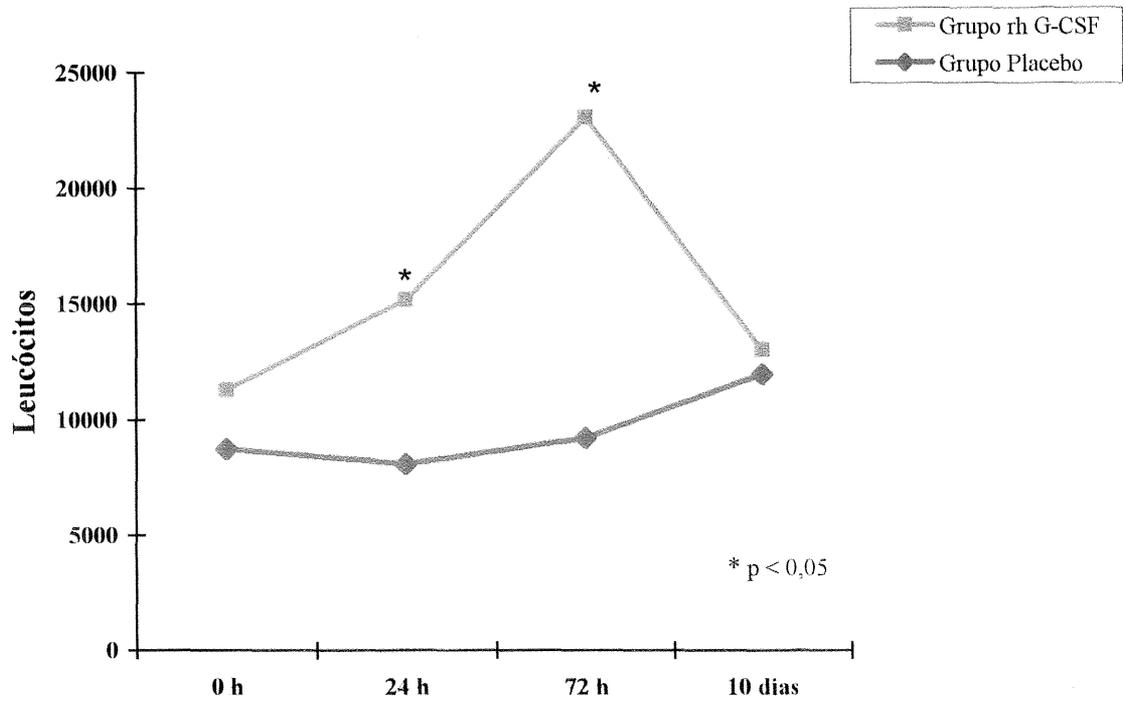


Fig. 4 – Mediana dos níveis dos leucócidos antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após o uso de rh-CSF ou placebo

A tabela 15 contém as medianas da ANC antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 15 - Níveis da Contagem Absoluta de Neutrófilos Periféricos (ANC) antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

CONTAGEM TOTAL DE NEUTRÓFILOS	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 21 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	5.316	7.076	0,3
Varição	748 - 22.440	1.058 - 20.424	
24 horas após			
Mediana	4.526	9.522	0,005
Varição	918 - 24.932	2.948 - 50.281	
72 horas após			
Mediana	4.703	16.843	0,00002
Varição	1.537 - 15.540	6.270 - 35.113	
10 dias após			
Mediana	5.049	8.446	0,07
Varição	2.856 - 23.688	1.818 - 17.818	

A mediana da ANC no início do estudo foi semelhante em ambos os grupos: 5.316 (748 - 22.440) no grupo com placebo *versus* 7.076 (1.058 - 20.424) no grupo rhG-CSF. Vinte e quatro horas após a administração do rhG-CSF ou placebo, ocorreu um aumento no grupo II para 9.522 (2.948 - 50.281), tendo todos os neutropênicos ficado com valores aumentados, *versus* 4.526 (918 - 24.932) no grupo placebo. Houve um aumento no grupo rhG-CSF em duas vezes a mediana do grupo placebo, sendo essa diferença estatisticamente significativa, com $p = 0,005$. Setenta e duas horas após o início do tratamento, o grupo II mostrou uma mediana de 16.843 (6.270 - 35.113) *versus* 4.703 (1.537 - 15.540), com uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00002$). Houve um aumento de quatro vezes a mediana do grupo placebo. Dez dias após o início do tratamento, ambos os grupos apresentaram medianas semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas.

A figura 5 contém a curva de distribuição da ANC antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo.

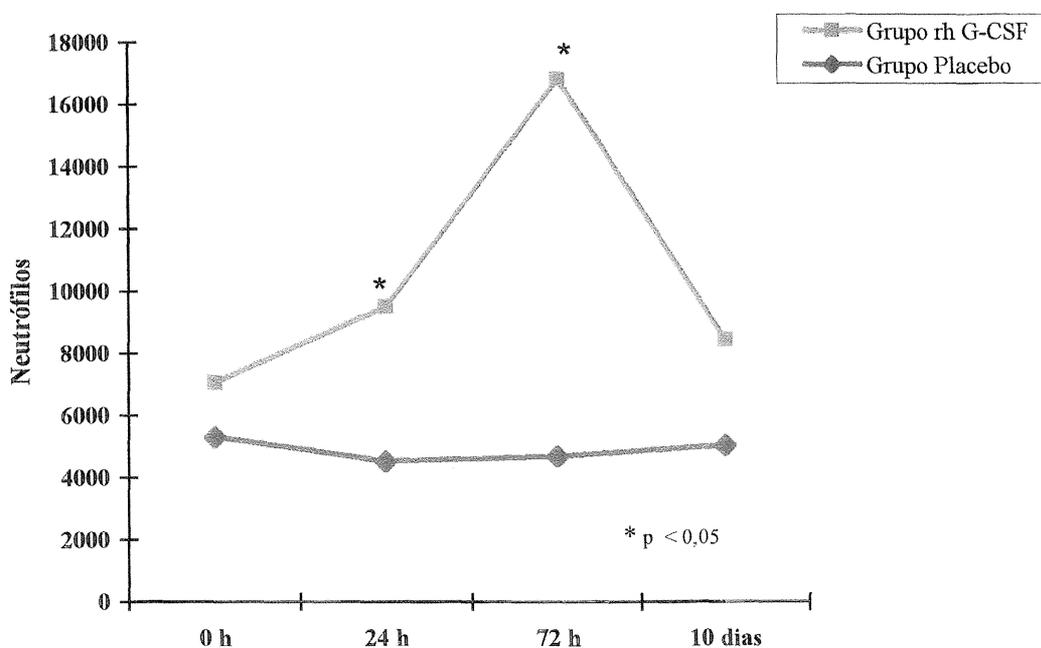


Fig. 5 - Mediana dos níveis da ANC antes, 24 horas, 72 horas e 10 dias após administração do rhG-CSF ou placebo

A tabela 16 contém as medianas dos níveis de eosinófilos plasmáticos antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose de rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 16 - Níveis de Eosinófilos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

EOSINÓFILOS	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 21 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	42	105	0,8
Varição	(0 - 420)	(0 - 452)	
24 horas após			
Mediana	56	276	0,1
Varição	(0 - 732)	(0 - 800)	
72 horas após			
Mediana	201	368	0,4
Varição	(0 - 1158)	(0 - 1920)	
10 dias após			
Mediana	205	105	0,2
Varição	(0 - 4410)	(0 - 1200)	

A contagem absoluta dos eosinófilos foi semelhante em ambos os grupos e em todos os momentos do estudo, não sofrendo mudanças frente à administração de rhG-CSF.

A tabela 17 contém os níveis de hemoglobina antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 17 - Níveis de Hemoglobina antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

HEMOGLOBINA	GRUPO I – PLACEBO (n = 22 CASOS)	GRUPO II – rhG-CSF (n = 21 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	15	14	0,2
Variação	12 - 19	10 - 19	
24 horas após			
Mediana	14	14	1
Variação	11 - 20	11 - 18	
72 horas após			
Mediana	13,5	15	0,2
Variação	9 - 18	10 - 18	
10 dias após			
Mediana	12	13,5	0,06
Variação	9 - 15	10 - 17	

A avaliação da hemoglobina ficou prejudicada. Apesar de não haver diferenças significativas ou efeitos clínicos na contagem da hemoglobina/hematócrito, alguns casos receberam transfusão de concentrado de hemácias para manter os níveis de hemoglobina/hematócrito em torno de 14g% ou 40%, respectivamente, na primeira semana de vida, devido à gravidade do quadro.

A tabela 18 contém as medianas dos níveis dos linfócitos antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 18 - Níveis de Linfócitos antes, 24 Horas, 72 Horas após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

LINFÓCITOS	GRUPO I - PLACEBO (n = 22 casos)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 21 casos)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	2.571	2.604	0,9
Varição	114 - 10.880	616 - 9.360	
24 horas após			
Mediana	2.349	3.886	0,07
Varição	42 - 7.560	540 - 13.713	
72 horas após			
Mediana	3.272	4.037	0,2
Varição	220 - 6364	984 - 7600	
10 dias após			
Mediana	4.002	4.320	0,4
Varição	1.602 - 8.721	900 - 10.268	

A contagem absoluta de linfócitos não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupo, não sofrendo alterações por ação do rhG-CSF.

A tabela 19 contém as medianas dos níveis dos monócitos antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a primeira administração e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 19 - Níveis dos Monócitos antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

MONÓCITOS	GRUPO I - PLACEBO (N = 22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n = 21 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	386	387	0,3
Varição	38 - 1.435	116 - 2.664	
24 horas após			
Mediana	405	665	0,1
Varição	58 - 1.494	88 - 3.140	
72 horas após			
Mediana	481	1.178	0,0002
Varição	86 - 1.158	0 - 5.291	
10 dias após			
Mediana	615	720	0,5
Varição	70 - 2.632	182 - 2.250	

A contagem absoluta de monócitos mostrou diferenças estatisticamente significativas 72 horas após a administração da 1ª dose de rhG-CSF, com um aumento 2,5 vezes maior em relação ao grupo controle ($p = 0,0002$).

A tabela 20 contém as medianas dos níveis de plaquetas antes da administração do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo e imediatamente antes da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração

da primeira dose do rhG-CSF ou placebo e imediatamente antes da terceira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo.

Tabela 20 - Níveis das Plaquetas antes, 24 Horas, 72 Horas e 10 Dias após a Administração de rhG-CSF ou Placebo

PLAQUETAS	GRUPO I - PLACEBO (n=22 CASOS)	GRUPO II - rhG-CSF (n= 22 CASOS)	p KRUSKAL-WALLIS
0 hora			
Mediana	207.000	217.500	0,3
Varição	58.000 - 332.000	126.000 - 380.000	
24 horas após			
Mediana	126.000	181.000	0,1
Varição	35.000 - 281.000	118.000 - 359.000	
72 horas após			
Mediana	160.000	187.000	0,9
Varição	41.000 - 331.000	65.000 - 428.000	
10 dias após			
Mediana	306.000	315.000	0,5
Varição	28.000 - 611.000	75.000 - 828.000	

A contagem de plaquetas foi semelhante nos dois grupos e em todos os momentos e não sofreu influência da administração do rhG-CSF.

6

DISCUSSÃO

6

DISCUSSÃO

6.1 - Introdução

A sepse neonatal é uma doença muito freqüente em nosso meio e a principal causa de morte no período neonatal. Ela foi responsável, no HCPA, no período compreendido entre 1984 a 1991, por 101 óbitos. Isto correspondeu a 35% do total de óbitos, e a sepse de início precoce apresentou 67 óbitos, ou seja, 19% do total de óbitos. Nesse período houve um total de 23.500 nascimentos, o que correspondeu a uma incidência de sepse neonatal de 20 casos para cada 1.000 nascidos vivo (MENEGAZ, MULLER, SHUMACHER, 1995; MIURA, 1997a). No Kaplan Hospital, de Israel, entre 1989 e 1992, em 18.227 nascimentos houve 109 casos de sepse, com uma incidência de 6,6/1.000 RNs e uma mortalidade de 20%; a sepse de início precoce teve uma mortalidade de 37% (LEIBOVITZ et al., 1997).

Nos Estados Unidos, a infecção bacteriana é responsável por 15% das mortes no período neonatal, sendo que, na forma precoce, a taxa de mortalidade atinge até 50%, enquanto na sepse tardia a taxa de mortalidade é de 15% (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; HICKEY & McCRACKEN, 1997). Nos países desenvolvidos, houve uma redução na incidência de sepse neonatal precoce porque cerca de 72% dos óbitos ocorrem dentro de 2 dias de hemocultura positiva, a despeito do tratamento apropriado de antibióticos (HICKEY & McCRACKEN, 1997). A principal ação foi a redução da sepse por GBS. O GBS é um coco gram-positivo e o mais importante agente etiológico da sepse

neonatal precoce nos países desenvolvidos. A sepse ocorre em 1 caso para cada 100 a 200 mães colonizadas ou em 1 a 4 casos por 1.000 nascidos vivos, sendo 8 a 12 vezes mais freqüente em prematuros (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; GIBBS et al., 1992; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a, 1996b, HICKEY & McCRACKEN, 1997). Nos Estados Unidos, houve uma redução parcial da sepse por GBS devido às recomendações do uso profilático periparto de penicilina G cristalina ou ampicilina em trabalho de parto prematuro na presença do GBS por ação conjunta dos Comitês do Feto e do Recém-Nascido da Academia Americana de Pediatria e da Academia Americana de Ginecologia e Obstetrícia (AAP, 1997). Além disso, também está indicada essa profilaxia nas seguintes condições: irmão prévio desse RN com história de sepse por GBS, bacteriúria por GBS durante a gravidez, GBS com trabalho de parto antes de 37 semanas ou bolsa rota há mais de 18 horas ou febre intraparto igual ou acima de 38°C (GIBBS et al., 1992; AAP, 1997). STOLL et al. (1996a, 1996b) enfatizaram, em dois trabalhos, o aumento de óbitos por infecção no período pós-natal nos Estados Unidos devido ao aumento da sobrevivência dos RNMBP. No Brasil, ainda não se tem uma conduta frente ao trabalho de parto prematuro com risco de infecção neonatal. A maior dificuldade consiste na falta de estudos epidemiológicos sobre a infecção neonatal. Quanto à etiologia, os dados existentes são provenientes de estudos retrospectivos e que mostram a baixa incidência do GBS, sendo encontrado no HCPA em menos de 8% dos casos de sepse neonatal (MIURA, 1997b).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito terapêutico do fator estimulador de colônias de granulócitos no tratamento adjuvante da sepse precoce em RNPTs. Os dados de literatura mostram que, mesmo com o advento de potentes antibióticos e cuidados especiais nas UTI neonatais, a sepse neonatal continua sendo a mais importante causa da mortalidade neonatal (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; GIBBS et al., 1992; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; LLORENS-

SÃEZ & McCRACKEN, 1993; SALZMAN et al., 1993; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a, 1996b; HICKEY & McCRACKEN, 1997). Ocorre uma grave deficiência do sistema imunológico do RNPT, sendo a mais importante a falha quantitativa e qualitativa dos neutrófilos (WILSON, 1995). Os neutrófilos polimorfonucleares representam a principal defesa para a fagocitose das bactérias e, no RNPT, ocorrem falhas na produção e função dos neutrófilos (DALE et al., 1995). Foi demonstrado que a utilização de citocinas estimuladoras do sistema imunológico hematopoiético (G-CSF e GM-CSF) é capaz de reverter a neutropenia, assim como aumentar a capacidade funcional e fagocítica dos neutrófilos (KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a; GILLAN et al., 1993). A G-CSF é uma citocina hematopoiética, estimuladora do sistema imunológico que é sintetizada e produzida em resposta ao estímulo inflamatório pelo estroma da medula óssea, células endoteliais, monócitos, macrófagos e fibroblastos e atua aumentando a granulopoiese (BONILLA et al., 1989; CAIRO et al., 1992b; CAIRO, 1993). No RNPT foram detectados baixos níveis plasmáticos de G-CSF em resposta à infecção, associados à depleção da reserva medular de neutrófilos e neutropenia (KOENIG & CHRISTENSEN, 1989; CAIRO et al., 1992c; GESSLER et al., 1993).

O rhG-CSF é usado com sucesso na síndrome de Kostman ou agranulocitose congênita (BONILLA et al., 1994), na neutropenia após quimioterapia para leucemia aguda e tumores sólidos (GABRILOVE et al., 1988b), após transplante de medula óssea e na redução da neutropenia na AIDS (MILES et al., 1991).

6.2 - Metodologia do Estudo

6.2.1 - Definição de Sepses

Utilizamos os critérios atuais para a definição de sepsis ou síndrome séptica, cujo conceito foi expresso em passagens precedentes do trabalho (BONE, 1991a, 1991c; BONADIO, HENNES, SMITH, 1993).

Assim, 44 RNPTs com menos de 5 dias de vida preencheram de forma consecutiva os critérios definidos como síndrome séptica ou sepsis clínica, no período compreendido entre 1º de agosto de 1996 e 30 de julho de 1997. Houve 6 casos de sepsis comprovada: um por GBS (1), dois por *Staphylococcus aureus*, um por *Staphylococcus epidermidis*, um por *Escherichia coli* e um por bacilo gram-negativo, não tendo sido nos demais 38 casos identificado o agente etiológico.

6.2.2 - Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito terapêutico e os efeitos sobre os componentes hematológicos e sobre as citocinas pró-inflamatórias hematopoiéticas mediante o emprego do rhG-CSF no tratamento adjuvante da sepsis neonatal precoce em RNPTs com menos de 5 dias de vida. Foi desenvolvido um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Foram avaliados de forma consecutiva 44 prematuros com menos de 5 dias de vida, distribuídos em 2 grupos, de forma aleatória, em 22 casos em cada grupo. O estudo tomou como base vários trabalhos que avaliaram o uso de rhG-CSF em RNs animais e em RNs humanos, a maioria dos quais consistia de relatos de casos, sendo dois estudos controlados e duplo-cegos e dois outros de casos controlados com casos históricos. Esses estudos mostraram

a reversão da neutropenia e, em alguns deles, ocorreu redução da mortalidade por sepse neonatal (ROBERTS et al., 1991; GILLAN et al., 1992; GILLAN et al., 1994; GILMORE, STRONCEK, KORONES, 1994; MURRAY, McCLAIN, WEARDEN, 1994; BARAK et al., 1995; BEDFORD-RUSSEL et al., 1995; CAIRO et al., 1995; DROSSOU et al., 1995; LA GAMMA, ALPAN, KOCHERLAKOTA, 1995; LEIBOVITZ, 1995; MAKHLOUF, 1995; NANKERVIS & SEGUIN, 1995; BARAK et al., 1997; KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a, 1997b).

6.3 - Tamanho da Amostra

Na primeira fase do trabalho, com 26 casos estudados, ocorreram 3 óbitos no grupo rhG-CSF e 6 no grupo placebo. A análise estatística interina dessa fase mostrou que seria necessário um total de 42 casos, se a tendência para a mortalidade fosse mantida, para que se alcançasse uma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de tratamento ($p < 0,05$). Com isso, a mortalidade seria reduzida em mais de 50% em relação ao tratamento convencional. Entretanto, a inclusão de mais 18 pacientes, distribuídos de forma aleatória, não seguiu tal tendência. Assim, com 44 casos estudados, suspendemos o estudo após 1 ano desde seu início. Este estudo correspondeu à maior casuística existente até o momento na literatura internacional (ROBERTS et al., 1991; GILLAN et al., 1992; GILLAN et al., 1994; GILMORE, STRONCEK, KORONES, 1994; MURRAY, McCLAIN, WEARDEN, 1994; BARAK et al., 1995; BEDFORD-RUSSEL et al., 1995; CAIRO et al., 1995; DROSSOU et al., 1995; LA GAMMA, ALPAN, KOCHERLAKOTA, 1995; LEIBOVITZ, 1995; MAKHLOUF, 1995; NANKERVIS & SEGUIN, 1995; BARAK et al., 1997; KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a, 1997b).

6.4 - Características Demográficas

As características demográficas distribuíram-se de forma semelhante em ambos os grupos, conforme observado na tabela 1. A prematuridade dos pacientes foi calculada pela média da idade gestacional pediátrica avaliada pelo método de Ballard expandido (BALLARD, NOVAK, DIRVER, 1979; BALLARD, KHOURY, DIRVER, 1991) e pela média do peso de nascimento: no grupo I foi de $29,4 \pm 3,1$ semanas e, no grupo II, de $30,7 \pm 2,9$ semanas, e a média do peso ao nascer foi, no grupo I, de 1.376 ± 491 g e, no grupo II, de 1.404 ± 598 g. Tais dados são semelhantes aos dos pacientes avaliados no mais recente estudo publicado por KOCHERLAKOTA & LA GAMMA (1997a), cujo peso médio do grupo tratado com rhG-CSF foi de 1.744 ± 319 g e cuja mediana da idade gestacional foi de 29 semanas, com uma variação de 24 - 41 semanas.

Avaliamos a gravidade clínica da sepse pelo escore SNAP cuja mediana no dia de entrada no estudo foi de 8 no grupo I, com variação 3 - 28, e de 9,5 no grupo II, com variação 0 - 23. Os 11 casos que foram a óbito tinham escore SNAP acima de 17 na primeira avaliação, e, de acordo com os autores, a mortalidade é próxima de 100% nos RNs com escore acima de 17. Esse escore pode variar de 0 a 42. O SNAP avalia o pior desempenho fisiológico no dia do nascimento. A soma desses valores fornece um escore que representa a gravidade da doença atual e é capaz de prever a mortalidade. Sua eficácia se correlaciona com a predição clínica dos médicos e enfermeiras e também com a intensidade dos procedimentos de terapia intensiva praticados. Há também uma ótima correlação com a sobrecarga de tarefas médica e do serviço de enfermagem, com a intensidade de procedimentos de UTI, com a estimativa de mortalidade por grupos de risco pelos médicos e com o tempo de hospitalização. Valores abaixo de 8 têm uma mortalidade abaixo de 20%, entre 8 e 17 a mortalidade varia de 30% a 50% e acima de 17 a mortalidade é próxima a 100% (BARD, 1993; RICHARDSON et al.,

1992, 1993). O SNAP é o escore mais utilizado na avaliação do estado fisiológico do RN, a partir da introdução de novas armas terapêuticas e tecnológicas na atenção ao RN crítico. O SNAP passou a ser, além de um índice preditivo de mortalidade, um índice preditivo de morbidade para infecção hospitalar, hemorragia intracraniana graus III e IV e retinopatia da prematuridade graus III e IV (RICHARDSON et al., 1992, 1993).

A distribuição quanto ao sexo mostrou o predomínio do sexo feminino com 29 casos (66%) contra 15 do sexo masculino (34%), em desacordo com a literatura que afirma o predomínio do sexo masculino, numa proporção de 4:1 (SIEGEL & McCRACKEN, 1981; JAFARI & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995), o que se explicaria, em parte, pela maior presença do receptor solúvel da IL-1 no sexo feminino, impedindo a progressão da infecção (MIURA & MIURA, 1997).

6.5 - Efeitos do rhG-CSF sobre a Mortalidade

Como existem poucos estudos clínicos randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo com o rhG-CSF na sepse neonatal, fica difícil avaliar o impacto direto desse medicamento na redução imediata da mortalidade, das complicações nos diversos sistemas e das infecções posteriores (ROBERTS et al., 1991; CAIRO et al., 1992b; GILLAN et al., 1992, 1993, 1994; GILMORE, STRONCEK, KORONES, 1994; MURRAY, McCLAIN, WEARDEN, 1994; BARAK et al., 1995; BEDFORD-RUSSEL et al., 1995; CAIRO et al., 1995; DROSSOU et al., 1995; LEIBOVITZ, 1995; ROSENTHAL et al. 1996; KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a).

Em nosso estudo, a mortalidade por sepse ocorrida nos primeiros sete dias de vida foi de 3 óbitos (13,6%) no grupo que recebeu placebo, enquanto no grupo que recebeu rhG-CSF não houve óbitos (0%). Esta diferença na mortalidade não foi estatisticamente significativa, porém aponta uma tendência do efeito da droga na redução da mortalidade imediata. Ao

final de 28 dias, haviam ocorrido 11 óbitos, sendo 5 no grupo medicamento e 6 no grupo placebo. Os 3 óbitos nos primeiros 7 dias após o início do tratamento tiveram o diagnóstico final de hemorragia intracraniana grau IV, além de outros focos hemorrágicos. A mortalidade tardia, ocorrida entre o 8^o e o 28^o após o início do tratamento, foi de 5 óbitos no grupo G-CSF e de 3 no grupo placebo. No grupo placebo, 2 óbitos foram decorrentes de enterocolite necrosante, enquanto no grupo medicamento não houve óbito por essa doença. Os óbitos por sepse de início precoce geralmente têm mínimas características histológicas de um processo infeccioso. Os achados típicos de bacteremia, como múltiplos abscessos disseminados de tamanho similar, vasculite purulenta e identificação bacteriana intravascular, são raros, exceto na sepse de início tardio (KLEIN & MARCY, 1995). O choque que acompanha a bacteremia leva a achados sobrepostos, como leucomalácia periventricular, hemorragia periventricular, necrose hepática, hemorragia medular renal, necrose renal cortical ou tubular aguda e hemorragia ou necrose adrenal. Evidências de coagulação intravascular disseminada, manifestadas por tiras de fibrina entrelaçadas dentro dos vasos ou pela presença de hematoma fibrinoso subaracnóideo, podem também estar presentes (JAFARI & McCracken, 1992; KLEIN & MARCY, 1995).

O impacto dessa droga sobre a mortalidade foi estudada em diversos modelos experimentais em RNs animais de laboratório com sepse e, mais recentemente, em seres humanos (MATSUMOTO et al., 1987; WHEELER et al., 1988; KAWAKAMI et al., 1990a; MOLINEAUX, PODJA, DEXTER, 1990; YASUDA et al., 1990; MATSUMOTO et al., 1991; ROBERTS et al., 1991; CAIRO et al., 1992b; DEMETRI & GRIFFIN, 1992; GILLAN et al., 1992, 1993; BEDFORD-RUSSEL et al., 1995; DROSSOU et al., 1995; HARTUNG et al., 1995; NANKERVIS & SEGUIN, 1995; SMITH et al., 1995; VAN DEVENTER, 1995; LUNDBLAD, NESLAND, GIERCKSKY, 1996; KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a; GLASPY et al., 1998; DUHRSEN et al., 1998).

É importante administrar concomitantemente antibióticos. Um estudo multicêntrico envolvendo mais de 20 centros médicos nos Estados Unidos sobre o uso do rhG-CSF na sepse neonatal tardia foi recentemente interrompido após terem sido estudados aproximadamente 100 casos. O impacto sobre a mortalidade foi pequeno, daí a necessidade de um número muito grande de casos para que se alcancem diferenças estatisticamente significativas na redução da mortalidade (JEFFS, 1997). Em adultos com choque séptico, para se obter uma redução de 10% na mortalidade com uma droga bloqueadora de citocinas no tratamento adjuvante da sepse, seriam necessários cerca de 6.000 casos, distribuídos em 2 grupos randomizados, controlados por placebo. Resta saber quem financiaria um projeto dessa magnitude (CHRISTMAN, HOLDEN, BLACKWELL, 1995). Nosso estudo é justificável porque, mesmo com antibióticos adequados e cuidados de UTI, a mortalidade é elevada, e cerca de 72% dos óbitos na sepse neonatal precoce em RNPTs ocorrem nas primeiras 48 horas de hemocultura positiva (KLEIN & MARCY, 1995; HICKEY & McCracken, 1997).

Em modelos experimentais com animais, GORGEN et al. (1992); induziram choque séptico em ratos administrando polissacarídeos de bactérias gram-negativas, seguidos do uso de rhG-CSF na dose de 50 µg/kg (1) e 250 µg/kg (2) sem antibióticos. O estudo foi controlado por placebo (3), e os resultados mostraram, respectivamente, uma mortalidade de 33% (1), 0% (2) e 83% (3). Houve uma redução do TNF- α no grupo 2. LUNDBLAD, NESLAND, GIERCKSKY (1996), ao aumentarem a dose de 20 µg/kg para 100 µg/kg, não obtiveram redução na mortalidade. CAIRO et al. (1990a, 1990b) em dois trabalhos, mostraram em ratos RNs com sepse por *Streptococcus* do grupo B que a administração de rhG-CSF associada com antibióticos por sete dias levou a uma redução significativa na mortalidade em relação ao grupo que recebeu somente antibióticos (CAIRO et al., 1990a, 1990b). Similarmente, a administração de rhG-CSF com antibióticos num modelo de sepse por gram-negativo e neutropenia em coelhos melhorou a sobrevivência comparada com a alcançada exclusivamente com antibióticos (SMITH et al., 1995). Em ratos RNs, a administração

intraperitoneal de *Streptococcus agalactiae* após a administração por sete dias do rhG-CSF na dose de 5 ug/kg/d provocou neutrofilia sustentada e redução na mortalidade em relação ao grupo controle (50% versus 100%) 96 horas após a indução da infecção. Não se obteve o mesmo sucesso na redução da mortalidade e prevenção da neutropenia quando se administraram os antibióticos mais rhG-CSF, 6 a 18 horas após a administração intraperitoneal do *S. agalactiae* (ROBERTS et al., 1991; CAIRO et al., 1992b). Esses dados sugerem que a eficácia da droga está relacionada à precocidade da administração, e bem menos a doses elevadas.

Em relação a RNs humanos, até o momento, cerca de 110 já foram tratados com rhG-CSF e, atualmente, estão em andamento dois estudos multicêntricos, um nos Estados Unidos e outro na Europa, duplo-cegos, randomizados, controlados por placebo, sobre o uso do medicamento em sepse neonatal tardia com o objetivo de reduzir a mortalidade em torno de 10%. O estudo americano foi interrompido porque, para atingirem-se diferenças estatisticamente significativas na redução da mortalidade, seria necessário um número bem maior de casos e também por terem sido observados grandes benefícios no aumento da resposta granulocítica e aumento da reserva medular de neutrófilos nos RNPTs (JEFFS, 1997).

KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997; publicaram trabalho sobre o uso de rhG-CSF, na dose de 10µg/kg/d, por três dias, em 14 RNPTs com sepse e com neutropenia, sendo 7 com sepse de início precoce e 7 com sepse de início tardio. Os resultados foram comparados com controles históricos, de forma retrospectiva, com 11 neonatos com sepse e neutropênicos. A mortalidade foi de 8% contra 45% do controle histórico ($p < 0,03$). Mais recentemente, BARAK et al. (1997) trataram 14 RNPTs com sepse e neutropenia com rhG-CSF, na dose de 5 a 20 µg/kg/d por 5 dias, mais antibióticos, e fizeram comparação histórica com 24 casos. A mortalidade foi de 2 óbitos no grupo tratado contra 9 óbitos nos controle, o que não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,1$).

Uma possível redução da mortalidade por sepse pode ser atribuída ao efeito do rhG-CSF provocando um aumento da quantidade absoluta de neutrófilos e ao melhor funcionamento dos neutrófilos (MANROE et al., 1979; GILLAN et al., 1993).

A duração do tratamento foi de 3 dias, de acordo com a recomendação de CAIRO (1989b) e GILLAN et al. (1993, 1994). Esse tempo é suficiente porque a resposta dos neutrófilos é imediata e mantém um platô em adultos após o quarto dia de tratamento independentemente de novas administrações, e, segundo vários autores, em RNPTs, após o terceiro dia, a contagem de neutrófilos também não se altera, ficando dentro de variações normais (CAIRO, 1989b; LA GAMMA, ALPAN, KOCHERLAKOTA, 1995, KOCHERLAKOTA & LA GAMMA, 1997a).

6.6 - Efeitos do rhG-CSF sobre a Infecção Hospitalar e Outras Complicações

O número de pacientes livres de infecção até 28 dias de vida foi significativamente maior no grupo que recebeu rhG-CSF. A diferença de 2 casos (9,1%) de infecção pós-natal no grupo rhG-CSF contra 9 (47,4%) no grupo placebo foi estatisticamente significativa ($p = 0,03$). No grupo rhG-CSF, detectaram-se 2 casos de sepse por *Staphylococcus aureus*, enquanto no grupo placebo foram identificados 2 casos de *Staphylococcus aureus*, 4 casos de *Staphylococcus epidermidis* e 1 caso de *Staphylococcus hemolyticus*, além de 2 casos de enterocolite necrosante. KOCHERLAKOTA et al. (1997b) estudaram 27 RNMBPs com neutropenia induzida por hipertensão materna e, após o uso de rhG-CSF (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{k}/\text{d}$ por 3 dias), verificaram que a incidência de infecção hospitalar foi de 14% (2/14) no grupo que recebeu rhG-CSF contra 61% (8/13) no grupo placebo ($p < 0,05$). A redução na incidência de infecção hospitalar em prematuros tem grandes vantagens, como menor mortalidade geral, menor número de complicações em outros órgãos, menor consumo de antibióticos e redução no tempo

de internação hospitalar. O rhG-CSF parece desenvolver um efeito protetor a médio prazo devido ao aumento relativo do G-CSF plasmático, revertendo a neutropenia e aumentando o NSP. Além disso, observou-se marcante hiperplasia mielóide a nível maturacional de neutrófilos sem aumento no número de precursores mielóides (CAIRO, 1989b; GESSLER et al., 1993; GLASPY et al., 1998; DUHRSEN et al., 1998). A hiperplasia mielóide revela-se por aumento na proporção mielóide:eritróide e na proporção de neutrófilos imaturos no sangue (MIURA & MIURA, 1997; WOLACH, 1997). Em nosso estudo, essa relação foi 50% maior no grupo com rhG-CSF, porém não atingiu uma significância estatística ($p = 0,06$). Vale lembrar que o G-CSF é a mais potente das citocinas testadas como mobilizador de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea para o sangue periférico (WHEELER et al., 1988; DEMETRI & GRIFFIN, 1992; MIURA, 1997b; MIURA & MIURA, 1997; DUHRSEN et al., 1998).

A administração de rhG-CSF não provocou complicações pulmonares que determinassem o aumento de oxigênio ou de ventilação mecânica ou tempo de hospitalização. Segundo alguns autores, a administração de rhG-CSF pode provocar agregação de neutrófilos no pulmão injuriado em ventilação mecânica com extravasamento dos mesmos, maior injúria pulmonar e maior dependência de oxigênio e de ventilação mecânica, caracterizando um pulmão de choque (DALE et al., 1995; VAN DEVENTER, 1995). LUNDBLAD, NESLAND, GIERCKSKY (1996) provocaram sepse intra-abdominal em ratos e estudaram a eficácia do rhG-CSF na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ em um estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo; eles verificaram redução na mortalidade (96% para 42%) e diminuição das bactérias, das endotoxinas circulantes, de TNF- α e de endotelina-1. O fluxo sanguíneo na microvasculatura melhorou e não se observou lesão endotelial pulmonar mediada pelo neutrófilo induzida pelo rhG-CSF. Um outro estudo mostrou que o rhG-CSF provocou bloqueio da agregação dos neutrófilos, enquanto no grupo placebo houve recrutamento dos neutrófilos e aumento do TNF- α (HARTUNG et al., 1995). Em nossa pesquisa, não houve

diferenças quanto ao tempo de dependência ao oxigênio, de ventilação mecânica, pneumonia, hemorragia intraventricular e enterocolite necrosante, sugerindo que o rhG-CSF não provoca agregação neutrofílica a nível do endotélio vascular injuriado. Portanto, os riscos provenientes da reperfusão após a injúria endotelial com a ativação de macrófagos e invasão local por neutrófilos aguardam maiores estudos, principalmente nas situações de displasia broncopulmonar, enterocolite necrosante, retinopatia da prematuridade e hemorragia intraventricular (DEMETRI & GRIFFIN, 1992; ADAM, LA GAMMA, BROWN, 1995; ROSENTHAL et al. 1996).

No início do quadro foram detectados 14 casos de broncopneumonia associado à sepse, fato que pode ser atribuído à presença de corioamnionite e trabalho de parto prematuro (GIBBS et al., 1992). No período pós-natal, foram diagnosticados mais 8 casos de broncopneumonia, sendo 6 no grupo placebo e 2 no grupo rhG-CSF, sugerindo também um efeito protetor do rhG-CSF contra infecções pós-natais (GIBBS et al., 1992; KOCHERLAKOTA & GAMMA, 1997b; WOLACH, 1997).

Em nosso estudo, a meningite esteve presente no início da sepse em 6 casos (13%), sendo 1 por GBS, 1 por *E. coli* e 1 por *S. aureus*. Todos eles tiveram boa evolução. Não houve registro de meningite pós-natal. Na sepse ocorre elevação dos níveis de G-CSF no sangue e no sistema nervoso central, principalmente quando há meningite concomitante por produção local de G-CSF (KAWAKAMI et al., 1990a; SHIMODA et al., 1991). O efeito do rhG-CSF na proteção a médio prazo do sistema nervoso central merece estudos posteriores.

6.7 - Efeitos do rhG-CSF sobre as Citocinas Hematopoéticas

Em nossa investigação, as citocinas analisadas – GM-CSF, TNF- α e a IL-6 – não mostraram alteração de nível sob a ação do rhG-CSF. GÖRGEN et al. (1992) constataram que a administração de altas doses de rhG-CSF, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, em ratos com sepse provocada por

polissacarídeos de bactérias gram-negativa, foi capaz de suprimir a produção de TNF- α e reduzir a mortalidade e a injúria hepática quando comparada à dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e ao grupo placebo. LUNDBLAD, NESLAND, GIERCKSKY (1996) em um estudo duplo-cego e randomizado, após provocarem sepse abdominal polimicrobiana, administrando antibióticos com ou sem G-CSF na dose 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ em ratos adultos, verificaram supressão nas concentrações de TNF- α e endotelina-1, além de redução na mortalidade e concentração de bactéria. O aumento da dose para 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ou o uso profilático de G-CSF não trouxe nenhuma vantagem. A supressão dos pró-inflamatórios também provocou redução na produção de endotelina-1, um potente vasoconstritor e depressor cardíaco, aumentando o fluxo sanguíneo nas áreas injuriadas. Assim, em animais, o rhG-CSF aumentou a produção e a função dos neutrófilos e reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias. Em humanos, observou-se também um aumento significativo nos níveis dos antagonistas dos receptores de IL-1 e de IL-8 e uma redução do interferon e de GM-CSF, produzindo efeitos benéficos na resposta anti-inflamatória (YUO et al., 1987; HAMMOND et al., 1989; LIESCHYKE & BURGUESS, 1992).

Vários estudos têm mostrado que os RNs produzem menos G-CSF endógeno do que os adultos (CAIRO et al., 1992b; CAIRO, 1993; BAILIE et al., 1994). Também há evidências de que o G-CSF endógeno é crucial na granulopoiese no período neonatal (CARTWRIGHT, ATHENS, WINTROBE, 1964; WHEELER et al., 1988; WOLACH, 1997). Níveis elevados de G-CSF são encontrados em estados de intensa demanda, como é o caso da sepse, e, portanto são excelentes marcadores de infecção aguda, como demonstrado por KAWAKAMI et al. (1990), IKENO (1994) e KENNON (1995), com boa sensibilidade e excelente especificidade.

Em nosso estudo, houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de G-CSF 24 horas e 72 horas após a aplicação da primeira dose do rhG-CSF, quando comparado ao placebo. Além disso, o rhG-CSF mostrou-se uma droga segura e bem tolerada, não tendo efei-

tos de intolerância gastrointestinal nem reações alérgicas. Após a primeira dose, em 24 horas houve um aumento em 16 vezes na mediana do G-CSF (154 pg/ml para 2.568 pg/ml) e cerca de 46 vezes a mais sobre a mediana do grupo controle. No grupo controle, após 24 horas de tratamento, os níveis de G-CSF baixaram de 141 pg/ml para 56 pg/m. E, 72 horas após o início do estudo, o grupo G-CSF mostrou uma mediana de 129 pg/ml contra 37 pg/ml do grupo controle ($p = 0,007$). Essa queda provavelmente seja devida à captação do G-CSF pelos receptores de membrana celular, seguida da depuração celular pelos neutrófilos circulantes (NICOLA, 1989). Os níveis de G-CSF no início do estudo eram elevados em ambos os grupos. Entretanto, comparado com o adulto, o RN não é capaz de gerar G-CSF efetivamente. Análises da expressão mRNA G-CSF do cordão umbilical e de monócitos de adultos mostraram expressões de G-CSF negligenciáveis (NICOLA, 1989; CAIRO et al., 1992c). De modo similar, após a ativação de células mononucleares do cordão, ocorre menor nível de G-CSF e de expressão mRNA G-CSF comparado com mononucleares do adultos similarmente ativados (MILLER, 1979; CAIRO et al., 1992c). Isto se repetiu quando se ativaram células mononucleares de prematuros (CAIRO et al., 1992c; SCHIBLER et al., 1993). Acrescente-se que os níveis do G-CSF em RNTs com neutropenia são significativamente menores do que em adultos com grau semelhante de neutropenia. Finalmente, durante a sepse experimental, houve falhas na expressão mRNA G-CSF da medula óssea, pulmões, fígado e baço (GRANOWITZ et al., 1994; HARTUNG et al., 1995).

6.8 - Efeitos do rhG-CSF sobre os Componentes Hematológicos

O uso de rhG-CSF tem mostrado produzir a proliferação do progenitor mielóide e induzir neutrofilia no sangue periférico do RN humano, além de manter ou mesmo aumentar de forma significativa as funções do neutrófilo como quimiotaxia, migração, aderência ao en-

dotélio e morte bacteriana (CAIRO, 1993; NANKERVIS & SEGUIN, 1995). Sabe-se que as células-tronco (*stem cells*) do RN são incapazes de se diferenciar em neutrófilos durante a infecção, devido ao baixo nível de G-CSF endógeno (GESSLER et al., 1993). MAKHLOUF et al. (1995) mostraram que a contagem de neutrófilos pode aumentar dentro de 6 horas após a administração de rhG-CSF e que esse aumento é dose-dependente sustentado até por 2 semanas no RN. Esse aumento sustentado deve-se à entrada de mais células progenitoras na via mieloproliferativa (LAYTON et al., 1989; BELLIS, SKLAR, OHLS, 1997).

A ação do rh-G-CSF se dá pela interação com os receptores de membrana das células-alvo. Os receptores são específicos no estroma da medula óssea, têm afinidade única e ocorrem em todas as células da série de neutrófilos granulócitos. Estão também presentes nos monócitos e seus precursores, mas não nos linfócitos, em outros granulócitos (eosinófilos e basófilos), em megacariócitos e em seus progenitores. A ligação, a internalização e a degradação são necessárias para que a G-CSF possa exercer seus efeitos sobre a proliferação das células progenitoras, a diferenciação e a restrição de linhagem (PLATZER et al., 1985; YUO et al., 1987; HAMMOND et al., 1989; OGAWA, 1989; CARR & MODI, 1997). No estroma da medula óssea, o G-CSF exerce seu efeito sobre as células progenitoras hematopoiéticas. Apesar de o G-CSF endógeno ter atividade na granulopoiese no período neonatal, seu nível é baixo em comparação com o do adulto (CAIRO, 1993; MORSTYN & DEXTER, 1995). BEDFORD et al. (1995) mostraram que rhG-CSF na dose de 5 a 10 µg/kg/dia aumentou os níveis de neutrófilos e monócitos em 12 RNs neutropênicos, sendo 7 deles com infecção comprovada. Sua segurança foi demonstrada por GILLAN et al. (1993) num estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, em 42 RNs com sepse presumível.

O aumento na contagem dos neutrófilos é considerado de grande importância no RN neutropênico e sem NSP (CARTWRIGHT, ATHENS, WINTROBE, 1964; CHRISTENSEN et al., 1982b; HILL, 1991; WHEELER et al., 1988). O G-CSF é o regulador fisiológico mais potente da mielopoiese e um ativador efetivo da função do neutrófilo madu-

ro (MIURA & MIURA, 1997). Ele suporta o crescimento clonal dos progenitores do neutrófilo (OGAWA, 1989) e aumenta a expressão dos receptores dos neutrófilos, a quimiotaxia, a atividade bactericida fagocítica, a geração de superóxido e também a citotoxicidade celular anticorpo-dependente (PLATZER et al., 1985; YUO et al., 1987; HAMMOND et al., 1989). WOLACH (1997) administraram rhG-CSF ou rhGM-CSF em 25 RNs saudáveis, respectivamente na dose de 10 µg/kg e 5 µg/kg, e verificaram que a quimiotaxia melhorou 91% e 100% com G-CSF e GM-CSF nos casos com quimiotaxia deficiente e 17% e 33% naqueles com quimiotaxia normal; e a produção de superóxido nos neutrófilos também passou para 52% e 89%, respectivamente, com G-CSF e GM-CSF. Nos casos de neutropenia grave após uma terapia mielossupressiva, ocorre uma correlação inversa entre os níveis de G-CSF e a contagem absoluta de neutrófilos (MATSUMOTO et al., 1987, 1991; BEGLEY, NICOLA, METCALF, 1988).

No início do nosso estudo, todos os pacientes tinham níveis elevados de G-CSF endógeno e um total de 29 casos, isto é, 66% dos pacientes apresentavam neutropenia (ACN < 1500/c), distribuídos de forma semelhante em ambos os grupos. Todos os casos de neutropenia após a administração de rhG-CSF, em 24 horas, estavam com a contagem de neutrófilos acima de 2000/c, ao contrário do grupo placebo, em que a metade persistiu com neutropenia. A neutropenia, em geral, tem se correlacionado com altas taxas de mortalidade (MANROE et al., 1979; CHRISTENSEN & ROTHSTEIN, 1980; SIEGEL & McCRACKEN, 1981; CHRISTENSEN et al., 1982a, 1982b; WHEELER et al., 1984; BAILEY et al., 1988; DU LOUVOIS & HARVEY, 1990; JAFARI & McCRACKEN, 1992; MANROE et al., 1992; MUSTAFA & McCRACKEN, 1992; KLEIN & MARCY, 1995; HARRIS, 1996; STOLL et al., 1996a; HICKEY & McCRACKEN, 1997; REREZ & WEISSMAN, 1997; WOLACH, 1997). O rhG-CSF aumentou as defesas do hospedeiro durante sepse experimental em animais adultos (YASUDA et al., 1990, 1991). CAIRO et al. (1990a, 1990b) mostraram que a administração de 5 µg/kg de G-CSF em dose única ou a mesma dose por 7 dias consecutivos

em ratos RNs com sepse experimental provocou aumento significativo em cerca de 6 vezes nos níveis totais de neutrófilos e de 2 vezes no NSP. Segundo BELLIS, SKLAR, OHLS (1997), a administração de rhG-CSF aumenta as funções dos neutrófilos de aderência ao endotélio e a expressão do receptor quimiotático dos neutrófilos.

A administração de rhG-CSF em RNPTs induziu aumento significativo na contagem total dos leucócitos e dos neutrófilos, além de um aumento no NSP 4 dias após a última dose de rhG-CSF. Não houve aumento significativo no estoque proliferativo de neutrófilos (NPP). Isto foi também observado por CAIRO et al. (1990b; 1992a) e GILLAN et al. (1994) quando estudaram ratos RNs com sepse presumível. A NSP foi 20% mais alta no grupo que recebeu rhG-CSF, e a relação NSP/NPP foi 30% maior do que no grupo controle. Recentemente, o mesmo foi observado 48 horas após a administração do rhG-CSF, com um aumento discreto no número de mielócitos e metamielócitos e um grande aumento no número de neutrófilos hipersegmentados (ULICH, DEL CASTILLO, SOUZA, 1988). Apesar da relação mielóide:eritróide ter sido o dobro em relação ao grupo-controle, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,06$). A hiperplasia mielóide pode ser demonstrada por um aumento na relação mielóide: eritróide, a proporção de neutrófilos imaturos no sangue aumenta e, em acréscimo, formas avantajadas (polimacrócitos) são produzidas (MORSTYN et al., 1988, KAWAKAMI et al., 1990). Assim sendo, vários autores recomendam cautela em pacientes com mielodisplasia, leucemia mielóide aguda ou leucemia mielóide crônica. Não tivemos nenhum caso de contagem de leucócitos superior a $100.000/\text{mm}^3$, o que seria uma indicação formal para a suspensão da droga (GABRILOVE et al., 1988b; MILES et al., 1991; BONILLA et al., 1994; MORSTYN & DEXTER, 1995).

No presente trabalho, a contagem absoluta de neutrófilos duplicou 24 horas após a administração de rhG-CSF e quadruplicou 72 horas após em relação ao grupo-controle. E, no 10º dia após o início do estudo, não houve diferenças entre os dois grupos, apesar de a mediana dos neutrófilos no grupo rhG-CSF ser 60% maior que no grupo placebo. Em ratos, a admi-

nistração diária de rhG-CSF induz uma neutrofilia sustentada (ULICH, DEL CASTILLO, SOUZA, 1988). A neutrofilia é dose-dependente. Em crianças com neutropenia crônica grave, a administração continuada de G-CSF pode manter os níveis de neutrófilos por anos (CAIRO, 1993; BONILLA et al., 1994). KOCHERLAKOTA et al. (1997) demonstraram que os prematuros têm maior suscetibilidade à infecção devido à menor expressão dos receptores dos neutrófilos ao sistema complemento e que são corrigidos após a administração de rhG-CSF na síndrome séptica.

Em nossa pesquisa, houve um aumento significativo na contagem absoluta dos monócitos 72 horas após a 1ª dose do rhG-CSF. Vários autores relatam aumento significativo no número de monócitos após o término do medicamento, mostrando que de fato o rhG-CSF também atua elevando o número de monócitos circulantes (CAIRO et al., 1992b; SCHIBLER et al., 1993; BEDFORD-RUSSEL et al., 1995; KOCHERLAKOTA & GAMMA, 1997b).

A contagem absoluta de linfócitos não sofreu alterações com a administração de rhG-CSF, uma vez que os linfócitos e seus precursores não possuem receptores para o G-CSF (NICOLA, 1989). Contudo, no estudo de KOCHERLAKOTA & GAMMA (1997b), ocorreu aumento significativo da contagem de linfócitos no 7º dia, porém dentro das variações normais, semelhante ao verificado em nosso estudo.

A contagem de plaquetas manteve-se normal, sem plaquetopenia nem plaquetose. O G-CSF não altera a ação da trombopoetina. Um estudo (NICOLA, 1989) com altas doses em cães e macacos mostrou reduções mínimas na contagem de plaquetas do sangue periférico por aumento do seqüestro esplênico, mas sem necessidade de compensação hematopoiética, sem alteração na trombopoiese e sem os efeitos adversos associados. No estudo de BEDFORD-RUSSEL (1995), alguns casos apresentaram plaquetopenia e, segundo a autora, a causa da neutropenia seria a doença básica, pois a plaquetopenia já existia antes da administração do rhG-CSF.

A avaliação quanto à eritropoiese em nosso estudo ficou prejudicada porquanto procurou-se manter nos primeiros dias de vida nos RNs críticos níveis de hematócrito acima de 40%, ocorrendo a transfusão de concentrado de hemácias (10 ml/k/dose) quando o paciente apresentava quedas no hematócrito abaixo de 40%. Em camundongos, a eritropoiese foi reduzida com tratamento com G-CSF em altas doses e duração prolongada (mais de 100 µg/kg/dia), ocorrendo compensação através da eritropoiese esplênica (MOLINEAUX, PODJA, DEXTER, 1990; CAIRO et al., 1992b). Nos estudos clínicos, em pacientes com neoplasias malignas e neutropenias crônicas graves, não se observaram efeitos diretos sobre os eritrócitos a médio e longo prazos (MOLINEAUX, PODJA, DEXTER, 1990; CAIRO et al., 1992b).

Resumindo este estudo, podemos afirmar que o emprego do rhG-CSF mostrou um aumento na contagem de neutrófilos circulantes e no NSP. Houve redução estatisticamente não significativa da mortalidade imediata por sepse nos primeiros 7 dias e redução significativa na incidência de infecção hospitalar nos primeiros 28 dias. A dose empregada de 10 µg/kg/d por 3 dias é segura e sem paraefeitos. Isto vem ao encontro da recomendação de usar o rhG-CSF frente a um RNPT com sepse e com neutropenia, mesmo em vigência de antibióticos adequados, devido à alta mortalidade e ao grande número de complicações (MORSTYN et al., 1988).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo permitiram que se estabelecessem as conclusões abaixo.

- A administração de rhG-CSF nos pacientes mostrou-se um medicamento seguro, bem tolerado e sem para-efeitos imediatos.
- O rhG-CSF não produziu redução da mortalidade na sepse neonatal precoce em RNPTs em níveis estatisticamente significativos, embora se houvesse observado uma tendência de redução na mortalidade nos primeiros 7 dias de vida.
- O rhG-CSF reduziu de forma significativa a incidência de infecção hospitalar até 28 dias após o início do tratamento.
- O rh-GSF produziu uma elevação na contagem de leucócitos e neutrófilos 24 e 72 horas após o início do tratamento e, dez dias após, os níveis foram semelhantes.
- Não houve alterações sobre a contagem de linfócitos, eosinófilos e plaquetas após a administração de rhG-CSF. Houve um ligeiro aumento na contagem de monócitos.
- O rhG-CSF produziu elevação significativa da citocina G-CSF 24 e 72 horas após o início da administração.
- Não houve alterações nos níveis das citocinas GM-CSF, TNF- α e IL-6 após a administração de rhG-CSF.
- O rhG-CSF provocou aumento no NSP e na relação NSP/NPP 7 dias após o início do tratamento.
- Não foram observados efeitos colaterais respiratórios e na contagem de plaquetas após o início do tratamento com rhG-CSF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAP. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Group B *Streptococcal* Infections. In: Red Book of American Academy of Pediatrics. Report of the Committee on Infectious Diseases. 24. ed. American Academy of Pediatrics, 1997. p. 494-509.
2. ADAM, D.; LA GAMMA, E.F.; BROWN, L.E. Nutritional management and multisystem organ failure/systemic inflammatory response in critically ill preterm neonates. **Crit. Care Clin.**, v. 11, n. 7, p. 751-784, 1995.
3. BAILIE, K.E.; IRVINE, A.E.; BRIDGES, J.M. et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. **Pediatr. Res.**, v. 35, n. 2, p. 164-168, 1994.
4. BALEY, J.E.; STORK, E.K.; WARKENTIN, P.I. et al. Neonatal neutropenia. Clinical manifestations, cause, and outcome. **Am. J. Dis. Child.**, v. 142, n. 11, p. 1161-1166, 1988.
5. BALLARD, J.L. KHOURY, J.C.; WEDIG, K. et al. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **J. Pediatr.**, v. 119, n. 3, p. 417-23, 1991.
6. BALLARD, J.L.; NOVAK, K.Z. DIRVER, M. A simplified score for assessment of fetal maturation of newly born infant. **J. Pediatr.**, v. 95, n. 5, pt. 1, p. 769-774, 1979.
7. BARAK, Y.; LEIBOVITZ, E.; MOGILNER, B. et al. The in vivo effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in neutropenic neonates with sepsis. **Eur. J. Pediatr.**, v. 156, n. 8, p. 643-646, 1997.
8. BARAK, Y.; LEIBOWITZ, E.; MOGLINER, B. et al. Neonatal sepsis associated with neutropenia: the in vivo effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF). **Exp. Hematol.**, v. 23, n. 8, p. 489-493, 1995. (Abstract).

9. BARD, H. Assessing neonatal risk: CRIB vs SNAP. *Lancet*, v. 342, n. 8869, p. 449-450, 1993.
10. BEDFORD-RUSSEL, A.R.; DAVIES, E.G.; BALL, S.E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment for neonatal neutropenia. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, v. 72, n. 1, p. F53-F54, 1995.
11. BEGLEY, C.; NICOLA, N.; METCALF, D. Proliferation of normal human promyelocytes and myelocytes after a single pulse stimulation by purified GM-CSF or G-CSF. *Blood*, v. 71, n. 3, p. 640-645, 1988.
12. BELLIS, Y.M.; SKLAR, L.A.; OHLS, R.K. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on term and preterm neonatal neutrophils adhesive phenotypes. *Pediatr. Res.*, v. 41, n. 4, p. 1304, 1997. (Abstract).
13. BONADIO, W.A.; HENNES, H.; SMITH, D. Reliability of observation variables distinguishing infectious outcome of febrile young infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 12, n. 2, p. 112-118, 1993.
14. BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.*, v. 115, n. 6, p. 457-469, 1991a.
15. BONE, R.C. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann. Intern. Med.*, v. 114, n. 4, p. 332-333, 1991b.
16. BONE, R.C. Toward the theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.*, v. 24, n. 2, p. 163-172, 1996a.
17. BONE, R.C. Why sepsis trials fail. *JAMA*, v. 276, n. 7, p. 565-566, 1996b.
18. BONE, R.C.; FISCHER Jr., C.J.; CLEMMER, T.P. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit. Care Med.*, v. 17, n. 5, p. 389-393, 1989.
19. BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK, R.A. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, v. 111, n. 1, p. 235-243, 1997.

20. BONILLA, M.; GILLIO, A.; RUGGERO, M. et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 24, p. 1574-1580, 1989.
21. BONILLA, M.A.; DALE, D.; ZEIDLER, C. et al. Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with severe congenital neutropenia. **Br. J. Haematol.**, v. 88, n. 4, p. 723-730, 1994.
22. BOXER, L.; HUTCHINSON, R.; EMERSON, S. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of patients with neutropenia. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, n. 1, pt. 2, p. S39-S40, 1992.
23. CAIRO, M.S. Neonatal neutrophil host defense. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis. **Am. J. Dis. Child.**, v. 143, n. 1, p. 40-46, 1989a.
24. CAIRO, M.S. Review of rhG-CSF and GM-CSF. Effects on neonatal neutrophils kinetics. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 11, n. 2, p. 238-244, 1989b.
25. CAIRO, M.S. Therapeutic implications of dysregulated colony-stimulating factor expression in neonates. **Blood**, v. 82, n. 8, p. 2269-2272, 1993.
26. CAIRO, M.S.; CHRISTENSEN, R.D.; SENDER, L.S. et al. Results of phase I/II of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in very low birth weight neonates: significant induction of circulatory neutrophils, monocytes, platelets, and bone marrow neutrophils. **Blood**, v. 86, n. 7, p. 2509-2515, 1995.
27. CAIRO, M.S.; MAUSS, D.; KOMMAREDDY, S. et al. Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of group B *streptococcal* sepsis in neonatal rats. **Pediatr. Res.**, v. 27, n. 6, p. 612-616, 1990a.
28. CAIRO, M.S.; PLUNKETT, J.M.; MAUSS, D. et al. Seven-day administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to newborn rats:

- modulation of neonatal neutrophilia, myelopoiesis, and group B *Streptococcus* sepsis. **Blood**, v. 76, n. 9, p. 1788-1794, 1990b.
29. CAIRO, M.S.; PLUNKETT, J.; NGUYEN, A. et al. Effect of stem cell factor with and without granulocyte colony-stimulating factor on neonatal hemapoiesis: In vivo induction of newborn myelopoiesis and reduction of mortality during experimental group B streptococcal sepsis. **Blood**, v. 80, n. 1, p. 96-101, 1992a.
30. CAIRO, M.S.; SUEN, Y.; SENDER, L. et al. Circulating granulocyte colony-stimulating factor levels after allogenic and autologous bone marrow transplantation: Endogenous G-CSf production correlates with myeloid engraftment. **Blood**, v. 79, n. 7, p. 1869-1873, 1992b.
31. CAIRO, M.S.; YU, S.; KNOPPEL, E. et al. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. **Pediatr. Res.**, v. 31, n. 6, p. 574-578, 1992c.
32. CARR, R.; MODI, N. Haematopoietic colony stimulating factors for preterm neonates. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 76, n. 2, p. F128-F133, 1997.
33. CARTWRIGHT, G.E.; ATHENS, J.W.; WINTROBE, M.M. The kinetics of granulopoiesis in normal man. **Blood**, v. 24, n. 4, p. 780-800, 1964.
34. CHRISTENSEN, R.D.; HARPER, T.E.; ROTHSTEIN, G. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm infants. **J. Pediatr.**, v. 109, n. 6, p. 1047-1051, 1986.
35. CHRISTENSEN, R.D.; MACFARLANE, J.L.; TAYLOR, N.L. et al. Blood and marrow neutrophils during experimental group B *streptococcal* infection: Quantification of the stem cell, proliferative, storage and circulating pools. **Pediatr. Res.**, v. 16, n. 7, p. 549-553, 1982a.
36. CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. **J. Pediatr.**, v. 96, n. 2, p. 316-318, 1980.

37. CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Pre and post-natal development of granulocytic stem cells, in the rat. **Pediatr. Res.**, v. 18, n. 7, p. 599-602, 1984.
38. CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G.; ANSTALL, H.B. et al. Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature marrow neutrophils. **Pediatrics**, v. 70, n. 1, p. 1-6, 1982b.
39. CHRISTMAN, J.W.; HOLDEN, E.P.; BLACKWELL, T.S. Strategies for blocking the systemic effects of cytokines in the septic syndrome. **Crit. Care Med.**, v. 23, n. 5, p. 955-963, 1995.
40. DALE, D.C.; LILES, W.C.; SUMMER, W.R. et al. Review: Granulocyte stimulating factor and role and relationships in infectious diseases. **J. Infect. Dis.**, v. 172, n. 4, p. 1061-1075, 1995.
41. DEMETRI, G.; GRIFFIN, J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. **Blood**, v. 78, n. 11, p. 2791-2808, 1992.
42. DROSSOU, V.; KANAKOUDI, F.; SARAFIDIS, K. et al. In vivo effect of rhG-CSF on neutrophil number and function of septic neonates. **Pediatr. Res.**, v. 43, n. 1, p. 60-65, 1995.
43. DU LOUVOIS, J.; HARVEY, D. Infection in the Newborn. New York: John Wiley & Sons, 1990. p. 13-14.
44. DUHRSEN, U.; VILLEVAL, J.L.; BOYD, J. et al. Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. **Blood**, v. 72, n. 5, p. 2074-2078, 1998.
45. ERDMAN, S.H.; CHRISTENSEN, R.D.; BRASLEY, P.P. et al. The supply and release of storage neutrophils: a developmental study. **Biol. Neonate**, v. 41, n. 3-4, p. 132-137, 1982.
46. GABRILOVE, J.; JAKUBOWSKI, A.; SCHER, H. et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy

- transitional-cell carcinoma of the urothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, n. 22, p. 1414-1422, 1988a.
47. GABRILOVE, J.L.; JAKUBOWSKI, A.; FAIN, K. et al. Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the uroepithelium. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 4, p. 1454-1461, 1988b.
48. GALLAGHER, P.G.; EHRENKRANTZ, P.A. Erythropoietin therapy for anemia of prematurity. **Clin. Perinatol.**, v. 20, n. 2, p. 169-191, 1993.
49. GESSLER, P.; KIRCHMANN, N.; KIENSTCH-ENGEL, R. et al. Serum concentration of granulocyte colony-stimulating factor in healthy term and preterm neonates and in vary diseases including bacterial infections. **Blood**, v. 82, n. 10, p. 3177-3182, 1993.
50. GIBBS, R.S.; ROMERO, R.; HILLIER, S.L. et al. A review of premature birth and subclinical infection. **Am. J. Obstetr. Gynecol.**, v. 166, n. 5, p. 1515-1528, 1992.
51. GILLAN, E.; SUEN, Y.; CHRISTENSEN, R.D.; et al. A comparison of G-CSF expression and production between newborn and adults and preliminary results of a randomized placebo-controlled trial of rhG-CSF in newborn with presumed sepsis. **Exp. Hematol.**, v. 29, n. 5, p. 773-780, 1992.
52. GILLAN, E.; YU, S.; STRINGHAM, D. et al. A randomised placebo-controlled phase I/II trial of rhG-CSF in newborns with presumed sepsis: absence of toxicity and induction of significant neutrophilia and bone marrow storage and progenitor pools. **Pediatr. Res.**, v. 33, n. 2, p. 291-296, 1993.
53. GILLAN, E.R.; CHRISTENSEN, R.D.; SUEN, Y. et al. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: a significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1427-1433, 1994.

54. GILMORE, M.M.; STRONCEK, C.F.; KORONES, D.N. Treatment of alloimmune neonatal neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. **J. Pediatr.**, v. 125, n. 6, pt. 1, p. 948-951, 1994.
55. GIVNER, L.B.; NAGARAJ, S.K. Hyperimmune human IgG or recombinant immune granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjunctive therapy for group B *streptococcal* sepsis in newborn rats. **J. Pediatr.**, v. 122, n. 5, pt. 1, p. 774-779, 1993.
56. GLASPY, J.A.; BALDWIN, G.C.; ROBERTSON, P.A. et al. Therapy for neutropenia in hairy cell leukemia with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Ann. Intern. Med.**, v. 109, n. 4, p. 789-795, 1998.
57. GOLDIE, A.S.; FEARON, K.C.H.; ROSS, J.A. et al. Natural cytokine antagonist and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. **JAMA**, v. 274, n. 2, p. 172-177, 1995.
58. GÖRGEN, I.; HARTUNG, T.; LEIST, M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v. 149, n. 3, p. 918-924, 1992.
59. GRANOWITZ, E.V.; PORAT, R.; GELFAND, J.A. et al. Administration of low-dose endotoxin to healthy humans increase C5a binding to circulation neutrophils. **J. Infect. Dis.**, v. 169, n. 2, p. 480-483, 1994.
60. HAMMOND, W.P.; PRICE, T.H.; SOUZA, L.M. et al. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 20, p. 1306-1311, 1989.
61. HARRIS, M.C. Septicemia neonatal. In: POLIN, R.; YODER, M.; BURG, F. **Neonatologia prática**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. p. 223-245.
62. HARRIS, M.C.; SHALIT, M.; SOUTHWICK, F.S. Diminished actin polymerization by neutrophils from newborn infants. **Pediatr. Res.**, v. 33, n. 1, p. 27-31, 1993.

63. HARTUNG, T.; DOCKE, W.D; GARTNER, F. et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. **Blood**, v. 85, n. 9, p. 2482-2489, 1995.
64. HICKEY, S.M.; MCCRAKEN Jr, G. Postnatal infection. In: FANAROFF, A.A.; MARTIN, R.J. **Neonatal-perinatal Medicine**. 6. ed. St Louis: Mosby, 1997. p. 717-769.
65. HILL, H.R. Granulocyte transfusions in neonates. **Pediatr. Rev.**, v. 12, n. 10, p. 298-302, 1991.
66. IKENO, K. Increased granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) levels in neonates with perinatal complications. **Acta Paediatr. Jpn.**, v. 36, n. 4, p. 366-370, 1994.
67. JAFARI, H.S.; MCCRACKEN Jr., G.H. Sepsis and septic shock: a review for clinicians. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 11, n. 9, p. 739-748, 1992.
68. JEFFS, R.A. **A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled safety and efficacy study of filgrastim (r-metHuG-CSF) in the treatment of late-onset neonatal sepsis**. G-CSF protocol. Thousand Oaks: AMGEN, 1997. 53 p.
69. KAWAKAMI, M.; TSUTSUMI, H.; KUMUKAWA, T. et al. Levels of granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. **Blood**, v. 76, n. 10, p. 1962-1964, 1990.
70. KEMP, A.S.; CAMPBELL, D.E. The neonate immune system. **Semin. Perinatol.**, v. 1, n. 1, p. 67-75, 1996.
71. KENNON, C.; OVERTURF, G.; BEISMAN, S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. **J. Pediatr.**, v. 125, n. 5, p. 765-769, 1996.
72. KLEIN, J.O.; MARCY, M.S. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4. ed. Saunders: Philadelphia, 1995. p. 835-890.

73. KOCHERLAKOTA, O.; LA GAMMA, E.F.; GOLIGHTLY, M. et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on surface expression of Fc and complement receptors of neutrophils in preterm in vivo. **Ped. Res.**, v. 41, n. 4, p. 936, 1997. (Abstract).
74. KOCHERLAKOTA, P.; LA GAMMA, E.F. Human granulocyte colony-stimulating factor may improve outcome attributable to neonatal sepsis complicated by neutropenia. **Pediatrics**, v. 100, n. 6, p. 1-7, 1997a.
75. KOCHERLAKOTA, P.; LA GAMMA, E.F. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor increased the absolute neutrophil count and decreased the incidence of infections in persistent preeclampsia-associated-neutropenia in VLBW neonates. **Pediatr. Res.**, v. 41, n. 4, p. 937, 1997b. (Abstract).
76. KOENIG, J.M.; CHRISTENSEN, R.D. Incidence neutrophils kinetics and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 9, p. 557-562, 1989.
77. LA GAMMA, E.F.; ALPAN, O.; KOCHERLAKOTA, P. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on preeclampsia-associated neonatal neutropenia. **J. Pediatr.**, v. 126, n. 3, p. 457-459, 1995.
78. LACY, J.B.; OHLSON, A. Administration of intravenous immunoglobulin for prophylaxis or treatment of infection in preterm infants: meta-analysis. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 72, n. 3, p. F151-F155, 1997.
79. LAYTON, J.E.; HOCKMAN, H.; SHERIDAN, W.P. et al. Evidence for a novel in vivo control of mechanism of granulopoiesis: mature cell related control of a regulatory growth factor. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1303-1307, 1989.
80. LEIBOVITZ, E. **A pilot, prospective trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF, Filgrastim) in the treatment of newborns infants**

with presumed sepsis and neutropenia. International Congress of Chemotherapy. Montreal, June 1995. (Abstract).

81. LEIBOVITZ, E.; RIMON-FLIDEL, O.; REICHER-JUSTER, A. et al. Sepsis at a neonatal intensive care unit: a four-year retrospective study (1989-1992). **Isr. J. Med. Sci.**, v. 33, n. 11, p. 734-738, 1997.
82. LIESCHKE, G.J.; BURGESS, A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). Review. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, n. 2, p. 99-106, 1992.
83. LLORENS-SÁEZ, X.; MCCRACKEN Jr, G.H. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology, and management. **J. Pediatr.**, v. 123, n. 4, p. 497-508, 1993.
84. LU, L.; BRIDDELL, R.H.; GRAHAM, C.D. et al. Effect of recombinant and purified human haematopoietic growth factor on in vivo colony formation by enriched populations of human megakaryocyte progenitor cells. **Br. J. Haematol.**, v. 70, n. 2, p. 149-156, 1988.
85. LUNDBLAD, R.; NESLAND, J.M.; GIERCKSKY, K.E. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, endothelin-1 in fulminante intra-abdominal sepsis in rats. **Crit. Care Med.**, v. 24, n. 5, p. 820-826, 1996.
86. MAKHLOUF, R.A.; DORON, M.W.; BOSE, C.L. et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor to neutropenic low birth weight infants of mothers with preeclampsia. **J. Pediatr.**, v. 126, n. 3, p. 454-456, 1995.
87. MANROE, B.L.; WEINBERG, A.G.; ROSENFELD, C.R. et al. The neonatal blood count in health and disease: I. Reference values for neutrophilic cells. **J. Pediatr.**, v. 95, n. 1, p. 89-98, 1979.

88. MANROE, E.; DAVIES, N.P.; BUGGINS, A.G.S. et al. Blood leucocyte count in the human fetus. **Arch. Dis. Child.**, v. 67, n. 5, p. 399-403, 1992.
89. MATSUMOTO, M.; MATSUBARA, S.; MATSUNO, T. et al. Protective effects of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 11, p. 215-221, 1987.
90. MATSUMOTO, M.; TAMURA, M.; MATSUBARA, S. et al. Mechanism of protective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSG) on *Pseudomonas* infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, n. 6, p. 461-474, 1991.
91. MENEGAZ, F.; MULLER, R.; SCHUMACHER, R.C.A. Perfil da mortalidade neonatal. **Rev. HCPA**, v. 15, n. 2, p. 185, 1995.
92. MILES, S.; MITSUYASU, R.; MORENO, J. et al. Combined therapy with recombinant granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin decreases hematologic toxicity from zidovudine. **Blood**, v. 77, n. 10, p. 2109-2113, 1991.
93. MILLER, M.E. Phagocyte function in the neonate: Selected aspects. **Pediatrics**, v. 64, suppl. 2, p. 709-712, 1979.
94. MIURA, C.; MIURA, E. Sistema imunológico neonatal. In: MIURA, E.; PROCIANOY, R.S. **Neonatologia, princípios e prática**. 2. ed. Artes Médicas: Porto Alegre, 1997. p. 293-307.
95. MIURA, E. Mortalidade perinatal e neonatal. In: MIURA, E.; PROCIANOY, R.S. **Neonatologia, princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997a. p. 17-20.
96. MIURA, E. Sepsis bacteriana. In: MIURA, E.; PROCIANOY, R.S. **Neonatologia, princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997b. p. 307-320.
97. MOLINEUX, G.; PODJA, Z.; DEXTER, T.M. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony stimulating factor. **Blood**, v. 75, n. 3, p. 563-569, 1990.

98. MORSTYN, G.; CAMPBELL, L.; SOUZA, L.M. et al. Effect of granulocyte colony stimulating on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. **Lancet**, v. 1, n. 8587, p. 667-672, 1988.
99. MORSTYN, G.; DEXTER, T.M. **Granulokine filgrastima G-CSF. Monografia do produto**. São Paulo: Amgen & Hoffmann-Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, 1995. 58 p.
100. MURRAY, J.C.; MCCLAIN K.L.; WEARDEN M.E. Using granulocyte colony-stimulating factor for neutropenia during neonatal sepsis. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 148, n. 7, p. 764-766, 1994.
101. MUSTAFA, M.M.; MCCRACKEN JR, G.H. Perinatal bacterial diseases. In: FEIGIN, R.D.; CHERY, J.D. **Textbook of pediatric infectious diseases**. 3. ed. Saunders: Philadelphia, 1992. p. 891-923.
102. NANKERVIS, C.A.; SEGUIN, J.H. Granulocyte colony-stimulating factor for neutropenia in neonatal sepsis. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 149, n. 2, p. 218-219, 1995.
103. NICOLA, N.A. Hematopoietic cell growth factors and their receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 45-77, 1989.
104. OGAWA, M. Effects of hemapoietic growth factors on stem cells in vitro. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 3, n. 3, p. 453-464, 1989.
105. PLATZER, E.; WELTE, K.; GABRILOVE, J. et al. Biological activities of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor on normal and leukemic cells. **J. Exp. Med.**, v. 162, n. 6, p. 1788-1801, 1985.
106. REREZ, E.; WEISSMAN, L. Novel approaches to the prevention and therapy of neonatal bacterial sepsis. **Clin. Perinatol.**, v. 24, n. 1, p. 213-229, 1997.

107. RICHARDSON, D.K.; GRAY, J.E.; MCCORMICK, M.C. et al. Birth weight and illness severity: independent predictors of NICU mortality. **Pediatr. Res.**, v. 31, n. 4, p. 285A, 1992.
108. RICHARDSON, D.K.; GRAY, J.E.; MCCORMICK, M.C. et al. Score for neonatal acute physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. **Pediatrics**, v. 91, n. 4, p. 617-623, 1993.
109. ROBERTS, R.L.; SZELC, C.M.; SCATES, S.M. et al. Neutropenia in an extremely premature infant treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Am. J. Dis. Child.**, v. 145, n. 7, p. 808-812, 1991.
110. RODWELL, R.L.; FAIMS, P.H.D.; TAYLOR, K.M.D.C. et al. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, n. 4, p. 372-376, 1993.
111. ROSENTHAL, J.; HEALEY, T.; ELLIS, R. et al. A two year follow-up of neonates with presumed sepsis treated with recombinant human granulocyte colony stimulating factor during the first week of life. **J. Pediatr.**, v. 128, n. 1, p. 135-137, 1996.
112. SALZMAN, M.B.; ISENBERG, H.D.; SHAPIRO, J.F. et al. A prospective study of the catheter hub as the portal of entry for the microorganism causing catheter-related sepsis in neonates. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 487-490, 1993.
113. SCCM. SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS COMMITTEE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 20, n. 6, p. 864-874, 1992.
114. SCHIBLER, K.R.; LIECHTY, K.W.; WHITE, W.L. et al. Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. **Blood**, v. 82, n. 8, p. 2478-2484, 1993.

115. SHERIDAN, W.P.; HUNT, P.; SCOTT, S.; ULICH, T.R. Hematologic effects of cytokines. In: REMICK, D.G.; FRIEDLAND, J.S. **Cytokines**. 2. ed. New York: Dekker, 1997. p. 487-505.
116. SHIMODA, K.; OKAMURA, S.; OMORI, F. et al. Granulocyte colony-stimulating factor in cerebrospinal fluid from patients with meningitis. **Blood**, v. 77, n. 10, p. 2214-2217, 1991.
117. SIEGEL, J.D.; MCCRACKEN Jr., G.H. Sepsis neonatorum. **N. Engl. J. Med.**, v. 304, n. 11, p. 642-647, 1981.
118. SILVEIRA, R.C. **Interleucina-6, fator necrose tumoral e interleucina-1 no diagnóstico de sepse neonatal precoce**. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 127 p. (Dissertação, Mestrado em Pediatria).
119. SMITH, W.S.; SUMNICHT, G.E.; SHARPE, R.W. et al. Granulocyte colony-stimulating factor versus placebo in addition to penicilin G in a randomized blinded study of gram-negative pneumonia sepsis. Analysis of survival and multisystem organ failure. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1301-1309, 1995.
120. ST. GEME III, J.W.; POLIN, R.A. Prevention and treatment of neonatal sepsis. In: SPITZER, A.R. **Intensive care of the fetus and neonate**. St. Louis: Mosby, 1996. p. 927-940.
121. STOLL, B.J.; GORDON, T.; KORONES, S.B. et al. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. **J. Pediatr.**, v. 129, n. 1, p. 72-80, 1996a.
122. STOLL, B.J.; GORDON, T.; KORONES, S.B. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human

- Development Neonatal Research Network. **J. Pediatr.**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1996b.
123. TAMURA, M.; MATSUMOTO, M.; YOSHINO, T. et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the mice receiving bone marrow transplantation following lethal irradiation. Acceleration of recovery of the peripheral blood neutrophils and potentiation of anti-pseudomonas resistance. **Exp. Hematol.**, v. 19, n. 1, p. 18-23, 1991.
124. ULICH, T.R.; DEL CASTILLO, J.; SOUZA, L.M. Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte colony stimulating factor-induced neutrophilia. **Am. J. Pathol.**, v. 133, n. 3, p. 630-638, 1988.
125. VAN DEVENTER, S.J.H. Progress in cytokine research and implications for immunotherapy of sepsis. *Clinician*, v. 13, n. 4, p. 9-13, 1995.
126. WARDROP, C.A.J.; HOLLAND, B.M. Recombinant haematopoietic growth factors in the newborn - will they be useful? **Eur. J. Pediatr.**, v. 154, n. 8, suppl. 3, p. S13-S14, 1995.
127. WATARI, L.; ASANO, S.; SHIRAFUJI, N. et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 117-122, 1989.
128. WHEELER, J.G.; CHAUVENET, A.R.; JOHNSON, C.A. et al. Neutrophil storage pool depletion in septic, neutropenic neonates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 3, n. 5, p. 407-409, 1984.
129. WHEELER, J.G.; CHAUVENET, A.R.; JOHNSON, C.A. et al. Neutrophil storage pool depletion in septic, neutropenic neonates. **Am. J. Dis. Child.**, v. 142, n. 10, p. 1161-1166, 1988.

130. WHEELER, J.G.; GIVNER, L.B. Therapeutic use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonatal rats with type III streptococcal sepsis. **J. Inf. Dis.**, v. 165, n. 5, p. 938-941, 1992.
131. WILSON, C.B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. (ed). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 17-67.
132. WILSON, C.B. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. **J. Pediatr.**, v. 108, n. 1, p. 1-12, 1986.
133. WOLACH, B. Neonatal sepsis: Pathogenesis and supportive therapy. **Semin. Perinatol.**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 1997.
134. WOLACH, B.; BEN DOR, M.; CHOMSKY, O. et al. Improved chemotactic ability of neonatal polymorphonuclear cells induced by mild membrane rigidification. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, n. 4, p. 324-328, 1992.
135. YASUDA, H.; AJIKI, Y.; SHIMOZATO, T. et al. Therapeutic efficacy of granulocyte colony-stimulating factor alone and in combination with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 8, p. 2502-2509, 1990.
136. YUO, A.; KITAGAWA, S.; OKABE, T. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 70, n. 2, p. 404-411, 1987.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. **Justificativa:** a doença apresentada pelo recém-nascido chama-se septicemia, que é uma infecção generalizada. A mortalidade associada é elevada, em torno de 50%, e mesmo entre os sobreviventes, cerca de 20% ficam com problemas.

2. **Objetivos:** usar rhG-CSF, granulokine, que é um medicamento que possivelmente seja capaz de reduzir a morbi-mortalidade da sepse neonatal.

3. **Riscos e os desconfortos:** em recém-nascidos não há relatos quanto a intolerância ou outros efeitos adversos, exceto uma trombocitopenia transitória, isto é, uma redução da quantidade das plaquetas do sangue.

4. **Possíveis benefícios:** o uso desta medicação pode reduzir em 50% a mortalidade por septicemia neonatal.

5. **Procedimentos envolvidos:** todos os recém-nascidos incluídos no estudo poderão receber, por sorteio, o medicamento ou uma substância sem ação terapêutica (placebo). Além da rotina de investigação da septicemia, que consiste na análise do sangue (hemograma, hemocultura, bioquímica, gasometria arterial), cultura do líquido cefalorraquidiano via punção lombar do SNC, cultura urinária de urina coletada por aspiração supra-púbica, cultura das fezes, vamos proceder duas punções aspirativas da tíbia, antes e após a administração do rhG-CSF, para a contagem do pool proliferativo de neutrófilos (NPP) e do pool de reserva medular de neutrófilos (NSP). Não há riscos ao paciente decorrentes da punção óssea, de acordo com os dados de literatura.

Eu, _____
responsável legal do recém-nascido _____, fui informada dos objetivos desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi as informações específicas sobre cada procedimento, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento, mesmo durante a realização da pesquisa. Além disso, sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a novas informações.

O responsável pelo projeto de pesquisa, certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial e serão utilizadas apenas para fins científicos. A pesquisa poderá ser interrompida, a critério dos pesquisadores, caso ocorram riscos ou benefícios diferentes dos previstos.

Fui informado que caso existam danos a saúde de meu filho(a), causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

(assinatura do responsável legal do paciente)

(assinatura do pesquisador)

III. CARACTERÍSTICAS INICIAIS DO RECÉM-NASCIDO

Ins. renal aguda
 Letargia
 Leucograma alterado
 O₂
 Quedas saturação < 85%
 Resíduo gástrico

IV - INFECCÃO E CULTURAS DO RECÉM-NASCIDO

Localização					Resultado						

V. ANTIBIÓTICOS

VI. TRATAMENTO

VII. EVOLUÇÃO

Causa Clínica:

Anátomo-patológico:

Relacionado à infecção

Reinternou por infecção

Parâmetros			
7.1 Choque			
7.2 Cirurgia abdominal			
7.3 CIVD			
7.4 Convulsões			
7.5 CPAP			
7.6 Membrana hialina			
7.7 Ducto arterioso patente			
7.8 Enterocolite necrosante			

Parâmetros			
7.9 Hemorragia intraventricular			
7.10 HPRN			
7.11 Ins. renal aguda			
7.12 Meningite			
7.13 Nutrição parenteral			
7.14 O ₂			
7.15 Pneumotórax			
7.16 VM			

VIII. EFEITOS ADVERSOS G-CSF

Parâmetros			
8.1 Anemia			
8.2 Febre			
8.3 <i>Rash</i> cutâneo			
8.4 R. Leucemóide			
8.5 Trombocitopenia			
8.6 Vômitos			

IX - PARÂMETROS EVOLUTIVOS

Parâmetros							30 dias
9.1	Basófilos						
9.2	Bastonados						
9.3	Eosinófilos						
9.4	G-CSF						
9.5	GM-CSF						
9.6	Hb						
9.7	Ht						
9.8	IL-1						
9.9	IL-6						
9.10	Leucócitos						
9.11	Linfócitos						
9.12	Metamielócitos						
9.13	Mielócitos						
9.14	Monócitos						
9.15	NPP						
9.16	NPP + NSP						
9.17	NSP						
9.18	Peso						
9.19	Plaquetas						
9.20	Segmentados						
9.21	SNAP						
9.22	TNF						
9.23	Mieloblastos						
9.24	Promielócitos						
9.25	Mielócitos:						
9.26							

9.27	Basófilos						
9.28	Metamielócitos						
9.29	Neutrófilos polimorfo						
9.30	Basófilos polimorfo						
9.31	Basófilos polimorfo						
9.32	Linfócitos						
9.33	Células plasmáticas:						
9.34	Monócitos						
9.35	Células retículo						
9.36	Megacariócitos						
9.37	Pronormoblastos						
9.38	Normoblastos						

Códigos:

II, III

1 (Sim)

1

Sim

2

Não

2 (Não)

P1 - *S. coagulase negativo*

P2 - *S. aureus*

P3 - *E. coli*

P4 - *K. pneumonia*

P5 - Outro gram-negativo

P6 - *Streptococcus grupo B*

IV : localização

1. Septicemia/bacteremia
2. Broncopneumonia
3. Meningite
4. Enterocolite necrosante
5. Infecção urinária
6. Choque séptico
7. Falência de múltiplos órgãos

Tipo

1. Sangue
2. Líquor
3. Urina
4. Secreção brônquica
5. Fezes
6. Pele e mucosas

V: Antibióticos

1. Ampicilina
3. Vancomicina

2. Amicacina
4. Cefotaxime
5. Imipenem
6. Gentamicina
7. Metronidazol
8. Outros

8. Ciprofloxacina
9. Outros

VII : Evolução

7.9 Hemorragia Intraventricular: I - grau I

2 - grau II 3 - grau III 4 - grau IV

SCORE NEONATAL ACUTE PHYSIOLOGY – SNAP

PARÂMETROS	ESCORE		
	1º dia	10º dia	30º dia
Pressão Arterial Média			
Aumentada: 1. 66-80 mmHg			
3. 81-100 mmHg			
5. > 100 mmHg			
Diminuída: 1. 30-55 mmHg			
3. 20-29 mmHg			
5. < 20 mmHg			
Frequência Cardíaca			
Aumentada: 1. 180-200 bpm			
3. 210-250 bpm			
5. >250 bpm			
Diminuída: 1. 80-90 bpm			
3. 40-79 bpm			
5. < 40 bpm			
Frequência Respiratória/ Frequência Ventilatória			
1. 60- 100 rpm			
3. > 100 rpm			
Temperatura			
1. < 36°C - > 38°C			
3. < 35°C - > 39 °C			
PO ₂ (mmHg)			
1. 50 - 65			
3. 33 - 49			
5. < 30			
PO ₂ /FiO ₂ (%)			
1. 2,5 - 3,5			
3. 0,3 - 0,49			
5. < 0,3			
PCO ₂ (mmHg)			
1. 50 - 65			
3. 66 - 90			
5. > 90			
Índice de Oxigenação (PmVA x FiO ₂ / PO ₂)			
1. 0,07 - 0,2			
3. 0,21 - 0,4			
5. > 0,4			
Hematócrito (%)			
Leucócitos (10 ³ /mm ³)			
1. 2,0 - 5,0			
3. < 2,0			
NI/NT			
1. > 0,21			
Neutrófilos Totais (mm ³)			
1. 500 - 999			
3. < 500			
Plaquetas (10 ³ /mm ³)			
1. 30 - 100			
3. 0 - 29			
Uréia (mg/dL)			
1. 40 - 80			
3. > 80			
Creatinina (mg/dL)			
1. 1,2 - 2,4			
3. 2,5 - 4,0			
5. > 4,0			

PARÂMETROS	1º dia	ESCORE 10º dia	30º dia
Débito Urinário (ml/kg/h)			
1. 0,5 – 0,1			
3. 0,1 – 0,49			
5. < 0,1			
Bilirrubina Indireta (mg/dL)			
1. 5- 10			
3. > 10			
Bilirrubina Direta (mg/dL)			
1. > 2,0			
Sódio (mEq/L)			
Aumentado: 1. 150 – 160			
3. 161 – 180			
5. > 180			
Diminuído: 1. 120 – 130			
3. < 120			
Potássio (mEq/L)			
Aumentado: 1. 6,6 – 7,5			
3. 7,6 – 9,0			
5. > 9,0			
Diminuído: 1. 2,0 – 2,9			
3. < 2,0			
Cálcio Total (mg/dL)			
Aumentado: 1. 12,0			
Diminuído: 1. 5,0 – 6,9			
3. < 5,0			
Glicose (mg/dL)			
Aumentado: 1. 150 – 250			
3. > 250			
Diminuído: 1. 30 – 40			
3. < 30			
Bicarbonato Sérico (mEq/L)			
Aumentado: 1. > ou = 33			
Diminuído: 1. 11 – 15			
3. < 11			
PH sérico			
1. 7,2 – 7,3			
3. 7,1 – 7,19			
5. < 7,1			
Convulsão			
1. Única			
3. Múltipla			
Apnéia			
1. resposta com estimulação			
3. sem resposta			
5. apnéia completa			
Sangue nas Fezes			
1. Positivo			