



ARTIGO ORIGINAL

Avaliação da eficácia do fator estimulador recombinante humano de colônias de granulócitos “rhG-CSF” no tratamento da sepse de início precoce, em recém-nascidos prematuros

Assessing the efficacy of the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor “rhG-CSF” in the treatment of early neonatal sepsis in premature neonates

Ernani Miura¹, Renato S. Procianoy², Cristina Bittar³, Clarissa S. Miura⁴, Cíntia Melo⁴, Maurício S. Miura⁵

Resumo

Objetivos: Avaliar a eficácia do fator estimulador recombinante humano de colônias de granulócitos (rhG-CSF) no tratamento da sepse de início precoce em recém-nascidos prematuros (RNP).

Material e métodos: Foi desenvolvido um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo em 44 RNP que tinham um “diagnóstico clínico” de sepse de início precoce. O grupo tratado (n=22) recebeu 10µg/kg/d de rhG-CSF, IV, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos, e o grupo placebo (n=22) recebeu o mesmo volume de uma solução, visualmente, indistinguível. Antes da primeira dose, antes da segunda e da terceira doses, e, novamente, 10 dias após a primeira dose, nós medimos o fator de necrose tumoral-α, a interleucina-6, o fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago, o G-CSF, a contagem de leucócitos, a contagem absoluta de neutrófilos, a relação neutrófilos imaturos/total, a contagem de plaquetas e a concentração de hemoglobina. Uma aspiração da medula óssea foi realizada sete dias após a primeira dose, e, na seqüência, medimos o percentual do estoque de reserva medular de neutrófilos (NSP) e a relação NSP/NPP (NPP= estoque proliferativo medular de neutrófilos).

Resultados: Os grupos tratado e placebo eram semelhantes: idade gestacional (29 ± 2 vs 31 ± 3 semanas) e peso ao nascer (1376 ± 491 vs 1404 ± 508 gramas). Eles apresentaram os mesmos escores de Apgar e SNAP de 24 horas. Não houve nenhum óbito durante a primeira semana de vida no grupo tratado, enquanto que ocorreram três óbitos no grupo placebo. A administração de rhG-CSF não modificou as concentrações plasmáticas das citocinas, exceto a citocina G-CSF. Os níveis plasmáticos da G-CSF, contagem de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos, percentuais de NSP e relação NSP/NPP foram maiores no grupo tratado 24 horas e 72 horas após a primeira administração. A ocorrência de infecções subseqüentes, por um período de até 28 dias de vida, seguindo a administração, foi significativamente menor no grupo tratado (n=2) do que no grupo placebo (n=9; p<0,02, RR 0,19 [IC 95% 0,05-0,78]). A taxa de mortalidade total não foi diferente entre o grupo tratado e o grupo placebo.

Conclusões: A administração de rhG-CSF no RNP, com diagnóstico clínico de sepse de início precoce, foi associado com uma menor incidência de infecção de aquisição hospitalar no período de três semanas subseqüentes ao tratamento, mas que não modificaram a taxa total de mortalidade.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(3): 193-199: fator estimulador de colônias de granulócitos, neutropenia, sepse.

Abstract

Objective: To evaluate the efficacy of the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in the treatment of early-onset neonatal sepsis among premature infants.

Materials and Methods: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial was performed among forty-four preterm neonates who had “clinical diagnosis” of early-onset sepsis. The treatment group (n=22) received 10µg/kg/d of rhG-CSF, IV once daily for three consecutive days, and the placebo group (n=22) received the same volume of a visually-indistinguishable vehicle. Prior to the first dose, and prior to the second and third doses, and again 10 days after the first dose, we measured tumor necrosis factor-α, interleukin-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, G-CSF, leukocyte count, absolute neutrophil count, immature/total neutrophil ratio, platelet count, and hemoglobin concentration. A bone marrow aspiration was performed seven days after the first dose, and both the neutrophil storage pool (NSP) percent and the NSP/NPP (neutrophil proliferative pool) ratios were tabulated.

Results: The treatment and placebo groups were of similar gestational age (29 ± 3 vs 31 ± 3 weeks) and birth weight (1376 ± 491 vs 1404 ± 508 grams). They had similar Apgar scores and 24 hour SNAP scores. No deaths occurred during the first week of life among the treatment group while three deaths occurred in the placebo group. RhG-CSF treatment did not alter the serum concentrations of the cytokines measured (except for G-CSF). Serum G-CSF levels, blood leukocyte counts, absolute neutrophil counts, NSP percentages, and NSP/NPP ratios were higher in the treatment group 24 hours and 72 hours after dosing. The occurrence of a subsequent infection over the two week period following dosing was significantly lower in the treatment group (n=2) than in the placebo group (n=9; p<0.02, RR 0.19 [0.05-0.78]). The overall mortality rate during the entire hospitalization was not different between treatment and placebo groups.

Conclusions: Administration of rhG-CSF to premature neonates with the clinical diagnosis of early-onset sepsis was associated with lower incidence of nosocomial infection over the ensuing three weeks period, but it did not change the overall mortality rate.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(3): 193-199: recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, neutropenia, sepsis.

1. Professor Doutor em Pediatria do Departamento de Pediatria e Puericultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Professor Titular do Departamento de Pediatria e Puericultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3. Médica hematologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4. Médicas residentes do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5. Aluno do sexto ano da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Recursos provenientes do FIPE-HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa) e do Laboratório Roche, Divisão de Biotecnologia.

Abreviaturas: rhG-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos; GM-CSF, fator estimulador de colônias de macrófago-granulócitos; TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; IL-6, interleucina-6; LC, contagem de leucócitos; CAN, contagem absoluta de neutrófilos; PT, contagem de plaquetas; NSP, estoque de reserva de neutrófilos; NPP, estoque proliferativo de neutrófilos; SNAP, escore fisiológico agudo neonatal.

Introdução

O sistema de defesa anti-infeccioso neonatal é caracterizado pela imaturidade no desenvolvimento humoral e celular. Deficiências qualitativa e quantitativa dos neutrófilos são reproduzíveis e incluem reduzido estoque de reserva de neutrófilos (NSP = soma de leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos bastonados e metamielócitos), deficiência na produção de neutrófilos após a inoculação bacteriana e redução das funções dos neutrófilos^{1,2}. A neutropenia, durante a sepse, resultante do reduzido NSP, está associada com uma alta taxa de óbitos e comprometimento de múltiplos órgãos por sepse bacteriana fulminante e infecção hospitalar³⁻⁵.

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é o regulador fisiológico da produção e função dos neutrófilos, sua ação biológica consiste na estimulação da proliferação dos precursores dos neutrófilos e no aumento da quimiotaxia, fagocitose, produção de superóxido e atividade bactericida^{6,7}. A produção de G-CSF é relativamente pobre a partir de monócitos obtidos no RN comparado com os obtidos no adulto⁸⁻¹⁰. Esses dados levam à especulação que a administração de rhG-CSF poderia melhorar o prognóstico de neonatos infectados ou poderia diminuir a sua incidência de infecção hospitalar⁸⁻¹¹. Além disso, a administração de rhG-CSF, em modelos animais com sepse neonatal, tem demonstrado aumento de sobrevivência¹²⁻¹⁴. Dois estudos de fase I/II sobre a administração de rhG-CSF, em neonatos com suspeita de sepse, mostraram um aumento dose-dependente na contagem de neutrófilos no sangue periférico e na medula óssea¹⁵, e três estudos clínicos descreveram resultados geralmente positivos dos efeitos do rhG-CSF na sobrevivência, exceto de Schibler¹⁶⁻¹⁸. Entretanto, esses três trabalhos envolveram pequeno grupo de pacientes, e dois deles utilizaram controles históricos. O estudo de Schibler foi randomizado, duplo-cego e controlado por tratamento com placebo e não mostrou aumento nos neutrófilos circulantes, nem aumento da reserva de neutrófilos.

Nossa hipótese foi de que a administração de rhG-CSF, em RNP com diagnóstico clínico de sepse de início precoce, poderia reduzir a taxa de mortalidade por sepse precoce, bem como reduzir a incidência de infecção hospitalar nas três semanas subsequentes, seguindo à última dose do medicamento. Foi usado um modelo clínico experimental, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.

Métodos

Critérios de seleção dos pacientes: foram selecionados todos os RNs com peso, ao nascer, compreendido entre 500 a 2.000 gramas, idade gestacional menor de 37 semanas, que tivessem menos de 5 dias de vida e que apresentassem o diagnóstico clínico de sepse internados na Unidade Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período relativo a 1º de julho de 1996 a 30 de junho de 1997. Foi uniformizada para o diagnóstico de "sepse clínica" a presença de pelo menos três dos seguintes itens neonatais, com um ou mais fator de risco materno para a sepse neonatal, associado com pelo menos um dos reagentes de fase aguda de infecção alterado¹⁵. Os itens neonatais foram 1) febre (acima de 38°C) ou hipotermia (abaixo de 36,5°C), 2) disfunção respiratória (apnéia e taquipnéia), 3) disfunção neurológica (convulsão ou hipotonia), 4) sinais gastrointestinais (vômitos ou distensão abdominal), 5) hiperbilirrubinemia idiopática (sem causa explicável senão pela sepse), 6) choque e 7) sangramento inexplicável. Os fatores de risco materno para infecção neonatal foram 1) febre, 2) infecção intra-amniótica, 3) ruptura prematura de membranas, 4) ruptura prolongada de membranas > 24 horas e 5) infecção urinária. Os dados laboratoriais considerados foram 1) neutropenia, definido como uma contagem absoluta de neutrófilos (CAN) < 1500/uL, 2) relação neutrófilos imaturos em relação a neutrófilos totais (I/T) maior que 0,2¹⁹, 3) IL-6 plasmático maior que 32 pg/mL²⁰, 4) TNF- α plasmático maior que 12 pg/ml²¹. Excluíram-se os casos em que a mãe tinha recebido duas ou mais doses de antibióticos antes do parto e os RN com malformação grave e asfixia severa, isto é, sem ventilação espontânea, hipoativa, bradicardia após às manobras de reanimação. Foi considerado RNP com infecção hospitalar quando, após o sétimo dia de vida, o RN apresentasse sinal clínico de sepse associado à hemocultura positiva ou enterocolite necrosante com sinais radiográficos de pneumatose intestinal ou confirmação pelo exame anátomo-patológico. Este projeto foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e de Pós-Graduação e Comitê de Ética do hospital, e, para cada caso, foi obtido o consentimento escrito dos pais do RN.

Protocolo do tratamento

No protocolo, os RN, no grupo tratamento (GT), receberam rhG-CSF (Granulokine, Roche-Amgen, Thousand Oaks, CA) intravenoso (IV), na dose de 10 μ g/kg diluído em 10 ml de soro glicosado a 5% mais 0,2% de albumina (2 mg/ml) e infundido em bomba de infusão em 30 minutos, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos. Os RN pertencentes ao grupo placebo (GP) receberam um volume idêntico IV sem rhG-CSF; ambas as soluções eram indistinguíveis. Todos os RN selecionados foram distribuídos ao acaso para receber G-CSF ou placebo, através de um critério de sorteio simples (44 envelopes com 22 GT e 22 GP) e de conhecimento exclusivo da farmacêutica da Unidade de Quimioterapia. Os participantes, os investigadores e o pessoal responsável pelos cuidados dos RN foram cegados e, conse-

qüentemente, desconheciam qual o tratamento empregado. Os critérios de suspensão do estudo foram contagem absoluta de neutrófilos (CAN) superior a 60.000 células, paraefeitos imediatos à administração do medicamento ou, ainda, quando retirada do consentimento pelos pais.

Avaliação Laboratorial Hematológica

Foram mensuradas contagem de leucócitos (CL), contagem absoluta de neutrófilos (CAN), contagem de monócitos, eosinófilos e linfócitos, relação neutrófilos imaturos/neutrófilos total (I/T), concentração de hemoglobina (Hb) e contagem de plaquetas (CP) no momento da entrada, antes da administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo, 24 horas, 72 horas e 10 dias após a primeira dose do tratamento. Essa avaliação hematológica do sangue periférico foi realizada em contador eletrônico Cobas Minus, e a contagem diferencial de leucócitos fez-se, manualmente, em lâmina corada pelo método May-Grunwald-Giemsa. Sete dias após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo, os pacientes foram submetidos à aspiração medular na tíbia. A contagem total de células foi executada, também manualmente, em contador eletrônico Cobas Minus, e a contagem diferencial de células foi feita em lâmina corada pelo método May-Grunwald-Giemsa. Foram avaliados o percentual da soma de células nucleadas identificadas como mieloblastos; promielócitos e mielócitos foram chamados de NPP (estoque proliferativo de neutrófilos); o percentual da soma de células nucleadas identificadas como metamielócitos, neutrófilos bastonados e neutrófilos segmentados foi chamado de NSP (estoque de reserva de neutrófilos); e a relação mielóide/eritróide medular (M/E). Todos os resultados dos componentes hematológicos circulatórios e medulares foram executados pela mesma hematologista.

Avaliação Laboratorial das Citocinas

Foram obtidas amostras sanguíneas para determinar as citocinas hematopoiéticas G-CSF, GM-CSF, IL-6 e TNF- α imediatamente antes da administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo, 24 horas após e imediatamente antes da administração da segunda dose do rhG-CSF ou placebo, 72 horas após a administração da primeira dose do rhG-CSF ou placebo e 10 dias após a primeira administração do rhG-CSF ou placebo. Essas citocinas foram medidas no plasma por método sanduíche ELISA (enzimo-imunoabsorvente-ensaio, Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN) de acordo com a orientação do fabricante. As amostras foram armazenadas a -70°C e posteriormente foram analisadas simultaneamente. Os valores mínimo e máximo foram respectivamente para o G-CSF, 11 pg/ml e 6000 pg/ml; GM-CSF, 3 pg/ml e 13 pg/ml; IL-6, 1 pg/l e 1437 pg/ml; e para o TNF- α , 11 pg/ml e 62 pg/ml, respectivamente.

Avaliação da Severidade da Doença

A severidade dos casos estudados foi avaliada pelo método do escore fisiológico agudo neonatal (SNAP) no

momento da entrada dos pacientes²². A mortalidade e a morbidade foram analisadas como medidas de desenlace. As complicações relacionadas à sepse e à prematuridade foram hemorragia intraventricular, período de tempo em ventilação mecânica, período de tempo em oxigênio, enterocolite necrosante, meningite e a ocorrência de um episódio de sepse subsequente durante a hospitalização.

Tamanho da Amostra e Análise Estatística

O estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que o uso de rhG-CSF poderia reduzir a mortalidade por sepse e a incidência de infecção hospitalar em 50%. Na primeira fase do estudo, nós estudamos 26 RNP, quando ocorreram 3 óbitos, em 13 casos (23%), no GT e 6 óbitos, em 13 casos (46%), no GP. A análise estatística interina mostrou que seriam necessários 42 pacientes a serem tratados nessas condições para se provar uma diferença estatisticamente significativa do efeito protetor do rhG-CSF ($p < 0,05$). Utilizamos, como poder do estudo, um intervalo de confiança de 90% que resultava num risco relativo (RR) de 0,5 (0,2-0,99). Os dados demográficos foram comparados por métodos paramétrico t de Student, exato de Fisher (mortalidade e infecção hospitalar) e não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A mediana dos níveis das citocinas (G-CSF, GM-CSF, IL-6, TNF- α), a contagem completa sanguínea (CL, CAN, I/T, linfócitos, monócitos, eosinófilos, CP, Hb) e a contagem neutrofílica da medula óssea (NSP, NPP, M/E) foram comparadas em cada momento por análise de variância, usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Resultados

Quarenta e quatro RNP foram incluídos no estudo, dividido em dois grupos: 22 no GT e 22 no GP. Dois casos foram excluídos por falta de consentimento dos pais. As características clínicas demográficas da amostra estudada não mostraram diferenças significativas em relação a peso médio ao nascer, idade gestacional média, mediana do escore de Apgar no 5º minuto de vida, mediana do escore SNAP no dia de entrada no estudo, número de RN neutropênicos (CAN $< 1500/c$), tempo de hospitalização, tempo de administração de oxigênio e de ventilação mecânica (Tabela 1). Trinta casos foram admitidos no primeiro dia de vida, 10 casos no segundo dia de vida e outros 4 casos até quatro dias de vida.

Na entrada do estudo, foram isolados os seguintes agentes patogênicos: *Streptococcus* do grupo B (1 caso, GT), *Staphylococcus aureus* (2 casos, GT e GP), *Staphylococcus epidermis* (1 caso, GP), *E coli* (1 caso, GT) e Bacilo gram-negativo não identificado (1 caso, GT).

Antes do tratamento, os níveis de G-CSF eram de leve a marcadamente aumentados no GP (mediana 141 pg/ml; variação 18-4985), bem como no GT (mediana 154 pg/ml; variação 23-4047). Vinte e quatro horas após a primeira dose (imediatamente antes da segunda dose), os níveis de

Tabela 1 - Dados clínicos e resultados de 44 recém-nascidos prematuros com diagnóstico clínico de sepse de início precoce

	Placebo (n = 22)	rhG-CSF (n = 22)
Peso (gramas, média ± DP)	1404 ± 508	1376 ± 491
Idade Gestacional (sem, média ± DP)	31 ± 3	29 ± 3
Masculino	14	9
Feminino	8	13
Apgar 5º min (mediana, variação)	8 (1 - 10)	7 (3 - 10)
SNAP (mediana, variação)	9 (0 - 23)	8 (3 - 28)
Óbitos < 7 dias de vida	3	0
Óbitos 8-28 dias de vida	3	5
Infecção hospitalar *	9	2

* P = 0,02 RR = 0,19 IC 95% 0,05-0,78

G-CSF foram significativamente maiores no GT (mediana 2568 pg/mL; variação 30-6000) do que no GP (mediana 56 pg/mL; variação 19-2289, $p < 0,00001$). Setenta e duas horas após a primeira dose de rhG-CSF (imediatamente antes da terceira dose), no GT, os níveis de G-CSF permaneceram significativamente maiores no GT (mediana de 129 pg/mL; variação 28-6000) do que no GP (mediana 37 pg/mL; variação 19-1608, $p < 0,007$). Dez dias após o início do tratamento, os níveis de G-CSF foram similares em ambos os grupos (Tabela 2). Os níveis plasmáticos do GM-CSF, TNF- α e IL-6 não foram diferentes após a administração de rhG-CSF entre o GT e o GP.

Antes do tratamento, as contagens dos leucócitos e da contagem absoluta de neutrófilos foram similares em ambos os grupos. Entretanto, 24 e 72 horas após, ambos estavam significativamente mais elevados no GT do que no GP (Tabela 3). Dez dias após o início do tratamento, não havia mais diferenças em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças entre os dois grupos em relação às

diferenças nas contagens da relação de neutrófilos I/T (GT, 0,18 na entrada, 0,19 com 24 horas, 0,13 com 72 horas e 0,09 com 10 dias, e no GP, 0,18 na entrada, 0,14 com 24 horas, 0,13 com 72 horas e 0,09 com 10 dias). Não ocorreram mudanças nas contagens absolutas de eosinófilos, linfócitos e plaquetas. Houve um aumento significativo na contagem absoluta de monócitos, com 72 horas após o início do tratamento, no GT (1178/mm³, variação 0-5291) do que no GP (481/mm³, variação 86-1158, $p < 0,0002$). O aspirado de medula óssea foi realizado sete dias após o início do tratamento em 36 pacientes (3 foram a óbito antes do sétimo dia, 5 não estavam em boas condições). O NSP e a relação NSP/NPP foram significativamente maiores no GT do que no GP (Tabela 4).

Durante a primeira semana de vida não ocorreram óbitos no GT, enquanto que no GP ocorreram três óbitos. Estudos de necropsia foram feitos nos três casos e a causa de morte foi hemorragia intraventricular de grau IV.

Onze casos de sepse hospitalar ocorreram durante as três semanas subsequentes ao tratamento: 9/19 (47,3%) no grupo placebo e 2/22 (9,1%) no grupo rhG-CSF ($p < 0,02$; RR 0,19 IC 95% 0,05-0,78). Nove desses onze casos foram identificados por hemocultura e dois casos de enterocolite necrosante foram diagnosticados por estudos radiográficos e anatomo-patológicos (GP). Os seguintes agentes bacterianos foram isolados: *Staphylococcus aureus* (4 casos, 2 GT e 2 GP), *Staphylococcus epidermis* (4 casos, GP) e *Staphylococcus hemolyticus* (1 caso, GP).

Foram três óbitos no GP na fase tardia. Um caso morreu no pós-operatório de obstrução intestinal por pâncreas anular no 24º dia de vida, e dois óbitos foram devido à enterocolite necrosante, respectivamente no 22º e 24º dia de vida. Cinco óbitos ocorreram no GT; dois tiveram hemorragia intraventricular grau III, respectivamente no 8º e 13º dia de vida; dois foram a óbito, tendo como causa de morte hemorragia pulmonar e doença de membrana hialina, ambos com 14 dias de vida; e o quinto óbito ocorreu no 25º dia de vida por insuficiência renal aguda.

Tabela 2 - Concentração plasmática de G-CSF, GM-CSF, TNF- α e IL-6 nos neonatos estudados antes (0 hora), 24 horas (imediatamente antes da segunda dose), 72 horas (imediatamente antes da dose final) e 10 dias após a administração de rhG-CSF ou placebo

CITOCINAS (mediana, variação)	0 hora		24 horas		72 horas		10 dias	
	Placebo	rhG-CSF	Placebo	rhG-CSF	Placebo	rhG-CSF	Placebo	rhG-CSF
G-CSF pg/mL	141 (18-4985)	154 (23-4047)	56 (19-2289)	2568 (30-6000) *	37 (19-1608)	129 (28-6000) **	29 (23-355)	39 (20-4258)
GM-CSF pg/mL	5,5 (4-12)	5,5 (4-13)	5 (4-10)	5 (4-13)	5 (3-8)	5 (4-8)	5 (3-11)	5 (4-9)
TNF- α pg/mL	14 (11-23)	13 (11-29)	14 (12-18)	14 (12-23)	14 (12-17)	14 (12-20)	14,5 (12-21)	14 (12-62)
IL-6 pg/mL	27,5 (1-1453)	20,5 (6-1500)	12 (5-1295)	15 (5-363)	11 (3-867)	11 (3-104)	11,5 (3-620)	6 (4-1034)

* $p < 0,00001$ vs placebo** $p < 0,007$ vs placebo

Tabela 3 – Valores hematológicos antes (0 horas), 24 horas (imediatamente antes da segunda dose), 72 horas (imediatamente antes da dose final) e 10 dias após a administração do rhG-CSF ou placebo

Valores Hematológicos	Placebo (n= 22)				rhG-CSF (n= 22)			
	Antes	24 horas	72 horas	10 dias	Antes	24 horas	72 horas	10 dias
Leucócitos/uL	8.750 (1.900-34.000)	8.100 (1.400-27.100)	9.250 (2.000-21.000)	12.000 (7.000-32.900)	11.300 (2.700-29.600)	15.200 (4.400-65.300)*	23.100 (9.500-48.100)†	13.050 (9.100-30.200)
Absoluto de Neutrófilos/uL	5.316 (748-22.440)	4.526 (918-24.932)	4.703 (1.537-15.540)	5.049 (2.856-23.688)	7.076 (1.458-20.424)	9.522 (2.948-50.281)‡	16.843 (6.270-35.113)§	8.446 (18.18-17.818)
Linfócitos/uL	2.571 (114-3.288)	2.349 (42-7.560)	3.272 (220-6.364)	4.002 (1.602-8.721)	2.604 (616-9.360)	3.886 (540-13.713)	4.037 (984-7.600)	4.320 (900-10.268)
Monócitos/uL	386 (38-1.450)	405 (58-1.494)	481 (86-1.158)	615 (70-2.632)	387 (116-2.664)	665 (88-3.140)	1.178 (0-5.291)¶	720 (182-2.250)
Plaquetas X10 ³ /uL	207 (58-332)	126 (35-281)	160 (41-331)	306 (28-611)	217 (126-380)	181 (118-359)	187 (65-428)	315 (75-828)
Hemoglobina g/dL	14,7 ± 2,2	14,7 ± 2,4	13,9 ± 2,8	12,2 ± 1,8	13,8 ± 2,8	14,5 ± 2,2	15,1 ± 2,0	13,6 ± 1,6

*p < 0,006 vs placebo

†p < 0,00002 vs placebo

‡p < 0,005 vs placebo

§p < 0,00002 vs placebo

¶p < 0,0002 vs placebo

As principais aferições medidas como complicações distribuíram-se de forma semelhante entre os dois grupos: média do tempo de hospitalização 35 vs 40 dias (P=0,5), oxigenioterapia 11,5 vs 12,8 dias (P=0,8), CPAP 5,8 vs 4,3 dias (P=0,3), ventilação mecânica 10,6 vs 8,1 dias (P=0,4).

Discussão

A sepse bacteriana continua sendo um problema de grande importância na neonatologia clínica. A sepse de início precoce e a infecção hospitalar são as grandes responsáveis pela mortalidade, morbidade, tempo de permanência hospitalar e altos custos nas unidades de terapia intensiva²³. A imaturidade de certas defesas antibacterianas, particularmente no sistema neutrofílico, constitui uma parte da razão para esse problema^{1,2}. Com a disponibilidade do rhG-CSF e a descoberta de seu papel na produção e funcionamento de neutrófilos e com o entendimento que a produção de G-CSF é relativamente limitada em RNP, pode ser especulado que a administração de rhG-CSF pode ser

um valioso adjuvante da antibioticoterapia e dos cuidados intensivos^{8,11}.

Foi claramente demonstrado, desde o primeiro estudo, publicado por Gillan et al.¹⁵, que a administração de rhG-CSF tem essencialmente os mesmos efeitos biológicos no RN que no adulto. Isto é, ele induz à produção de neutrófilos provenientes do NSP e subsequentemente causa um aumento dose-dependente na produção, na circulação e na reserva medular de neutrófilos. Gillan et al.¹⁵ estudaram 42 RN que tinham “sepse presumível”, trataram com placebo (n=9) ou rhG-CSF nas doses que variaram de 1,0 a 20,0 µg/kg/dia por três dias consecutivos. Embora esse estudo não avaliasse seu impacto sobre a mortalidade, foi observado que nenhum dos 42 neonatos morreram, refletindo uma amostra composta predominantemente por pacientes não-críticos.

Posteriormente, Kocherlakota et al.¹⁶ descreveram os resultados de 27 neonatos, 14 que receberam rhG-CSF e 13 controles concomitantes. Somente ocorreu uma morte precoce no grupo rhG-CSF comparado com três óbitos no grupo controle. Durante toda a hospitalização, houve mais um óbito no grupo rhG-CSF e mais seis no grupo controle. Schibler et al.¹⁷ realizaram um estudo randomizado com 10 RNP com sepse de início precoce para receber rhG-CSF e 10 para receber placebo e houve dois óbitos durante o estudo em cada grupo. As complicações como hemorragia intaventricular, displasia broncopulmonar e infecção hospitalar se distribuíram de forma semelhante entre os dois grupos. Barak et al.¹⁸ trataram 14 RNP que tinham sepse presumível com rhG-CSF e observou somente um óbito de forma precoce, comparado com nove óbitos entre 24 casos-históricos que não foram tratados com rhG-CSF. Similarmente aos dados de Kocherlakota, Schibler e Barak, nós não observamos nenhum óbito precoce entre os receptores

Tabela 4 - Valores hematológicos (mediana e variação) na medula óssea da reserva de neutrófilos nos neonatos estudados, sete dias após a administração de placebo ou rhG-CSF

	Placebo (n = 18)	rhG-CSF (n = 18)	p Kruskal-Wallis
NSP (%)	51,5 (19 – 62)	61 (43 – 70)	0,003
NPP (%)	17,5 (12 – 57)	16 (7 – 48)	0,3
NSP/NPP	2,9 (0,3 – 4,5)	3,7 (0,9 – 9,4)	0,05
M/E	11 (2 – 44)	19,5 (7 – 80)	0,06

de rhG-CSF contra três óbitos que ocorreram no grupo placebo. É possível que esse fato seja relevante, uma vez que Klein descreveu que 72% dos óbitos devidos à sepse de início precoce ocorrem nas primeiras 48 horas seguindo o diagnóstico²⁹. Quando os dados de mortes precoce do presente estudo são adicionados aos descritos por Gillan, Kocherlakota, Schibler e Barak, observamos que houve somente dois óbitos em 93 receptores de rhG-CSF (2,2%) contra 18 óbitos de 76 controles (23,7%). Quando é consolidado o total de óbitos (precoce e tardio) dos quatro estudos, observou-se que ocorreram 11 óbitos de 93 receptores de rhG-CSF (11,7%) contra 27 óbitos de 76 neonatos controle (36,8%). Nós ressaltamos que os cinco estudos provêm de diferentes amostras de pacientes e que os resultados não podem ser interpretados com confiança. Por exemplo, no presente estudo, os níveis relativamente baixos prévios de G-CSF, TNF- α , IL-6, e ainda na relação I/T indicam que nossos pacientes eram menos criticamente doentes do que os pacientes estudados por Schibler¹⁸. Os estudos descritos por Gessler²⁴, Kennon²⁵ indicam que os neonatos com sepse grave têm geralmente elevados níveis de G-CSF endógeno, enquanto que nossos pacientes tiveram somente níveis prévios de normais a moderadamente elevados de G-CSF endógeno. É necessário aguardar outros estudos de metodologia semelhante para serem submetidos a um estudo de metanálise.

Nenhum dos três estudos citados estudaram de forma prospectiva, o efeito da aplicação de rhG-CSF na incidência de infecção hospitalar. Gillan et al.¹⁵ citaram um potencial efeito salutar, isto é, que o tratamento com rhG-CSF resultou em um considerável aumento no tamanho do NSP. Nós observamos o mesmo efeito em nosso estudo, bem como observamos uma menor incidência de infecção hospitalar entre o grupo tratado com rhG-CSF. Nós especulamos que a menor incidência de infecção hospitalar pode ser devido ao maior estoque de NSP, o qual persiste por um indeterminado período de tempo, seguindo a cessação da administração de rhG-CSF. Ou, ainda, que talvez a melhoria do funcionamento dos neutrófilos (quimiotaxia e fagocitose), persistindo por um período de tempo, uma vez cessada a aplicação de rhG-CSF, ou a combinação nos efeitos quantitativos e qualitativos nos neutrófilos.

Recentemente, Cairo et al.²⁶ publicaram um estudo randomizado, controlado por placebo sobre a incidência de infecção hospitalar após a aplicação profilática de rhGM-CSF em RNMBP. Eles estudaram 264 neonatos com menos de 72 horas de vida; 134 casos receberam rhGM-CSF na dose de 8 μ g/kg/dia, IV, diariamente por sete dias, e após alternando cada dia até 21 dias; 130 receberam placebo. Não encontraram diferenças na incidência de infecção hospitalar entre ambos os grupos. Entretanto, foi observado um aumento na ANC nos dias 7, 14 e 21, um aumento na expressão de receptores C3bi e uma elevada concentração de células progenitoras no sangue periférico no dia 8 no grupo rhGM-CSF. Carr et al.²⁷ usando o mesmo rhGM-CSF profilaticamente por 5 dias, em um estudo randomiza-

do, controlado por placebo em 72 neonatos prematuros nas primeiras 72 horas de vida, produziram um desaparecimento da neutropenia no grupo tratado, comparado com uma incidência de 40% de neutropenia no grupo controle. Não ocorreram diferenças na mortalidade entre ambos os grupos e uma tendência de menor número de casos de infecção hospitalar no grupo tratado: 11/36 vs 18/39 (OR 0,51, IC 95% 0,20-1,31).

Nós observamos que os níveis de TNF- α e IL-6 eram levemente elevados na entrada do estudo, e ambos podem ser úteis marcadores de sepse neonatal^{20,21,28,29}. Embora os níveis de GM-CSF, TNF- α e IL-6 não mostrassem diferenças após a administração de rhG-CSF, Gørgen et al.³⁰ mostraram uma redução na mortalidade e supressão da atividade do TNF- α após a aplicação de altas doses de rhG-CSF (250 mg/kg) em ratos com sepse por gram-negativo. De forma similar, em ratos com sepse experimental, Lundbland et al.²⁹ mostraram uma redução na mortalidade, contagem de bactérias, TNF- α e endotelina-1 após a aplicação de altas doses de rhG-CSF.

Nenhum dos estudos prévios com a administração de rhG-CSF, em RN humanos infectados, mostraram efeitos adversos a curto prazo e a longo prazo. De maneira similar, nós não observamos nenhum efeito adverso em nossos pacientes. Potencialmente, pode ocorrer uma lesão endotelial pulmonar produzida pela administração de rhG-CSF e que pode ser manifestada por necessidades crescente de oxigênio e por um período maior de ventilação mecânica^{31,32}. Nós não observamos nenhum desses efeitos, e podemos concluir que não foram observados efeitos danosos pulmonares. Detectamos um aumento na concentração de monócitos, a semelhança dos dados descritos por Gillan¹⁵, Schibler¹⁷, Kocherlakota¹⁶ e Bedford-Russell³³, entretanto a trombocitopenia descrita por Bedford-Russell, e não descrita por Gillan, Schibler e Kocherlakota também não foi observada em nosso estudo.

Em conclusão, nós observamos que a administração de rhG-CSF aos neonatos prematuros que têm diagnóstico clínico de sepse de início precoce não alterou a mortalidade, porém produziu um aumento na concentração de neutrófilos no sangue periférico e na medula óssea. Houve também uma redução significativa na infecção hospitalar nas três semanas subsequentes.

Agradecimentos

Ao Dr. Robert D. Christensen, chefe da Neonatologia da Universidade da Flórida, Gainesville, USA, por seu profissionalismo e presteza na execução desta pesquisa; à Luciana D. Nocci, pelo auxílio na análise estatística.

Referências bibliográficas

1. Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility. In Remington JS and Klein JO, ed. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1995. p.17-67.

2. Hill HR. Host defenses in the neonate: prospects for enhancement. *Semin Perinatol* 1985;9:2-11.
3. Stohl BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR 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* 1996; 129:72-80.
4. Stohl BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR 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* 1996; 129:63-71.
5. Polin RA, St. Geme JW. Neonatal sepsis. *Adv Pediatr Infect Dis* 1992; 7:25-61.
6. Demetic G, Griffin J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1992;78:2791.
7. Tdrossou-Agakidou V, Kanakoudi-Tsakalidou F, Sarafidis K. Administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor to septic neonates induces neutrophilia and enhances the neutrophil respiratory burst and beta 2 integrin expression. *Eur J Pediatr* 1998;157:582-588.
8. Schibler KR, Leichty KW, White W, Christensen RD. Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. *Blood* 1993;82:2478-84.
9. Liechty KW, Schibler KR, Ohls DR, White WL, Christensen RD. The failure of newborn mice infected with *Escherichia coli* to accelerate neutrophil production correlates with their failure to increase transcripts for granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6. *Biol Neonate* 1993;64:331-40.
10. Cairo M, Suen Y, Knoppel E, Knoppel E, van de Vem C, Nguyen A, Sender L. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr Res* 1992;31:574-8.
11. Cairo M. Therapeutic implications of dysregulated colony-stimulating factor expression in neonates. *Blood* 1993;82:2269-72.
12. Cairo MS, Plunkett J, Mauss D, van de Ven C. Seven-day administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor to newborn rats: modulation of neonatal neutrophilia, myelopoiesis, and group B streptococcal sepsis. *Blood* 1990; 76:1788-94.
13. Cairo MS, Plunkett J, Nguyen A, van de Ven C. Effects of stem cell factor with and without granulocyte colony-stimulating factor on neonatal hematopoiesis: in vivo induction of newborn myelopoiesis and reduction in mortality during experimental group B streptococcal sepsis. *Blood* 1992;80:96-101.
14. Cairo M, Mauss D, Kommareddy S, Norris K, van de Vem C, Mondalou H. Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of group B Streptococcal sepsis in neonatal rats. *Pediatr Res* 1990;27:612-6.
15. Gillan E, Christensen R, Suen Y, Ellis R, van de Vem C, Cairo MS. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. *Blood* 1994;84: 1427-33.
16. Kocherlakota P, La Gamma EF. Human granulocyte colony-stimulating factor may improve outcome attributable to neonatal sepsis complicated by neutropenia. *Pediatrics*. 1997;100:e6.
17. Barak Y, Leibowitz E, Mogliner B. The *in vivo* effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in neutropenic neonates with sepsis. *Eur J Pediatr* 1997;156:643-6.
18. Schibler KR, Osborne KA, Leung LY, Le TV, Baker SI, Thompson DD. A randomized, placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor administration to newborn infants with neutropenia and clinical signs of early-onset sepsis. *Pediatrics* 1998;102:6-13.
19. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood cell count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979;95:89-98.
20. Panero A, Pacifico L, Rossi N. Interleukin-6 in neonates with early and late onset infection. *Pediatr Inf Dis J* 1997;16:370-7.
21. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-a and interleukin-1b for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.
22. Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldman DA. Score for neonatal acute physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics* 1993;91: 617-23.
23. Klein JO, and Marcy MS. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 835-90.
24. Gessler P, Kirchmann N, Kientsch-Engel R, Haas N, Lasch P, Kachel W. Serum concentrations of granulocyte colony-stimulating factor in healthy term and preterm neonates and in those with various diseases including bacterial infection. *Blood* 1993;82: 3177-82.
25. Kennon C, Overturf G, Beisman S. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. *J Pediatr* 1996;128:765-69.
26. Cairo MS, Agosti J, Ellis R, Laver JJ, Puppala B, de Lemos R, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of prophylactic recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reduce nosocomial infections in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 1999;134:64-70.
27. Carr R, Modi N, Doré CJ, El-Rifai R, Lindo D. A randomized, controlled trial of prophylactic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human newborns less than 32 weeks gestation. *Pediatrics* 1999;103:796-802.
28. De Bont ES, Martens A, Van Raan I. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr* 1994;83:696-9.
29. Lundblad R, Nesland JM, Giercksky KE. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, endothelin-1 in fulminate intra-abdominal sepsis in rats. *Crit Care Med* 1996;24:820-6.
30. Görgen I, Hatung T, Leist M. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodent against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992;149:918-24.
31. Dale DC, Liles WC, Summer WR. Review: Granulocyte stimulating factor and role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995;172:1061-75.
32. Van Deventer SJH. Progress in cytokine research and implications for immunotherapy of sepsis. *Clinician* 1995;13:9-13.
33. Bedford-Russel AR, Davies EG, Ball SE, Gordon-Smith E. Granulocyte colony-stimulating factor treatment for neonatal neutropenia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1995;72:F53-F54.

Endereço para correspondência:

Dr. Ernani Miura,
Rua Anita Garibaldi, 217/802
CEP 90450-001 - Porto Alegre - RS
Email: emiura.voy@zaz.com.br