

Perfil de citocinas em recém-nascidos prematuros utilizando amostras de sangue coletadas em papel filtro: correlação com desfechos clínicos desfavoráveis.

Cytokines in preterm newborns using blood samples collected on filter paper: correlation with unfavorable clinical outcomes.

Juliana de Oliveira Marcatto¹, José Augusto Almeida Barbosa², Marcus Vinicius Andrade³, Camilla Ribeiro Lima Machado⁴, Ângela Soares da Cunha Castello Branco⁵, Luciana de Gouvêa Viana², Pedro Guatimosin Vidigal²

RESUMO

Introdução: A identificação precoce de citocinas pode favorecer a condução clínica e adoção de medidas preventivas na população neonatal. **Objetivo:** Avaliar os níveis séricos de Interleucinas (IL) 2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Mastócitos (GM-CSF) nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros através de coleta de sangue em papel filtro. **Métodos:** Estudo analítico observacional prospectivo desenvolvido com 34 recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas. As dosagens foram feitas com 10, 60 e 180 minutos de vida em papel filtro. Utilizado o reagente Bio-Plex ProT Human Cytokine Standard 8 plex, Group I BIO-RAD e as leituras realizadas com Luminex 100. **Resultados:** Houve associação entre sepse e a presença de IFN- γ e TNF- α com 10, 60 e 180 minutos de vida. A associação entre sepse e a presença de IL-6 foi observada com 180 minutos de vida. Níveis reduzidos de GM-CSF na primeira hora de vida foram relacionados à hipotermia ($p=0,005$) à admissão na unidade neonatal. **Conclusão:** A detecção dos níveis de citocinas em papel filtro é viável nas primeiras horas de vida de recém-nascidos prematuros. As vantagens são a facilidade de coleta, armazenamento, transporte e utilização de pequenos volumes. O IFN- γ e TNF- α e IL-6 podem ser considerados marcadores para o desenvolvimento de sepse nessa população. A redução dos níveis de GM-CSF em pacientes hipotérmicos favorecendo quadros de neutropenia aponta para a importância da prevenção da hipotermia.

Palavras-chave: Citocinas; Testes Hematológicos; Recém-Nascido Prematuro; Sepse.

¹ Doutor, Enfermeira. Professora da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

² Doutor, Médico

³ Doutor, Médico. Professor da Faculdade de Medicina (FM) da UFMG

⁴ Mestre em ciências aplicadas à saúde do adulto, Bióloga

⁵ Mestranda em saúde do adulto, Estatística

Instituição:

Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, MG - Brasil.

* Autor Correspondente:

Juliana de Oliveira Marcatto
E-mail: julianaoliveiramarcatto@gmail.com

Recebido em: 01/05/2017.

Aprovado em: 09/08/2017.

ABSTRACT

Introduction: Early identification of cytokines may favor clinical management and the adoption of preventive measures. **Objective:** This study aims to evaluate the serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon gamma (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and Stimulating Factor of Granulocyte and Mast Cell Colonies (GM-CSF) in the first three hours of life of preterm newborns through blood collection on filter paper. **Methods:** Prospective observational analytical study developed with 34 preterm infants with gestational age between 28 and 32 weeks. Measurements were made at 10, 60 and 180 minutes of life on filter paper. Used Bio-Plex Pro T Human Cytokine Standard 8 plex reagent, Group I BIO-RAD and readings performed through the Luminex 100. **Results:** There was an association between sepsis and the presence of IFN- γ and TNF- α at 10, 60 and 180 minutes of life. Association between sepsis and the presence of IL-6 was observed with 180 minutes. Reduced levels of GM-CSF in the first hour of life were related to hypothermia on admission to the neonatal unit ($p=0.005$). **Conclusion:** The detection of levels of cytokines in samples collected on filter paper showed to be viable in the first few hours of life with the following advantages: ease of collection, storage / transport and the use of small volumes. IFN- γ and TNF- α and IL-6 may be considered promising markers for the development of sepsis in this population. The reduction of levels of GM-CSF in hypothermic patients favoring neutropenia alerts the need for preventive care of this condition.

Keywords: Cytokine; Hematologic Tests; Infant, Premature; Sepsis.

INTRODUÇÃO

Em recém-nascidos prematuros, várias intervenções são necessárias para fornecer suporte de vida e auxiliar no processo de adaptação à vida extrauterina.¹ Suporte ventilatório, hemodinâmico e metabólico são frequentemente necessários desde o momento do nascimento em sala de parto e se estendem para a unidade neonatal durante as primeiras horas de vida. Tais intervenções são potencialmente estressoras e capazes de induzir a liberação de citocinas que atuam como mediadores da resposta inflamatória, sendo responsáveis por induzir quimiotaxia para o local da lesão.^{2,3}

Investigações acerca dos níveis séricos de citocinas e a associação com os desfechos clínicos desfavoráveis prevalentes em recém-nascidos prematuros têm sido conduzidas com o objetivo de favorecer diagnósticos precoces, aumentar a sobrevida, minimizar morbidade e mortalidade, além de possibilitar a adoção de medidas preventivas e mudanças nas práticas assistenciais vigentes.⁴⁻⁷

A utilização de soro e plasma é o padrão ouro na identificação de biomarcadores. Entretanto, o custo, a logística relacionada à punção venosa ou arterial, a manipulação e transporte das amostras após a coleta configuram obstáculos para essa prática.^{7,8} Na população neonatal, além de todas estas considerações, o volume de sangue utilizado na realização dos exames deve ser

um ponto de atenção, uma vez que múltiplas coletas resultam em comprometimento da volemia total, aumentando o risco de anemia e de quadros clínicos específicos da prematuridade, tais como desequilíbrios hidroeletrólíticos, apneia e alterações do fluxo sanguíneo cerebral.⁹

A utilização de dosagens a partir de sangue coletado em papel filtro é um recurso alternativo por apresentar uma série de vantagens. Trata-se de um procedimento minimamente invasivo que pode ser realizado através de punção de calcanhar, sem a necessidade de processamento da amostra. Além disso, o armazenamento e transporte das amostras é fácil e tem como principal benefício o fato de utilizar pequenos volumes de sangue e promover estabilização dos mediadores a serem investigados, especialmente no caso das citocinas.¹⁰

O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil das citocinas interleucina (IL) 2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Mastócitos (GM-CSF) nas primeiras três horas de vida de recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 e 32 semanas, através de coleta de sangue em papel filtro correlacionando-os com desfechos clínicos desfavoráveis do período neonatal. Objetivou-se ainda avaliar a associação dos níveis dessas citocinas com o desenvolvimento de hipotermia.

A investigação do comportamento das citocinas nessa população em estágios de vida tão precoce pode ajudar na adoção de medidas preventivas e de controle uma vez que a maior parte das investigações realizadas em recém-nascidos ocorreu a partir de quatro horas de vida.¹¹

MÉTODOS

Trata-se de um estudo analítico observacional prospectivo realizado em um hospital de Belo Horizonte, MG. Os pacientes foram recrutados no período de julho/2013 a dezembro/2014, sendo incluídos prospectivamente 34 recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 28 a 32 semanas, nas primeiras três horas de vida. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Instituição hospitalar onde foi realizada a coleta de dados. Os responsáveis pelos recém-nascidos envolvidos na pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão foram recém-nascidos portadores de malformações congênitas, filhos de mães diabéticas e/ou submetidas à anestesia geral para o parto, usuárias de drogas ilícitas ou portadoras de síndromes que cursam com doenças endócrinas, além de recém-nascidos em parada cardiorrespiratória ao nascimento. Os pacientes envolvidos nesse estudo foram acompanhados até a alta ou óbito hospitalar a fim de se avaliar os desfechos clínicos estudados.

As amostras de sangue capilar foram coletadas em papel filtro em três momentos distintos: 10, 60 e 180 minutos de vida através de punção de calcanhar. A técnica utilizada para realização das punções seguiu as orientações adotadas pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD) descrito no programa de triagem neonatal, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Procedures and Devices for the Collection for Diagnosis Capillary Blood Specimens; Approves standard - Sixth Edition, CSLI document H04-A6 (ISBN1-56328-667-8)*.

Para cada tempo foram preenchidos cinco círculos (*spots*) do papel filtro, mantido na posição horizontal por três horas para secagem, identificado e posteriormente congelado a 20°C negativos até a análise. O eluato foi obtido a partir de metodologia testada previamente como componente deste trabalho (9 mm de papel filtro eluído com 250 µL de solução tampão).¹² O presente estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo nº APQ-00863-11, demanda universal.

Todas as dosagens foram realizadas em duplicata. As dosagens de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF foram realizadas usando o reagente comercialmente disponível *Bio-Plex ProT Human Cytokine Standard 8 plex*, Group I BIO-RAD, Richmond, CA, USA. Trata-se de um ensaio que utiliza a metodologia xMAP, possibilitando a determinação quantitativa de múltiplas citocinas que apresenta precisão intra e interensaio de 5 a 10% para citocinas. As leituras foram analisadas através de um sistema automatizado de análises laboratoriais (Luminex 100; Luminex, Austin, TX, USA) com *software* adequado.

As variáveis explicativas estudadas foram idade gestacional, peso de nascimento, gênero, Apgar de primeiro e quinto minuto, temperatura axilar à admissão na unidade neonatal, tipo de parto, uso de corticoide pré-natal, fração inspirada de oxigênio (FiO₂) máxima, tempo de utilização de Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas (CPAP), tempo de utilização de ventilação mecânica, uso de amins, hemotransfusão e tempo total de internação. Dentre as variáveis desfecho, foi investigada a correlação entre a dosagem das citocinas e a displasia broncopulmonar (DBP), sepse, hemorragia peri-intraventricular (HPIV), retinopatia da prematuridade (ROP) e óbito.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a caracterização da amostra total, com análise da frequência para as variáveis categóricas e as medidas descritivas (média, mediana, percentis 25 e 75, mínimo, máximo e desvio-padrão) para as variáveis quantitativas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Como a dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α mostrou uma distribuição não normal, testes não paramétricos foram utilizados.

Testes paramétricos foram utilizados para GM-CSF, por apresentar distribuição normal nos dados. Para a comparação das dosagens das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α) em relação aos tempos avaliados, usou-se o teste de Friedman e o teste ANOVA de medidas repetidas para GM-CSF. As comparações múltiplas (dois a dois) quando necessárias foram realizadas pelo teste de Wicoxon.

Para avaliação da expressão das citocinas em cada tempo por desfecho (sepse, DBP, HPIV, óbito e sem desfecho desfavorável) empregou-se o teste de Mann-Whitney para IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α e o teste t de Student para GM-CSF. Análise univariada foi realizada para avaliar associação entre desfechos clínicos como sepse e a presença de citocinas nos diferentes tempos de coleta utilizando-se para tal o teste Qui-quadrado de Pearson com correção de Yates ou Teste exato de Fisher quando adequado, calculando-se então o OR e IC 95%. Em todos os testes estatísticos o nível de significância utilizado foi de 5%, ou seja, testes com valor p inferior a 5% foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas com o *software* SPSS versão 20.0 salvo a análise univariada quando foi utilizado o *software* Minitab 16.

RESULTADOS

Os dados demográficos, perinatais e neonatais dos 34 recém-nascidos incluídos no estudo estão descritos na Tabela 1 e a frequência de desfechos clínicos está descrita na Tabela 2. Todos os pacientes da pesquisa utilizaram CPAP em sala de parto, durante transferência e nas três primeiras horas de admissão na unidade neonatal. A FiO₂ variou de 40 a 100%, 91,2% das mães não apresentaram infecção do trato urinário (ITU) durante a gestação. Nenhum dos pacientes incluídos na pesquisa foi intubado nas primeiras três horas de vida, mas alguns foram intubados posteriormente, sendo a média de utilização de ventilação mecânica de 12,6 dias nesta população.

Foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os tempos para as citocinas IL-6, IL-8 e IFN- γ (p<0,05). As citocinas IL-2 e IL-4 não foram detectadas em nenhum dos tempos investigados.

Tabela 1 - Dados demográficos, perinatais e neonatais.

Características	Valores
Idade gestacional (semanas) Média (Mínima/Máxima)	30,56 (28 - 32)
Peso de nascimento (g) Média (Mínimo/Máximo)	1.385 (585 - 2710)
Gênero (%) - F/M	38,2/61,8
Apgar 1º minuto- Média(Mínimo/Máximo)	7 (4-9)
Apgar 5º minuto-Média (Mínimo/Máximo)	9 (5-10)
Idade materna - Média (Mínima/Máxima)	29,79 (17-44)
Desfecho do parto Vaginal/Cesárea (%)	8,8/88,2
Uso de corticoide pela mãe (%)	97,1
Amniorrexe prematura (%)	23,5
Temperatura de admissão $\leq 36,5^{\circ}\text{C}$ (%)	38,2
Uso de amins (%)	20,6
Hemotransfusão (%)	14,7
Tempo de utilização de CPAP (dias) - Média (Mínimo/Máximo)	10,21 (1-45)
Tempo de utilização de ventilação mecânica - Média (Min/Max)	12,65 (0-131)
Tempo de internação (dias) - Média (Mínimo/Máximo)	39,26 (5-131)

Tabela 2 - Frequência de desfechos clínicos.

Desfecho	Percentual de ocorrência (%)/N
Displasia broncopulmonar	17,6 / 6
Sepse	35,3 / 12
Retinopatia da prematuridade*	26,5 / 9
Hemorragia intraventricular**	20,6 / 7
Óbito	8,8 / 3
Nenhum desfecho desfavorável	47,1 / 16

* Um dos nove pacientes afetados apresentou a forma grave da doença demandando fotocoagulação

**Nenhum paciente apresentou HPIV grau III e IV

Comparando-se a expressão de citocinas nos diferentes tempos estudados em relação a cada desfecho (seps, DBP, ROP, HPV e óbito), o único achado significativo estatisticamente foi para o grupo que desenvolveu seps. Nesse grupo a expressão do TNF- α com 60 minutos de vida foi maior que no grupo sem seps (Tabela 3). Não houve diferença para outras citocinas, em diferentes tempos e para os demais desfechos.

Uma vez identificada essa diferença na variável seps, teste de correlação (análise univariada) foi aplicado buscando-se identificar outras associações entre as citocinas e os demais desfechos propostos no estudo. Foi encontrada correlação da expressão de citocinas apenas para o desfecho seps. Assim, houve associação significativa entre seps e a presença de IFN- γ e TNF- α com 10, 60 e 180 minutos de vida ($p < 0,05$). A associação significativa entre seps e a presença de IL-6 foi observada com 180 minutos de vida ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Na população estudada, 13 pacientes apresentaram temperatura axilar inferior a $36,4^{\circ}\text{C}$ no momento da admissão na unidade neonatal. Quando avaliados os níveis séricos de citocinas na população que desenvolveu hipotermia comparando com os recém-nascidos que não desenvolveram, observou-se que os valores de GM-CSF foram significativamente mais elevados no grupo que não apresentou hipotermia ($p = 0,005$) (Tabela 5).

Quando o grupo que não demandou intubação durante a internação (16 pacientes) foi comparado ao grupo intubado após a terceira hora de vida (18 pacientes), não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas nas dosagens das citocinas investigadas nas primeiras três horas de vida.

Tabela 3 - Comparação dos níveis séricos de citocinas entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de seps.

Variáveis	N	SEPSE		N	Sim Média	Mediana	P
		Não Média	Mediana				
IL-6 10'		4,25	0,00		20,90	2,50	0,327
IL-6 60'	22	33,42	8,90	12	80,84	24,80	0,299
IL-6 180'		42,58	7,50		191,82	16,80	0,204
IL-8 10'		82,10	69,70		174,25	77,00	0,511
IL-8 60'	22	125,47	114,80	12	242,11	151,80	0,317
IL-8 180'		254,83	230,30		511,35	238,40	0,462
IL-10 10'		7,56	0,00		12,25	15,90	0,204
IL-10 60'	22	12,42	0,00	12	13,87	16,00	0,560
IL-10 180'		9,80	2,40		11,16	13,20	0,749
IFN- γ 10'		88,37	0,00		135,12	79,80	0,094
IFN- γ 60'	22	115,00	0,00	12	119,44	105,40	0,317
IFN- γ 180'		99,00	0,00		267,47	134,80	0,133
TNF- α 10'		82,05	8,40		122,40	24,20	0,383
TNF- α 60'	22	40,95	0,00	12	102,49	15,60	0,048
TNF- α 180'		160,32	0,00		107,76	58,60	0,396
GM-CSF 10'		396,26	310,00		466,13	452,8	0,547*
GM-CSF 60'	22	357,41	268,10	12	444,75	477,8	0,480*
GM-CSF 180'		362,68	322,70		379,29	389,20	0,881*

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

Tabela 4 - Correlação entre níveis séricos de citocinas nos pacientes que desenvolveram sepse nas primeiras três horas de vida; análise univariada.

Interleucinas	Sepse		IC 95%	
	P	OR		
(Variável preditora)				
IL-6 180'	< 0,05**	8,33	0,90	76,75
IFN-G 10'	< 0,05**	7,11	1,40	36,12
IFN-G 60'	< 0,05*	4,67	0,96	22,79
IFN-G 180'	< 0,01*	7,87	1,35	45,83
TNF- α 10'	< 0,05**	8,33	0,90	76,75
TNF- α 60'	< 0,01*	7,87	1,35	45,83
TNF- α 180'	< 0,05**	12,00	1,30	110,52

* teste Qui-quadrado de Pearson, com correção de Yates

**Teste exato de Fisher

A população foi estratificada de acordo com o peso de nascimento e dividida em dois grupos: maiores (13 pacientes) e menores de 1500 gramas (21 pacientes), não sendo identificadas dosagens de citocinas com diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos diferentes tempos estudados.

DISCUSSÃO

A avaliação e detecção das citocinas nos primeiros 180 minutos de vida, em recém-nascidos prematuros, em papel filtro, conforme se mostrou possível nesse estudo, revelam perfis complexos que podem ser de significância fisiológica e patofisiológica servindo como possíveis marcadores de desfechos graves que acometem essa população.

A utilização do papel filtro como estratégia para realização de monitoramento laboratorial tem sido testada nos últimos anos.^{10,13,14} A principal vantagem da coleta de amostras de sangue em papel filtro é o pequeno volume necessário, o que na população neonatal constitui aspecto relevante em decorrência da volemia total circulante e da grande demanda de múltiplas coletas para monitoramento clínico e laboratorial.

A menor intensidade da dor causada aos recém-nascidos, a facilidade de coleta, armazenamento, transporte e a estabilidade das citocinas são também vantagens da utilização do papel filtro quando comparada à coleta convencional.^{8,13,14} A coleta utilizando-se esse método se mostrou exequível e tecnicamente simples por meio desse trabalho.

A dosagem de biomarcadores com potencial preditivo e/ou prognóstico tem sido alvo de vários estudos em neonatologia, uma vez que pode possibilitar a identificação de grupos de pacientes com maior probabilidade de desenvolvimento de desfechos clínicos graves ou com potencial de complicação, o que possibilita a identificação precoce e a adoção de medidas preventivas direcionadas para este grupo.^{11,15}

Em relação ao comportamento das citocinas nos diferentes tempos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados na expressão de IL-6, IL-8 e IFN- γ . Existem divergências na literatura acerca do momento de liberação das citocinas. IL-6 apresentou concentrações diferenciadas nos três tempos, sendo as maiores concentrações detectadas com 60 minutos de vida. Em relação à IL-8, níveis progressivamente mais elevados foram observados ao longo das três primeiras horas de vida. IL-6 e IL-8 apresentam meia-vida curta e suas concentrações circulantes reduzem significativamente com o tratamento antimicrobiano nos casos de sepse, tornando-as indetectáveis após 24 horas de instituição do tratamento.¹⁶

Wu *et al.*¹⁷ conduziram um estudo com 75 recém-nascidos com diagnóstico de sepse e concluíram que altos níveis de IL-6 e IL-8 estavam correlacionados à gravidade da infecção e que a detecção dessas duas citocinas de maneira combinada pode auxiliar no diagnóstico de sepse. Entretanto, a observação do comportamento das mesmas pode ser útil na identificação de práticas que induzem resposta inflamatória, ainda que não descritas como doenças com fisiopatologia estabelecida, como acontece nos casos de manipulações e procedimentos realizados na prática clínica, incluindo os potencialmente dolorosos e que muitas vezes são considerados pela equipe como sendo intervenções isentas de riscos.

Mesmo em relação à sepse, como as dosagens podem ser feitas nas primeiras três horas de vida, sua presença poderia, sim, já chamar a atenção para o desenvolvimento desse desfecho (no caso da IL-6), no que pese a possibilidade do uso de antimicrobianos maternos no periparto interferir negativamente nos níveis dessas dosagens, o que não foi motivo de abordagem no presente estudo. Especificamente quanto ao IFN- γ , o mesmo foi detectado com três horas de vida. Em trabalhos que investigam a associação de citocinas com DBP, o IFN- γ apresentou correlação com DBP e óbito.¹¹

Em relação à sepse, foi evidenciada a correlação de IL-6, IFN- γ e TNF- α nos primeiros 180 minutos de vida, não sendo identificado o mesmo para DBP, ROP, HPIV e óbito.

A sepse é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nas unidades neonatais, sendo sua identificação,

Tabela 5 - Comparação dos níveis séricos de citocinas na primeira hora de vida entre pacientes que desenvolveram ou não quadro de hipotermia no momento da admissão na Unidade Neonatal.

Variáveis	N	Hipotermia			P		
		Não		Sim			
		Média	Mediana	N	Média	Mediana	
IL-6 (1 H)	21	60,21	17,90	13	32,32	5,40	0,207
IL-8 (1 H)	21	146,95	114,80	13	191,12	148,60	0,221
IL-10 (1 H)	21	15,24	15,90	13	9,31	0,00	0,316
IFN- γ (1 H)	21	134,62	42,70	13	88,57	0,00	0,650
TNF- α (1 H)	21	83,17	10,30	13	28,08	0,00	0,316
GM-CSF (1 H)*	21	499,96	401,30	13	212,00	209,60	0,005

*Teste T de Student/ Demais variáveis teste de Mann-Whitney

prevenção e controle um grande desafio para a equipe de saúde.^{18,19} Um estudo demonstrou que o TNF- α apresenta alta sensibilidade no diagnóstico de inflamação, mas não pode ser utilizado para diferenciar recém-nascidos infectados de não infectados e que níveis aumentados podem prever maior risco de óbito. Assim, os autores desse estudo sugerem a associação de dosagem de IL-6 e TNF- α para diagnóstico de sepse neonatal.¹⁸

Outros estudos também demonstraram o aumento dos níveis de TNF- α em pacientes com sepse clínica quando comparados ao grupo controle.^{20,21} A expressão de TNF- α parece ter correlação com a gravidade da sepse e com a mortalidade.²² A maioria dos trabalhos publicados investigaram recém-nascidos de muito baixo peso buscando a associação da expressão de citocinas com os desfechos clínicos de etiologia inflamatória prevalentes no período neonatal, especialmente de DBP e sepse.^{11,23,24}

No presente estudo 17,6% da população estudada desenvolveu displasia broncopulmonar, mas não foi evidenciada correlação com as citocinas investigadas em nenhum dos tempos estabelecidos. A relação das citocinas com o desenvolvimento de retinopatia da prematuridade e hemorragia intraventricular também foi investigada em alguns estudos, mas assim como para DBP também não foi demonstrada no presente estudo.^{6,25,26}

Na população estudada, um dos nove pacientes com diagnóstico de retinopatia da prematuridade desenvolveu a forma grave da doença, não havendo nenhum caso de hemorragia peri intraventricular grau III e IV. Porém, vale ressaltar que a intensidade da resposta de expressão das citocinas (resposta inflamatória), está associada com a intensidade do dano. Como no presente estudo praticamente os pacientes não apresentaram formas graves das doenças (DBP e ROP), essa pode ser uma explicação para o achado da correlação das citocinas apenas com sepse.

As dosagens de GM-CSF não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos analisados. Entretanto, chamou a atenção o fato de que na população estudada foi identificada correlação entre a redução dos níveis séricos de GM-CSF em 13 pacientes que apresentaram hipotermia (temperatura axilar inferior a 36,4°C) à admissão na Unidade Neonatal quando comparada à população que não apresentou hipotermia.

O GM-CSF tem como característica estimular a proliferação de células progenitoras mieloides -unidades formadoras de colônias de granulócitos macrófagos (CFU-GM) e unidades formadoras de colônias de eosinófilos (CFU-EO), induzindo também a maturação e liberação para o sangue periférico do *pool* de neutrófilos medulares. Ambos os fatores, além da ação exercida na medula óssea, agem também nos neutrófilos maduros, melhorando sua função, ou seja, aumentando a quimiotaxia, a fagocitose, a atividade bactericida e o metabolismo oxidativo, em estudos experimentais *in vitro* em neutrófilos de recém-nascidos.

O desenvolvimento de neutropenia é uma condição frequente entre recém-nascidos prematuros e, por este motivo, a administração de GM-CSF tem sido proposta como estratégia profilática e terapêutica nos casos de sepse. Entretanto, os dados disponíveis na literatura não subsidiam sua utilização.^{27,28} Ficou demonstrado no presente estudo que a hipotermia reduz os níveis de GM-CSF sugerindo a possibilidade de quadros mais severos de neutropenia e, conseqüentemente, maior probabilidade de desenvolvimento de quadros sépticos.

Alguns pacientes incluídos na pesquisa, apesar de não terem sido intubados nas primeiras três horas de vida, demandaram intubação posterior durante a internação (18 pacientes). Foi investigado se esta população apresentava comportamento diferenciado em relação aos níveis séricos de citocinas quando comparada à população que não demandou ventilação mecânica em nenhum momento durante a internação (16 pacientes), não sendo identificadas diferenças estatisticamente significativas entre estas populações.

A estratificação da população estudada de acordo com o peso se mostrou necessária, uma vez que a maior parte dos estudos desenvolvidos em relação às dosagens de citocinas e sua correlação com os desfechos clínicos são realizados em populações de recém-nascidos de extremo baixo peso. Assim, foi comparada a relação com os desfechos clínicos entre menores e maiores de 1500 gramas, não sendo identificadas diferenças de comportamento entre as populações de nenhuma das citocinas investigadas.

CONCLUSÃO

A descrição do comportamento das citocinas em estágios precoces de vida pós-natal pode possibilitar avaliações em relação ao potencial estressor dos procedimentos realizados nas primeiras horas de vida. Esta expressão demonstra a capacidade fisiológica de recém-nascidos prematuros de responder a insultos, que podem ter início na vida intrauterina, sendo potencializados pelos procedimentos pós-natais aos quais são submetidos especialmente nas primeiras horas de vida.

A correlação de sepse neonatal e dosagens elevadas de IL-6, IFN- γ e TNF- α representa achado promissor no monitoramento de recém-nascidos sob o risco de tal desfecho. A hipotermia resulta em redução dos níveis de GM-CSF favorecendo quadros de neutropenia, o que aponta para a necessidade de cuidados voltados para prevenção desse quadro, especialmente no que se refere à manipulação de recém-nascidos prematuros nas primeiras horas de vida.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer às famílias que autorizaram a inclusão de seus bebês nesse trabalho e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa (demanda universal, processo nº APQ00863-11).

REFERÊNCIAS

1. Bryce J, Black RE, Walker N, Bhutta ZA, Lawn JE, Steketee RW. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? *Lancet*. 2005;365(9478):2193-200.
2. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, *et al.*; Members of the Vermont Oxford Network. Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics*. 2002;110(1 Pt 1):143-51.
3. Carvalho CG, Silveira RC, Procianny RS. Ventilator-induced lung injury in preterm infants. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2013;25(4):319-26.

4. Bose CL, Damman CEL, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(6):F455-61.
5. Lam HS, Ng PC. Biochemical markers for neonatal sepsis. *Pathology.* 2008;40(2):141-8.
6. Silveira RC, Fortes Filho JB, Procianoy RS. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(3):1297-301.
7. Sävman K, Blennow M, Hagberg H, Tarkowski E, Thoresen M, Whitelaw A. Cytokine response in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Acta Paediatr.* 2002;91(12):1357-63.
8. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography.* 2007;44(4):899-925.
9. Bhat BV, Plakkal M. Management of Shock in Neonates. *Indian J Pediatr.* 2015;82(10):923-9.
10. Skogstrand K, Thorse P, Nørgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sørensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem.* 2005;51(10):1854-66.
11. Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, et al.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 2009;123(4):1132-41.
12. Arya SC. Testing for AIDS on samples of dried blood prepared on filter papers. *Vaccine.* 1988;6(3):210.
13. Skogstrand K, Ekelund CK, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Nørgaard-Pedersen, et al. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *J Immunol Methods.* 2008;336(1):78-84.
14. McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am J Hum Biol.* 2014;26(1):1-9.
15. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence.* 2014;5(1):170-8.
16. Worthman CM, Starling JF. Hormone measures in finger-prick blood spot samples: new field methods for reproductive endocrinology. *Am J Phys Anthropol.* 1997;104(1):1-21.
17. Wu YQ, Shen J, Zhou QL, Zhao HW, Liu LR, Liu X. Interleukin 6 and interleukin 8 in diagnosing neonatal septicemia. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2016;30(4):1107-13.
18. Prashant A, Vishwanath P, Kulkarni P, Sathya Narayana P, Gowdara V, Nataraj SM, et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e68426.
19. Machado JR, Soave DF, Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:269681.
20. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1- β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 1999;88(6):647-50.
21. Pickler R, Brown L, McGrath J, Lyon D, Rattican D, Cheng CY, et al. Integrated review of cytokines in maternal, cord and newborn blood: part II - associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants. *Biol Res Nurs.* 2010;11(4):377-86.
22. Girardin EB, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Pautner L. Serum tumor necrosis factor in newborn at risk for infections. *Eur J Pediatr.* 1990;149(9):645-7.
23. Laughon MM, Langer JC, Bose CL, Smith PB, Ambalavanan N, Kennedy KA, et al.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(12):1715-22.
24. Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol.* 2010;37(3):599-610.
25. Merhar S. Biomarkers in neonatal posthemorrhagic hydrocephalus. *Neonatology.* 2012;101(1):1-7.
26. Maheshwari A, Schelonka RL, Dimmit RA, Carlo WA, Munoz-Hernandez B, Das A, et al.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2014;76(1):100-8.
27. Castagnola E, Dufour C. Role of G-CSF GM-CSF in the management of infections in preterm newborns: an update. *Early Hum Dev.* 2014;90 (Suppl 2):S15-17.
28. Carr R, Modi N, Doré C. G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3):CD003066.