

11237
47
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios Superiores
Hospital General Centro Médico La Raza

**FACTOR RECOMBINANTE ESTIMULANTE DE
COLONIAS GRANULOCITO-MACROFAGO (rGM-CSF)
EN EL TRATAMIENTO DE SEPTICEMIA NEONATAL**

TESIS DE POSTGRADO
Para obtener el Título de
Especialización en Pediatría Médica
p r e s e n t a

Dr. Juan Carlos García Crespo

Asesor de Tesis: **Dr. José Vicente Estrada Flores**



IMSS

México, D. F.

Enero 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

**Al Doctor Vicente Estrada:
por el apoyo, confianza
y la amistad que me ha
brindado.**

A mis padres:

**Mariana y Carlos
porque es otra forma de
decirles que los quiero...**

A MI FUTURA ESPOSA:

SANDRA FUENTES ESQUINCA.

Por su amor, comprensión y paciencia que me impulsó para llegar a la meta.

Con quien formaré lo más sagrado y bello de una pareja, la familia.

A MIS HERMANAS:

ANA MARIA Y NORMA DIANA.

Por su apoyo, comprensión y afecto.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS:

Por que siempre me alentaron a seguir adelante y nunca me abandonaron en los momentos difíciles.

A TODOS LOS NIÑOS DEL MUNDO:

por se la motivación de mi posgrado y futuro humano.

Por que alguna vez fuimos niños y nuestros hijos lo serán.

EN ESPECIAL:

A Laura, Bety, Rosita y Lupita.

Por su amistad y lealtad que me han brindado.

Por haberme impulsado durante los 2 años que convivimos

y por haber compartido juntos momentos difíciles.

INDICE

Título	1
Lista de Investigadores	2
Objetivo	3
Planteamiento del problema	4
Identificación de variables	5
Hipótesis	5
Introducción y antecedentes científicos...	6
Material y Métodos	8
Análisis estadístico	10
Resultados	10
Discusión	14
Bibliografía	24

TITULO DEL PROYECTO:

**FACTOR RECOMBINANTE ESTIMULANTE DE COLONIAS
GRANULOCITO-MACROFAGO (rGM-CSF) EN EL
TRATAMIENTO DE SEPTICEMIA NEONATAL.**

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Dr. José Vicente Estrada Flores.

Médico Neonatólogo, adscrito al servicio de Neonatología del Hospital General del Centro Médico La Raza.

INVESTIGADORES ASOCIADOS:

Dra. María Teresa Dueñas

Médico Hematóloga, adscrita al servicio de Hematología del Hospital General del Centro Médico La Raza.

Dr. Juan Carlos García Crespo.

Médico Residente de 3er año de Pediatría del Hospital General del Centro Médico La Raza.

SERVICIOS PARTICIPANTES:

Servicio de Neonatología y de Hematología Pediátrica del Hospital General del Centro Médico La Raza.

OBJETIVO.

Evaluar los efectos del GM-CSF en la sobrevida, número de leucocitos totales y su cuenta diferencial, precursores granulocíticos en médula ósea y mortalidad, en recién nacidos ingresados al Servicio de Neonatología del Hospital General del Centro Médico La Raza con diagnóstico de septicemia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La septicemia neonatal constituye la 10ª causa de ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital General del Centro Médico La Raza y la quinta causa de mortalidad de dicho servicio, con un promedio de 70 ingresos y 25 defunciones anuales por ésta patología. La tasa de mortalidad oscila entre 20-35% del total de los casos, pese al manejo con antimicrobianos de amplio espectro y exsanguineotransfusión en los casos graves. El RN es especialmente susceptible a los procesos infecciosos bacterianos debido a la inmadurez del sistema inmunológico, por lo que la administración de GM-CSF que corrige varias de estas deficiencias en la inmunidad celular de los neutrófilos, puede resultar beneficiosa en el tratamiento de la septicemia neonatal.

¿Cuáles son los efectos del GM-CSF sobre la sobrevida, número de leucocitos totales y cuenta diferencial, precursores granulocíticos en médula ósea y mortalidad en recién nacidos con septicemia neonatal?

IDENTIFICACION DE VARIABLES.

1.-Variable independiente.

1.1 Tratamiento con GM-CSF.

Indicadores: presente - ausente.

Escala de medición: nominal.

Definición operacional: es la administración de GM-CSF (Molgramostim - LEUCOMAX, Sandoz-Plough) a recién nacidos con septicemia neonatal, a dosis de 30 mcg/kg cada 24 horas por 3 - 5 dosis.

2.- Variables dependientes.

2.1 Sobrevida.

Indicadores: presente - ausente.

Escala de medición: nominal.

Definición operacional: es la sobrevida de los recién nacidos estudiados a los 30 días de edad posnatal para los de término y a las 36 semanas de edad posconcepcional para los de pretérmino.

2.2 Número de leucocitos totales.

Indicadores: número de leucocitos por mm^3

Escala de medición: escalar continua.

Definición operacional: es el número de leucocitos totales en la biometría hemática obtenida de sangre periférica por mm^3 .

2.3 Cuenta diferencial de leucocitos

Indicadores: número de los diferentes tipos de leucocitos por mm^3 y en porcentaje del total.

Escala de medición: escalar continua.

Definición operacional: es el número de los diferentes tipos de leucocitos (segmentados linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos, en banda y metamielocitos) en la biometría hemática de sangre periférica por mm^3 y en porcentaje total.

2.4 Mortalidad.

Indicadores: presente - ausente.

Escala de medición: nominal.

Definición operacional: es la ocurrencia de defunciones durante los primeros 30 días de vida posnatal para los neonatos a término y hasta las 36 semanas de edad posconcepcional en los pretérmino secundaria directamente a septicemia neonatal.

HIPOTESIS.

Hipotesis alterna (H1).- Los pacientes con septicemia neonatal tratados con GM-CSF muestran sobrevida, número de leucocitos totales, cuenta diferencial, precursores granulocíticos en médula ósea y mortalidad mejores que los pacientes no tratados.

Hipótesis nula (H0).- Los pacientes con septicemia neonatal tratados con GM-CSF muestran sobrevida, número de leucocitos totales, cuenta diferencial, precursores granulocíticos en médula ósea y mortalidad similar a los pacientes no tratados.

INTRODUCCION.

La septicemia neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos de infección sistémica acompañados de bacteremia en el primer mes de vida posnatal (1). Los mecanismos de defensa inmune en el neonato son inmaduros y contribuyen al mayor riesgo de desarrollar septicemia en recién nacidos a término y pretérmino.

Las diferencias más importantes que parecen aumentar el riesgo de septicemia bacteriana en el recién nacido son los defectos en la inmunidad mediada por anticuerpos y los cambios cuantitativos y cualitativos en el sistema fagocítico (2).

Las deficiencias cuantitativas y cualitativas de los neutrófilos son múltiples. Christensen y Rothstein han mostrado en ratas recién nacidas sólo un 10-20% de unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (CFU-GM) comparadas con el animal adulto y, a pesar de este escaso número, su tasa de proliferación está al 75-80% de sus niveles máximos, por lo que la producción de granulocitos en la médula ósea no es capaz de aumentar en el recién nacido en condiciones fisiológicas, y menos aún si existe infección bacteriana grave con gran consumo de neutrófilos (2,3). Además, la reserva medular de neutrófilos (polimorfonucleares, bandas y metamielocitos), en el recién nacido, es de sólo el 25% comparada con la del adulto. Esto predispone a depleción medular en presencia de septicemia grave y es un factor pronóstico de importancia en la sobrevida (4).

Durante la septicemia neonatal, aún el número adecuado de polimorfonucleares puede ser insuficiente debido a que su capacidad de función está alterada. Se han demostrado, in vitro e in vivo, múltiples anomalías en los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) del recién nacido, que incluyen: alteraciones en la activación de los PMN, quimiotaxis disminuida, reducción en la deformabilidad, menor capacidad de fagocitosis, reducción en la capacidad de expresión de receptores de membrana (C3b1), disminución en la adherencia, reducción de la actividad bactericida intracelular de bacterias y depresión del metabolismo oxidativo (2,5,6). Estas alteraciones son más evidentes en situaciones de estrés o infección.

El tratamiento de la septicemia neonatal se limita al manejo de sostén con antibióticos, en la mayoría de los casos. Se han utilizado otras modalidades terapéuticas como la administración de gammaglobulina endovenosa y

transfusión de granulocitos con cierto resultado, sin embargo, ésta última tiene el inconveniente de requerir transfusiones frecuentes debido a la vida media corta del neutrófilo y el paciente está expuesto a los riesgos asociados a la transfusión de sangre de varios donadores (7-11).

Recientemente se ha descubierto que la división celular de los precursores medulares hematopoyéticos depende del aporte continuo o intermitente de factores proteicos altamente específicos. Estos factores promotores de crecimiento actúan como reguladores de la hematopoyesis y fueron llamados factores estimulantes de colonias (colony-stimulating factors-CSFs). Al menos dos clases de factores son importantes para el desarrollo de las células hematopoyéticas; los factores clase I: multi-CSF o interleucina 3 y CSF granulocito-macrófago (GM-CSF), y los clase II: CSF granulocito (G-CSF), CSF monocito (M-CSF) y la eritropoyetina (12-16).

El GM-CSF fue modificado y clonado en 1985 (12,17). Tiene, además de sus conocidas funciones sobre la multiplicación y diferenciación celular en médula ósea, efectos directos sobre los neutrófilos maduros y puede jugar un papel principal, junto con otros CSFs en la regulación de la respuesta inmune. El GM-CSF produce una amplia gama de efectos estimulantes sobre la función de los neutrófilos maduros y, probablemente, juegue un papel importante en la activación de los fagocitos durante la respuesta inmune. El GM-CSF también aumenta la quimiotaxis hacia los sitios de lesión y puede producir inmovilización de las células en los sitios de inflamación con exposiciones prolongadas. La citotoxicidad de los monocitos y eosinófilos tanto para microorganismos patógenos, como para células tumorales aumenta con la exposición a GM-CSF (12, 19-24).

Las posibilidades terapéuticas del GM-CSF en la septicemia bacteriana en el recién nacido son prometedoras. Los efectos del factor sobre la función de los neutrófilos del neonato humano *in vitro* han sido descritas (12, 18-24); y estudios experimentales en animales recién nacidos han demostrado el efecto protector del GM-CSF y G-CSF en infecciones bacterianas por *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, estreptococo del grupo B tipo III (25-28). También se les ha utilizado como coadyuvantes en el tratamiento de infecciones por hongos con resultados variables (29). El recién nacido neutropénico con septicemia bacteriana, constituye un candidato adecuado para el tratamiento con GM-CSF, ya que su uso, en teoría,

corregiría tanto las deficiencias cuantitativas como las alteraciones funcionales de los neutrófilos. En el presente estudio describimos los efectos del GM-CSF administrado a recién nacidos neutropénicos con diagnóstico de septicemia bacteriana severa y que habían mostrado falta de respuesta al tratamiento médico convencional.

MATERIAL Y METODOS.

Población. Se estudiaron los recién nacidos ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital General del Centro Médico La Raza, en el periodo comprendido de enero a julio de 1994, con diagnóstico de septicemia neonatal, con leucopenia, neutropenia y ausencia de respuesta al tratamiento médico convencional con antibióticos y exsanguinotransfusión.

Se incluyeron en el estudio a los recién nacidos a término < 30 días de edad posnatal y los pretérmino < 37 semanas de edad posconcepcional con diagnóstico de septicemia neonatal en base a:

a). Datos clínicos de infección: rechazo a la alimentación, mal estado general, fiebre, irritabilidad, hiporreactividad, distermias, apneas, crisis convulsivas, datos de choque o acidosis persistente.

b). Datos hematológicos: leucocitosis > de $30 \times 10^9/l$ ($30,000/mm^3$) en los primeros 3 días de edad o > $15 \times 10^9/l$ ($15,000/mm^3$) en cualquier momento posterior; leucopenia < $5 \times 10^9/l$ ($5,000/mm^3$), neutropenia < $1.5 \times 10^9/l$ ($1500/mm^3$), bandas totales > $0.6 \times 10^9/l$ ($600/mm^3$), relación bandas/neutrófilos > 0.2, relación inmaduros/maduros > 0.15; VSG > 15 mm/hr, proteína-C reactiva > 0.9 mg/dl, trombocitopenia < $100 \times 10^9/l$ ($100,000/mm^3$); fibrinógeno 4.5 umol/l (150mg/dl).

c). Datos de certeza: hemocultivo con desarrollo bacteriano.

El diagnóstico de septicemia se realizó en un sistema de puntuación basado en 13 parámetros (tabla 1) que han sido asociados con la presencia de infección (30-37), y que en nuestra unidad han mostrado una sensibilidad de 91% y especificidad de 92% con una puntuación ≥ 9 para el diagnóstico de septicemia (Fernández-Celis, observaciones no publicadas). Además del diagnóstico de septicemia fue indispensable que los pacientes hubieran mostrado falta de respuesta al tratamiento convencional empleado en nuestra unidad, consistente en la administración de doble esquema de antimicrobianos

Tabla 1.- CRITERIOS HEMATOLOGICOS PARA SEPTICEMIA NEONATAL

Criterio	Puntuación *
Leucocitos > 30,000 en < 72 h.	1
Leucocitos > 15,000 en > 72 h.	1
Leucopenia < 5,000	2
Neutropenia < 1,500	2
Bandas totales > 600	1
Relación bandas/neutrófilos > 0.2	2
Rel. inmaduros/maduros > 0.15	2
Granulaciones tóxicas y/o vacuolas en PMN	1
Proteína C reactiva > 0.9 mg/dl	1
Sedimentación globular > 15mm/h	1
Fibrinógeno < 150 mg/dl	1
Plaquetas < 100,000	1
Hemocultivo con desarrollo	5

* Puntuación ≥ 9 = septicemia. Valores $\times \text{mm}^3$

además la realización de exsanguinotransfusión en 2-3 ocasiones. Considerando falta de respuesta a la persistencia de los índices hematológicos de infección con una puntuación > 9 , persistencia de desarrollo bacteriano en hemocultivo y/o alteraciones hemodinámicas como hipotensión y/o choque persistentes acompañados de acidosis metabólica.

Protocolo. Una vez incluidos los pacientes se realizó toma de médula ósea por punción en cresta tibial anterior, realizando frotis en portaobjetos y tinción posterior con técnica de Leishman - Giemsa o tinción de Wright y análisis con microscopio de luz, y se determinó, en cuentas de 1000 células, la reserva medular de neutrófilos (PMN, bandas y metamielocitos) considerando normal un rango de 25% a 57% y los precursores de neutrófilos (neutrófilos en proliferación: mieloblastos, promielocitos y mielocitos) con rango normal de 7.7% a 30%. Se administró GM-CSF (Molgramostim-LEUCOMAX Sandoz Plough), como polvo liofilizado en envases conteniendo 400 ug de

GM-CSF con una actividad específica de 10^8 U/mg. La dosis fue de 25 ug/kg, diluido en 20 ml de solución glucosada al 5%, por vía endovenosa durante 3 días. Este es un factor recombinante humano obtenido a partir de E. coli, no glucosilado. Los detalles de la estructura y producción de éste factor, han sido reportados previamente (38). La dosis fue elegida para alcanzar óptimos resultados terapéuticos en breve tiempo con los menores efectos adversos (39). Se prefirió la ruta de administración endovenosa sobre la subcutánea, considerando que un porcentaje significativo de los pacientes tenían alteraciones hemodinámicas que podrían haber impedido la absorción adecuada del medicamento por esta última vía. Se tomó biometría hemática completa los días 1, 2 y 3 durante la administración del medicamento y 10 días después del inicio, se registró el número total de leucocitos y la cuenta diferencial de los diferentes tipos de leucocitos (linfocitos, segmentados, monocitos, eosinófilos, basófilos, formas en banda, metamielocitos y mielocitos). Al término de la administración del GM-CSF se tomó nueva muestra de médula ósea procesándola de la misma manera que el primer espécimen. Se anotó el número de sobrevivientes y fallecimientos en los 10 días posteriores al diagnóstico de septicemia neonatal.

Análisis estadístico. Se realizó mediante prueba de análisis de varianza para mediciones repetidas (ANOVA), con prueba de t de Student dentro del análisis de varianza, y prueba de U de Mann-Whitney. Se consideraron significativas diferencias con una $p < 0.05$. Los resultados se muestran como media + error estándar. El estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital General del Centro Médico La Raza, para investigaciones en seres humanos. Se solicitó autorización por escrito a los familiares para su inclusión en el estudio.

RESULTADOS.

Se estudiaron 13 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, cuyas características generales se muestran en la tabla 2, tres de estos pacientes fueron excluidos del análisis final debido a que no se contó con el examen de médula ósea al final del tratamiento. Todos se encontraban con asistencia mecánica a la ventilación. De ellos 6 fueron del sexo masculino y 4 del femenino, con una edad gestacional de 34.8 ± 4.2

Tabla 2.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

Paciente No.	Sexo	E.G. sem.	Peso g.	Edad días	Dx al ingr.	ExTF (n)	Hemocultivo	Meningitis	Falleció	Causa
1	F	32	1300	6	SDR	3	Klebsiella sp	no	no	-
2	M	30	1050	16	SDR	3	S. aureus	no	no	-
3	M	38	2800	13	EHI	2	S. aureus	si	no	-
4	M	40	3475	19	EHI	3	Klebsiella sp	no	no	-
5	F	34	1675	12	SDR	3	Enterobacter	no	si	DBP
6	M	32	1200	8	SDR	3	S. aureus	no	no	-
7	F	32	1425	14	SDR	2	S. aureus	no	no	-
8	M	40	3200	13	EHI	2	Klebsiella sp	si	no	-
9	M	40	2975	11	SAM	3	E. coli	si	no	-
10	F	30	1060	34	SDR	3	S. aureus	no	si	HPIV-4

semanas y un peso promedio de 2016 ± 975 g. Seis de ellos fueron pretérmino y 4 a término. La causa principal de ingreso fue el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en 6 pacientes, encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) en 3, y síndrome de aspiración de meconio (SAM) en 1 paciente. La edad promedio al momento de inicio del tratamiento con GM-CSF fue de 14.6 ± 7.7 días. Todos los pacientes habían recibido tratamiento convencional con antibióticos, de los cuales los esquemas más utilizados fueron dicloxacilina con amikacina en 3 pacientes, vancomicina con cefotaxima en 3 pacientes, dicloxacilina con cefotaxima en 2 y dicloxacilina con ceftazidima en 2 pacientes. Treinta por ciento de los pacientes cursaron además con meningitis. Se realizó exanguinotransfusión por septicemia en 7 pacientes en 3 ocasiones y en 2 ocasiones en 3 pacientes. El germen causal más frecuente de septicemia fue el *Staphylococcus aureus* en 5 casos, seguido de *Klebsiella sp* en 3, *Enterobacter* y *Escherichia coli* en 1 paciente, respectivamente. Los 3 casos de meningitis fueron ocasionados por *Staphylococcus aureus*. Los criterios hematológicos en el momento del diagnóstico de septicemia se muestran en la tabla 3.

La respuesta clínica al tratamiento fue buena. Se observó rápida remisión del proceso infeccioso, con desaparición de la inestabilidad

Tabla 3.- CRITERIOS HEMATOLOGICOS DE SEPTICEMIA NEONATAL AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO

Criterio	Pacientes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leucocitos	1000	1700	3200	1800	2550	3650	4000	960	3900	1200
PMN	70	204	640	648	510	1460	400	153	585	528
Bandas	130	204	280	36	281	584	200	19	150	108
Metamielo citos	10	0	64	18	153	37	40	0	39	0
Mielocitos	20	0	32	0	153	72	40	0	78	24
Rel B/N	1.8	1	0.43	0.05	0.55	0.4	0.5	0.12	0.26	0.2
Rel I/M	2.2	1	0.58	0.08	1.15	0.47	0.7	0.12	0.46	0.2
GT/V	+	+	-	+	++	+	-	+	+	+
VSG	18	22	17	13	19	17	18	12	17	10
PCR	1.2	1.6	1.3	1.2	1.6	1.3	<0.5	1.7	1.3	1.0
Fibrinógeno	120	95	110	185	95	200	153	146	125	80
Plaquetas	45000	140000	60000	38000	25000	16000	116000	60000	10000	5000
Hemocultivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Puntuación	18	17	17	12	18	17	14	13	18	17

PMN= polimorfonucleares; Rel B/N= relación banda/neutrófilo; PCR= proteína C-reactiva .

Rel I/M= relación inmaduros/maduros; VSG= sedimentación globular.

GT/V= granulaciones tóxicas y/o vacuolizaciones en neutrófilos.

Valores x mm³

hemodinámica y corrección de las alteraciones metabólicas secundarias a ella, en las 48 hrs siguientes de iniciado el tratamiento con GM-CSF.

Los hallazgos hematológicos antes, durante y después de la administración de GM-CSF se muestran en la tabla 4. El análisis mediante ANOVA mostró diferencias altamente significativas durante el período de estudio en el número de leucocitos totales ($F = 46.04$; $p < 0.00000001$), polimorfonucleares ($F = 38.17$; $p < 0.00000001$), bandas totales ($F = 17.61$; $p = 0.0000016$), linfocitos ($F = 9.48$; $p = 0.00019$), monocitos ($F = 11.28$; $p = 0.000056$), eosinófilos ($F = 8.22$; $p = 0.00047$), y plaquetas ($F = 5.6$; $p = 0.0059$)

Tabla 4.- HALLAZGOS HEMATOLOGICOS EN PACIENTES TRATADOS CON GM-CSF.

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3	Día 10
Leucocitos totales	2396 + 385	3590 + 466	10200 + 1322	19860 + 2137
PMN	519 + 123	1378 + 264	6681 + 907	12720 + 1612
Bandas	199 + 51	373 + 92	875 + 122	1518 + 228
Metamielocitos	36 + 14	61 + 17	172 + 40	378 + 177
Mielocitos	41 + 15	50 + 16	95 + 32	161 + 68
Linfocitos	1267 + 249	1362 + 310	1741 + 282	3447 + 528
Monocitos	190 + 43	199 + 22	445 + 161	1069 + 246
Eosinófilos	118 + 36	128 + 38	242 + 78	590 + 153
Basófilos	15 + 8	28 + 7	36 + 18	90 + 41
Plaquetas x 1000	51.5 + 14.2	51.6 + 15.2	71.2 + 12.2	100.5 + 12.5

No hubo diferencias significativas en el número de metamielocitos, mielocitos ni basófilos.

Realizamos prueba t para diferencia de medias dentro del ANOVA para determinar el momento en que estas diferencias habian alcanzado mayor impacto en el número de leucocitos durante el tratamiento con GM-CSF (Figuras 1-6). Encontramos aumento significativo en el número de leucocitos totales entre el 2° y 3er día (3590 + 466 vs 10200 + 1322; p = 0.00079) y mayor entre el 3° y 10° día (10200 + 1322 vs 19880 + 2137; p = 0.0000073); hubo diferencias significativas en el número de polimorfonucleares entre el 2° y el 3er día (1378 + 264 vs 6681 + 907; p = 0.0002) que aumentó entre el 3° y 10° día (6681 + 907 vs 12720 + 1612; p = 0.00005). El aumento en el número de bandas fué menos marcado, pero significativo, entre el 2° y 3er día (373 + 92 vs 875 + 122; p = 0.015) y entre el 3° y 10° día (875 + 122 vs 1518 + 228; p = 0.0025). La diferencia en el número de metamielocitos en sangre periférica sólo alcanzó significancia estadística entre el 2° y el 3er día (61 + 17 vs 172 + 40; p = 0.011). Se observó un aumento significativo en el número de linfocitos, monocitos y eosinófilos entre el 3° y 10° (1741 + 282 vs 3447 + 528, p = 0.0018; 445 + 161 vs 1069 + 246, p = 0.0044 y, 242 + 78 vs 590 + 153, p = 0.0094, respectivamente). No hubo diferencias significativas

en el número de mielocitos, basófilos y plaquetas, en la comparación de los diferentes días estudiados.

En médula ósea se observó una diferencia significativa en los precursor granuloctícos y en la reserva medular de neutrófilos ($11.5\% \pm 1.58$ vs $19.4\% \pm 1.15$; $p= 0.000029$; y $14.1\% \pm 1.67$ vs $38.4\% \pm 2.43$; $p= 0.00001$, respectivamente) (Tabla 5).

Como efectos secundarios a la administración del GM-CSF observamos fiebre en un paciente en quien la infusión se administró durante una hora, efecto que desapareció al prolongar el tiempo de infusión a 2 horas. En otros 2 pacientes observamos disminución de la PaO₂ en 7 y 10 torr, respectivamente, pero sin que la oxemia disminuyera a niveles menores de 50 torr. Se encontró discreto aumento en las enzimas hepáticas TGO y TGP en 2 pacientes (<70 U/L), sin que este efecto pudiera atribuirse a la administración del GM-CSF, ya que ambos recibían nutrición parenteral total de más de 7 días de duración en el momento de la toma de la muestra. Ochenta por ciento de los pacientes sobrevivieron (n = 8), los dos fallecimientos, ocurrieron a consecuencia de complicaciones de hemorragia peri-intraventricular grado 4 y displasia broncopulmonar severa, sin que al momento del fallecimiento, hubiera desarrollo bacteriano en los hemocultivos. Estos fallecimientos ocurrieron a los 16 y 42 días posteriores al diagnóstico y tratamiento de la septicemia con GM-CSF, por lo que no se consideraron atribuibles al proceso infeccioso.

DISCUSION.

En seres humanos el GM-CSF ha sido utilizado en el manejo de la anemia aplásica, neutropenia congénita sintomática, neutropenia inducida por fármacos, trasplante de médula ósea y neutropenia asociada a infección por virus de la inmunodeficiencia humana (18, 40-44); aunque sus potenciales usos son múltiples, particularmente los relacionados al tratamiento de enfermedades infecciosas. Sus efectos relacionados a la cinética celular en médula ósea y los observados sobre la función del neutrófilo maduro, lo hacen un medicamento atractivo para el tratamiento de la septicemia neonatal grave asociada a la depleción de neutrófilos.

El GM-CSF afecta la cinética de los precursores granuloctícos en médula ósea, causando entrada rápida de las células en el ciclo celular y

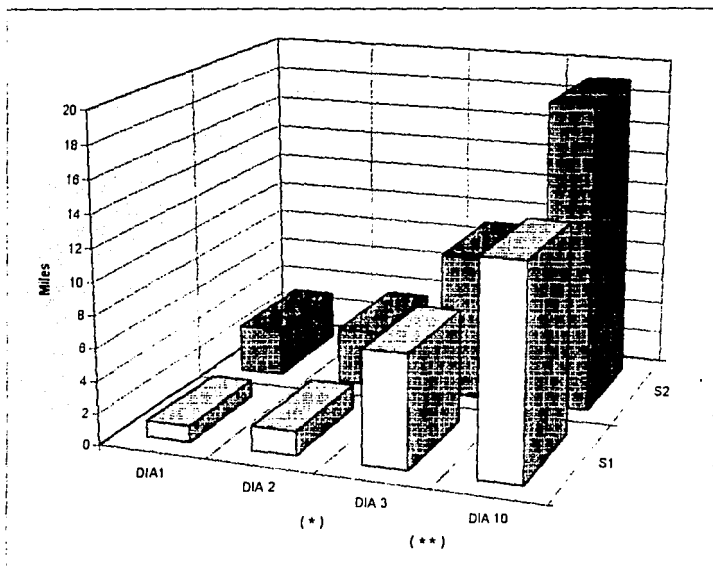
Tabla 5.- HALLAZGOS EN MEDULA OSEA EN PACIENTES TRATADOS CON GM-CSF.

No. de paciente	Precursores de	Precursores de	Reserva medular	Reserva medular
	neutrófilos %	neutrófilos %	de neutrófilos %	de neutrófilos %
	(inicial)	(final)	(inicial)	(final)
1	16	24	10	34
2	14	20	10	28
3	10	16	18	40
4	8	15	14	39
5	21	23	14	40
6	<5	15	10	55
7	14	18	20	45
8	12	24	<5	36
9	<5	17	18	37
10	10	22	22	30
Total	11.5 \pm 1.58	19.4 \pm 1.15	14.1 \pm 1.68	38.4 \pm 2.43

disminuyendo el tiempo del ciclo celular hasta en un tercio. La tasa y número de divisiones celulares, así como el compromiso de línea, dependen de la concentración de GM-CSF en un rango de 1 a 1000 pmol. Concentraciones mayores de GM-CSF dan por resultado un ciclo celular más corto y producen compromiso de las células progenitoras hacia la línea granulocítica (18).

Cairo, reporta aumento en la cuenta leucocitaria hacia la línea granulocítica a las 6, 24 y 48 horas después de la inyección intraperitoneal única de GM-CSF en ratas, con disminución hacia los valores normales a las 72 horas (12). En nuestro estudio, encontramos aumento significativo de los precursores granulocíticos (mieloblastos, promielocitos y mielocitos) y en la reserva medular de neutrófilos (PMN, bandas y metamielocitos) en médula ósea después del tratamiento con GM-CSF. El aumento en el número de neutrófilos en sangre periférica fue evidente a partir del 2° día de tratamiento, con incremento progresivo hasta el 10° día. Un hallazgo inesperado fue el aumento en el número de linfocitos entre el 3er y 10° día,

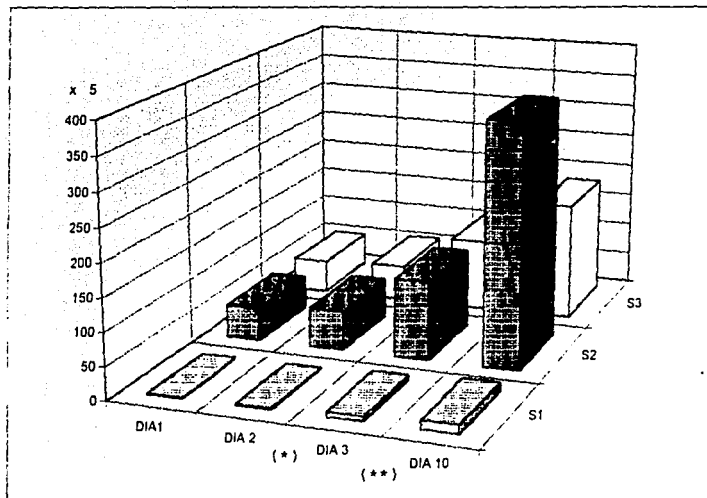
EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE GM-CSF SOBRE LEUCOCITOS TOTALES Y PMN



S1 = POLIMORFONUCLEARES (PMN).

S2 = LEUCOCITOS TOTALES.

Figura 1.- Aumento en los leucocitos totales y polimorfonucleares (PMN) con la administración de GM-CSF. (*) indica diferencias significativas entre los valores encontrados el 2º y 3er día en el número de leucocitos totales y PMN ($p=0.00079$ y $p=0.0002$, respectivamente) y (**) indica diferencias significativas entre el 3er y 10º día posterior a la administración del medicamento tanto para los leucocitos totales como para los PMN.

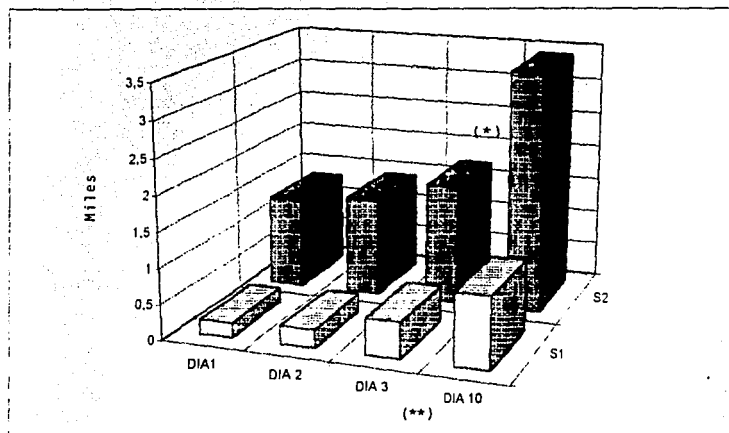


S 1 = MIELOCITOS.

S 2 = BANDAS.

S 3 = METAMIELOCITOS.

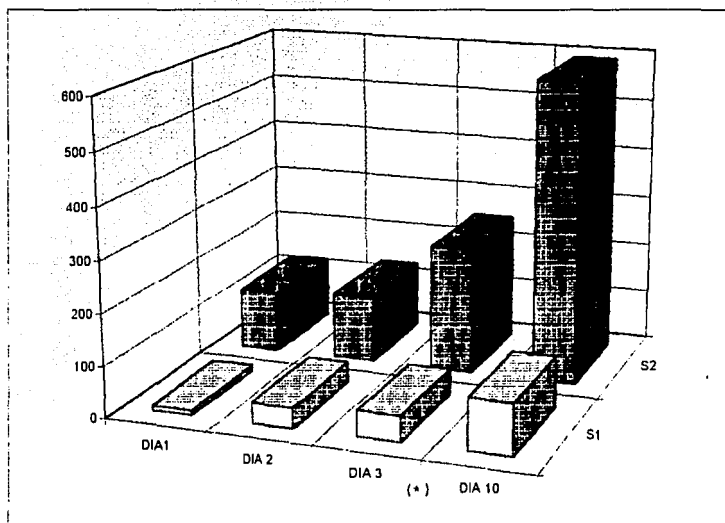
Figura 2.- Efecto de la administración del GM-CSF sobre las bandas, metamielocitos y mielocitos. (*) indica diferencias significativas entre el 2° y 3er día de tratamiento en el número de bandas ($p = 0.015$); (**) indica diferencias significativas entre el 3er y 10° día ($p = 0.0025$ y $p = 0.011$, respectivamente), para las bandas y los metamielocitos. No hubo diferencias significativas en el número de mielocitos durante todo el periodo de estudio.



S1 = MONOCITOS.

S2 = LINFOCITOS.

Figura 3.- Efecto de la administración de GM-CSF sobre el número de linfocitos y monocitos. (*) indica diferencias significativas entre el 3er y 10º día ($p=0.0018$) para los linfocitos y (**) indica diferencias significativas en el mismo periodo para los monocitos ($p=0.0044$).

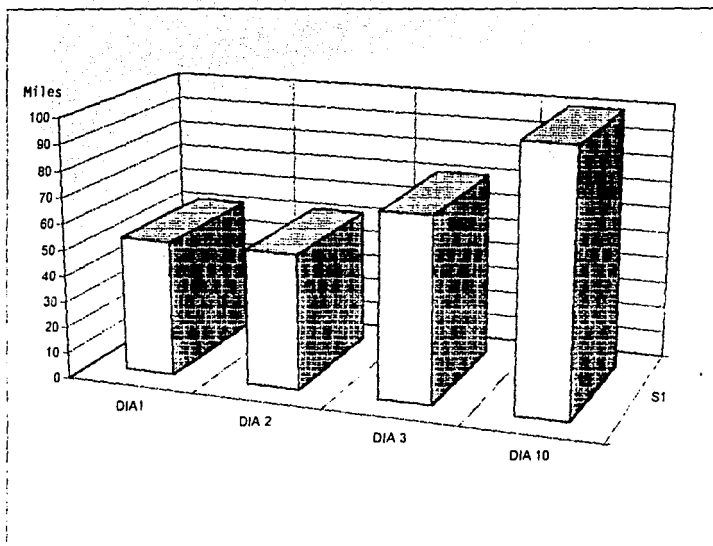


S 1 = BASOFILOS.

S 2 = EOSINOFILOS.

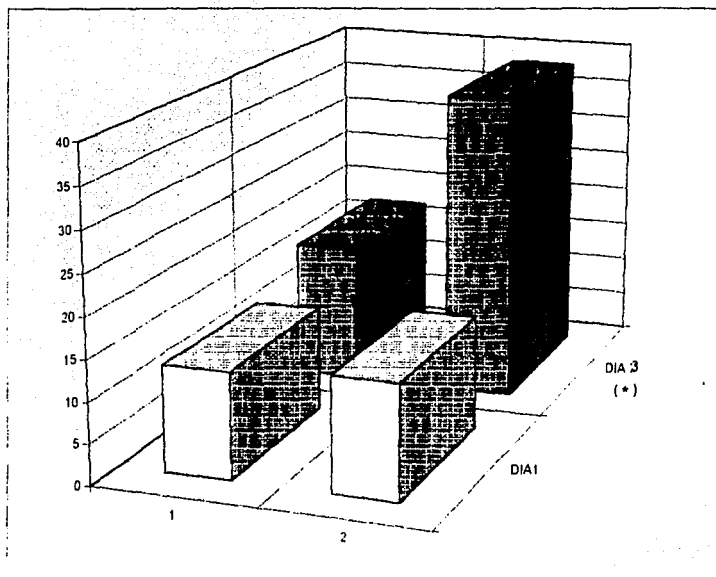
Figura 4.- Efecto de la administración de GM-CSF sobre el número de eosinófilos y basófilos. (*) indica diferencias significativas en el número de eosinófilos entre el 3er y 10° día ($p < 0.0094$). No hubo diferencias en el número de basófilos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



S1 = PLAQUETAS.

Figura 5.- Efecto de la administración de GM-CSF sobre el número de plaquetas. La gráfica muestra que no hubo diferencias significativas en el número de plaquetas en todo el periodo de estudio.



1 = PRECURSORES DE NEUTROFILOS (PN).

2 = RESERVA MEDULAR DE NEUTROFILOS (RMN).

Figura 6.- Efectos de la administración de GM-CSF sobre los precursores de neutrófilos (PN) y la reserva medular de neutrófilos (RMN). (*) indica diferencias significativas entre la muestra de médula ósea tomada el primer día y el control al 3er día de tratamiento ($p < 0.00001$).

efecto no descrito en relación a la administración de GM-CSF. Esto podríamos explicarlo de 2 maneras, primero, que el aumento en el número de linfocitos fuera tan sólo un reflejo del aumento en el número total de leucocitos, ya que el porcentaje relativo de los mismos se mantuvo constante a lo largo de todo el período de estudio; y segundo, que el GM-CSF influya, a través de complejas interrelaciones con otras citocinas, en la regulación y multiplicación de las líneas celulares de la estirpe linfoide. De hecho, la administración de GM-CSF aumenta las funciones accesorias de los monocitos con aumento de la expresión de superficie de los antígenos HLA-DR y del péptido codificador de interleucina 1 (IL-1) que contribuyen al incremento en la proliferación de linfocitos T dependiente de monocitos (23, 45).

La falta de respuesta temprana antes de las 48 horas, en la cuenta leucocitaria puede haber estado relacionada con la severidad del proceso infeccioso. Cannistra et al. (46) han observado que la incubación de neutrófilos con factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inhibe la expresión del receptor de GM-CSF, previniendo una excesiva activación de los neutrófilos en los sitios de inflamación. Es posible que las elevadas concentraciones de TNF- α durante la septicemia bacteriana grave (47) jueguen un papel similar sobre los precursores granulocíticos en médula ósea inhibiendo o retardando la multiplicación y diferenciación celular temprana con la administración del GM-CSF.

La mejoría clínica fue evidente en nuestros pacientes y el efecto sobre la mortalidad significativamente diferente de lo reportado previamente incluso en pacientes tratados con inmunoglobulinas (10, 11). El hecho de que nuestra población haya comprendido pacientes con septicemia bacteriana severa que no había respondido al manejo habitual con antibióticos y exsanguinotransfusiones, abre expectativas promisorias en el manejo de esta patología con GM-CSF. Hay varios factores que explican la mejoría clínica y hematológica observada. Anderson et al. y Shigeoka et al. (48, 49) evaluaron la función de los neutrófilos en recién nacidos sanos e infectados, encontrando una marcada disminución de la función leucocitaria en los pacientes sépticos. Estas alteraciones han sido ampliamente corroboradas por otros (2, 6). Además de estas alteraciones funcionales, la capacidad de proliferación de las células troncomedulares es limitada, y predispone al neonato a depleción de neutrófilos en situaciones de mayor demanda (4, 5).

La comparación de estas alteraciones con los efectos descritos del GM-CSF nos permiten visualizar las ventajas del tratamiento de la septicemia bacteriana severa acompañada de neutropenia con este medicamento.

El aislamiento bacteriano en hemocultivo no fue significativamente diferente a lo reportado por otros hospitales similares en México (50), si bien encontramos predominio de gram-positivos en los pacientes estudiados.

Roberts, en 1991 (51) reportó los efectos del tratamiento de un prematuro con G-CSF, pero el uso fue como preventivo de septicemia en un paciente con múltiples episodios de sepsis, con buena respuesta, sin embargo no fueron evaluados los efectos del medicamento durante la infección activa ni los hallazgos en médula ósea. Se ha sugerido que la utilización de G-CSF puede ser preferible al GM-CSF en la septicemia neonatal, debido a los menores efectos adversos del primero (52), sin embargo, nuestro estudio no apoya tal selección basada en la presencia de efectos secundarios, ya que los observados son similares a los reportados para el G-CSF (53).

Los efectos secundarios descritos son, en su mayoría, leves, como dolor óseo, letargia, fiebre, eritema facial y discreto aumento de peso el día de administración. Se ha descrito un síndrome de la "la primera dosis" en los 15-30 minutos siguientes a la administración del GM-CSF, consistente en hipotensión e hipoxemia (39), se ha sugerido que el origen de esta disminución sea la marginación inicial de los neutrófilos a nivel de los capilares pulmonares relacionada con el decremento inicial en las cifras de neutrófilos circulantes. En nuestros pacientes encontramos disminución de la PaO₂ en dos de ellos, aunque esta fue leve y no comprometió la saturación arterial de oxígeno normal en ningún caso. Solo observamos fiebre en un paciente, en quien la infusión se administró en 1 hora el primer día de tratamiento, efecto que desapareció al prolongar el tiempo de infusión a 2 horas en los días subsiguientes. Otros efectos colaterales son difíciles de evaluar en el recién nacido pero creemos que la administración en el breve lapso de 3 días contribuyó a los escasos efectos adversos observados.

hasta donde sabemos, este es el primer estudio clínico sobre los efectos del GM-CSF en el tratamiento de la septicemia neonatal severa, en neonatos neutropénicos. La respuesta clínica satisfactoria, la disminución significativa en la mortalidad y los escasos efectos adversos observados, justifican la evaluación del tratamiento de la septicemia neonatal con GM-CSF en un número mayor de pacientes neutropénicos en protocolos controla

lados doble ciego, para situar este manejo en su lugar definitivo dentro del esquema de tratamiento y evaluar objetivamente la utilidad de este medicamento a futuro.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Klein JO, Moray SM. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and the newborn. Philadelphia: Saunders, 1990: 601-56.
- 2.- Cairo MS. Neonatal neutrophil host defense. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis. AJDC 1989; 143: 40-6.
- 3.- Christensen RD, Hill HR, Rothstein G. Granulocytic stem cell (CFUc) proliferation in experimental group B streptococcal sepsis. Pediatr Res 1983; 17: 278-80.
- 4.- Christensen RD, Rothstein G. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. J Pediatr 1980; 96: 316-8.
- 5.- Dore M, Slauson DO, Neilsen NR. Membrane NADPH oxidase activity and cell size in bovine neonatal and adult neutrophils. Pediatr Res 1990; 28: 327-31.
- 6.- Hill HR. Biochemical, structural and functional abnormalities of polymorphonuclear leucocytes in the neonate. Pediatr Res 1987; 22: 375-82.
- 7.- Christensen RD, Rothstein G, Anstall HB. Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia and depletion of mature marrow neutrophils. Pediatrics 1982; 70: 1-6.
- 8.- Laurenti F, Ferro R, Isacchi G. Polymorphonuclear leukocyte transfusion for the treatment of sepsis in the newborn infant. J Pediatr 1981; 98: 118-23.
- 9.- Cairo MS, Worcester C, Rucker R. Role of circulating complement and polymorphonuclear leukocyte transfusion in treatment and outcome in critically ill neonates with sepsis. J Pediatr 1987; 110: 935-41.
- 10.- Haque KN, Zaidi MH. IgM-enriched intravenous immunoglobulin therapy in neonatal sepsis. AJDC 1988; 142: 1293-1296.
- 11.- Kliegman RM, Clapp DW, Berger M. Targeted immunoglobulin therapy for the prevention of neonatal infections. Rev Infect Dis 1990; Suppl 4: 443-55.

- 12.- Cairo MS. Review of G-CSF and GM-CSF. Effects on neonatal neutrophils kinetics. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1989; 11:238-44.
13. Grooman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N Eng J Med* 1989; 321: 1449-59.
- 14.- Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res* 1988; 48 Suppl 1: 624-37.
- 15.- Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236: 1229-37.
- 16.- Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* 1985; 229: 16-22.
- 17.- Cantrell MA, Anderson D, Cerreti DP, Price V, McKereghan K, et al. Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6250-4.
- 18.- Furman WL, Crist WM. Potential uses of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 388-99.
- 19.- Cairo MS, Van de Ven C, Toy C, Suen Y, Mauss D, Sender L. GM-CSF primes and modulates neonatal PMN motility: up-regulation of C3b1 (Mo 1) expression with alteration in PMN adherence and aggregation. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 249-57.
- 20.- Khwaja A, Carver JE, Lynch DC. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte CSF and tumor necrosis factor in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 1992; 79: 745-53.
- 21.- Cairo MS, Van de Ven C, Toy C, Mauss D, Sender L. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes neonatal granulocytes for enhanced oxidative metabolism and chemotaxis. *Pediatr Res* 1989; 26: 395-9.
- 22.- Mc Niece I, Andrews R, Stewart M, Clark S, Boone T, Quesenberry P. Action of interleukin 3, G-CSF, and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF. *Blood* 1989; 74: 110-4.
- 23.- Smith PD, Lamerson CL, Wong HL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates human monocyte accessory cell function. *J Immunol* 1990; 144: 3829-34.

24.- Metcalf D. The colony-stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. *Cancer* 1990; 65: 2185-95.

25.- Tanaka T, Okamura S, Okada K, Suga A, Shimono N, Ohhara N, et al. Protective effect of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against *Pseudomonas aeruginosa* infection in leukopenic mice. *Infect Immun* 1989; 57: 1792-99.

26.- Frenck RW, Sarman G, Harper TE, Buescher ES. The ability of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to protect neonatal rats from septic death due to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1990; 162: 109-14.

27.- Wheeler JG, Givner LB. Therapeutic use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonatal rats with type III group B streptococcal sepsis. *J Infect Dis* 1992; 165: 933-41.

28.- Matsumoto M, Tamura M, Matsubara S, Matsuno T, Ono M, Yokota T. Mechanism of protective effect of recombinant human granulocyte stimulating factor (rG-CSF) on *Pseudomonas* infection. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 461-74

29.- Grant SM, Heel RC. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in the management of myelosuppression. *Drugs* 1992; 43: 516-60.

30.- Rodwell RL, Leslie AL, Tudehoe DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr* 1988; 112: 761-7

31.- Philip AGS, Hewitt JR. Early diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics* 1980; 65: 1036-41.

32.- Manroe BL, Weinberg L, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95: 89-98.

33.- Gregory J, Hey E. Blood neutrophil response to bacterial infection in the first month of life. *Arch Dis Child* 1972; 47: 747-53.

34.- Akenzua GI, Hui YT, Milner R, Zipursky A. Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. *Pediatrics* 1974; 54: 38-42.

35.- Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. The leucocytes left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J Pediatr* 1981; 98: 101-5.

- 36.- Manroe BL, Rosenfield CR, Weinberg AG, Browne R. The differential leukocyte count in the assesment and outcome of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *J Pediatr* 1977; 91: 632-7.
- 37.- Liu CH, Lehan C, Speer ME, Fernbach DJ, Rudolph AJ. Degenerative changes in neutrophils: an indicator of bacterial infection. *Pediatrics* 1984; 74: 823-7.
- 38.- Burgess AW, Begley CG, Johnson GR. Purification and properties of bacterially synthesized human GM-CSF. *Blood* 1987; 69: 43-51.
- 39.- Cebon J, Lieschke GJ, Bury GW, Morstyn G. The dissociation of GM-CSF efficacy from toxicity according to route of administration: a pharmacodynamic study. *Br J Hematol* 1992; 80: 144-50.
- 40.- Vadhan-Raj S, Jeha SS, Buescher S, LeMaistre A, Yee G, Lloreta J. Stimulation of myelopoiesis in a patient with congenital neutropenia: biology and nature of response to recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 75: 858-64.
- 41.- Welte K, Zeidler C, Reiter A, Müller W, Odenwald E, Souza L. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood* 1990; 75: 1056-63.
- 42.- Gabilove JL. Introduction and overview of hematopoietic growth factors. *Semin Hematol* 1989; 26 Suppl 2: 1-4.
- 43.- Morstyn G, Lieschke GJ, Sheridan W, Layton J, Cebon J, Fox RM. Clinical experience with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Semin Hematol* 1989; 26 Suppl 2: 9-13.
- 44.- Glaspy JA, Golde DW. Clinical applications of the myeloid growth factors. *Semin Hematol* 1989; 26 Suppl 2: 14-7.
- 45.- Smith PD, Janoff EN, Wahl SM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augmentation of human monocyte effector and accessory cell function. In: Van Furth R, editor. *Hemopoietic growth factors and mononuclear phagocytes*. Basel:Karger, 1993: 79-89.
- 46.- Cannistra SA, Groshek P, Garlick R, Miller J, Griffin JD. Regulation of surface expression of the GM-CSF receptor in normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 93-7.

47.- De Brant ESJM, Martens A, Van Raan J, Samson G, Fetter WPF, et al. Tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and interleukin-6 plasma level in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1993; 33: 380-3.

48.- Anderson DC, Pickering LK, Feigin RD. Leukocyte function in normal and infected neonates. *J Pediatr* 1974; 85: 420-5.

49.- Shigeoka AO, Santos JI, Hill HR. Functional analysis of neutrophil granulocytes from healthy, infected and stressed neonates. *J Pediatr* 1979; 95: 454-60.

50.- Martínez-Limón AJ, Mancilla-Ramírez J, Santos-Preciado JI. Sepsis neonatal. Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1988; 46: 77-8.

51.- Roberts RL, Szeic CM, Scates SM, Boyd MT, Soderstrom KM, Davis MW. Neutropenia in extremely premature infant treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *AJDC* 1991; 145: 808-12.

52.- Baillie KEM, Irvine AE, Bridges JM, McClure BC. G-CSF and GM-CSF in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res* 1994; 35: 164-168.

53.- Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor: its basic aspects and clinical applications. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 400-13.