

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

CRISTIANE RAUPP NUNES

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO:
USO DE AZITROMICINA NA PREVENÇÃO DE DANO PULMONAR EM RECÉM-
NASCIDOS PRÉ-TERMO SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Porto Alegre

2019

CRISTIANE RAUPP NUNES

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO:
USO DE AZITROMICINA NA PREVENÇÃO DE DANO PULMONAR EM RECÉM-
NASCIDOS PRÉ-TERMO SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

A apresentação desta tese é requisito parcial para título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Soibermann Procianoy

Pesquisador Colaborador: Prof. Dra. Andrea Lúcia Corso

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Cristiane Raupp
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO: USO DE AZITROMICINA NA
PREVENÇÃO DE DANO PULMONAR EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO
SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA / Cristiane Raupp
Nunes. -- 2019.

121 f.

Orientador: Rita de Cássia Silveira.

Coorientador: Renato Soibermann Procianoy.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Recém-nascido. . 2. Azitromicina. . 3.
Prematuro. . 4. Displasia broncopulmonar. . 5.
Interleucina. . I. Silveira, Rita de Cássia, orient.
II. Procianoy, Renato Soibermann, coorient. III.
Título.

CRISTIANE RAUPP NUNES

ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO:

Uso de azitromicina na prevenção de dano pulmonar em recém-nascidos pré-termo submetidos à ventilação mecânica

A apresentação desta tese é requisito parcial para título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Porto Alegre, 16 de dezembro de 2019

Banca Examinadora:

Prof Dr Paulo Roberto Antonacci Carvalho-
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Dra Luciana Friedrich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra Claudia Regina Hentges
Hospital Materno Infantil Presidente Vargas

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus,
pois toda a glória e honra são dEle.
A todos os recém-nascidos prematuros
e às suas mães, por aceitarem participar dessa pesquisa.
À minha família, pelo amor e apoio constante, em especial
ao meu filho João e a minha mãe Schirlei,
que dão sentido maior à minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos, transmitindo-me a segurança e a confiança necessárias para que pudesse seguir em frente e atingir meus objetivos.

Agradeço também à todas as pessoas que Deus, com sua infinita sabedoria e constante amor por mim, colocou na minha vida:

À Profressora e Dra. Rita de Cássia Silveira pela acolhida, orientação e dedicação, especialmente na reta final deste processo – obrigada por ter acreditado e investido no meu potencial.

Ao Professor e Dr. Renato Procianoy, pelos comentários pertinentes e experientes, sempre.

À Professoara e Dra Andrea Corso pelo carinho, incentivo constante e pela parceria desde o início desta trajetória.

Aos meus pais, que me deram a vida e especialmente minha mãe Schirlei pelo companheirismo. Minhas irmãs Luciane, Viviane, sobrinhos e demais, familiares pelo amor, apoio incondicional e orações, minha eterna gratidão.

Às irmãs Viviane e Marilene por me mostrar que sem Deus não somos nada, pelas madrugadas de oração, por nunca me deixar desistir e me ensinar a confiar.

Às crianças que participaram dessa pesquisa, essenciais para a realização do meu doutorado, desejo que cresçam com saúde e sejam felizes.

À equipe de funcionários do UTI neonatal HCPA, pela colaboração durante a realização da coleta de dados e auxiliando com os procedimentos.

Ao Dr Hugo Bock pelas valiosas contribuições na análise das citocinas e Ureaplasma.

À Vania Hirakata, pela assessoria estatística.

Aos funcionários do PPGSCA e Professora e Dra Elsa Giugliani pela oportunidade e confiança.

Ao FIPE e ao PROPG da UFRGS pelo apoio financiamento da pesquisa.

E ao meu amado filho João, melhor presente que ganhei na vida, muito obrigada pela paciência, agora podemos brincar!!!

RESUMO

Introdução: Os antibióticos macrolídeos têm propriedades anti-inflamatórias e pressupõe-se que sejam capazes de inibir inflamação em múltiplos pontos na cascata inflamatória. Macrolídeos têm sido utilizados para o tratamento de infecção por *Ureaplasma* spp., e com a intenção de prevenir a displasia broncopulmonar em prematuros, sendo a Azitromicina a droga de melhor escolha. **Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório da azitromicina na prevenção da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (VM) em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso através das dosagens das citocinas pré e pós uso da medicação. Secundariamente, Avaliar a associação entre a presença do *Ureaplasma* no sangue dos recém-nascidos pré-termo e a resposta ao uso de azitromicina. **Métodos:** Ensaio clínico randomizado duplo-cego, placebo controlado, incluindo recém-nascidos (RNs) pré-termos que foram à ventilação mecânica invasiva nas primeiras 72 horas de vida. Os pacientes foram randomizados para azitromicina endovenosa (na dose de 10/mg/kg/dia por 5 dias) ou placebo (SF 0,9%) dentro das primeiras 12 horas do início da VM. Foram coletadas duas amostras de sangue (pré e após intervenção) para dosagens de interleucinas (ILs) e PCR para *Ureaplasma*. Os pacientes foram acompanhados durante a internação hospitalar para os desfechos óbito e DBP. (Identificador NCT03485703). Foram excluídos da amostra pacientes com malformações congênitas maiores ou síndromes cromossômicas, STORCH reagentes e filhos de mães portadoras do vírus HIV. **Resultados:** 80 prematuros randomizados, após 3 óbitos foram analisados 38 no grupo azitromicina 39 no grupo placebo. Peso e idade gestacional foram semelhantes. Níveis séricos de IL2 pré e pós azitromicina foram $1,67 \pm 0,17$ pg/ml e $1,64 \pm 0,14$ pg/ml ($p=0,002$); IL-6 pré $2,41 \pm 0,73$ pg/ml e pós $2,06 \pm 0,41$ pg/ml ($p=0,001$); e IL8 pré $3,24 \pm 0,44$ pg/ml e pós $3,03 \pm 0,34$ ($p=0,003$). No grupo placebo níveis de IL- β ($1,29 \pm 0,39$ pg/ml e $1,44 \pm 0,23$ pg/ml, 0,007) e IL-8 ($2,90 \pm 0,61$ pg/ml e $3,16 \pm 0,36$ pg /ml) aumentaram significativamente após 5 dias de administração. Displasia broncopulmonar (DBP) presente em 43,8% (14) do grupo azitromicina e 75,9% (22) placebo ($p = 0,018$). Houve redução na incidência do desfecho DBP/morte nos prematuros que receberam azitromicina (52,4% *versus* 84,6% no grupo placebo; $p=0.003$). **Conclusão:** Azitromicina apresenta efeitos anti-inflamatórios com redução de citocinas após 5 dias de uso e reduz desfecho DBP/morte em prematuros ventilados.

Descritores: Recém-nascido. Prematuro. Displasia broncopulmonar. Interleucina. Azitromicina.

ABSTRACT

Introduction: Macrolide antibiotics have anti-inflammatory properties and are assumed to be capable of inhibiting inflammation at multiple points in the inflammatory cascade. Macrolides have been used to treat *Ureaplasma* spp. infections with the intention of preventing BPD, being Azithromycin the drug of choice. **Objectives:** The evaluation of the anti-inflammatory effect of azithromycin on the prevention of mechanical ventilation-induced lung injury (MV) in very low birth weight preterm infants through the dosing of cytokine pre- and post-use of medication. In addition, this study evaluated the association between the presence of *Ureaplasma* in the blood of preterm newborns and the response to azithromycin use. **Methods:** Double-blind, placebo-controlled, randomized controlled trial including preterm infants who underwent invasive mechanical ventilation within the first 72 hours of life. Patients were randomized to receive intravenous azithromycin (at a dose of 10 / mg / kg / day for 5 days) or placebo (saline solution 0.9%) within the first 12 hours of MV onset. Two blood samples were collected (pre- and post-intervention) for interleukin (ILs) dosage and *Ureaplasma* PCR. Patients were followed during hospitalization for outcomes of death and BPD. (Identifier NCT03485703). Patients with major congenital malformations, chromosomal syndromes, positive for STORCH, and who had mothers with HIV were excluded from the sample. **Results:** Eighty randomized preterm infants were analyzed. After three deaths, they were separated into the group which received the medicine (38 subjects) and into the placebo group (39 subjects). Weight and gestational age were similar. Serum levels for IL2 before and after azithromycin were 1.67 ± 0.17 pg / ml and 1.64 ± 0.14 pg / ml ($p = 0.002$), respectively; for IL-6 pre was 2.41 ± 0.73 pg / ml and post 2.06 ± 0.41 pg / ml ($p = 0.001$); and for IL8 pre, 3.24 ± 0.44 pg / ml and post 3.03 ± 0.34 ($p = 0.003$). In the placebo group levels of IL- β (1.29 ± 0.39 pg / ml and 1.44 ± 0.23 pg / ml, 0.007) and IL-8 (2.90 ± 0.61 pg / ml and 3.16 ± 0.36 pg / ml) increased significantly after 5 days of administration. Bronchopulmonary dysplasia was present in 43.8% (14) of the azithromycin group and 75.9% (22) in the placebo ($p = 0.018$). There was a reduction in the incidence of BPD / death in preterm infants receiving azithromycin (52.4% versus 84.6% in the placebo group; $p = 0.003$). **Conclusion:** Azithromycin has anti-inflammatory effects and reduces cytokine levels after 5 days of use, thus, reducing BPD / death outcome in ventilated preterm infants.

Key words: newborn; preterm; bronchopulmonar dysplasia; interleucins, azithromycin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1-	Estágios do desenvolvimento pulmonar.....	20
Figura 2 -	Fluxograma do estudo.....	51
Quadro 1-	Manual de Instruções SACACE Biotechnologies	56

ARTIGO 1

Figura 1-	Fluxograma de seleção de artigos para revisão integrativa de literatura, elaborado a partir do Guideline Prima, Galvão, 2015 ⁴¹	81
Quadro 1 -	Principais características dos estudos selecionados para revisão integrativa.....	82

ARTIGO 2

Figura 1-	Fluxograma <i>CONSORT</i> do progresso das fases do ensaio randomizado dos grupos azitromicina e placebo	103
-----------	--	-----

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 -	Critérios diagnósticos para Displasia Broncopulmonar	31
------------	--	----

ARTIGO 2

Table 1-	Characteristics of neonates included in the study (n = 80).....	104
Table 2 -	Plasma interleukin levels before and after azithromycin or placebo.....	104
Table 3 -	Neonatal characteristics and morbidities in the azithromycin and placebo groups.....	105
Table 4 -	Outcomes of Ureaplasma-positive patients (n = 28)	106
Table 5 -	Outcomes of the total sample (n = 80).....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ar ambiente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATB	antibiótico
CID	código internacional de doenças
CMIV	centro de mistura intravenosas
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CRF	capacidade residual funcional
DBP	displasia bronbopulmonar
Dpoc	doença pulmonar obstritiva crônica
EHP	estenose hipertrófica do piloro
FiO2	fração inspirada de oxigênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IG	idade gestacional
IGC	idade gestacional corrigida
IMV	<i>intermittent mandatory ventilation</i>
nCpap	<i>continuous positive airway pressure</i>
NICHD	National Institute of Child Health and Human Development
NIH	National Institute of Health
PCA	pesistência canal arterial
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP	<i>positive inspiratory pressure</i>
RN	recém-nascidos
RNMBP	recém-nascido de muito baixo peso
SDR	síndrome do desconforto respiratório
SIM	Sistema de Informação sobre Motaridade
SIMV	<i>synchronized intermittent mandatory ventilation</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Up	<i>Ureaplasma parvum</i>
UTIN	unidade de terapia intensiva neonatal
Uu	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VAF	ventilação de alta frequência
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

VILI	<i>ventilator induce lung injury</i>
VM	ventilação mecânica
VPP	ventilação por pressão positiva
HIC	hemorragia intracraniana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 O PULMÃO DO PREMATURO.....	19
2.1.1 Período embrionário inicial (3 a 6 semanas).....	19
2.1.2 Período pseudoglandular (6 a 17 semanas).....	20
2.1.3 Período canalicular (16 a 27 semanas).....	21
2.1.4 Período sacular (27 a 36 semanas).....	21
2.1.5 Período alveolar (36 semanas a 2 anos)	21
2.2 VENTILAÇÃO MECÂNICA	23
2.3 DISPLASIA BRONCOPULMONAR	27
2.3.1 Curso clínico da DBP	28
2.3.2 A Evolução na definição da DBP.....	30
2.3.3 Alterações no quadro patológico da DBP	31
2.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	33
2.5 UREAPLASMA UREALYTICUM E PARVUM	36
2.5.1 Associação com displasia broncopulmonar	38
2.6 AZITROMICINA NA PREVENÇÃO DA LESÃO PULMONAR.....	41
3 JUSTIFICATIVA	46
4 HIPÓTESE	47
5 OBJETIVOS	48
5.1 OBJETIVO GERAL	48
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
6 METODOLOGIA	49
6.1 DESENHO DO ESTUDO	49
6.2 POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	49
6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	49
6.4 TAMANHO DA AMOSTRA.....	49
6.5 LOGÍSTICA	49
6.6 DOSAGEM DAS INTERLEUCINAS.....	51
6.7 EXTRAÇÃO DO DNA E PCR TEMPO REAL.....	54
6.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO	56
6.8.1 Variáveis dependentes.....	56

6.8.2 Variáveis independentes	56
6.9 RANDOMIZAÇÃO	57
6.10 CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	57
6.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	58
REFERÊNCIAS	60
7 RESULTADOS	77
3. DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA, FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS).....	77
7.2 ARTIGO 2	99
ABSTRACT	99
8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
APENDICE A - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS PROJETO 110639.....	115
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	117
ANEXO B – TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS INSTITUCIONAIS	118
ANEXO C - TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITE DE ÉTICA HCPA.....	119
ANEXO D - MAPA DE REAÇÃO MULTIPLEX. (IL)	120

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, aproximadamente 15 milhões de bebês nascem prematuros em todo o mundo (antes das 37 semanas completas de gestação), colocando a taxa global de nascimentos prematuros em 11%. Cerca de 85% desses nascimentos são prematuros moderados (32 a 33 semanas) a tardios (34 a 36 semanas), 10% são muito prematuros extremos (28 a 31 semanas) e 5% são bebês extremamente prematuros (<28 semanas) (TORCHIN *et al.*, 2015).

No Brasil, as taxas de prematuridade ficam em torno de 10%. Em 2017, 317.862 bebês nasceram prematuros (10,87% dos nascimentos), o dobro quando comparado ao índice de alguns países europeus. Destes, 44.514 nasceram antes de completar 32 semanas de idade gestacional (IG) (DATASUS, [201-]; DE SOUZA *et al.*, 2019), apontando a prematuridade como um grave problema de saúde pública no Brasil. Dados do estudo “*Born too Soon*” 8 (BLENCOWE *et al.*, 2019) revelaram que em países de renda média, o percentual de prematuridade é de 9,4% e, nos países com baixa renda de 11,8%, colocando o Brasil neste último patamar.

Conforme o relatório da Fundação das Nações Unidas para Infância (UNICEF) em coalisão com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo todo em 2017, por volta de 2,5 milhões de recém-nascidos morreram nos primeiros 28 dias de vida, a maioria por causas evitáveis. Cerca de 80% dessas crianças tinham baixo peso ao nascer e, em torno de 65%, eram prematuras (WORLD, 2019). Segundo o Ministério da Saúde, através de dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do TABNET/DATASUS, a prematuridade é a principal causa de morte no primeiro mês de vida. O Brasil computou 1565 óbitos ligados à prematuridade em 2017 (categoria CID 10 P07, faixa etária 1: 0 a 6 dias, 7 a 27 dias). A região nordeste apresentou 684 (43% dos casos), seguida pela região sudeste com 435 óbitos (27%). Na sequência aparece a região norte com 215 mortes (13,7%), a região sul com 145 (9,2%) e por último a região centro-oeste com 86 óbitos (5,4%) (DATASUS, [2019]).

A sobrevivência dos recém-nascidos (RNs) prematuros tem melhorado nos últimos anos devido a inovações no cuidado neonatal, incluindo suporte ventilatório (SELESTRIN *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2008). A maioria desses RNs responderá ao suporte respiratório inicial, contudo neonatos doentes com forma grave de doença

respiratória ou sepse grave poderão evoluir para falência respiratória progressiva exigindo uso de ventilação mecânica invasiva (AGUIAR *et al.*, 2010).

A introdução da ventilação mecânica invasiva, como adjuvante no tratamento da insuficiência respiratória aguda, resultou em taxas de sobrevida significativamente expressivas. Entretanto, evidências clínicas e experimentais demonstraram que a ventilação mecânica (VM) também pode induzir lesão pulmonar e aumentar a morbidade e a mortalidade dos pacientes com insuficiência respiratória (CARVALHO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, têm aumentado o número de evidências de que a VM pode causar lesão pulmonar através da liberação de células inflamatórias e mediadores solúveis. Estes estudos sugerem que o epitélio alveolar é uma fonte importante de liberação de citocinas. Sugerem também que estratégias ventilatórias podem aumentar as citocinas sistêmicas e levar à disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (BOHRER; SILVEIRA; NETO; PROCIANOY, 2009).

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas de muito baixo peso molecular, com ações semelhantes aos hormônios. Elas contribuem para a patogênese de várias doenças através da habilidade de induzir outros mediadores inflamatórios, causar sequestro e acúmulo de neutrófilos, e aumentar a permeabilidade vascular (TREMBLAY *et al.*, 2002). As alterações nas citocinas pro-inflamatórias foram implicadas na patogênese de quase todos os processos de doença no prematuro, principalmente, modulando danos no cérebro, nos intestinos e nos pulmões - dados recentes demonstraram o aumento dos níveis de citocinas na sepse e em formas moderadas a graves de displasia broncopulmonar (DBP) (GRONECK *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que a intubação e a ventilação com pressão positiva (VPP) em neonatos pré-termo são os maiores preditores de DBP subsequente (BERNER *et al.*, 1998). Outros estudos mostram que pressões e volumes correntes elevados nas vias aéreas aumentam a produção de citocinas pro-inflamatórias nos pulmões em modelos animais e em aspirados de traqueia de neonatos humanos (FRANK; PARSONS; MATTHAY, 2006; LISTA *et al.*, 2006; ALLISON *et al.*, 2008). Existem controvérsias a respeito do exato momento de liberação dessas citocinas na resposta inflamatória pulmonar pois os mecanismos precisos de dano pulmonar pela ventilação são complexos.

Carvalho, Silveira e Procianoy (2013) e Bhorer, Silveira, Neto e Procianoy (2009) demonstraram que a VM, como um estímulo único, e mesmo por curto período,

induziu a liberação plasmática de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-6, interleucina- 8 e TNF- α) em recém-nascidos a termo e em prematuros, imediatamente antes e duas horas após VM, sugerindo que a cascata de eventos que leva à inflamação pulmonar inicia dentro de duas horas após intubação. Nos pacientes desse estudo, a interleucina -10 reduziu de modo significativo após as 2 horas de ventilação - dado o seu papel de mediador anti-inflamatório, pode-se inferir que contribuiu para o dano pulmonar.

Macrolídeos são antibióticos bacteriostáticos, podendo apresentar efeitos bactericidas. O primeiro macrolídeo (eritromicina) tem atividade antibacteriana contra a maioria dos cocos gram-positivos e alguns anaeróbios e bacilos gram-positivos. Os bacilos gram-negativos são resistentes à eritromicina (AGHAI *et al.*, 2007). O aparecimento dos novos macrolídeos no mercado, como a claritromicina e a azitromicina, têm apresentado novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções que, em geral, são resistentes a outros antibióticos. As características farmacocinéticas dos macrolídeos, como o seu elevado volume de distribuição e acumulação intracelular, levam a uma alta concentração tecidual, que no trato respiratório pode ser 50 a 100 vezes maior do que no plasma (AGHAI *et al.*, 2007).

Além disso, macrolídeos têm atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, como demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando modelos humanos e animais em diferentes situações clínicas. Estas outras propriedades conferem a esta classe de antibióticos um papel que difere do seu clássico uso como antibiótico e abre novas possibilidades terapêuticas (AGHAI *et al.*, 2007; BALLARD; ANSTEAD; SHOOK, 2007).

A corioamnionite materna está associada com desenvolvimento da displasia broncopulmonar, sendo o *Ureaplasma urealyticum* (*Uu*) um dos principais agentes associados. O papel do *Uu* antenatal e pós-natal ainda precisa ser determinado, mas há evidências de que a infecção e a colonização por este agente podem levar à ativação da resposta pró-inflamatória pulmonar (SEVILLA-SANCHEZ; SOY-MUNER; SOLER-PORCAR, 2010). A azitromicina como antibiótico e agente anti-inflamatório pode diminuir a inflamação pulmonar suprimindo a produção de citocinas induzidas pelo *ureaplasma* e assim promover benefícios em longo prazo ao pulmão do recém-nascido.

Imunomodulação refere-se à atividade de suprimir a ativação prolongada dos sistemas imune e anti-inflamatório, o que pode levar a efeitos adversos no organismo,

mas sem afetar a resposta imune inata como é visto com o uso de agentes imunossupressores. Tem sido relatado que os macrolídeos suprimem a produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bloqueiam a ativação de fatores transcrição nuclear, mobilizam e aceleram a apoptose dos neutrófilos e melhoram o *clearance* mucociliar (SHINKAI; PARK; RUBIN, 2005).

Nos últimos anos, vários estudos utilizando a azitromicina no tratamento da fibrose cística demonstraram que este macrolídeo melhorou significativamente a função pulmonar e diminuiu as exacerbações respiratórias quando comparado ao placebo. Macrolídeos são agora medicamentos de primeira linha no tratamento da panbronquillite difusa e recomendados para pacientes com fibrose cística (EQUI; BALFOUR-LYNN; BUSH; ROSENTHAL, 2002; SAIMAN *et al.*, 2003; CLEMENT *et al.*, 2006; FLORESCU; MURPHY; KALIL, 2009; KABRA *et al.*, 2010; SOUTHERN *et al.*, 2012; SILVA FILHO *et al.*, 2013; MOGAYZEL JÚNIOR *et al.*, 2014). Também tem sido avaliado na terapia da bronquite crônica, na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (UZUN *et al.*, 2012), sinusite crônica, asma e bronquiectasia (ALTENBURG *et al.*, 2013). Ballard *et al.* (2011) sugerem que a profilaxia com azitromicina em prematuros de extremo baixo peso pode reduzir a incidência de displasia pulmonar e o uso de corticóide pós-natal.

A natureza do dano pulmonar induzido pela ventilação mecânica está claramente estabelecida, inclusive com a liberação de mediadores imunoinflamatórios (BALLARD; ANSTEAD; SHOOK, 2007; BALLARD *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2018). No entanto, uma terapia medicamentosa segura que diminua a sua severidade não está disponível. A azitromicina é um antibiótico macrolídeo com potentes efeitos anti-inflamatórios, mas foi pouco estudada em prematuros, salvo alguns estudos em prematuros extremos para a prevenção da displasia broncopulmonar (BALLARD; ANSTEAD; SHOOK, 2007, SEVILLA-SANCHEZ; SOY-MUNER; SOLER-PORCAR, 2010; BALLARD *et al.*, 2011, HASSAN *et al.*, 2011; GHAREHBAGHI *et al.*, 2012; VISCARDI *et al.*, 2013; CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015; MERCHAN *et al.*, 2015).

Com poucas exceções os estudos não foram desenhados para explorar os efeitos colaterais causados pelos macrolídeos e raros estudos disponíveis na literatura descrevem os efeitos adversos desta medicação na população neonatal

(CHANDRUPATLA; DEMETRIS; RABINOVITZ, 2002; MERCHAN *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2015).

Sabe-se que a ventilação mecânica, embora necessária como suporte ao RN com insuficiência respiratória grave, induz resposta inflamatória pulmonar importante. O papel do *Ureaplasma* antenatal e pós-natal ainda precisa ser determinado, mas há evidências de que a infecção e a colonização por este agente podem levar à ativação da resposta pró-inflamatória pulmonar (SEVILLA-SANCHEZ; SOY-MUNER; SOLER-PORCAR, 2010). Os antibióticos macrolídeos apresentam propriedades anti-inflamatórias e pressupõe-se que sejam capazes de inibir inflamação (SHINKAI; PARK; RUBIN, 2005; BALLARD *et al.*, 2011).

Não é conhecido o comportamento das interleucinas pró-inflamatórias IL- 1 β , IL- 2 IL-6, IL-8, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10, pré e após uso de azitromicina em prematuros sob VM. A dosagem destes mediadores e o acompanhamento dos pacientes em relação ao desfecho pulmonar poderá nos auxiliar nessa questão, especialmente comparando o efeito da intervenção versus placebo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PULMÃO DO PREMATURO

O pulmão humano se desenvolve em períodos cronológicos que podem ser subdivididos em três: embrionário inicial; período fetal propriamente dito e período pós-natal. O chamado período fetal, se subdivide ainda em três estágios: pseudoglandular, canalicular e sacular (figura 1), os quais descrevem pelos seus nomes a morfologia das vias aéreas e dos espaços aéreos. Ainda se sabe que há uma sobreposição entre o começo e o fim de cada período. Geralmente é aceito o que compreende (BURRI, 1997):

- a) período embrionário inicial (3 a 6 semanas);
- b) período pseudoglandular (6 a 17 semanas);
- c) período canalicular (17 a 27 semanas);
- d) período sacular (27 a termo – 36 semanas).
- e) período alveolar (36 semanas aos 2 anos) (RANGANATHAN, 2010; WOODS; SCHITTNY, 2018).

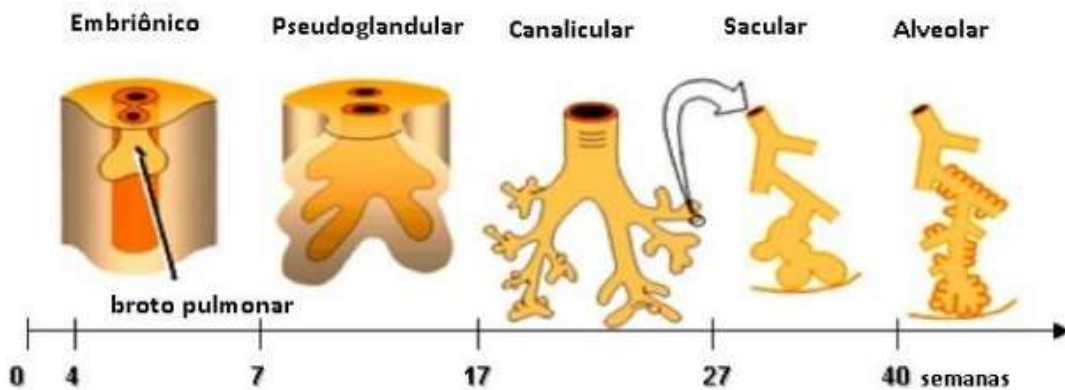
Paralelamente ao desenvolvimento dos pulmões, ocorre o desenvolvimento da circulação pulmonar. O crescimento vascular pulmonar se constitui por dois processos: vasculogênese – formação de novos vasos sanguíneos desde células endoteliais– e a angiogênese – formação de novos vasos desde capilares por brotação (BURRI; TAREK, 1990; CARVALHO *et al.*, 2018).

2.1.1 Período embrionário inicial (3 a 6 semanas)

Após a fertilização, entre as 5-7 semanas é que se inicia o desenvolvimento dos pulmões. Posteriormente ao intestino primitivo se formar, o pulmão se apresenta no fim da quarta semana através do esôfago como um broto do mesmo; logo, o conteúdo do epitélio pulmonar deriva do endoderma e do tecido conjuntivo da mesoderma germinativo, o que faz com que porções dos lóbulos e dos segmentos da árvore das vias aéreas comecem a se formar, tomando o aspecto de tubos colunares altos do epitélio (BURRI, 1984). No mesênquima imaturo ocorre a vasculogênese, de

onde artérias pulmonares se desenvolvem até circundarem os túbulos pulmonares, tal qual um entrelaçamento vascular. No fim desse período, os vasos centrais e das vias aéreas se assemelham ao padrão adulto (RANGANATHAN, 2002). A veia pulmonar tem sua formação a partir do átrio esquerdo do coração. Ao chegar no fim das sete semanas, o pulmão parece uma glândula túbulo-acinar (com tubos e porções secretoras que se assemelham a um cacho de uvas), dando início ao seu período pseudoglandular (JOSHI; KOTTECHA, 2007).

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento pulmonar



Fonte: Modificado de Centre de Reference des Maladies Respiratoires Rares (2012).

2.1.2 Período pseudoglandular (6 a 17 semanas)

Nesse estágio, ocorre a formação das vias aéreas condutoras e dos contornos acinosos, devido ao crescimento e processo de ramificação contínuos na periferia da parte externa dos tubos do epitélio. O desenvolvimento vascular se completa até o final dessa fase. No epitélio cúbico, na região distal, inicia-se a diferenciação celular (SILVEYRA, 2016). As células epiteliais cubóides são preenchidas com glicogênio, importante para a diferenciação celular e componente essencial do sistema surfactante – o qual mais tarde se constituirá dos alvéolos (TREMBLAY; PROVOST, 2013). O papel desse sistema é de diminuir a tensão superficial que se encontra na interface ar-líquido, fazendo com que a expansão dos pulmões ocorra de forma facilitada, o que é crucial para a manutenção íntegra da funcionalidade dos alvéolos. A fina cama de líquido que se encontra no pulmão após a primeira respiração – quando a maioria já foi reabsorvida – é revestida pelos lipídios surfactantes, os quais

proporcionam estabilidade aos alvéolos, diminuem o trabalho respiratório e não permitem o colapso alveolar (JOSHI; KOTTECHA, 2007).

2.1.3 Período canalicular (16 a 27 semanas)

Na sequência temos o estágio o canalicular, o qual se resume ao desenvolvimento inicial do parênquima pulmonar e à multiplicação de capilares. No final da 17ª semana, encontramos estruturas em tubo que representam os prospectivos ácinos do parênquima de troca de gases. Encontra-se, então, o ácino bem delineado juntamente a um túbulo-tronco que será um bronquíolo terminal com bronquíolos respiratórios (SILVEYRA, 2016). Em 20 semanas, é possível se observar que o epitélio alveolar sofre um achatamento, o que significa que as células cubóides se diferenciam em células epiteliais do tipo I e do tipo II – precursoras da produção e secreção de surfactante. Por esse motivo, as células epiteliais alveolares do tipo II possuem uma importância significativa para os pulmões se desenvolverem normalmente, constituindo um marco importante para o aumento da sobrevivência de prematuros extremos (JOSHI; KOTTECHA, 2007).

2.1.4 Período sacular (27 a 36 semanas)

Após, inicia-se o estágio compreendido entre a 24ª e a 36ª semana de gestação, denominado de período sacular. Existe um aumento da área superficial de trocas gasosas devido ao alargamento das vias aéreas periféricas com dilatação das estruturas tubulares acinares que formam “sáculos”, em que as vias aéreas terminam em grupos de sáculos com paredes relativamente finas, razão pela qual essa fase é chamada de sacular e essa se inicia a partir da 24ª semana (STOCKS; HISLOP; SONNAPPA, 2013). Nesse momento é que ocorre a formação da elastina, a qual possui um papel significativamente importante para o desenvolvimento do pulmão, sendo o passo inicial para formar os alvéolos pulmonares (HISLOP, 2002; COPLAND; POST, 2004; JOSHI; KOTTECHA, 2007).

2.1.5 Período alveolar (36 semanas a 2 anos)

Finalmente, chegamos no estágio alveolar, onde novas cadeias de tecido levantam os septos primários existentes e se estendem aos espaços aéreos, onde se subdividem os sacos em alvéolos menores (septação secundária) (ROTH-KLEINER; POST, 2005). Portanto, com o desenvolvimento e maturação dos alvéolos – que compreendem o sistema surfactante – aumentam, a cada dia de gestação, as chances dos nascidos pré-termos de sobreviverem. O papel desse sistema é de diminuir a tensão superficial que se encontra na interface ar-líquido, fazendo com que a expansão dos pulmões ocorra de forma facilitada, o que é crucial para a manutenção da funcionalidade dos alvéolos. Esta etapa final começa nas 36 semanas de gestação e permanece durante toda a infância e adolescência (STOCKS; SONNAPPA, 2013).

Quando o nascimento ocorre entre as 24-32 semanas de gestação, o desenvolvimento dos pulmões se encontra no estágio sacular (JOSHI; KOTECHA, 2007; STOCKS; HISLOP; SONNAPPA, 2013).

Levando-se em consideração este padrão de desenvolvimento, é naturalmente esperado que fatores pré-natais e pós-natais precoces exerçam efeitos importantes sobre o crescimento pulmonar posterior (FRIEDRICH; CORSO; JONES, 2005). Sabe-se que qualquer estágio do desenvolvimento do sistema respiratório pode ser suscetível a danos por diversos mecanismos, acarretando, assim, um risco de modificação do seu padrão normal de desenvolvimento (STICK, 2000).

Como os prematuros nascem antes de completar o desenvolvimento e maturação pulmonar, apresentam espessamento da barreira hemato-alveolar, epitélio das vias aéreas indiferenciado ou imaturo e redução na capacidade de produzir o surfactante. Podem apresentar também dificuldade em eliminar o líquido pulmonar, apresentando pulmões pouco complacentes, susceptíveis ao colapso e com dificuldades nas trocas gasosas (JOBE *et al.*, 2008), redução na produção de surfactante, troca gasosa prejudicada e respiração espontânea e independente ineficiente resultam, muitas vezes, na necessidade de VM.

Todas essas características, somadas às menores quantidades de colágeno e elastina, disfunção quantitativa e qualitativa do surfactante pulmonar, e menor capacidade residual funcional (CRF) (FORONDA, 2011), deixam o sistema respiratório do RN prematuro mais suscetível à lesão pulmonar induzida por ventilação ou a VILI (do inglês *ventilator-induced lung injury*). Qualquer dano nos estágios precoces do crescimento pulmonar pode resultar em sequelas a longo prazo (CARVALHO *et al.*, 2018).

2.2 VENTILAÇÃO MECÂNICA

Houve um aumento na sobrevivência neonatal, nos últimos 50 anos, devido ao desenvolvimento das terapias na assistência perinatal. Entre os vários avanços podemos destacar a descoberta (AVERY; MEAD, 1959), a utilização com sucesso (FUJIWARA, 1980) e a aprovação (GOLDSMITH; KAROTKIN, 1990) do uso de surfactante exógeno para o tratamento da doença das membranas hialinas, o uso antenatal de corticosteróides (LIGGINS; HOWIE, 1972), bem como o progresso nos aparelhos e técnicas utilizadas no suporte ventilatório do recém-nascido de risco.

A ventilação assistida é uma das principais técnicas utilizadas em cuidados intensivos neonatais. Esta tem como principal objetivo otimizar as trocas, diminuir o trabalho respiratório, e reexpandir as áreas atelectasiadas (GUINSBURG; MIYOSHI, 2005).

A indicação da VM em neonatologia ocorre quando há inabilidade dos pulmões em manter a ventilação adequada. A escolha das estratégias respiratórias deve ser baseada em princípios fisiopatológicos (MORETTI; PAPOFF, 2012).

Prematuros extremos nascem durante o final do estágio canalicular do desenvolvimento pulmonar fetal (24-26 semanas). Durante esse estágio ocorre o desenvolvimento das vias aéreas distais e dos primeiros ácinos (bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos rudimentares). Já os muito prematuros nascem no início do estágio sacular do desenvolvimento (26-32 semanas). Nesse estágio, há maior diferenciação das vias aéreas periféricas e estruturas acinares, as células epiteliais do tipo I estão mais formadas, e as do tipo II estão imaturas. A vasculogênese ainda está incompleta, porém, mais desenvolvida (ZOBAN; CERNY, 2003; MOSS, 2006; CARVALHO *et al.*, 2018). Contudo, nenhum desses estágios de desenvolvimento é compatível com a respiração independente, e as crianças cujos nascimentos ocorrem durante essas idades gestacionais necessitam de algum tipo de suporte ventilatório e de oxigênio suplementar. A exposição precoce do pulmão prematuro ao ambiente extrauterino, à VM e ao oxigênio pode alterar o processo de desenvolvimento pulmonar (ZOBAN; CERNY, 2003). Isso acontece porque a VM e o oxigênio, embora fundamentais para a sobrevivência dessas crianças, produzem estímulos mecânicos e bioquímicos diversos, podendo repercutir no desenvolvimento normal do pulmão prematuro (AMBALAVANAN; CARLO, 2006).

Do ponto de vista respiratório, devido à imaturidade pulmonar, os prematuros apresentam, com frequência, síndrome de desconforto respiratório (SDR), apneias e infecções, requerendo a utilização prolongada de oxigênio e/ ou suporte ventilatório (ZHANG *et al.*, 2018).

A associação entre suporte ventilatório e uso prolongado de oxigênio no período neonatal, especialmente em recém-nascidos prematuros de idade gestacional inferior a 30 semanas, está relacionada ao desenvolvimento de displasia broncopulmonar (NIWA *et al.*, 2011; CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013; REBELLO; MASCARETTI; MARINI, 2013; MIKUSIAKOVA *et al.*, 2015). Diversos estudos também observaram que recém-nascidos prematuros submetidos à ventilação mecânica no período neonatal apresentaram maior risco de desenvolver doenças respiratórias, como asma e pneumonia, nos primeiros anos de vida, quando comparados com aqueles não ventilados (DE MELLO; DUTRA; LOPES, 2004; FRIEDRICH; CORSO; JONES, 2008; CHALFUN *et al.*, 2009; STEVENS *et al.*, 2010; FAUROUX *et al.*, 2014). Foi verificada ainda, associação entre ventilação mecânica no período neonatal e alterações dos parâmetros da função pulmonar (espirometria) aos 8-9 anos (KOTECHA *et al.*, 2012) assim como maior chance de apresentar asma durante a infância e a vida adulta (GREENOUGH, 2008; KOTECHA; KOTECHA, 2012; GIBSON; DOYLE, 2013).

No desconforto respiratório grave, a ventilação mecânica invasiva é indicada, no entanto, a ventilação mandatória intermitente (IMV), do inglês *Intermittent Mandatory Ventilation*, além de estar associada à DBP como já citamos, está fortemente ligada a desfechos desfavoráveis no neurodesenvolvimento, especialmente nos prematuros (NATARAJAN *et al.*, 2012; STOLL *et al.*, 2015;).

A ventilação mecânica convencional, ciclada a tempo e limitada à pressão, é vastamente utilizada na neonatologia há várias décadas. Esta modalidade de ventilação é de fácil manuseio e acessível a todas as UTI neonatais, porém, se o recém-nascido não apresenta uma sincronia com o respirador, há risco de lesão pulmonar. Os respiradores utilizados para este tipo de ventilação dispõem de equipamentos microprocessados acoplados, que detectam o início da respiração espontânea através de uma variação de fluxo ou de pressão, e, tal estímulo desencadeia uma respiração mecânica. A ventilação sincronizada permite que o recém-nascido participe do trabalho respiratório. As vantagens da ventilação sincronizada sobre a ventilação convencional são: ajuste do volume corrente a cada

respiração, propiciando uma melhor ventilação alveolar e permitindo diminuir a pressão positiva inspiratória (PIP); melhor oxigenação; diminuição do risco de barotrauma; redução da variação do fluxo sanguíneo cerebral e aceleração do desmame da ventilação (LESSA; SUGUIHARA, 2004; CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013).

Nos últimos anos vários métodos de ventilação não invasiva, incluindo pressão positiva contínua nas vias aéreas (nCPAP), ventilação intermitente com pressão positiva nasal e cânula nasal de alto fluxo, têm sido utilizados com a esperança de prevenção da lesão pulmonar (CUMMINGS; POLIN, 2016). Infelizmente, estudos clínicos mostraram que até 38-42% dos bebês com muito baixo peso ao nascer sofrem fracasso no tratamento e requerem IMV (BARRINGTON; BULL; FINER, 2001; STEFANESCU *et al.*, 2003). Além disso, embora o nCPAP seja cada vez mais usado, as taxas de DBP não diminuíram (SHAH, 2012; STOLL *et al.*, 2015). A ventilação de alta frequência (VAF) surgiu com uma promessa de ventilação protetora, mas os estudos mostram que ela não é superior à ventilação convencional em relação aos desfechos pulmonares (COOLS; OFFRINGA; ASKIE, 2015).

Não é necessário ventilar um recém-nascido prematuro por muito tempo para causar lesão pulmonar. Carvalho, Silveira e Procianoy (2013) realizaram um estudo de coorte incluindo 43 recém-nascidos com dificuldade respiratória grave e idade gestacional $32,2 \pm 3$ semanas. Esse estudo teve como objetivo analisar qualquer associação entre os níveis de oxigênio na amostra sanguínea e os níveis plasmáticos das interleucinas IL-6, IL-1 β , IL-10 e IL-8 e TNF- α em recém-nascidos pré-termo sob ventilação mecânica (VM) em seus primeiros dois dias. As amostras de sangue foram coletadas antes e 2 horas após a VM invasiva. Para fins de análise, os recém-nascidos foram separados de acordo com a necessidade de oxigênio: grupos de baixa necessidade de oxigênio ($\leq 30\%$) e alta necessidade de oxigênio ($> 30\%$). Os resultados mostraram que no grupo que recebeu altas concentrações de oxigênio, os níveis plasmáticos de IL-6, IL-8 e TNF- α aumentaram significativamente após duas horas sob VM, ou seja, apenas alguns ciclos ventilatórios já podem desencadear uma reação inflamatória (COOLS; OFFRINGA; ASKIE, 2015). Portanto, uma ventilação gentil é fundamental para tentar diminuir a incidência dessas lesões. A UTI Neonatal do Hospital Jackson Memorial, da Universidade de Miami, apresenta um dos índices mais baixos de DBP entre as UTIs que participam da rede neonatal do *National Institute of Health* (NIH), embora optem por intubação e ventilação mecânica precoces

(NAIK *et al.*, 2001). Isso se deve, provavelmente, ao emprego de estratégia de ventilação gentil, com volume corrente e tempo inspiratório baixos, com controle da oferta de oxigênio e tolerância a níveis mais elevados de PaCO₂ (SUGUIHARA; LESSA, 2005).

A utilização de ventilação mecânica no período neonatal poderia causar alterações das vias respiratórias, principalmente através do barotrauma e volutrauma, atelectotrauma e biotrauma. Esse tipo de ventilação também induz a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α), produzindo lesão às células do epitélio e do endotélio pulmonar, o que pode levar a edema alveolar e alteração morfológica da estrutura broncoalveolar. Essas lesões produzidas num período precoce da vida podem ser irreversíveis, mesmo após a maturação pulmonar e o remodelamento das vias aéreas em etapas posteriores (TURNER; BRADSHAW; BRANDON, 2005; NARDELLI *et al.*, 2007; ABMAN, 2010).

Evidências recentes indicam que algumas abordagens ventilatórias, como a “estratégia do pulmão aberto” e a ventilação direcionada por volume, são capazes de reduzir os danos aos pulmões causados pela VM e melhorar os resultados respiratórios de bebês extremamente prematuros. No entanto, ainda existe uma enorme heterogeneidade entre as diferentes unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) em relação às estratégias e dispositivos de ventilação adotados (PETRILLO *et al.*, 2019).

O Grupo de Trabalho em Pneumologia Neonatal da Sociedade Italiana de Neonatologia promove fortemente a implementação de Diretrizes de Boas Práticas em ventilação em todo o país, organizando intervenções focadas, como cursos teóricos / práticos e treinamentos, com o objetivo de atender às necessidades de aprimoramento de médicos e enfermeiros e melhorar os resultados nessa categoria específica de bebês recém-nascidos e de fato, foi demonstrado que a implementação das diretrizes está associada a uma melhora significativa no controle respiratório dos bebês (MEHLER *et al.*, 2012; SANT’ANNA; KESZLER, 2012; TEMPLIN *et al.*, 2017).

Apesar desses progressos, as afecções do aparelho respiratório constituem-se, ainda, em causa importante de morbimortalidade neonatal. Com frequência prolongam o tempo de internação hospitalar e limitam o prognóstico. Portanto, a estabilização das desordens respiratórias continua sendo um dos principais desafios no período neonatal. Tanto os óbitos como as complicações ocorrem, em geral, na

fase aguda da doença, sendo em grande parte limitados aos RNs prematuros de muito baixo peso (BRASIL, 2014).

2.3 DISPLASIA BRONCOPULMONAR

A displasia broncopulmonar (DBP) foi primeiramente descrita há exatos 52 anos por Northway, Rosan e Porter (NORTHWAY; ROSAN; PORTER, 1967) para definir um grupo de nascidos pré-termos que possuía insuficiência respiratória grave e que sobreviveram à síndrome do desconforto respiratório após o recebimento de suporte respiratório com altos níveis de oxigênio e ventilação com pressão positiva. A evolução clínica desses bebês se caracterizou por insuficiência respiratória crônica grave e com a presença de áreas de hiperinsuflação pulmonar alternadas por densidades aumentadas adjacentes. Grande parte desses pré-termos foi a óbito por insuficiência respiratória e no exame dos pulmões *post-mortem* observou-se enfisema generalizado, fibrose intersticial e alterações epiteliais das vias aéreas (NORTHWAY; ROSAN; PORTER, 1967).

Apesar dos avanços significativos no atendimento perinatal, a displasia broncopulmonar (DBP) continua sendo uma das doenças mais comuns, complexas e intrigantes da medicina perinatal, que acomete aproximadamente 10.000 a 15.000 crianças por ano apenas nos Estados Unidos. Aproximadamente 40% das crianças com extremo baixo peso ao nascer (peso < 1000 g) desenvolvem DBP (JOBE, 2011; STOLL *et al.*, 2015). Nas unidades neonatais que compõem a Rede Brasileira de Pesquisas Perinatais, a incidência relatada foi de 19% para RNPT com peso ao nascer < 1500 gramas (GUINSBURG *et al.*, 2016).

A DBP e suas complicações têm implicações importantes para a utilização dos recursos de saúde, pois estudos de acompanhamento demonstraram que bebês com DBP requerem readmissão hospitalar frequente nos primeiros 2 anos de vida por infecções respiratórias, asma e problemas relacionados; eles também apresentam anormalidades persistentes da função pulmonar quando adolescentes e adultos jovens (STOLL *et al.*, 2015).

A DBP é o resultado de processos anormais de desenvolvimento ou reparo pulmonar durante um período crítico de crescimento pulmonar, quando os alvéolos estão sendo formados. As características patológicas da DBP incluem desenvolvimento alveolar simplificado e vasculatura pulmonar anormal (OKAMOTO *et*

al., 2009; JOBE, 2011; HWANG; REHAN, 2018). Por análises multivariadas, os principais preditores de DBP não foram surpreendentes: menor idade gestacional e ventilação mecânica no dia 7.

Bebês prematuros nascidos entre 23 e 32 semanas de gestação estão particularmente em risco de DBP porque nascem no estágio sacular do desenvolvimento pulmonar, antes do desenvolvimento alveolar e são vulneráveis a lesões pulmonares por vários fatores ambientais. A sobrevivência de RNs mais imaturos levou a alterações consideráveis na epidemiologia, no curso clínico e no quadro patológico da DBP, a qual foi chamada de “Nova DBP” (JOBE, 2011). Essa situação conduziu a novos desafios aos clínicos e maiores investimentos dos pesquisadores para a melhoria do resultado para os nascidos pré-termos. Esses bebês descritos com a “Nova DBP” nascem no estágio precoce do desenvolvimento pulmonar e são expostos a vários danos pré-natais e pós-natais que podem causar a interrupção do desenvolvimento alveolar e vascular normal. Contrariamente a à DBP original, o quadro patológico dos bebês com a Nova DBP se caracteriza por simplificação alveolar e uma menor quantidade de capilares, os quais também se apresentam na forma dismórfica, com menores evidências de enfisema e fibrose (OKAMOTO *et al.*, 2009).

Apesar das melhorias e novas tecnologias no cuidado neonatal, a incidência geral de DBP em pré-termos extremos não teve alteração significativa na última década. Supõe-se que isso se deva ao aumento da sobrevivência das crianças mais doentes e com idades gestacionais menores. Os nascidos com idade gestacional superior a 28 semanas de gestação possuem menor incidência de DBP e, quando essa ocorre, normalmente se mostra mais leve. A incidência de DBP em pré-termos com muito baixo peso é de cerca 40%, como já foi dito anteriormente; contudo, há diferenças dentre os diversos centros, em consequência das variações nas práticas clínicas, das características populacionais e das definições utilizadas para a DBP (McEVOY; *et al.*, 2014; TOMÉ, 2018).

2.3.1 Curso clínico da DBP

Apesar de ser usada como estratégia-chave no tratamento de RNPT em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal (UTINeo), a ventilação mecânica está diretamente relacionada à lesão tecidual no parênquima pulmonar imaturo (BALANY;

BHANDARI, 2015). A DBP ocorre mais comumente em bebês prematuros que necessitam de ventilação mecânica e oxigenoterapia para problemas respiratórios agudos, chegando atualmente a acometer 40% dos prematuros extremos (STOLL *et al.*, 2015).

Quando os pulmões são expostos a volumes correntes elevados, a excessiva distensão leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e reduz a expressão de citocinas anti-inflamatórias. Mesmo a ventilação em volumes correntes baixos é prejudicial causando lesão por estiramento pelo colapso pulmonar do parênquima imaturo e pouco ventilado (BALANY; BHANDARI, 2015).

Múltiplos estudos observacionais associam a sepse neonatal como fator de risco independente para o desenvolvimento de DBP. Esses achados sugerem que a infecção pós-natal pode ser o preditor mais importante para DBP (BANCALARI, 2006). Dados americanos apontam que 36% dos neonatos nascidos antes de 28 semanas de IG apresentam pelo menos um episódio de sepse, com até 50% de mortalidade associada. Na comparação com bebês a termo, a sepse em prematuros é cerca de mil vezes mais frequente, sendo causa de mortalidade e prejuízo no desenvolvimento neurológico (WYNN, 2016).

A corioamnionite aumenta o risco de sepse neonatal precoce, desencadeando uma cascata inflamatória pulmonar já muitas vezes até antes do nascimento. Os patógenos bacterianos que são mais frequentemente isolados nos casos de corioamnionite incluem as espécies humanas de *Ureaplasma* (*Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma Urealyticum*), *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* e menos frequentemente, *Gardnerella spp.*, *Mycoplasma spp.* e *Bacteroides spp.* (DiGIULIO *et al.*, 2008; COX *et al.*, 2016; SWEENEY *et al.*, 2016; SWEENEY *et al.*, 2017) ou seja, organismos vaginais de baixa virulência. Contudo, dos microrganismos citados, o *Ureaplasma spp.* é identificado como o mais comuns no líquido amniótico e nas placentas de mulheres com corioamnionite (GERBER *et al.*, 2003; NAMBA *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2016) e parto prematuro (SWEENEY *et al.*, 2017).

A persistência do canal arterial (PCA) é um fator associado ao desenvolvimento de DBP. Um amplo estudo epidemiológico realizado na América do Sul identificou alguns dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da DBP em bebês de peso extremamente baixo ao nascer. Entre eles destacam-se a PCA, além da sepse (TAPIA *et al.*, 2006). O shunt esquerda-direita no canal arterial patente produz um aumento

no fluxo sanguíneo pulmonar e na quantidade de fluido pulmonar, o que afeta negativamente a função pulmonar e a troca gasosa (BANCALARI, 2006).

Além desses fatores, acredita-se que haja uma predisposição genética para o desenvolvimento da DBP. O mecanismo ainda não está bem estabelecido, mas há a sugestão de que os genes reguladores do desenvolvimento pulmonar sofram interferência dos mediadores inflamatórios presentes no pulmão lesado, estimulando a expressão gênica de mediadores que favorecem o surgimento de fibrose pulmonar (BANCALARI, 2006). Em estudo que envolveu 751 crianças, das quais 428 desenvolveram DBP, foi possível identificar o envolvimento de várias vias genéticas relacionadas ao desenvolvimento e reparo pulmonar, associadas à DBP grave (AMBALAVANAN; CARLO, 2006). No entanto, mais estudos são necessários para determinar se há ou não uma predisposição genética e determinar quais são os fatores genéticos envolvidos.

2.3.2 A Evolução na definição da DBP

Várias definições têm sido propostas para a DBP numa busca contínua para definir a gravidade da doença pulmonar da melhor forma e, assim, prever os resultados a longo prazo. Em 2001 Jobe e Bancalari (JOBE; BANCALARI, 2001) (Tabela 1) em consenso com o National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), dos Estados Unidos, e validado posteriormente por Ehrenkranz *et al.* (2005), propõem uma nova definição para displasia. De acordo com essa definição, considera-se como apresentando DBP todo RN que tenha utilizado oxigênio suplementar por um período ≥ 28 dias. Estes RN são reavaliados com 36 semanas de IG corrigida (se IG < 32 semanas) ou no 56º dia de vida (se IG ≥ 32 semanas) ou na alta hospitalar. Nesta reavaliação, aqueles em ar ambiente são classificados como DBP leve; os que ainda estão recebendo uma fração inspirada de oxigênio (FiO₂) < 0.3, como DBP moderada; e aqueles com FiO₂ > 0.3 e/ou pressão contínua em vias aéreas (CPAP) e/ou ventilação mecânica, como DBP grave (Tabela 1). Esta definição permitiu identificar o espectro de gravidade (JOBE; BANCALARI, 2001).

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para displasia broncopulmonar

IG ao nascer	Leve	Moderada	Grave
<32 semanas	O2 suplementar por 28 dias e AA com 36 sem IGC ou na alta	O2 suplementar por 28 dias e FiO2 <0,3 com 36 sem IGC ou na alta	O2 suplementar por 28 dias e FiO2 ≥ 0,3 com 36 semanas IGC ou na alta
	O2 suplementar por 28 dias e AA com 56 dias ou na alta	O2 suplementar por 28 dias e FiO2 <0,3 com 56 dias ou na alta	O2 suplementar por 28 dias e FiO2 ≥ 0,3 ou sem suporte de pressão positiva com 56 dias ou na alta

Fonte: JOBE; BANCALARI, 2001.

Embora ainda utilizada na atualidade a definição do NICHD vem sendo questionada por alguns autores. Existe alguma evidência de que a idade gestacional corrigida (IGC) de 36 semanas, talvez, não seja o momento ideal para diagnosticar a DBP. Outro aspecto levantado é o fato desta definição não considerar o uso de novas estratégias de suporte respiratório que vem ganhando espaço em Neonatologia, como a cânula nasal de alto fluxo, por exemplo. Além disso, tal definição está baseada apenas no tratamento, isto é, no uso de oxigênio suplementar, não considerando a fisiopatologia da doença (EHRENKRANZ *et al.*, 2005; POINDEXTER *et al.*, 2015).

Recentemente, Isayama e colaboradores (2017), mostraram que a dependência de oxigênio com 40 semanas de IGC seria um melhor preditor de desfecho aos 18-21 meses de idade do que a dependência às 36 semanas de IGC. Assim, pelo exposto, é possível que, em breve, a definição atualmente considerada, por consenso, venha a ser modificada (ISAYAMA *et al.*, 2017).

2.3.3 Alterações no quadro patológico da DBP

Concomitante às mudanças epidemiológicas, no quadro clínico e no manejo pré- e pós-natal dos pré-termos, ao longo dos anos surgiram significativas mudanças no quadro patológico da DBP. A DBP observada hoje – a chamada “nova DBP” – resulta de alterações no desenvolvimento alveolar e vascular (JOBE, 2011).

A imaturidade é considerada o fator de risco mais significativo para a DBP, com a incidência da doença sendo inversamente relacionada à idade gestacional (DUARTE, 2010).

Além da imaturidade, a *Ventilator Induced Lung Injury* (VILI) causada pela VM é um dos fatores principais para o desenvolvimento de DBP (LISTA *et al.*, 2006; KESZLER; ABUBAKAR, 2007; KESZLER, 2009; DARGAVILLE; TINGAY, 2012). A tensão de cisalhamento, o volume inspirado, a pressão do ar e a concentração de oxigênio estão todos envolvidos no dano das células epiteliais, contribuindo para o extravasamento de proteínas nas vias aéreas, inibindo a função do surfactante e aumentando a infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos. Além disso, a VM pode causar uma resposta inflamatória sistêmica, com ativação de fagócitos na circulação e de linfócitos T, CD4 e CD8, ativação essa que também ocorre na DBP (MELVILLE; MOSS, 2013). As infecções sistêmicas ou pulmonares aumentam o risco de DBP. Estudos realizados em animais demonstraram que a colonização dos pulmões fetais pelo *Ureaplasma* levou a um aumento da inflamação e à alteração do desenvolvimento alveolar (LI *et al.*, 2014). Adicional a isso, diversos estudos epidemiológicos têm sugerido a forte associação entre a colonização por *Ureaplasma* no trato respiratório e um aumento significativo no risco de desenvolvimento de DBP.

Estudos também demonstram que há alteração do microbioma pulmonar por fatores pré- e pós-natais, como pelo uso de antibióticos por exemplo, o que traz um crescente interesse na possibilidade de haver uma associação entre microbiota pulmonar alterada e risco de DBP (CASSELL; WAITES; CROUSE, 2001; RIVERA; SIDDAIAH; OJI-MMUO; SILVEYRA; SILVEYRA, 2016).

Resh, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (RESCH; GUTMANN; REITERER; LUXNER; URLESBERGER, 2016) afirmam que um fator de risco antenatal é a corioamnionite materna, pois está associada a posterior desenvolvimento de DBP, sendo o *Ureaplasma urealyticum* o agente etiológico mais encontrado nos menores de 30 semanas de IG.

Está bem estabelecido que a intubação e ventilação com pressão positiva em neonatos pré-termos são fatores preditivos para DBP (VAN MARTER *et al.*, 2000). As pressões altas nas vias aéreas, associadas aos volumes correntes elevados aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões em modelos animais e em aspirados de traquéia de neonatos humanos.

Essa ativação de leucócitos está relacionada ao aumento da produção de citocinas, com reações inflamatórias associadas ao crescimento vascular anormal e dano às vias aéreas distais do pequeno paciente (BOSE; DAMMANN; LAUGHON, 2008).

2.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). As citocinas atuam como mensageiros químicos entre as células. Essas proteínas operam em uma abordagem complexa e gradual, produzindo uma cascata de efeitos que contribuem para o desenvolvimento e a função do sistema imunológico. As citocinas regulam as respostas inflamatórias estimuladas por um desafio antigênico. De acordo com seu papel na resposta inflamatória, as citocinas podem ser divididas naquelas que promovem inflamação ou protegem contra infecções e naquelas que diminuem a inflamação (DINARELLO, 2003).

Concentrações elevadas de citocinas são observadas nos prematuros com síndrome do desconforto respiratório que subsequentemente desenvolvem DBP (VISCARDI *et al.*, 2004; VENTO *et al.*, 2006).

As citocinas inflamatórias possuem a habilidade de causar a liberação de outros mediadores inflamatórios, o que faz com que elas cooperem para a patogenia de diversas doenças (LAL; NAMASIVAYAM, 2015). As citocinas pró-inflamatórias têm participação na patogênese de praticamente todos os processos de doença nos nascidos prematuros, sobretudo na modulação de danos no Sistema Nervoso Central, nos intestinos e nos pulmões. Há um aumento nos níveis de citocinas na sepse e nas formas moderadas a graves de displasia broncopulmonar (DBP) (BERNER *et al.*, 1998; RIVERA; SIDDAIAH; OJI-MMUO; SILVEYRA; SILVEYRA, 2016).

Há três citocinas de fase aguda que sinalizam a presença de dano pulmonar: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina 1- β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6). A IL-6 é uma citocina com funções pró e anti-inflamatórias importantes para o sistema imunológico. As citocinas atuam sobre várias outras células que não possuem uma resposta imediata ao insulto inicial, fazendo com que elas iniciem programas de transcrição e, deste modo, multipliquem a resposta inflamatória. Além disso, são responsáveis por estimular a vinda de células inflamatórias ao sítio de lesão, por meio de *up regulation* nas células endoteliais e leucocitárias (KOTECHA; CHAN; AZAM;

SILVERMAN; SHAW, 1995; KOTECHA; SILVERMAN; SHAW; KLEIN, 1998). A IL-1 precede o aumento de IL-6 e IL-8, e isso parece anteceder o influxo de células inflamatórias através da atração de neutrófilos ao foco inflamatório. As células inflamatórias no espaço alveolar amplificam os danos aos pulmões (BHANDARI; ELIAS, 2006).

A IL-2 é uma citocina envolvida na ativação, crescimento e diferenciação das células T, assim como na indução do crescimento, diferenciação e ativação funcional de uma variedade de outras células que participam da resposta imune. A IL-2 produzida por uma célula T ativada de maneira autócrina estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos, assim como de células B (SPOLSKI; LI; LEONARD, 2018).

A partir da secreção de IL-2, inicia-se uma ativação em cascata de diversas citocinas incluindo outras interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral, com efeitos sinérgicos e inibitórios sobre a sua própria atividade no sistema imune. A grande função da IL-2 no sistema imune é na proliferação clonal das células T e células B antígeno (Ag) dependentes (específicas); tímócitos jovens; natural assassinas (NK); macrófagos (MØ), células assassinas (CK) ativadas por linfocinas (DE ANDRADE; BASTOS, 1992; GIUGNO; MACHADO; AMANTÉA; MENNA-BARRETO, 2004).

Sendo uma citocina de ação anti-inflamatória, a interleucina-10 (IL-10) se expressa de modo tardio após a lesão, seguidamente ao aumento dos níveis de IL-8 (MALEFYT; ABRAMS; BENNETT; FIGDOR; DE VRIES, 1991). Recém-Nascidos pré-terms podem vir a ter uma produção baixa de interleucinas regulatórias, como a IL-10; com isso, tornam-se mais predispostos a uma resposta inflamatória exacerbada (BERESFORD; SHAW, 2002).

São característicos da DBP a simplificação e o aumento de diâmetro das estruturas alveolares, o desequilíbrio entre a atividade proteolítica neutrofílica e a redução dos inibidores (SPEER, 2006). A apoptose de neutrófilos também é comprometida nesses bebês que desenvolvem DBP (KOTECHA *et al.*, 2003).

A interação fisiopatológica entre desenvolvimento pulmonar e inflamação foi estudada em modelos animais. A exposição intrauterina à endotoxina no líquido amniótico de cordeiros prematuros alterou a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), com conseqüente remodelamento vascular, o qual precederia a simplificação alveolar (KRAMER, 2009). Experimentos em adultos e in

vitro mostraram que a distensão alveolar sozinha produz resposta pró-inflamatória, aumentando a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , o que provavelmente contribui para a patogênese de displasia (FRANK; PARSONS; MATTHAY, 2006). Alisson *et al.* (2008) desenvolveram um modelo animal de ventilação intraútero que comprovou desenvolvimento pulmonar alterado devido à VM, de forma dissociada de outros fatores iatrogênicos que poderiam contribuir.

Como já discutimos no capítulo sobre ventilação mecânica, existem controvérsias a respeito do exato momento de liberação dessas citocinas na resposta inflamatória pulmonar; os mecanismos precisos de dano pulmonar pelo ventilador são complexos e não totalmente entendidos.

Quinn, Moufarrej, Volokhov e Hales (2002) ventilaram ratos adultos por duas horas e detectaram que os níveis de IL-8 em lavado broncoalveolar eram os mesmos que nos controles, mas quatro horas depois aumentavam bastante, sugerindo uma expressão retardada de citocinas. Já Hillman *et al.* (2007) demonstraram em cordeiros que a ventilação breve por 15 minutos induziu aumento das citocinas nos pulmões.

Capoluongo e colaboradores (2005) reportaram que as citocinas séricas nos dias um, três e cinco em lactentes em ventilação de alta frequência oscilométrica eram menores do que naqueles em ventilação intermitente mandatória.

Os estudos em prematuros muito pequenos que documentam a inflamação sistêmica associada à ventilação têm sido limitados a um número pequeno de sujeitos e de mediadores inflamatórios (CAPUOLONGO *et al.*, 2005; TURUNEN *et al.*, 2011). Estudo realizado no Hospital de Clínicas De Porto Alegre (HCPA), com RNs a termo e prematuros tardios mostrou que a VM, como um estímulo único e mesmo por curto período, induz a liberação plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) duas horas após serem submetidos à ventilação (BOHRER; SILVEIRA; NETO; PROCIANOY, 2009), sugerindo que a cascata de eventos que leva à inflamação pulmonar e remodelamento nos neonatos possa começar dentro de duas horas após o início da ventilação. Nos pacientes desse estudo, a IL-10 reduziu de modo significativo após duas horas de ventilação. O estudo de Carvalho, Silveira e Procianoy (2013), já citado anteriormente, confirma os estudos acima e acrescenta que o tempo de ventilação associado às concentrações maiores de oxigênio são responsáveis por aumentar significativamente os níveis plasmáticos de IL-6, IL-8 e TNF- α após duas horas sob VM desencadeando uma reação inflamatória (CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013).

2.5 UREAPLASMA UREALYTICUM E PARVUM

Os micoplasmas genitais *Ureaplasma urealyticum* (*Uu*) e *Ureaplasma parvum* (*Up*) estão entre os menores organismos de vida livre e auto-replicantes. Eles não possuem parede celular, possuem capacidades biossintéticas limitadas e colonizam as superfícies mucosas do trato geniturinário e respiratório (WAITES; XIAO; PARALANOV; VISCARDI; GLASS, 2012).

As espécies de micoplasma genital, o *Up* e *Uu* são os organismos mais comuns isolados do líquido amniótico infectado e das placentas (SWEENEY, 2017) e contribuem para resultados adversos da gravidez, incluindo a corioamnionite, o nascimento prematuro e morbidades neonatais como pneumonia, meningite e DBP (VISCARDI; HASDAY, 2009; VISCARDI, 2014).

Eles são transmitidos em humanos através de contato direto entre hospedeiros (venereamente por contato genital-genital ou genital-oral), verticalmente da mãe para o feto ou recém-nascido ou nosocomialmente através do transplante de tecidos (WAITES, 2008).

A infecção por *Ureaplasma* é comum em recém-nascidos de muito baixo peso, principalmente entre os nascidos de trabalho de parto prematuro, reforçando a hipótese de associação entre prematuridade e infecção por *Ureaplasma*. Fonseca (2011), em seu estudo realizado em um hospital universitário de Porto Alegre constataram que a prevalência da infecção por *Ureaplasma* foi de 12,63% em recém-nascidos de muito baixo peso, sendo que destes, 5,26% eram *Uu*, 5,26% *Up* e 2,11% ambos. A presença de *Ureaplasma* foi associada à infecção ovular e ao trabalho de parto prematuro.

Kataoka *et al.* (2006) encontraram evidências de que a colonização vaginal por *Up*, mas não por *Uu*, está associada ao aborto tardio e nascimento prematuro. Biernat-Sudolska, Rojek-Zakrzewska e Lauterbach (2006) observaram que prematuros infectados por *Uu* necessitavam mais suporte ventilatório, surfactante e antibióticos, além de apresentarem maior mortalidade em relação aos infectados por *Up*. Já Katz, Patel, Duffy, Schelonka, Dimmitt e Waites (2005) não encontraram diferença significativa quanto à prevalência das espécies entre recém-nascidos com ou sem DBP.

Olomu *et al.* (2009) encontraram em seu estudo que a presença de *Ureaplasma* no parênquima placentário antes das 28 semanas de idade gestacional aumentou o

risco de hemorragia intraventricular e lesões cerebrais em neonatos prematuros. O papel do *Ureaplasma* como causador de dano cerebral neonatal também apareceu no modelo experimental em camundongos realizado por Normann *et al* (2009).

Clifford *et al* (2010) revisaram as publicações relevantes sobre o assunto e encontraram que apesar de alguns estudos sugerirem que a detecção de *Ureaplasma* no líquido (LCR) de neonatos com clínica de meningite ou sepse seja de até 9% dos casos, a proporção na maioria dos estudos é de menos de 1%. Há dificuldades em se estabelecer a patogenicidade do *Ureaplasma* na meningite neonatal, já que em uma proporção significativa de pacientes com tal infecção o organismo é contido pelo sistema imune sem tratamento antibiótico específico. Apesar de não estarem necessariamente relacionadas etiologicamente, complicações como hemorragia intraventricular, hidrocefalia e atraso de desenvolvimento parecem ser comuns nesse grupo de pacientes.

Berger *et al.* (2009) estudaram uma coorte de 114 prematuros nascidos entre 23 e 33 semanas de idade gestacional de mães que tiveram cultura de líquido amniótico obtida durante a cesariana. Essas crianças foram subsequentemente avaliadas com 24 +/- 1,1 meses de idade corrigida através da escala de desenvolvimento infantil de Bayley II e exame neurológico padronizado. Um grupo de 67 crianças com cultura de líquido amniótico negativa foi comparado a 47 crianças com cultura positiva, sendo positiva para *Uu* em 32 casos e para outras bactérias em 15 casos. Pacientes com cultura positiva apresentaram um risco significativamente maior de apresentar um escore PDI (índice de desenvolvimento psicomotor) adverso (OR 3,1; CI 1.3-3.7), um desfecho neurológico anormal (OR 4,8; CI 1,4-16,4) e uma maior probabilidade de diagnóstico de paralisia cerebral (OR 4,8; CI 1,4-16,4) aos dois anos de idade corrigida em comparação aos com os de cultura negativa.

Goldenberg *et al.* (2008) realizaram cultura de sangue de cordão umbilical para *Uu* e *M. hominis* de 351 prematuros nascidos entre 23 e 32 semanas de idade gestacional. Esses microorganismos foram encontrados em 23% das culturas de sangue de cordão (52% positivo para *Uu*, 26% positivo para *M. hominis* e 22% positivo para ambos). Culturas positivas foram mais comuns nos nascimentos prematuros espontâneos quando comparados aos indicados (34,7% x 3,2%; p= 0,0001) e naqueles com menor idade gestacional, filhos de mães não brancas e com idade inferior a 20 anos. Inflamação e infecção intrauterina (evidenciados por cultura placentária, aumento de IL-6 no sangue de cordão e histologia placentária) também

foram mais comuns entre os com cultura positiva. Neonatos com cultura positiva tiveram mais chance de apresentar síndrome da resposta inflamatória sistêmica (41,3% x 25,7%; $p= 0,007$; OR ajustado 1,86; 1,08-3,21) e provavelmente DBP (26,8% x 10,1%; $p= 0,0001$, OR ajustado 1,99; 0,91-4,37). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto a outros desfechos neonatais, como síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intraventricular ou morte.

2.5.1 Associação com displasia broncopulmonar

A colonização do pulmão do pré-termo com *Ureaplasma* é um achado frequente nas crianças de risco para o desenvolvimento de DBP (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005; VISCARDI; HASDAY, 2009).

Viscardi *et al.*, (2008) conduziram um estudo para determinar a incidência de doença invasiva por *Up* e *Uu* e sua relação com desfechos adversos em um estudo de coorte prospectiva de recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP). Eles realizaram PCR a partir do DNA extraído do sangue de cordão umbilical ou venoso e do LCR de 313 neonatos. A colonização do trato respiratório também foi investigada. *Ureaplasma* foi detectado no soro e/ou LCR de 74 (23,6%) recém-nascidos (19,1% no sangue de cordão umbilical, 18,1% no sangue venoso e 19,1% no LCR). *Up* foi a espécie predominante (70%). A presença do *Ureaplasma* foi associada ao aumento da IL-1 β no sangue de cordão ($p= 0,039$; OR 2,6; IC 1,05-6,45) e ao aumento no risco de hemorragia intraventricular grau ≥ 3 , e esta diferença permaneceu significativa após ajuste para idade gestacional ($p= 0,036$; OR 2,5; IC 1,06-5,89). *Up* foi a espécie detectada em todos os casos de hemorragia intraventricular severa e PCR positivo. Apesar de a incidência de DBP ter sido maior em recém-nascidos com colonização do trato respiratório (41 x 23%, $p=0,003$), não houve diferença na incidência de DBP entre neonatos com ou sem *Ureaplasma* detectados no sangue ou LCR. No geral, quase metade da coorte foi positiva para *Ureaplasma* em um ou mais compartimentos (sangue, líquido ou trato respiratório), confirmando que este microorganismo é o patógeno mais comumente encontrado nesta população.

A taxa de colonização do trato respiratório com *Ureaplasma* em recém-nascidos com muito baixo peso ao nascer (RNMBP, <1500 g) varia de 20 a 45%. Em uma coorte prospectiva recente do Centro Médico da Universidade de Maryland, observamos que a colonização respiratória por *Ureaplasma* estava inversamente relacionada à idade gestacional (OR, 0,821; IC, 0,720-0,934). Sessenta e cinco por

cento dos bebês com menos de 26 semanas de gestação foram cultura ou positivos para PCR uma ou mais vezes durante o primeiro mês de vida, em comparação com 31% dos bebês com idade ≥ 26 semanas de idade gestacional (SUNG *et al.*, 2011). O *Ureaplasma* spp teve uma alta prevalência sendo o principal agente causador de corioamnionite no nascimento prematuro no nosso estudo de (5 em 20 casos) (KIKHNEY *et al.*, 2017).

Por si só a corioaminitite já é um fator de risco para desenvolvimento de DBP. Não bastasse, é um fator de risco para o surgimento de outras doenças como que predispõe o desenvolvimento da DBP. Assim podemos concluir que sua presença agrava os riscos de o recém-nascido prematuro desenvolver DBP. Em estudos em humanos, a corioamnionite foi associada à morte neonatal (MALLOY, 2014; ARAYICI *et al.*, 2014), sepse neonatal de início precoce (ARAYICI *et al.*, 2014; STIMAC *et al.*, 2014), restrição de crescimento intra-uterino (MOSCUZZA *et al.*, 2011), comprometimento neurológico (KORZENIEWSKI *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2016), hemorragia peri-intraventricular (ARAYICI *et al.*, 2014), displasia broncopulmonar (HARTLING; LIANG; LACAZE-MASMONTEIL, 2012; PERRONE, 2012; ERIKSSON *et al.*, 2014), persistência do canal arterial (MOSCUZZA, 2011, PERRONE, 2012; HARTLING; LIANG; LACAZE-MASMONTEIL, 2012; ERIKSSON *et al.*, 2014), retinopatia da prematuridade (CHEN *et al.* 2011; WOO *et al.*, 2013) e enterocolite necrosante (BEEN *et al.*, 2013; MOORE; ARNOLD; WRIGHT, 2013).

Combinando infecção pré-natal por *Ureaplasma* e exposição pós-natal ao oxigênio, a inflamação pré-natal pode prejudicar o desenvolvimento cerebral, com evidências de ativação microglial, atraso da mielinização e alteração do desenvolvimento neuronal (NORMANN *et al.*, 2009). A infecção por *Ureaplasma* pode estar associada à inflamação pulmonar mais grave e causar uma pneumonia que raramente se diferencia clinicamente da síndrome do desconforto respiratório (SDR) e / ou pode interferir na resposta ao tratamento com surfactante (BEEN *et al.*, 2010). Normann *et al.* (2009) desenvolveram um modelo em camundongos combinando a infecção pré-natal por *Ureaplasma* e a exposição pós-natal ao oxigênio. A presença intra-amniótica do *Up* aumentou as citocinas pró-inflamatórias na placenta e nos pulmões fetais. A inflamação pré-natal exacerbou os efeitos deletérios do oxigênio no desenvolvimento pulmonar.

Mourani *et al.* (2011) realizaram identificação molecular de bactérias em amostras seriadas do aspirado traqueal de prematuros intubados, isolando genes de

rRNA colhidos por PCR para determinar a composição de comunidades bacterianas e o tempo de aquisição nas vias aéreas desses bebês. Descobriram que, durante as primeiras 72 horas após o nascimento, a maioria das amostras de aspirado traqueal apresentava cargas bacterianas baixas ou indetectáveis, porém dentro de 7 dias de vida, a colonização bacteriana sustentada com diversas espécies está presente nas vias aéreas de prematuros intubados. Em 96,9% das amostras a detecção bacteriana exibiu um organismo dominante, sendo que *Staphylococcus* e *Ureaplasma* foram as espécies mais frequentemente identificadas. Os métodos moleculares identificaram todas as espécies detectadas pelas culturas clínicas tradicionais, mas também identificaram possíveis patógenos, incluindo *Ureaplasma*, que não foram detectados pelos métodos padrão de cultura bacteriana. Assim, uma resolução melhorada da detecção bacteriana em relação à carga bacteriana geral, diversidade de espécies dentro do microbioma ou identificação de organismos específicos para terapia direcionada, tem o potencial de fornecer mais informações sobre a patogênese da DBP. Esses achados são importantes porque a infecção e a inflamação pulmonar precoce têm demonstrado prejudicar o desenvolvimento alveolar e contribuir para o desenvolvimento da DBP.

O estudo de Wagner *et al.* (2017) teve por objetivo avaliar o microbioma das vias aéreas inferiores em prematuros que necessitam de ventilação mecânica para determinar a existência de uma relação entre o microbioma do trato respiratório inicial e a gravidade da DBP. Foram analisadas amostras de aspirado traqueal de 79 prematuros com diferentes níveis de DBP (23 DBP leve, 27 moderada e 29 grave) sendo estas coletadas entre 5 e 9 dias de vida. O resultado foi a presença de ureaplasma em 18% destes aspirados perdendo apenas para o *Staphylococcus* (68%). O estudo concluiu que a carga bacteriana nas vias aéreas não revelou um padrão que estivesse fortemente ligado à gravidade da DBP, isoladamente ou em conjunto com fatores clínicos. No entanto, como o sistema imunológico de bebês prematuros ainda está amadurecendo, a simples colonização por bactérias pode ser suficiente para gerar uma resposta inflamatória que atrapalha o desenvolvimento pulmonar e predispõe à DBP.

Viscardi e Hasday (2009) realizaram uma revisão sumarizando as evidências que suportam um papel causal do *Ureaplasma* na DBP. Eles propuseram que a infecção por *Ureaplasma* iniciada intra-útero e potencializada na vida pós-natal pela exposição à volutrauma e ao oxigênio induz a uma resposta inflamatória desregulada

e sustentada no pulmão imaturo, que prejudica a alveolarização e estimula a proliferação de miofibroblastos e a deposição excessiva de colágeno e elastina. A elucidação dos mecanismos pelos quais o *Ureaplasma* pode contribuir na patogênese da DBP não apenas fornece evidências de uma relação causal, mas também identifica alvos potenciais para intervenção na prevenção e tratamento de RNs colonizados.

A azitromicina, quando administrada profilaticamente, está associada à redução da DBP e da DBP / morte em prematuros (NAIR; LOGANATHAN; SORAISHAM, 2014).

2.6 AZITROMICINA NA PREVENÇÃO DA LESÃO PULMONAR

A azitromicina pertence à nova geração de antibióticos macrolídeos, chamada azalídeos (AMSDEN, 2005; KANOH; RUBIN, 2010); é derivada da eritromicina e possui muitas vantagens frente a essa, sendo por isso um dos antibióticos mais comumente prescritos. Dentre essas vantagens, destaca-se a longa meia-vida e a boa concentração e penetração tecidual, maior espectro de ação, maior potência e melhor atividade *in vitro* do que todos os outros macrolídeos contra as bactérias aeróbias e anaeróbias gram-negativas (AMSDEN, 2005). Sua alta concentração nos tecidos, maior do que no plasma ou soro, deve-se a sua rápida distribuição tecidual a sua alta concentração celular, mantendo-se com os níveis altos por um período de 7-10 dias. Essas características permitem que a azitromicina possa ser administrada em dose única diária, o que traz maior comodidade de uso e a melhor adesão dos pacientes ao tratamento (GOODMAN, 2012; LAKOS *et al.*, 2012; VISCARDI *et al.*, 2013).

Os macrolídeos são fármacos com efeitos antibióticos consagrados especialmente para patógenos intracelulares (*Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*). Agem inibindo a síntese proteica e o crescimento bacteriano do ribossomo celular, fazendo com que proteínas vitais deixem de ser sintetizadas, causando a morte do patógeno. Este grupo de antimicrobianos atinge alta concentração no interior das células inflamatórias, permitindo a liberação da droga no local da inflamação induzida por macrófagos. Dentre os macrolídeos, a azitromicina é que possui maior tempo de permanência no meio intracelular. Os macrolídeos podem ter efeitos bactericidas ou bacteriostáticos, dependendo de concentrações plasmáticas e teciduais, tamanho do inóculo e microorganismos infectantes. Podem

ser utilizados em pacientes alérgicos aos antibióticos betalactâmicos, por possuírem estrutura química diferente (CAZZOLA *et al.*, 2006; ZAROGOULIDIS *et al.*, 2011).

Comparada aos outros macrolídeos, a azitromicina geralmente possui atividade maior contra bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas. Possui atividade *in vitro* contra muitos organismos gram-positivos e gram negativos aeróbios e anaeróbios; não é inativada por beta-lactamases produzidas por *H. influenza* e *M. catharralis* (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2010). Contudo, sua estrutura confere maior estabilidade em meio ácido, agindo muito bem contra os gram-positivos. Desta forma, podemos dizer que este macrolídeo possui amplo espectro de ação (TORKILDSEN; O'BRIEN, 2008; PETROPOULOS *et al.*, 2009).

Apesar dos efeitos *in vitro* e dos estudos feitos em determinadas populações terem mostrado os efeitos benéficos da ação anti-inflamatória dos macrolídeos nas doenças respiratórias em neonatos, o impacto causado pelas reações adversas descritas nas respostas clínicas traz a discussão do uso a longo-prazo e em quais populações pode-se utilizar os medicamentos de uma forma segura. Smith *et al.* (2015) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de identificar o uso e as reações adversas associadas à azitromicina em neonatos. Foram identificados 11 artigos envolvendo 473 neonatos. Foram relatadas 371 reações adversas principalmente de origem respiratória (358/1000 neonatos), neurológica (273/1000 neonatos) e gastrointestinais (196/1000 neonatos). Não houve diferença significativa na incidência de elevação de enzimas hepáticas entre o grupo azitromicina e placebo ($p = 0,76$). Houve quatro casos de estenose hipertrófica de piloro.

Alguns estudos apontaram que independente de sua atividade antimicrobiana potente, os antibióticos (ATBs) macrolídeos apresentam propriedades antiinflamatórias e antivirais (CULIC, O.; ERAKOVIC; PARNHAM, 2001; SHINKAI; PARK; RUBIN, 2005). Dentre seus efeitos mais relevantes estão a inibição da síntese e/ou secreção de citocinas pró-inflamatórias; efeitos nos neutrófilos através da inibição da migração (quimiotaxia) para os sítios de inflamação, inibindo a apoptose, fagocitose e adesão. Os macrolídeos parecem inibir a degranulação dos leucócitos, reduzir a inflamação eosinofílica e aumentar o transporte mucociliar, diminuindo a produção de muco *in vivo* e *in vitro*. Além disso, também podem provocar a redução da secreção das células caliciformes; redução da broncoconstrição através da diminuição da liberação da endotelina-1 e inibição de respostas colinérgicas do músculo liso das vias aéreas (HODGE *et al.*, 2006; BEIGELMAN *et al.*, 2010). Estudos

têm utilizado essa classe de medicamento como droga de ação imunomoduladora, com finalidades antiinflamatórias em várias doenças respiratórias, porém seu uso nestas situações ainda é relativamente recente (KNEYBER *et al.*, 2008; MAZUMDER; HOSSAIN; KABIR, 2009).

A intervenção benéfica de antibióticos macrolídeos já vem sendo estudada em doenças pulmonares tais como a fibrose cística (FC) (SAMSON *et al.*, 2016), a asma, as bronquiectasias e a bronquiolite viral aguda (BRUSSELLE; PAVORD, 2017). Além de sua ação antimicrobiana comprovadamente efetiva para diversos agentes, eles possuem uma atividade imunomoduladora antineutrófila que possibilitam seu uso também no tratamento da asma e bronquiolite viral aguda (STEIN, 2015).

Uma metanálise que avaliou o uso de macrolídeos em pacientes com FC incluiu 8 ensaios clínicos randomizados (ECR) e controlados por placebo (654 pacientes). O tratamento com azitromicina (focado em 7 dos ECRs deste estudo) resultou em melhoria significativa da função pulmonar das crianças com fibrose cística, principalmente em pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa* (CAI *et al.*, 2011). Um estudo multicêntrico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo realizado nos EUA com uma casuística de 185 pacientes não infectados por *P. aeruginosa* concluiu que a azitromicina não tem o mesmo efeito sobre a função pulmonar, mas que pode reduzir, consideravelmente, a ocorrência de exacerbações pulmonares agudas no grupo tratado. A incidência de efeitos colaterais não foi significativamente diferente entre grupo placebo e tratado com azitromicina (SAIMAN *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados na revisão sistemática realizada por Southern e colaboradores (SOUTHERN *et al.*, 2012) corroboram com os analisados nos estudos acima quanto ao resultado do uso de macrolídeos em fibrose cística; porém, considerando os poucos dados em longo-prazo e a preocupação de desenvolvimento de resistência bacteriana aos macrolídeos, as atuais evidências não são fortes o suficiente para indicar a azitromicina para todos os pacientes com fibrose cística.

A azitromicina é a droga de escolha no tratamento de infecção por *Ureaplasma* e prevenção da DBP pois tem as menores constantes inibitórias mínimas, inferiores a 0,6 µg / L para *Uu.* e *Up.* Além disso, a azitromicina tem sido avaliada em alguns estudos recentemente quanto à sua eficácia. No controlado por placebo de Gharehbaghi *et al.* (2012), realizado em uma população de 108 recém-nascidos prematuros que receberam azitromicina oral (10 mg / kg por 1 semana e 5 mg / kg por

1 semana), foi encontrada uma menor taxa de DBP nos pacientes tratados (25% de DBP vs. 43% no grupo placebo). Ballard, Anstead e Shook (2007) realizaram um estudo piloto com 43 bebês ≤ 1000 g de peso ao nascer, admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Universidade de Kentucky (nível III, centro de referência regional). O estudo piloto foi duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Os bebês foram randomizados para tratamento ou placebo dentro de 12 horas após o início da ventilação mecânica (VMI) e dentro de 72 horas após o nascimento. O grupo de tratamento recebeu azitromicina 10 mg / kg / dia por 7 dias, seguido de 5 mg / kg / dia azitromicina ou o placebo até que a criança não necessitasse mais de ventilação mecânica ou oxigênio suplementar, até um máximo de 6 semanas. A mortalidade, incidência de DBP, dias de VMI e outras morbidades não foram significativamente diferentes entre os grupos. O uso pós-natal de esteroides foi significativamente menor no grupo de tratamento [31% (6/19)] vs. grupo placebo [62% (10/16)] ($p = 0,05$). A duração da ventilação mecânica foi significativamente menor nos sobreviventes do tratamento, com uma mediana de 13 dias (1 a 47 dias) vs. 35 dias (1 a 112 dias) ($p = 0,02$).

Merchan e colaboradores (2015) realizaram uma pesquisa utilizando um curso de 3 dias com dose de 20 mg / kg de azitromicina administrada por via intravenosa em 15 recém-nascidos pré-termo para avaliar sua eficácia na erradicação do *Ureaplasma* e determinar sua segurança nessa população. Este regime de dosagem mostrou eficácia e segurança na erradicação do *Ureaplasma*, e os parâmetros do modelo farmacocinético foram estimados com alta precisão. Com base no estudo atual em recém-nascidos prematuros, um regime de 3 doses intravenosas de 20 mg / kg / dia de azitromicina parece ser seguro e eficaz, erradicando o *Ureaplasma* do trato respiratório em todos os indivíduos positivos para a cultura.

Nair, Loganathan e Soraisham (2014) realizaram uma metanálise e encontraram três estudos examinando a associação entre azitromicina administrada profilaticamente e o desenvolvimento de DBP e observaram uma redução modesta nos casos de DBP (RR 0,83, IC 95% 0,71-0,91, número necessário para tratar = 10). No entanto, os autores concluíram que o uso rotineiro de azitromicina nessa população deve aguardar novos estudos, incluindo farmacocinética e segurança do medicamento a longo prazo. Isso é particularmente importante, pois dados recentes mostram que o uso de antibióticos em bebês com muito baixo peso ao nascer pode realmente aumentar o risco de desenvolver DBP. Por exemplo, Novitsky, Tuttle,

Locke, Saiman, Mackley e Paul (2015) observaram que recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer que receberam antibióticos por mais de 48 horas durante a primeira semana de vida dobraram o risco de desenvolver DBP (OR ajustado 2,2; IC95% 1,4-3,5) e que cada dia adicional de antibióticos utilizado na primeira semana de vida aumentou o risco de desenvolver DBP (OR ajustado 1,2 por dia do antibiótico, IC 95% 1,1-1,2). Da mesma forma, Cantey *et al.* (2017) relataram recentemente que a cada dia adicional de uso de antibióticos nas 2 primeiras semanas de vida em bebês nascidos com menos de 29 semanas de gestação aumenta, significativamente, o risco de desenvolver DBP grave (OR 1,15, IC 95% 1,08–1,27).

Uma grande preocupação com o uso excessivo dos macrolídeos, de forma genérica, é a resistência bacteriana que pode induzir. Uma série de estudos tem demonstrado que o seu uso excessivo induz à resistência, principalmente em cepas de pneumococo. Nesse sentido, novos estudos para determinar sua real importância no tratamento das patologias citadas, bem como avaliações de dosagem e frequência de uso, são extremamente importantes para que a prática médica não resulte em mais problemas do que benefícios para a população (DA SILVA FILHO; PINTO; STEIN, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Os antibióticos macrolídeos têm propriedades antiinflamatórias e pressupõe-se que sejam capazes de inibir inflamação em múltiplos pontos na cascata inflamatória. A ventilação mecânica, embora necessária como suporte ao neonato com insuficiência respiratória grave, induz à resposta inflamatória pulmonar relevante.

Ações anti-inflamatórias incluem inibição de citocinas pró-inflamatórias. Não é conhecido o comportamento das interleucinas pró-inflamatórias IL- 1 β , IL- 2, IL-6, IL- 8, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10, pré e após uso de azitromicina. A discussão que gera dúvida envolve as vantagens e desvantagens do uso deste antimicrobiano na lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. A dosagem destes mediadores auxiliará nesta questão, especialmente comparando ao efeito (se positivo) da intervenção versus placebo.

Além disso, o estabelecimento da presença de um efeito anti-inflamatório após o emprego da azitromicina é importante para o estudo de fatores de proteção contra a injúria pulmonar e posteriores sequelas tais como a displasia broncopulmonar.

4 HIPÓTESE

A hipótese desse estudo é de que a azitromicina reduz a inflamação pulmonar induzida pela ventilação mecânica em prematuros, conferindo um caráter protetor.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da azitromicina na prevenção da lesão induzida pela VM mediada por citocinas nos níveis plasmáticos das citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) em recém-nascidos pré-termo, submetidos à ventilação mecânica nas primeiras 72h de vida, internados na Unidade de Tratamento Intensivo do HCPA, pré e pós uso de azitromicina.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito da azitromicina nos desfechos perinatais óbito e displasia broncopulmonar;

Avaliar a associação entre a presença do Uu no sangue dos RNs pré-termo e a resposta ao uso de azitromicina, através da dosagem de citocinas e desfechos neonatais;

Avaliar a associação entre a presença do Uu e das citocinas no sangue dos RNs pré-termo e os diversos desfechos da sua evolução clínica.

6 METODOLOGIA

6.1 DESENHO DO ESTUDO

Ensaio clínico duplo-cego randomizado placebo controlado que encontra-se registrado no *Clinical Trials* sob o NCT03485703.

6.2 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Constituída pelos recém-nascidos de muito baixo peso admitidos, na Unidade de Tamento Inensiva Neonatal, durante o período de coleta de dados do estudo (agosto de 2013 a maio de 2016), em uso de ventilação mecânica invasiva nas primeiras 72h de vida. Estudo restrito a neonatos admitidos na UTIN do HCPA.

6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Malformações congênitas maiores ou síndromes cromossômicas.

Mães portadoras do vírus da imunodeficiência humana, HIV e STORCH.

6.4 TAMANHO DA AMOSTRA

No cálculo do tamanho da amostra foram considerados os achados publicados em estudo prévio de Ballard *et al.* (2011); para detectar uma diferença de um DP entre as médias das citocinas nos dois grupos, considerando um α de 0,05 e um poder de 90%, foram necessários aproximadamente, 44 pacientes em cada grupo (total de 88).

6.5 LOGÍSTICA

Os pacientes prematuros, logo ao nascer, foram avaliados por médico residente ou neonatologista plantonista na UTI Neonatal, encaminhados para internação, conforme a evolução em sala de parto, idade gestacional e peso de nascimento. Para cada paciente admitido na UTI por prematuridade com sinais de angústia respiratória, durante o período de estudo, a investigadora foi avisada através de um formulário de

dados que foi gerado a partir da observação. A Idade gestacional foi avaliada pelos dados maternos e confirmada por ultra-sonografia obstétrica precoce e exame clínico neonatal.

A idade gestacional foi determinada pela melhor estimativa obstétrica ou pelo exame físico do recém-nascido. A DBP foi definida como necessidade de oxigênio por um período ≥ 28 dias de vida.

As medidas das citocinas foram realizadas usando o kit disponível comercialmente HUMAN CYTOKINE LINCOPLEX (Linco Research; St Charles, Missouri). É um ensaio de multiplex para a determinação quantitativa simultânea dessas citocinas. As leituras foram realizadas pelo Luminex 100 (Austin, Texas) com *software* apropriado.

Todas as amostras foram então centrifugadas por 5 minutos em 5000 rotações por minuto (rpm) antes do ensaio a fim de obter 300 mcL de plasma. O plasma foi congelado a -80°C para análise laboratorial conjunta, identificando-se pelo número e momento da coleta da amostra.

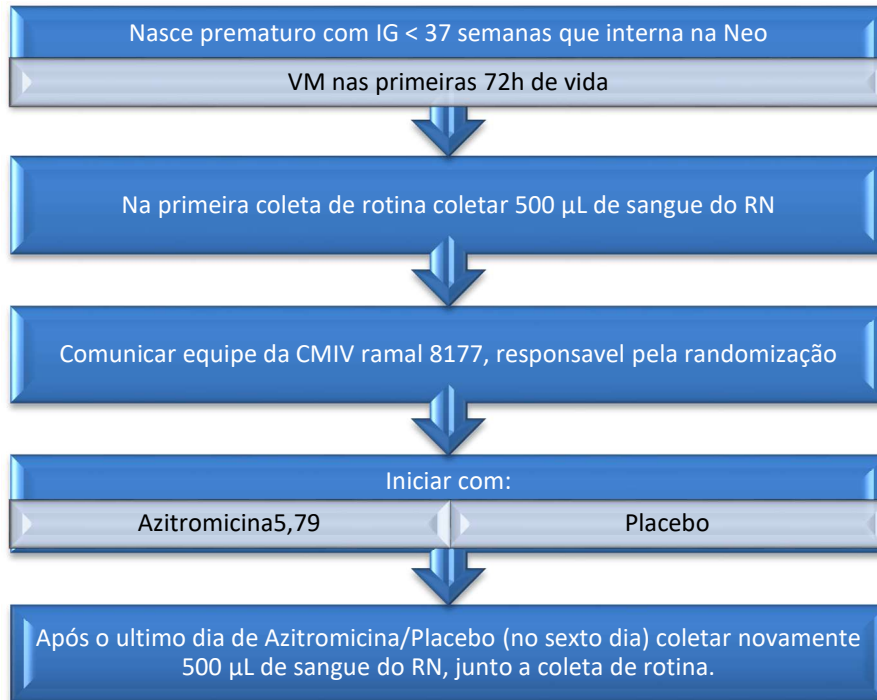
Para a identificação do *Ureaplasma* foi utilizada a mesma amostra que foi centrifugada e congelada, com temperatura de -80° . No momento da análise as amostras foram descongeladas e realizadas a identificação do Uu e Up através do *Kit Ureaplasma parvum/urealyticun Real-TM (Sacace Biotechnologies)*. Utilizou-se a estrutura do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para centrifugação, congelamento para análise e para a realização dos ensaios.

Os pacientes com indicação de VM eram submetidos a exames conforme a rotina do Serviço de Neonatologia, assim, quando da elegibilidade e aceitação do ingresso no estudo, era coletada uma alíquota adicional de 500 μL de sangue em tubo de EDTA para posterior análise de citocinas e PCR para *Ureaplasma*. Ao ingressar no estudo, um grupo de recém-nascidos recebeu azitromicina EV na dose de 10mg/Kg/dia e outro grupo recebeu placebo (SF 0,9%) no mesmo volume por cinco dias. Não houve coleta de sangue exclusivamente para o estudo. Os pacientes foram acompanhados durante a internação hospitalar.

Após 5 dias da randomização, outra amostra era coletada para exames, citocinas PCR para *Ureaplasma*. Não houve coletas exclusivamente para o estudo. A pesquisadora (CR) era então avisada desses nascimentos, analisava os casos e preenchia ficha de dados após a aplicação do termo de consentimento livre e

esclarecido (TCLE) dos casos elegíveis conforme visível no Fluxograma do estudo, (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma do estudo



Fonte: Elaboração própria (2019)

6.6 DOSAGEM DAS INTERLEUCINAS

Foi utilizada a estrutura da Unidade de Análise de Moléculas e Proteínas do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para centrifugação e congelamento das amostras, com a realização do ensaio no mesmo local, sob a supervisão do Dr. Hugo Bock. As medidas das citocinas foram realizadas usando o kit MILLIPLEX® Human Cytokine / Chemokine HCYTOMAG-60K – ensaio de multiplex para a determinação quantitativa simultânea de interleucinas ou outras substâncias, conforme kit e protocolos previamente estabelecidos. A leitura foi realizada pelo Luminex 100 (Austin, Texas) com *software* apropriado.

A tecnologia Luminex™ xMAP (MAP = Perfil de Múltiplos Analitos, x = variável, como citocinas, oligonucleotídeos, etc) dosa múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas, tecnologia aplicável a imunoenaios.

Esse método envolve um processo exclusivo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que pode ser identificada pelo instrumento Luminex. Os kits são comercialmente disponíveis, se fundamentando na reação e/ou interação do enzimo- imunoensaio; apresentam coeficientes de variação intra e inter ensaio inferiores a 5%.

Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, é adicionado um anticorpo de detecção. A detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (SAPE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 100 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera. Cada kit contém todos os componentes necessários (incluindo padrões, controles de qualidade, microesferas exclusivas conjugadas a anticorpos, anticorpos de detecção, tampão de ensaio e tampão de lavagem) para ensaio de 96 cavidades em microplaca de titulação. O volume mínimo de amostra necessário é de $< 50 \mu\text{L}$.

Os componentes do kit são armazenados entre 2 e 8°C, e, uma vez que os padrões e controles tenham sido reconstituídos, são armazenados em $\leq -20^\circ\text{C}$ em tubos de polipropileno. As microesferas conjugadas a anticorpos, anticorpos de detecção e a SAPE não devem ser congeladas. Para a reação ocorrer também é necessária a obtenção do Fluido de Revestimento (*sheath fluid*), essencial para a condução dos feixes de laser. As amostras dos pacientes, que ficaram armazenadas no freezer a -80°C durante o período de coleta, foram descongeladas em temperatura ambiente 24 horas antes do início do experimento.

Preparação das microesferas: cada frasco de microesferas conjugadas foi agitado no vórtex por um minuto, aspirou-se 60 μL de cada um e adicionou-se 2,64 ml de diluente para formar 3 ml em um frasco de misturas que é disponibilizado no kit.

Preparação dos Controles de Qualidade: inicialmente os controles 1 e 2 foram reconstituídos utilizando-se 250 μL de água deionizada e homogeneizados no vórtex.

Após dez minutos, foram transferidos a tubos de polipropileno. Preparação do Tampão de lavagem: 30 ml de tampão foram diluídos em 270 ml de água deionizada e armazenados em frasco adequado.

Preparação do Soro Matriz: foi adicionado 1 ml de água deionizada ao frasco do soro matriz e deixou-se dez minutos em repouso. Preparação dos padrões de citocinas humanas: o padrão foi reconstituído com 250 ml de água deionizada para uma concentração total de 10000 pg/mL para todos os analitos. Foi misturado em vórtex por dez segundos, depois em repouso por dez minutos para depois ser transferido ao tubo de polipropileno para ser usado como o padrão de 10000 pg/mL. A seguir, foram identificados cinco tubos, que se tornariam os padrões 2000, 400, 80, 16 e 3,2 pg/mL. Em cada tubo, adicionado 200 µL de tampão de ensaio. Aspirou-se 50 µL do padrão com 10000 pg/mL e adicionou-se no tubo de 2000 pg/mL, misturou-se no vórtex, depois aspirou-se 50 µL desse último tubo e adicionou-se no tubo de 400 pg/mL, até o último tubo. Após preparados todos os padrões, controles e tampões, foi necessário preparar a microplaca de titulação: primeiro foi umidificada com 200 µL de tampão de ensaio em cada pocinho, selada com o papel-filme adequado que vem no kit e agitada por dez minutos no agitador de placas. Após removeu-se o tampão por vácuo.

Em seguida, aspiraram-se 25 µL de cada padrão e dos controles, adicionados à microplaca. Quanto ao padrão zero, adicionaram-se 25 µL do tampão de ensaio e depois 25 µL de tampão aos poços da placa onde ficaram as amostras. Adicionaram-se aos padrões e controles 25 µL de soro matriz, e então 25 µL de cada amostra aos seus respectivos poços. Para finalizar, adicionaram-se a todos os poços 25 µL de microesferas.

A microplaca foi selada e deixada por 16 horas em geladeira a 4 °C sob agitação. No dia seguinte, retirou-se a placa da geladeira, removeu-se o líquido por vácuo e se lavou com 200 µL de tampão de lavagem duas vezes, removendo novamente o líquido por vácuo. Nesse momento, adicionados a cada poços 25 µL dos anticorpos de detecção, microplaca selada e deixada por uma hora no agitador de placas.

Após essa etapa, foi adicionado 25 µL da SAPE à placa, que foi selada e deixada por 30 minutos no agitador de placas. Novamente removeu-se o líquido por vácuo e se lavou com 200 µL de tampão de lavagem duas vezes, removendo novamente o líquido por vácuo. Adicionou-se por fim o Fluido de Revestimento - 150 µL, agitando-se a placa por mais cinco minutos no agitador de placas e, então,

inserindo-a no leitor do Luminex. Após a leitura de cada interleucina em cada sítio, o programa construiu curvas padrões, através das quais se obtiveram os resultados em pg/dL para cada paciente, em duplicata, após a aplicação de equações polinomiais de base quatro; o que permitiu as correções da leitura dos feixes luminosos de cada citocina, conforme pressuposto equacional:

$$P(x) = a_0x^n + a_1x^{n-1} + a_2x^{n-2} + \dots + a_{n-1}x + a_n, \text{ onde:}$$

$P(x)$ = valor final em pg/ml de cada citocina
 Números complexos a_0, a_1, \dots, a_n são os coeficientes do luminômetro fornecidos pelo Luminex 100;

X_1 = valores brutos da IL-1 β ;

X_2 = valores brutos da IL-6;

X_3 = valores brutos da IL-8;

X_4 = valores brutos da TNF- α ;

X_5 = valores brutos da IL-10;

$n = 4$ (grau do polinômio aplicado).

6.7 EXTRAÇÃO DO DNA E PCR TEMPO REAL

Foi utilizada a estrutura da Unidade de Análise de Moléculas e Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para centrifugação e congelamento das amostras, com a realização do ensaio no mesmo local, sob a supervisão do Dr. Hugo Bock.

O DNA de *Ureaplasma parvum* / *urealyticum* foi extraído dos espécimes, amplificados usando amplificação em tempo real e detectado usando reflexos fluorescente sondas de corante específicas para o *Ureaplasma Sacace*™ Ur. parvum / urealyticum Real-TM VER 04.09.2017 inibição. O parvum do *Ureaplasma* é detectado no canal FAM (verde), *Ureaplasma urealyticum* no canal JOE (amarelo) / Cy3 / HEX e no DNA do IC no ROX (Orange) / Texas Canal vermelho.

O Ur. parvum / urealyticum Real-TM foi armazenado na UAMP a 2-8 ° C, exceto para PCR-mix-2 e TaqF Polimerase que deve ser armazenada a -16 ° C. O DNA-sorb-A deve ser armazenado a 2-8 ° C.

As amostras foram preparadas seguindo as recomendações do fabricante:

Primeiramente, a solução de lise e solução de lavagem (no caso de armazenamento a + 2-8 ° C) foi aquecida a 60–65 ° C até o desaparecimento dos

cristais de gelo. Foi preparada a quantidade necessária de 1,5 ml de tubos de polipropileno, incluindo um tubo para controle negativo de extração, adicionada a cada tubo 10 µl de controlo interno e 300 µl de solução de lise, após, adicionada 100 µl de amostras ao tubo apropriado. Os controles foram preparados da seguinte maneira:

- a) adicionar 100 µl de C- (Controlo Negativo fornecido com o kit de amplificação) ao tubo Cneg.

Agitar os tubos no *Vortex* e incubar por 5 min a 65 ° C. Centrifugar por 5-7 segundos.

Após esse processo misturar no *Vortex* vigorosamente o *Sorbent* e adicionar 20 µl para cada tubo. Novamente passar pelo *Vortex* por 5-7 segundos e incubar todos os tubos por 3 min em temperatura ambiente repetindo esse passo. Centrifugar todos os tubos por 30 segundos a 5000g e usar uma micropipeta com um aerossol plugado ponta de barreira, remover cuidadosamente e descartar o sobrenadante de cada tubo sem perfurar a massa cimentada no fundo do tubo. Adicionar 500 µl de solução de lavagem a cada tubo, *Vortex* muito vigorosamente e centrifugar por 30 segundos a 10000g. Remover e descartar o sobrenadante de cada tubo repetindo esse passo e após pôr para incubar todos os tubos com a tampa aberta durante 5-10 min a 65 ° C. Ressuspender o sedimento em 100 µl de eluente de DNA. Incubar por 5 min a 65 ° C e agite no *Vortex* simultaneamente. Centrifugar os tubos durante 1 min a 12000 g.

O sobrenadante contém DNA pronto para amplificação. Se a amplificação não for executada, no mesmo dia de extração, as amostras processadas podem ser armazenadas a 2-8 ° C por no máximo período de 5 dias ou congelado a -20 ° / -80 ° C, como foi no caso deste estudo.

A próxima etapa de execução da PCR em tempo Real também foi realizada na UAMP sob supervisão do Dr Hugo Bock.

1. Inicialmente prepara-se a quantidade necessária de tubos de reação para amostras (N) e controles (N + 2).

Prepare no novo tubo estéril para cada amostra 10 * (N + 1) µl de PCR-mix-1-FRT, 5,0 * (N + 1) de PCR-mix-2 e 0,5

* (N + 1) de Polimerase TaqF. *Vortex* e centrifugar por 2-3 segundos. Adicionar a cada tubo 15 µl de mistura reacional e 10 µl de amostra de DNA extraída tubo, misturando por pipetagem. Preparar para cada painel 2 controles:

- adicionar 10 µl de tampão de ADN ao tubo com controlo negativo de amplificação;
- adicionar 10 µl de Controlo Positivo C + ao tubo marcado com Controlo Positivo de Amplificação;

Insira os tubos no termociclador realizando a programação conforme instrução o quadro abaixo (quadro 1).

Quadro 1 – Manual de Instruções SACACE Biotechnologies

Amplification

1. Create a temperature profile on your Real-time instrument as follows:

Stage	Rotor type instruments ¹				Plate type or modular instruments ²			
	Temp, °C	Time	Fluorescence detection	Cycle repeats	Temp, °C	Time	Fluorescence detection	Cycle repeats
Hold	95	15 min	–	1	95	15 min	–	1
Cycling	95	5 s	–	5	95	5 s	–	5
	60	20 s	–		60	20 s	–	
	72	15 s	–		72	15 s	–	
Cycling 2	95	5 s	–	40	95	5 s	–	40
	60	20 s	FAM(Green), JOE(Yellow), Rox (Orange)		60	30 s	FAM, JOE/HEX/Cy3, Rox/TexasRed	
	72	15 s	–		72	15 s	–	

¹ For example Rotor-Gene™ 3000/6000/Q (Corbett Research, Qiagen)

² For example, SaCycler-96™ (Sacace), CFX/IQ5™ (BioRad); Mx3005P™ (Agilent), ABI® 7300/7500 Real Time PCR (Applied Biosystems), SmartCycler® (Cepheid)

Fluorescence is detected at the 2nd step of Cycling 2 stage (60 °C) in FAM/Green, JOE/Yellow/Hex/Cy3 and ROX (Orange) fluorescence channels.

Ureaplasma parvum is detected on the FAM (Green) channel, *Ureaplasma urealyticum* on the JOE (Yellow)/Cy3/HEX channel, IC on the ROX (Orange) channel

6.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO

6.8.1 Variáveis dependentes

Serão consideradas variáveis dependentes: Níveis das citocinas, PCR para ureaplasma, DBP e óbito.

6.8.2 Variáveis independentes

Serão consideradas variáveis independentes:

Do RN: idade gestacional (determinada pela melhor estimativa obstétrica ou pelo exame físico do recém-nascido), sexo, peso de nascimento, Apgar no primeiro e no quinto minuto, procedimentos de reanimação, administração de surfactante, corticóide pós natal, morbidades e intercorrências do RN como enterocolite necrosante, pneumonia, sepse precoce e /ou tardia, PCA, hemorragia periintraventricular, colestase NPT, tempo de permanência na UTI, procedimentos submetidos, tempo de permanência em ventilação assistida (necessidade de pressão positiva contínua nas vias aéreas, ou CPAP, e/ou ventilação mecânica), oxigenoterapia.

Maternas: corioamnionite histológica, corticóide antenatal e via de parto.

6.9 RANDOMIZAÇÃO

Os pacientes com até 72h de vida em ventilação mecânica por no mínimo 12h, foram randomizados e receberam azitromicina EV na dose de 10 mg/Kg/dia uma vez ao dia, ou placebo (SF 0,9%) no mesmo volume, foi coletada uma alíquota de 500uL em tubo de ETDA para análise de citocinas e PCR para *Ureaplasma*. Após 5 dias do início uso da azitromicina ou placebo uma nova amostra foi obtida para dosagem citocinas e PCR para *Ureaplasma*.

A randomização dos pacientes se deu por sequência simples, gerada por computador no site Randomization.com (www.randomization.com). Os RNs foram randomizadas em grupo intervenção e grupo controle. Um profissional externo ao grupo de pesquisa, no caso, o farmacêutico responsável pela diluição e liberação da medicação, ficou responsável pela lista gerada para alocação dos pacientes.

A prescrição foi realizada pelo médico responsável.

Houve recolhimento da medicação do estudo (azitromicina) pelo fabricante da medicação sob orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por seis meses devido a um problema com um lote inteiro do produto. Razão pela qual, o estudo ficou sem alocação ou inclusões de janeiro a junho 2014.

6.10 CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram organizados e analisados com auxílio do *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0. As variáveis

qualitativas foram expressas por meio de frequência e porcentagem. As variáveis quantitativas foram expressas por meio de média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartil.

As análises estatísticas inferenciais foram realizadas com um nível de significância $\alpha = 0,05$, portanto, nível de confiança de 95%. A normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi investigada por meio do teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. As variâncias das variáveis quantitativas foram verificadas quanto à homogeneidade por meio do teste de Levene.

A comparação das médias das variáveis quantitativas entre as categorias das variáveis qualitativas dicotômicas foi realizada por meio dos testes t de Student e U de Mann-Whitney nos casos de amostra independente, teste t de Student para amostras em pares e T de Wilcoxon, nos casos de amostra pareada. Para as variáveis interleucinas foi utilizada a técnica de logaritimização através do teste T-student.

A associação entre as variáveis qualitativas foi investigada por meio do teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) para as amostras não pareadas e, e teste exato de Fisher para as amostras pareadas.

O cálculo do risco relativo da DBP, do óbito e do desfecho composto DBP/óbito da azitromicina versus placebo no subgrupo *Ureaplasma* positivo, foi realizado através do programa WINPEPI, versão 11.65, estimando-se um intervalo de confiança de 95%. A utilização do programa se deu pela vantagem de ajuste das categorias com percentuais igual a zero (óbito-AZM).

6.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Atendendo à Resolução 466/12, que regulamenta a pesquisa com seres humanos, o estudo foi submetido para avaliação quanto aos seus aspectos metodológicos e éticos pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo emitido parecer favorável, sob o número 110639 (ANEXO A), com termo de consentimento informado assinado pelos pais ou responsáveis. O presente estudo encontra-se registrado no *Clinical Trials* sob o NCT03485703.

Para o presente estudo foram utilizados dados da ficha clínica, obtidos por meio de revisão do prontuário eletrônico, foram transcritos para um formulário padronizado

(APÊNDICE A), para cada criança, que foi anonimizada e identificada por código de número.

Foi preenchido o Termo de Compromisso para Utilização de Dados, que é fornecido pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA. Deste modo, foi assegurada a confidencialidade das informações contidas nos bancos que possam identificar os indivíduos. Também foi dado aos pais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para solicitar a autorização para a coleta de sangue e inclusão no estudo.

REFERÊNCIAS

- ABMAN, S. H. Bronchopulmonary dysplasia. **New York: Informa HealthCare USA Inc.**, 2010.
- AGHAI, Z. H. *et al.* Azithromycin supresses activation of nuclear factor-kappa b and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate from premature infants. **Pediatric Research**, v. 62, p. 483-8, Oct. 2007.
- AGUIAR, C. R. *et al.* O recém-nascido de muito baixo peso. 2. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.
- ALLISON, B. J. *et al.* Ventilation of the very immature lung in utero induces injury and BPD-like changes in lung structure in fetal sheep. **Pediatric Research** v. 64, n. 4, p. 387-92, Oct. 2008.
- ALTENBURG, J. *et al.* Effect of azithromycin maintenance treatment on infectious exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: the bat randomized controlled trial. **Jama**, v. 309, n. 12, p. 1251-9, Mar. 2013.
- AMBALAVANAN, N.; CARLO, W. A. Lung-protective ventilation strategies in neonatology. **Semin perinatol**, v. 4, n. 30, p. 192-9, 2006.
- AMSDEN, G. W. Anti-Inflammatory Effects of macrolides—an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 10-21, Jan. 2005.
- ARAYICI, S. *et al.* The effect of histological chorioamnionitis on the short-term outcome of preterm infants ≤ 32 weeks: a single-center study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 27, n. 11, p. 1129-33, 2014.
- AVERY, M. E.; MEAD, J. Surface properties in relation to atelectasia and hyaline membrane disease. **AMA journal of diseases of children**, v. 97, n. 5, p. 517-23, May 1959.
- BALANY, J.; BHANDARI, V. Understanding the impact of infection, inflammation, and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. **Frontiers in medicine**, v. 2, p. 90, Dec. 2015.
- BALLARD, H. O. *et al.* Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pediatric Pulmonology**, v. 46, n. 2, p. 111-8, Feb. 2011.
- BALLARD, H. O.; ANSTEAD, M. I.; SHOOK, L. A. Azitromycin in the extremely low birth weight for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. **Respiratory Research**, v. 8, n. 41, Jun. 2007.

BANCALARI, E. Bronchopulmonary dysplasia. *In*: LAURENT, G. J.; SHAPIRO, S. D. (ed.). **Encyclopedia of Respiratory Medicine**. Four-Volume Set. Elsevier Inc. 2006. p. 300-305.

BARRINGTON, K. J.; BULL, D.; FINER, N. N. Randomized trial of nasal synchronized intermittent mandatory ventilation compared with continuous positive airway pressure after extubation of very low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 107, n. 4, p. 638-41, 2001.

BEEN, J. V. *et al.* Chorioamnionitis as a Risk Factor for Necrotizing Enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 2, p. 236-242.e232, Feb. 2013.

BEEN, J. V. *et al.* Chorioamnionitis alters the response to surfactant in preterm infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. 10-5.e1, Jan. 2010.

BEIGELMAN, A. *et al.* Azithromycin attenuates airway inflammation in a mouse model of viral bronchiolitis. **Respiratory Research**, v. 11, p. 90, June 2010.

BERESFORD, M. W.; SHAW, N. J. Detectable il-8 and il-10 in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome. **Pediatric Research**, v. 52, n. 6, p. 973-8, Dec. 2002.

BERGER, A. *et al.* Intrauterine infection with ureaplasma species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. **J Perinat Med**, v. 37, n. 1, p. 72-8, 2009.

BERNER, R. *et al.* Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, interleukin (il)-1beta, il-6, il-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. **Pediatric Research**, v. 44, n. 4, p. 469-77, Oct. 1998.

BHANDARI, V.; ELIAS, J. A. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 4-18, Feb. 2006.

BIERNAT-SUDOLSKA, M.; ROJEK-ZAKRZEWSKA, D.; LAUTERBACH, R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 3, p. 609-11, 2006.

BLENCOWE, H. *et al.* 15 Million Preterm births: priorities for action based on national, regional and global estimates. *In*: WORLD Health Organization. **Born Too Soon: the global action report on preterm birth**. Geneva: WHO Press, 2012. p. 16-31.

BOHRER, B.; SILVEIRA, R. C.; NETO, E. C.; PROCIANOY, R. S. Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. 16-9, Sep. 2009.

BOSE, C. L.; DAMMANN, C. E. L.; LAUGHON, M. M. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 93, n. 6, p. F455-F461, Nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde**. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRUSSELLE, G.; PAVORD, I. Azithromycin in uncontrolled asthma. **The Lancet**, v. 390, n. 10095, p. 629-30, 2017.

BURRI, P. H. Fetal and postnatal development of the lung. **Annual Review Of Physiology**, v. 46, n. 1, p. 617-28, 1984.

BURRI, P. H: Structural aspects of postnatal lung development – **Alveolar Formation and Growth**. **Biol Neonate** 2006; 89:313-322. doi: 10.1159/000092868

BURRI, P. H.; TAREK, M. R. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. **The Anatomical Record**, v. 228, n. 1, p. 35-45, 1990.

CAI, Y. *et al.* Effectiveness and safety of macrolides in cystic fibrosis patients: a meta-analysis and systematic review. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 5, p. 968-78, May 2011.

CANTEY, J. B. *et al.* Antibiotic exposure and risk for death or bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 181, p. 289-93, Feb. 2017.

CAPUOLONGO, E. *et al.* Comparison of serum levels of seven cytokines in premature newborns undergoing different ventilatory procedures: high frequency oscillatory ventilation or synchronized intermittent mandatory ventilation. **European Cytokine Network**, v. 16, n. 3, p. 199-205, Sep. 2005.

CARVALHO, C. G. *et al.* Preterm neonates with respiratory distress syndrome: ventilator-induced lung injury and oxidative stress. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, Apr. 2018.

CARVALHO, C. G.; SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Ventilator-induced lung injury in preterm infants. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, n. 4, p. 319-26, Oct./Dec. 2013.

DE CARVALHO, W. B. *et al.* (ed.). **Ventilação pulmonar mecânica em pediatria e neonatologia**. 2. ed. Ver. Atual. Ampl. São Paulo: Atheneu, 2005.

CASSELL, G. H.; WAITES, K. B.; CROUSE, D. T. Mycoplasmal infections. *In*: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. (ed.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 733-767.

CAZZOLA, M. B. F. *et al.* Role of macrolides as immunomodular agents. **Clinical Pulmonary Medicine**, v. 13, n. 5, p. 274-81, 2006.

CENTRE DE REFERENCE DES MALADIES RESOIPATOIRES RARES. **Development of the Respiratory System: the stages.** 2012.

CHAKKARAPANI, A. A.; PAES, B.; SHIVANANDA, S. Macrolides do not affect the incidence of moderate and severe bronchopulmonary dysplasia in symptomatic ureaplasma-positive infants. **Acta Paediatrica**, v. 104, n. 10, p. e427-e432, Oct. 2015.

CHALFUN, G. *et al.* Fatores associados à morbidade respiratória entre 12 e 36 meses de vida de crianças nascidas de muito baixo peso oriundas de uma uti neonatal pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p. 1399-408, jun. 2009.

CHANDRUPATLA, S.; DEMETRIS, A. J.; RABINOVITZ, M. Azithromycin-induced intrahepatic cholestasis. **Dig Dis Sci**, v. 47, v. 10, p. 2186-8, Oct. 2002.

CHANG, H.; CLAURE, N.; D'UGARD, C.; TORRES, J.; NWAJEL, P.; BANCALARI, E. Effects of synchronization during nasal ventilation in clinically stable preterm infants. **Pediatric Research**, v. 69, n. 1, p. 84-89, Jan. 2011.

CHEN, M. L. *et al.* Placenta microbiology and histology and the risk for severe retinopathy of prematurity. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, n. 10, p. 7052-8, Sep. 2011.

CLEMENT, A. *et al.* Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: a double blind, placebo controlled trial. **Thorax**, v. 61, n. 10, p. 895-902, Oct. 2006.

CLIFFORD, V. *et al.* Ureaplasma: pathogen or passenger in neonatal meningitis? **The Pediatric infectious disease journal**, v. 29, n. 1, p. 60-4, jan. 2010.

COOLS, F.; OFFRINGA, M.; ASKIE, L. M. Elective high frequency oscillatory ventilation versus conventional ventilation for acute pulmonary dysfunction in preterm infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. CD000104, Mar. 2015.

COPLAND, I.; POST, M. Lung development and fetal lung growth. **Paediatric respiratory reviews**, v. 5, n. A, p. S259-64, 2004.

COX, C. *et al.* The common vaginal commensal bacterium ureaplasma parvum is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine**, v. 29, n. 22, p. 3646-51, Nov. 2016.

CULIC, O.; ERAKOVIC, V.; PARNHAM, M. J. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1-3, p. 209-29, Oct. 2001.

CUMMINGS, J. J.; POLIN, R. A.; Noninvasive respiratory support. **Pediatrics**, v. 137, n. 1, 2016.

DA SILVA FILHO, L. V.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in lung diseases: recent literature controversies. **Jornal de pediatria**, v. 91, p. S52-60, 2015.

DARGAVILLE, P. A.; TINGAY, D. G. Lung protective ventilation in extremely preterm infants. **Journal of paediatrics and child health**, v. 48, n. 9, p. 740-6, 2012.

DATASUS. **MS/SVS/DASIS** - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC. [201-]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Acesso em: 30 ago. 2019.

DE ANDRADE, L. C. F.; BASTOS, M. G. Sistema receptor para interleucina-2 (IL-2). **J Bras Nefrol**, v. 17, n. 2, p. 78-84, 1995.

DE MELLO, R. R.; DUTRA, M. V.; LOPES, J. M. Morbidade respiratória no primeiro ano de vida de prematuros egressos de uma unidade pública de tratamento intensivo neonatal. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, p. 503-10, Apr. 2004.

DE SOUZA, D. M. L. *et al.* Prevalência de prematuridade e fatores associados no estado do rio grande do sul. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4052-70, 2019.

DiGIULIO, D. B. *et al.* Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3056, Aug. 2008.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1. *In*: THOMPSON, A. (ed.). **The Cytokine Handbook**. London: Academic Press, 2003. p. 47-82.

DUARTE, P. E. C. R. **Fatores Associados à Displasia Broncopulmonar**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

EHRENKRANZ, R. A. *et al.* Validation of the national institute of health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1353-60, Dec. 2005.

EQUI, A.; BALFOUR-LYNN, I. M.; BUSH, A.; ROSENTHAL, M. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. **The Lancet**, v. 360, n. 9338, p. 978-84, Sept. 2002.

ERIKSSON, L. *et al.* Prenatal inflammatory risk factors for development of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatric pulmonology**, v. 49, n. 7, p. 665-72, July 2014.

FAUROUX, B. *et al.* Respiratory morbidity of preterm infants of less than 33 weeks gestation without bronchopulmonary dysplasia: a 12-month follow-up of the castor study cohort. **Epidemiology & Infection**, v. 142, n. 7, p. 1362-74, July 2014.

FLORESCU, D. F.; MURPHY, P. J.; KALIL, A. C. Effects of prolonged use of azithromycin in patients with cystic fibrosis: a meta-analysis. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 467-72, Mar. 2009.

FONSECA, L. T. **Prevalência da infecção por ureaplasma urealyticum e parvum em recém-nascidos de muito baixo peso**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FORONDA, F. K. *et al.* The impact of daily evaluation and spontaneous breathing test on the duration of pediatric mechanical ventilation: a randomized controlled trial. **Critical Care**, v. 39, n. 11, p. 2526-33, Nov. 2011.

FRANK, J. A.; PARSONS, P. E.; MATTHAY, M. A. Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. **Chest**, v. 130, n. 6, p. 1906-14, 2006.

FRIEDRICH, L.; CORSO, A. L.; JONES, M. H. Prognóstico pulmonar em prematuros. **Jornal de pediatria**, v. 81, n. 1, p. S79-S88, 2005.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FUJIWARA, T. *et al.* Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. **Lancet**, v. 1, n. 8159, p. 55-9, Jan. 1980.

GERBER, S. *et al.* Detection of ureaplasma urealyticum in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, n. 3, p. 518-21, Feb. 2003.

GHAREHBAGHI, M. M. *et al.* Efficacy of azithromycin for prevention of bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Turkish journal of medical sciences**, v. 42, n. 6, p. 1070-5, 2012.

GIBSON, A. M.; DOYLE, L. W. Respiratory outcomes for the tiniest or most immature infants. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**., v. 19, n. 2, p. 105-11, Nov. 2013.

GIUGNO, K. M.; MACHADO, D. C.; AMANTÉA, S. L.; MENNA-BARRETO, S. S. Concentrações de interleucina-2 na secreção nasofaríngea de crianças com bronquiolite viral aguda pelo vírus respiratório sincicial. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 4, p. 315-20, ago. 2004.

GOLDENBERG, R. L. *et al.* The alabama preterm birth study: umbilical cord blood ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 198, n. 1, p. 43.e1-43.e5, Jan. 2008.

GOLDSMITH, J. P.; KAROTKIN, E. H. Introduction to assisted ventilation. In: GOLDSMITH, J. P.; KAROTKIN, E. H. (ed.). **Assisted Ventilation of the Neonate**. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2003. p. 1-14.

GOODMAN, G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 2012.

GREENOUGH, A. Long-term pulmonary outcome in the preterm infant. **Neonatology**, v. 93, p. 324-7, 2008.

GRONECK, P. *et al.* Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. **Pediatrics**, v. 93, n. 5, p. 712-8, May 1994.

GUINSBURG, R. *et al.* Death or survival with major morbidity in vlbw infants born at brazilian neonatal research network centers. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 6, p. 1005-9, Mar. 2016.

GUINSBURG, R.; MIYOSHI, M. H. Ventilação pulmonar mecânica convencional no período neonatal. *In*: KOPELMAN, B. I.; SANTOS, A. M. N.; GOULART, A. L.; ALMEIDA, M. F. B.; MIYOSHI, M. H. **Diagnóstico e Tratamento em Neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 149-59.

HARTLING, L.; LIANG, Y.; LACAZE-MASMONTEIL, T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 1, p. F8–F17, Jan. 2012.

HASSAN, H. E. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and biologic effects of azithromycin in extremely preterm infants at risk for ureaplasma colonization and bronchopulmonary dysplasia. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 9, p. 1264-1275, 2011.

HILLMAN, N. H. *et al.* Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, n. 6, p. 575-81, Sep. 2007.

HISLOP, A. A. Airway and blood vessel interaction during lung development. **Journal of anatomy**, v. 201, n. 4, p. 325-34, Oct. 2002.

HODGE, S. *et al.* Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 3, p. 486-95, Sep. 2006.

HWANG, J. S.; REHAN, V. K. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia: pathophysiology, prevention, and treatment. **Lung**, v. 196, n. 2, p. 129-38, Apr. 2018.

ISAYAMA, T. *et al.* Revisiting the definition of bronchopulmonary dysplasia effect of changing panoply of respiratory support for preterm neonates. **Jama pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 271-279, Mar. 2017.

JOBE, A. H. The new bronchopulmonary dysplasia. **Current opinion in pediatrics**, v. 23, n. 2, p. 167-72, Apr. 2011.

JOBE, A. H.; BANCALARI, E. Bronchopulmonary dysplasia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 7, p. 1723-9, June 2001.

JOBE, A. H. *et al.* Injury and inflammation from resuscitation of the preterm infant. **Neonatology**, v. 94, n. 3, p. 190-6, Oct. 2008.

JOSHI, S.; KOTECHA, S. Lung growth and development. **Early Human Development**, v. 83, n. 12, p. 789-94, Dec. 2007.

KABRA, S. K. *et al.* Long-term daily high and low doses of azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. **Journal of cystic fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 17-23, Jan. 2010.

KANO, S.; RUBIN, B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 3, p. 590-615, July 2010.

KATAOKA, S. *et al.* Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 1, p. 51-5, Jan. 2006.

KATZ, B.; PATEL, P.; DUFFY, L.; SCHELONKA, R. L.; DIMMITT, R. A.; WAITES, K. B. Characterization of ureaplasmas isolated from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4852-4, Sep. 2005.

KESZLER, M. State of the art in conventional mechanical ventilation. **Journal of perinatology**, v. 29, n. 4, p. 262-75, Apr. 2009.

KESZLER, M.; ABUBAKAR, K. M. Volume guarantee ventilation. **Clinics in perinatology**, v. 34, n. 1, p. 107-16, Mar. 2007.

KIKHNEY, J. *et al.* Is ureaplasma spp. The leading causative agent of acute chorioamnionitis in women with preterm birth? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 2, p. 119.e1-119.e7, Feb. 2017.

KNEYBER, M. C. J. *et al.* Azithromycin does not improve disease course in hospitalized infants with respiratory syncytial virus (rsv) lower respiratory tract disease: a randomised equivalence trial. **Pediatric pulmonology**, v. 43, n. 2, p. 142-9, Feb. 2008.

KORZENIEWSKI, S. J. *et al.* A "multi-hit" model of neonatal white matter injury: cumulative contributions of chronic placental inflammation, acute fetal inflammation and postnatal inflammatory events. **J Perinat Med**, v. 42, n. 6, p. 731-43, Sep. 2014.

KOTECHA, S. *et al.* The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants. **Thorax**, v. 58, n. 11, p. 961-7, 2003.

KOTECHA, S. J. *et al.* Effect of late preterm birth on longitudinal lung spirometry in school age children and adolescents. **Thorax**, v. 67, n. 1, p. 54-61, Jan. 2012.

KOTECHA, S.; CHAN, B.; AZAM, N.; SILVERMAN, M.; SHAW, R. J. 1995 Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from infants who develop chronic lung disease. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 72, n. 2, p. F90-F96, Mar. 1995.

KOTECHA, S.; KOTECHA, S. J. Long term respiratory outcomes of perinatal lung disease. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 2, p. 65-6, Apr. 2012.

KOTECHA, S.; SILVERMAN, M.; SHAW, R.; KLEIN, N. Soluble L-selectin concentration in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants who develop chronic lung disease of prematurity. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 78, n. 2, p. F143-7, Mar. 1998.

KRAMER, B. W.; KALLAPUR, S.; NEWNHAM, J.; JOBE, A. H. prenatal inflammation and lung development. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 2-7, 2009.

LAKŐS, A. K. et al. Safety and effectiveness of azithromycin in the treatment of respiratory infections in children. **Current medical research and opinion**, v. 28, n. 1, p. 155-62, Jan. 2012.

LAL, C. V.; NAMASIVAYAM, A. Biomarkers, early diagnosis, and clinical predictors of bronchopulmonary dysplasia. **Clinics in perinatology**, v. 42, n. 4, p. 739-54, Dec. 2015.

LALAK, N. J.; MORRIS, D. L. Azithromycin clinical pharmacokinetics. **Clinical pharmacokinetics**, v. 25, n. 5, p. 370-4, Nov. 1993.

LESSA, A. C.; SUGUIHARA, C. **Novas modalidades terapêuticas na insuficiência respiratória do recém-nascido**. Programa de Atualização em Neonatologia, v. 1, p. 115-152. Sociedade Brasileira de Pediatria, 2004. Ciclo 1:115-52.

LI, Y. *et al.* Influencing factors for severity of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. **Zhongguo Dang Dai er ke za zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, v. 16, n. 10, p. 1014-1018, 2014.

LIGGINS, G. C.; HOWIE, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. **Pediatrics**, v. 50, n. 4, p. 515-25, Oct. 1972.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-26, Feb. 2000.

LISTA, G. *et al.* Lung inflammation in preterm infants with respiratory distress syndrome: effects of ventilation with different tidal volumes. **Pediatr Pulmonol**, v. 41, n. 4, p. 357-63, Apr. 2006.

LU, H. Y. *et al.* Contribution of histologic chorioamnionitis and fetal inflammatory response syndrome to increased risk of brain injury in infants with preterm premature rupture of membranes. **Pediatric Neurology**, v. 61, p. 94-98.e1, Aug. 2016.

MALEFYT, R. Q.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.; DE VRIES J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of experimental medicine**, v. 17, n. 5, p. 1209-20, nov. 1991.

MALLOY, M. H. Chorioamnionitis: epidemiology of newborn management and outcome United States 2008. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 611-5, Aug. 2014.

MARINI, J. J. Mechanical ventilation: past lessons and the near future. MARINI, J. J. Mechanical ventilation: past lessons and the near future. **Critical Care**, v. 17, n. 1, p. S1, 2013.

MAZUMDER, M. H. M.; HOSSAIN, M. M.; KABIR, A. management of bronchiolitis with or without antibiotics: a randomised control trial. **Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons**, v. 27, n. 2, p. 63-9, 2009.

McEVOY, C. T.; *et al.* L. Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI workshop on the primary prevention of chronic lung diseases. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 3, p. S146-53, Apr. 2014.

MEHLER, K. *et al.* Outcome of extremely low gestational age newborns after introduction of a revised protocol to assist preterm infants in their transition to extrauterine life. **Acta Paediatrica**, v. 101, n. 12, p. 1232-9, Dec. 2012.

MELVILLE, J. M.; MOSS, T. J. The immune consequences of preterm birth. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, p. 79, May 2013.

MERCHAN, L. M. *et al.* Pharmacokinetics, microbial response, and pulmonary outcomes of multidose intravenous azithromycin in preterm infants at risk for ureaplasma respiratory colonization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 570-8, Jan. 2015.

MIKUSIAKOVA, L. *et al.* Effects on lung function of small-volume conventional ventilation and high-frequency oscillatory ventilation in a model of meconium aspiration syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 866, p. 51-59, Jan. 2015.

MOGAYZEL JÚNIOR, P. J. *et al.* Cystic fibrosis foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial pseudomonas aeruginosa infection. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 10, p. 1640-50, Dec. 2014.

MOORE, S. W.; ARNOLD, M.; WRIGHT, C. Necrotizing enterocolitis and the placenta—a key etiological link. **Journal of pediatric surgery**, v. 48, n. 2, p. 359-62, Feb. 2013.

MORETTI, C.; PAPOFF, P. Ventilazione meccanica e patologie respiratorie del neonato. *In*: MIRABILE, L.; BARONCINI, S. (ed.). **Rianimazione in età pediatrica**. Milano: Springer, 2012.

MOSCUZZA, F. *et al.* Correlation between placental histopathology and fetal/neonatal outcome: chorioamnionitis and funisitis are associated to intraventricular haemorrhage and retinopathy of prematurity in preterm newborns. **Gynecol endocrinol**, v. 27, n. 5, p. 319-23, May 2011.

MOSS, T. J. Respiratory consequences of preterm birth. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 3, p. 280-4, 2006.

MOURANI, P. M. *et al.* Molecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. e25959, 2011.

NAIK, A. S. *et al.* Effects of ventilation with different positive end-expiratory pressures on cytokine expression in the preterm lamb lung. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 3, 2001.

NAIR, V.; LOGANATHAN, P.; SORAISHAM, A. S. Azithromycin and other macrolides for prevention of bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Neonatology**, v. 106, n. 4, p. 337-47, 2014.

NAMBA, F. *et al.* Placental features of chorioamnionitis colonized with ureaplasma species in preterm delivery. **Pediatric research**, v. 67, n. 2, p. 166-72, Feb. 2010.

NARDELLI, L. M. *et al.* Entendendo os mecanismos determinantes da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, n. 4, p.469-74, out.-dez. 2007.

NATARAJAN, G. *et al.* Outcomes of extremely low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia: impact of the physiologic definition. **Early human development**, v. 88, n. 7, p. 509-15, July 2012.

NIWA, T. *et al.* Benefits and risks associated with the r100 high frequency oscillatory ventilator for patients with severe hypoxaemic respiratory failure. **Anaesth Intensive Care**, v. 39, n. 6, p. 1111-9, Nov. 2011.

NORMANN, E. *et al.* A novel mouse model of ureaplasma-induced perinatal inflammation: effects on lung and brain injury. **Pediatric research**, v. 65, n. 4, p. 430, 2009.

NORTHWAY, W. H Jr.; ROSAN, R. G.; PORTER, D. Y. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease. bronchopulmonary dysplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 276, n. 7, p. 357-68, Feb. 1967.

NOVITSKY, A.; TUTTLE, D. LOCKE, R. G.; SAIMAN, L.; MACKLEY, A.; PAUL, D. A. Prolonged early antibiotic use and bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. **American journal of perinatology**, v. 32, n. 1, p. 43-8, Jan. 2015.

OKAMOTO, C. T. *et al.* Análises histopatológica e morfométrica no diagnóstico da “nova” displasia broncopulmonar e comparação clinicopatológica com a forma clássica da doença. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 2, p. 155-60, abr. 2009.

OLOMU, I. N. *et al.* Perinatal correlates of ureaplasma urealyticum in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. 1329-36, May 2009.

PERRONE, S. *et al.* Perinatal outcome and placental histological characteristics: a single-center study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 110–3, Apr. 2012.

PETRILLO, F. *et al.* Neonatal respiratory support strategies for the management of extremely low gestational age infants: an italian survey. **Italian journal of pediatrics**, v. 45, n. 1, 2019.

PETROPOULOS, G. *et al.* A review of ts/vi remote sensing based methods for the retrieval of land surface energy fluxes and soil surface moisture. **Progress in Physical Geography**, v. 33, n. 2, p. 224-50, 2009.

POINDEXTER, B. B. *et al.* Comparisons and limitations of current definitions of bronchopulmonary dysplasia for the prematurity and respiratory outcomes program. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. 12, p. 1822-30, Dec. 2015.

QUINN, D. A.; MOUFARREJ, R. K.; VOLOKHOV, A.; HALES, C. A. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and mip-2 production in ventilator-induced lung injury. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 2, p. 517-25, Aug. 2002.

RANGANATHAN, S. Lung development, lung growth and the future of respiratory medicine. **European Respiratory Journal**, v. 36, n. 4, p. 716-7, Oct. 2010.

REBELLO CM, MASCARETTI RS. A “nova” displasia broncopulmonar. Sistema de educação médica continuada a distância. **Programa de atualização em neonatologia**.

<http://www.artmedpanamericana.com.br/file.php/1/biblioteca/SEMCAD/PRORN/ciclo%201/rnc1m2-03.pdf> (acessado em 24/Ago/2019).

RESCH, B.; GUTMANN, C.; REITERER, F.; LUXNER, J.; URLESBERGER, B. Neonatal ureaplasma urealyticum colonization increases pulmonary and cerebral morbidity despite treatment with macrolide antibiotics. **Infection**, v. 44, n. 3, p. 323-7, June 2016.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 73-91, Nov. 1995.

RIVERA, L.; SIDDAIAH, R.; OJI-MMUO, C.; SILVEYRA, G. R.; SILVEYRA, P. Biomarkers for bronchopulmonary dysplasia in the preterm infant. **Frontiers in pediatrics**, v. 4, p. 33, Mar. 2016.

ROTH-KLEINER, M.; POST M. Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development. **Pediatric pulmonology**, v. 40, n. 2, p. 113-34, Aug. 2005.

SAIMAN, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 290, n. 13, p. 1749-56, Oct. 2003.

SAIMAN, L. *et al.* Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 303, n. 17, p. 1707-15, May 2010.

SAMSON, C. *et al.* Long-term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis. **Respir Med**, v. 117, p. 1-6, Aug. 2016.

SANT'ANNA, G. M.; KESZLER, M. Developing a neonatal unit ventilation protocol for the preterm baby. **Early human development**, v. 88, n. 12, p. 925-9, Dec. 2012.

SELESTRIN, C. C. *et al.* Avaliação dos parâmetros fisiológicos em recém-nascidos pré-termo em ventilação mecânica após procedimentos de fisioterapia neonatal. **Journal of Human Growth and Development**, v. 17, n. 1, p. 146-55, 2007.

SEVILLA-SANCHEZ, D.; SOY-MUNER, D.; SOLER-PORCAR, N. Usefulness of macrolides as anti-inflammatories in respiratory diseases. **Archivos de Bronconeumología ((English Edition))**, v. 46, n. 5, p. 244-54, May 2010.

SHAH, P. S. *et al.* Outcomes of preterm infants < 29 weeks gestation over 10-year period in Canada: a cause for concern? **Journal of perinatology**, v. 32, n. 2, p. 132, Feb. 2012.

SHINKAI, M.; PARK, S. C.; RUBIN, B. K. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics. **Clinical Pulmonary Medicine**, v. 12, n. 4, p. 341-8, Nov. 2005.

SILVA FILHO, L. V. R. F. *et al.* *Pseudomonas Aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 39, n. 4, p. 495-512, jun./ago. 2013.

SILVEYRA, P. Chapter 9: developmental lung disease. *In*: HEMNES, A. R. (ed.). **Gender, Sex Hormones and Respiratory Disease**. A Comprehensive Guide. Switzerland: Humana Press, Springer International Publishing, 2016.

SMITH, C. *et al.* Use and safety of azithromycin in neonates: a systematic review. **BMJ Open**, v. 5, n. 12, p. e008194, 2015.

SOUTHERN, K. W. *et al.* Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, p. CD002203, Nov. 2012.

SPEER, C. P. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 11, n. 5, p. 354–62, May 2006.

SPOLSKI, R.; LI, P.; LEONARD, W. J. Biology and Regulation of IL-2: from Molecular Mechanisms to human therapy. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 10, p. 648-59, Oct. 2018.

STEFANESCU, B. M. *et al.* A randomized, controlled trial comparing two different continuous positive airway pressure systems for the successful extubation of extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 112, n. 5, p. 1031-8, Nov. 2003.

STEIN, R. T. Use of macrolides in pediatric lung diseases: recent literature controversies. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 91, p. S52-60, nov.-dec. 2015.

STEVENS, T. P.; *et al.* Effect of cumulative oxygen exposure on respiratory symptoms during infancy among vlbw infants without bronchopulmonary dysplasia. **Pediatric pulmonology**, v. 45, n. 4, p. 371-9, Apr. 2010.

STICK, S. The contribution of airway development to paediatric and adult lung disease. **Thorax**, v. 55, n. 7, p. 587-94, 2000.

STIMAC, M. *et al.* Effect of chorioamnionitis on mortality, early onset neonatal sepsis and bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates with birth weight of <1,500 grams. **Collegium antropologicum**, v. 38, n. 1, p. 167-71, Mar. 2014.

STOCKS, J.; HISLOP, A.; SONNAPPA, S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. **The lancet Respiratory medicine**, v. 1, n. 9, p. 728-42, Nov. 2013.

STOCKS, J.; SONNAPPA, S. Early life influences on the development of chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic Advances Respiratory Disease**, v. 7, n. 3, p. 161-73, June 2013.

STOLL, B. J. *et al.* Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. **Jama**, v. 314, n. 10, p. 1039-51, Sep. 2015.

SUGUIHARA, C.; LESSA, A. C. Como minimizar a lesão pulmonar no prematuro extremo: propostas. **Jornal de pediatria**, v. 81, n. 1, p. S69-S78, Mar. 2005.

SUNG, T. J. *et al.* Frequency of ureaplasma serovars in respiratory secretions of preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 5, p. 379-83, May 2011.

SWEENEY, E. L. *et al.* Placental infection with *ureaplasma* species is associated with histologic chorioamnionitis and adverse outcomes in moderately preterm and late-preterm infants. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 8, p. 1340-7, Apr. 2016.

SWEENEY, E. L. *et al.* The human ureaplasma species as causative agents of chorioamnionitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 349-79, Dec. 2017.

TAPIA, J. L. *et al.* Displasia broncopulmonar: incidência, fatores de risco e utilização de recursos em uma população sul-americana de recém-nascidos de muito baixo peso. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 1, p. 15-20, 2006.

TEMPLIN, L. *et al.* A quality improvement initiative to reduce the need for mechanical ventilation in extremely low gestational age neonates. **American journal of perinatology**, v. 34, n. 8, p. 759-64, July 2017.

TOMÉ, C. **Incidência de displasia broncopulmonar em recém nascidos de muito baixo peso ao nascer e fatores associados**. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências Sociais e Humanas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

TORCHIN, H. *et al.* Epidémiologie de la prématurité: prévalence, évolution, devenir des enfants. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 44, n. 8, p. 723-31, 2015.

TORKILDSEN, G.; O'BRIEN, T. P. Conjunctival tissue pharmacokinetic properties of topical azithromycin 1% and moxifloxacin 0.5% ophthalmic solutions: a single-dose, randomized, open-label, active-controlled trial in healthy adult volunteers. **Clinical therapeutics**, v. 30, n. 11, p. 2005-14, Nov. 2008.

TREMBLAY, L. N *et al.* Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin -6 messenger RNA. **Critical care medicine**, v. 30, n. 8, p. 1693-700, Aug. 2002.

TREMBLAY, Y.; PROVOST, P. R. Major enzymes controlling the androgenic pressure in the developing lung. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 137, p. 93-8, 2013.

TURNER, B. S.; BRADSHAW, W.; BRANDON, D. Neonatal lung remodeling: structural, inflammatory, and ventilator-induced injury. **The Journal of perinatal & neonatal nursing**, v. 19, n. 4, p. 362-76, Oct.-Dec. 2005.

TURUNEN, R. *et al.* Increased postnatal inflammation in mechanically ventilated preterm infants born to mothers with early onset preeclampsia. **Neonatology**, v. 100, n. 3, p. 241-7, June 2011.

UZUN, S. *et al.* Influence of macrolide maintenance therapy and bacterial colonisation on exacerbation frequency and progression of copd (columbus): study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v. 13, p. 82, Jun. 2012.

VAN MARTER, L. J. *et al.* Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? the neonatology committee for the developmental network. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. 1194-1201, June 2000.

VENTO, G. *et al.* Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 5, p. 723-30, May 2006.

VISCARDI, R. M. *et al.* Azithromycin to prevent bronchopulmonary dysplasia in ureaplasma-infected preterm infants: pharmacokinetics, safety, microbial response, and clinical outcomes with a 20-milligram-per-kilogram single intravenous dose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2127-33, May 2013.

VISCARDI, R. M. *et al.* Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants. **Pediatric research**, v. 55, n. 6, p. 1009, June 2004.

VISCARDI, R. M. Ureaplasma species: role in neonatal morbidities and outcomes. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 99, n. 1, p. F87-F92, Nov. 2014.

VISCARDI, R. M.; HASDAY, J. D. Role of ureaplasma species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. **Pediatric research**, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 84R-90R, May 2009.

VISCARDI, R. M. *et al.* Incidence of invasive ureaplasma in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. **Journal of perinatology**, v. 28, n. 11, p. 1-7, July 2008.

WAGNER, B. D. *et al.* Airway microbial community turnover differs by bpd severity in ventilated preterm infants. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. 1e0170120, Jan. 2017.

WAITES, K. B. Ureaplasma infection. **Medscape**, Mar. 2008.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 757-89.6, Oct. 2005.

WAITES, K. B.; XIAO, L.; PARALANOV, V.; VISCARDI, R. M.; GLASS, J. I. Molecular methods for the detection of mycoplasma and ureaplasma infections in humans: a paper from the 2011 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 5, p. 437-50, Sep. 2012.

WOO, S. J. *et al.* Effects of maternal and placental inflammation on retinopathy of prematurity. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 250, n. 6, p. 915-23, Jun. 2012.

WOODS J. C.; SCHITTNY, J. C. Lung structure at preterm and the birth. *In*: JOBE, A. A.; WHITSETT, J. A., ABMAN, S. H. **Fetal lung development-clinical correlates & future technologies**. Cambridge University Press, New York, 2018. p. 586-599.e2.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Survive and Thrive: transforming care for every small and sick newborn.** Geneva: WHO Press, 2019.

WYNN, J. L. Defining neonatal sepsis. **Current opinion in pediatrics**, v. 28, n. 2, p. 135-140, Apr. 2016.

YAN, Z. *et al.* Effects of oxygen concentration and exposure time on cultured human airway epithelial cells. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 9, n. 2, p. 224-9, 2008.

ZAROGOULIDIS, P. P. N. *et al.* Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases. **European journal of clinical pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 479-503, May 2011.

ZHANG, Huayan *et al.* Prolonged respiratory support of any type impacts outcomes of extremely low birth weight infants. **Pediatric pulmonology**, v. 53, n. 10, p. 1447-1455, 2018.

ZOBAN, P.; CERNY, M. Immature lung and acute lung injury. **Physiological research**, v. 52, n. 5, p. 507-516, 2003.

7 RESULTADOS

7.1 ARTIGO 1

USO DE MACROLÍDEOS EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS PARA PREVENÇÃO DE DISPLASIA BRONCOPULMONAR

Cristiane Raupp Nunes^{1,2}, Andréa Lúcia Corso^{2,3}, Renato Soibelman Procianoy^{1,2,3}, Rita de Cássia Silveira^{1,2,3}.

1. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Serviço de Neonatologia Hospital de Clínicas de Porto Alegre
3. Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

RESUMO

Introdução e Objetivo: Macrolídeos apresentam efeitos anti-inflamatórios e têm sido sugerido seu uso para a prevenção da displasia broncopulmonar (DBP) em recém-nascidos (RNs) prematuros. A infecção/colonização por *Ureaplasma* spp. têm sido associada à DBP em prematuros. O objetivo desta revisão é avaliar a eficácia e segurança do uso de macrolídeos na prevenção da DBP em prematuros. **Métodos:** Foi realizada pesquisa em base de dados MEDLINE, EMBASE e Cochrane Central Register of Controlled Trials dos últimos dez anos. Foram incluídos ensaios clínicos randomizados que avaliaram os efeitos da terapia com macrolídeos na DBP em prematuros. Um modelo de efeito aleatório/fixo foi usado para sintetizar resultados predefinidos. **Resultados:** Oito estudos envolvendo 599 prematuros foram elegíveis para a análise. Macrolídeos quando utilizados profilaticamente (em 5 estudos) não mostraram redução significativa na DBP ou no desfecho composto de DBP/morte. Da mesma forma, não houve redução significativa da DBP ou no resultado composto de DBP/óbito, quando macrolídeos foram usados em bebês positivos para *Ureaplasma*. No entanto, a terapia profilática com

azitromicina (em 3 estudos) foi associada a uma redução significativa da DBP.

Conclusão: Esta revisão demonstra que a terapia profilática com azitromicina ainda se mostrar controversa quanto à redução de DBP e do resultado composto de DBP/morte em prematuros. No entanto, dadas as informações limitadas sobre farmacocinética e possíveis efeitos nocivos, mais estudos devem ser realizados antes do uso rotineiro da azitromicina na população neonatal.

Palavras-chave: Macrolídeos. Displasia broncopulmonar. Prematuro. Ureaplasma.

ABSTRACT

Introduction and Objective: *Macrolides have anti-inflammatory effects and their use has been suggested for the prevention of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in premature newborns. Infection / colonization by Ureaplasma spp. has been associated with BPD in preterm infants. This review aimed to evaluate the efficacy and safety of macrolide use in preventing BPD in preterm infants.* **Methods:** *Research was carried out on the MEDLINE, EMBASE, and Cochrane Central Register of Controlled Trials databases of the last ten years. Studies on randomized controlled trials evaluating the effects of macrolide therapy on BPD in preterm infants were included. A random / fixed effect model was used to select predefined results.* **Results:** *Eight studies involving 599 preterm infants were eligible for the analysis. When used prophylactically (in 5 studies), macrolides showed no significant reduction in BPD or in the outcomes of BPD / death. Similarly, there was no significant reduction in BPD or in the outcomes of BPD / death when macrolides were used in Ureaplasma-positive infants. However, prophylactic azithromycin therapy (seen in 3 studies) was associated with a significant reduction in BPD.* **Conclusion:** *This review demonstrates that prophylactic therapy with azithromycin is still controversial regarding the reduction of BPD and the composite outcome of BPD / death in premature infants. Nevertheless, given the limited information on pharmacokinetics and its possible harmful effects, further studies should be performed before the regular use of azithromycin in the neonatal population.*

Keywords: Macrolídeos. Displasia broncopulmonar. Prematuro. Ureaplasma.

INTRODUÇÃO

Estima-se que a cada ano 15 milhões de prematuros nasçam em todo o mundo¹. No Brasil, em 2017, a taxa de prematuridade foi de 10,87%, o dobro quando comparado ao índice de alguns países europeus. Destes nascimentos, 44.514 não haviam completado 32 semanas de idade gestacional (IG) (DATASUS, [201-]). Estes números mostram a prematuridade como um grave problema de saúde pública no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2019). Após 50 anos da sua descrição inicial, apesar dos avanços significativos no atendimento perinatal, a displasia broncopulmonar (DBP) continua sendo uma das complicações mais comuns da prematuridade, e acomete aproximadamente 10.000 a 15.000 recém-nascidos (RNs) por ano apenas nos Estados Unidos. Aproximadamente 40% dos neonatos com extremo baixo peso ao nascer (peso < 1000 g) desenvolvem DBP (STOLL *et al.*, 2015; JOBE, 2011). Nas unidades neonatais que compõem a Rede Brasileira de Pesquisas Perinatais, a incidência de DBP é de 19% RNs com peso ao nascer < 1500 gramas (GUINSBURG *et al.*, 2016) e de 44-77% para aqueles nascidos com menos de 1000g (EHRENKRANZ *et al.*, 2005).

O *Ureaplasma spp* (Ua) é o microorganismo mais comum isolado do líquido amniótico e da placenta e contribui para resultados adversos da gravidez, incluindo a corioamnionite (SWEENEY *et al.*, 2017), nascimento prematuro e morbidades neonatais (VISCARDI, 2014). Estudos em humanos sugerem que a infecção por Ua está associada à restrição de crescimento intrauterino (MOSCUZZA *et al.*, 2011), morte neonatal (MALLOY, 2014; ARAYICI *et al.*, 2014), sepse precoce neonatal (ARAYICI *et al.*, 2014; STIMAC *et al.*, 2014), hemorragia peri-intraventricular (ARAYICI *et al.*, 2014; KASPER *et al.*, 2011; VISCARDI; HASHMI; GROSS; SUN; RODRIGUEZ; FAIRCHILD, 2008), displasia broncopulmonar (KASPER *et al.*, 2011; VISCARDI; HASHMI; GROSS; SUN; RODRIGUEZ; FAIRCHILD, 2008; PERRONE, S. *et al.*, 2012; ERIKSSON; HAGLUND; ODLIND; ALTMAN; KIELER, 2014; HARTLING; LIANG; LACAZE-MASMONTEIL, 2012; SCHELONKA; KATZ; WAITES; BENJAMIN JUNIOR, 2005; OZDEMIR *et al.*, 2012), persistência do canal arterial (MOSCUZZA, F. *et al.*, 2011; ARAYICI *et al.*, 2014; PERRONE *et al.*, 2012), retinopatia da prematuridade (MOSCUZZA, F. *et al.*, 2011; OZDEMIR *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2012) e enterocolite necrosante (MOORE; ARNOLD; WRIGHT, 2013; BEEN *et al.*, 2013; OKOGBULE-WONODI *et al.*, 2011). Todas essas associações

podem ser atribuídas à capacidade do *Ureaplasma* de provocar uma reação inflamatória.

Macrolídeos são antibióticos bacteriostáticos, podendo apresentar efeitos bactericidas e que apresentam atividade antiinflamatória e imunomoduladora, como demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando modelos humanos e animais em diferentes situações clínicas. Estas outras propriedades conferem a esta classe de antibióticos um papel que difere do seu clássico uso como antibiótico e abre novas possibilidades terapêuticas (BALLARD; ANSTEAD; SHOOK, 2007; SEVILLA-SANCHEZ; SOY-MUNER; SOLER-PORCAR, 2010; JAFFÉ; BUSH, 2001; AGHAI *et al.*, 2007).

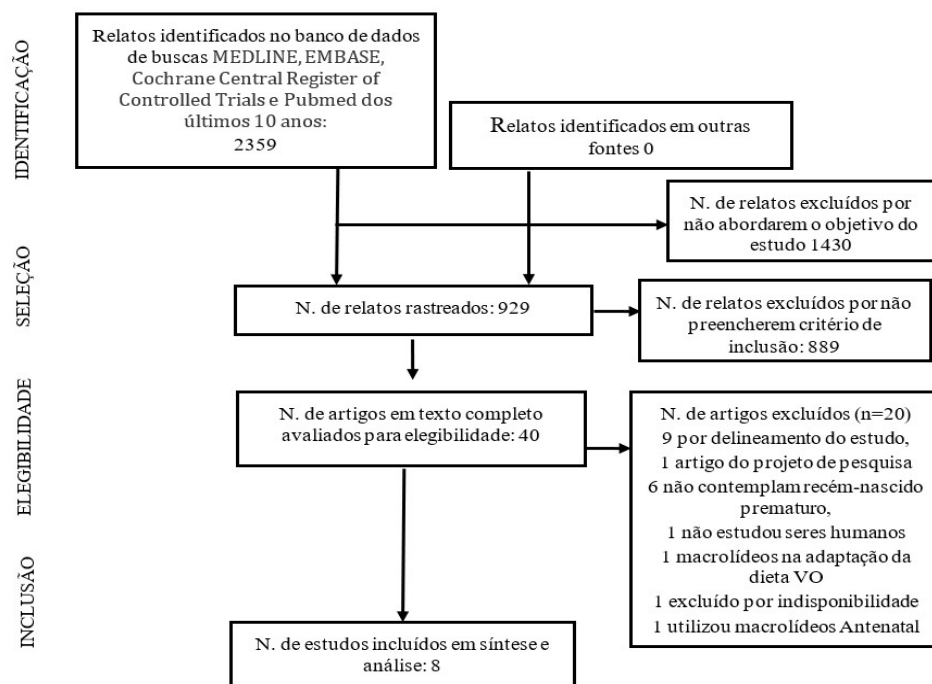
Os macrolídeos têm sido utilizados com sucesso no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose cística. Existem evidências limitadas sobre o uso de macrolídeos para o tratamento da infecção/colonização por *Ureaplasma* ou para uso profilático (independentemente do status da cultura de *Ureaplasma*) para a prevenção da DBP em prematuros (NAIR; LOGANATHAN; SORAISHAM, 2014). Poucos estudos clínicos foram publicados entre 2010 e 2019, usando diferentes macrolídeos para prevenção de DBP (NAIR; LOGANATHAN; SORAISHAM, 2014; MABANTA; PRYHUBER; WEINBERG; PHELPS, 2003). Este artigo objetivou realizar uma revisão da literatura abrangendo o uso de macrolídeos na prevenção da displasia broncopulmonar do prematuro.

MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, guiada pela seguinte questão norteadora: “Quais os resultados do uso de macrolídeos em prematuros para prevenção da displasia broncopulmonar?”. Foi realizada uma pesquisa abrangente quanto às publicações dos últimos 10 anos nos seguintes bancos de dados: Ovid MEDLINE, EMBASE, Cochrane Central Register of Controlled Trials e Pubmed, SCOPUS. Foram utilizados os seguintes unitermos: "*Ureaplasma and preterm*", "*macrolides and preterm*" e "*bronchopulmonary dysplasia and preterm*". Foram incluídos na amostra os artigos que se enquadravam nos seguintes critérios: artigos sem restrição de idiomas, com seus resumos publicados nas bases de dados selecionadas, no período compreendido entre 2010 a 2019 e cuja metodologia adotada permitisse obter evidências científicas acerca desta terapêutica, quais sejam:

ensaios clínicos randomizados controlados individualmente, ou estudos com delineamento de pesquisa quase experimental; artigos que retratassem procedimentos, intervenções que contribuíssem para responder a questão norteadora. Foram excluídos estudos do tipo revisão de literatura ou sistemática, cartas e editoriais, teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso, artigos não referentes ao período neonatal, estudos que não utilizaram macrolídeos na intervenção e aqueles apenas sobre DBP, ou que a intervenção não tenha sido aplicada no pré-termo. Num primeiro momento, a busca gerou como resultado 2259 artigos, após, foram aplicados os critérios de inclusão/exclusão, que reduziu para 920, destes, 600 não preencheram os critérios de inclusão, sendo selecionados 8 estudos. Todo esse processo de seleção está representado no fluxograma abaixo (Figura 1). Posteriormente, foram revisados os resumos disponíveis. Adicionalmente, foram examinadas as listas de referências bibliográficas dos estudos relevantes para identificar outros artigos potencialmente elegíveis. Limitamos nossa pesquisa apenas a estudos em humanos.

Figura 1 - Fluxograma de seleção de artigos para revisão integrativa de literatura, elaborado a partir do Guideline Prima (GALVÃ PANSANI; HARRAD, 2015).



Fonte: Elaboração própria

Adicionalmente, foram examinadas as listas de referências bibliográficas dos estudos relevantes para identificar outros artigos potencialmente elegíveis. Limitamos nossa pesquisa apenas a estudos em humanos.

Com a finalidade de minimizar prováveis erros sistemáticos ou viés de aferição dos estudos, devido a erros na interpretação dos resultados e delineamento dos estudos, dois pesquisadores realizaram a leitura dos artigos e o preenchimento dos instrumentos de forma independente, os quais foram posteriormente comparados. Nos casos em que ocorreram discordâncias entre eles, houve uma discussão para chegar a um consenso.

RESULTADOS

Os estudos identificados e incluídos na revisão, título, autores e ano de publicação, objetivo, principais resultados e recomendações/conclusões são apresentados no Quadro 1.

Os oito artigos selecionados foram distribuídos o conforme ano de publicação, e as pesquisas na área predominaram em 2011 (3). Os anos de 2012 (1), 2013(1), 2015 (2) e 2016 (1) tiveram a mesma quantidade de artigos publicados, não foram encontrados artigos publicados em 2010, 2014, 2017, 2018 e 2019 que contemplassem o objetivo desse estudo.

No que tange o tipo de publicação referente ao método e à técnica de pesquisa empregada, tem-se: 6 ensaios clínicos sendo (3 randomizados e 3 farmacocinéticos), além de 1 caso controle e 1 coorte retrospectivos. Esses possuíam objetivos diversos, mas todos se relacionavam ao objeto de pesquisa.

Quadro 1 - Principais características dos estudos selecionados para revisão integrativa

Referência	Objetivos	Tipo de Estudo	Compa-rador	N	Início do Macrolídeo	Conclusões
Clarithromycin in preventing bronchopulmonary dysplasia in Ureaplasma urealyticum-positive preterm infants (OZDEMIR <i>et al.</i> , 2011).	<ul style="list-style-type: none"> Determinar a relação da colonização de <i>U.urealyticum</i> com DBP em prematuros com peso de nascimento ≤ 1250 g; Avaliar, a eficácia e segurança do tratamento com claritromicina na 	Ensaio Clínico randomizado	Placebo	74 37/37	0-72 h de vida Claritromicina 10 mg/kg por 10 dias	<ul style="list-style-type: none"> DBP foi maior em pacientes ureaplasa positivo (15,9% X 36,4%; $P < 0,01$). A única variável significativa associada ao desenvolvimento da DBP foi a duração da ventilação mecânica. As culturas de 2 dias após a descontinuação do tratamento mostram que a

	<p>erradicação de <i>Urealyticum</i> nas vias respiratórias;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prevenir a DBP em prematuros com cultura positiva. 				<p>Claritromicina resultou na erradicação de <i>Urealyticum</i> em 68,5% dos pacientes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • O estudo concluiu que o tratamento com claritromicina para bebês com muito baixo peso ao nascer e com cultura positiva para o <i>Urealyticum</i> reduz a incidência de desenvolvimento de DBP. • Nenhum evento adverso grave relacionado ao uso de claritromicina foi documentado. • A mortalidade: 18% (20 de 111) no grupo da azitromicina X 22% (24 de 109) no grupo do placebo (P = 0,45). • A incidência de DBP: 76% (69 de 91) no grupo da azitromicina X 84% (71 de 85) no grupo do placebo (P = 0,2). • Orr para DBP/morte 0,46 para DBP ou morte no grupo da azitromicina e não foi estatisticamente significante. • O estudo não demonstra nenhum benefício no tratamento de rotina de recém-nascidos prematuros com terapia com azitromicina. • A incidência de DBP no subgrupo <i>Ureaplasma</i> foi de 73% no grupo da azitromicina versus 94% no grupo do placebo (P = 0,03). • no subgrupo <i>Ureaplasma</i>, usando o modelo logístico exato, demonstrou uma diminuição na DBP ou morte no grupo da azitromicina com uma razão de chances estimada de 0,026 (0,001-0,618, intervalo de confiança de 95%). • Porém, a azitromicina pode ter um papel no tratamento e/ou profilaxia de recém-nascidos prematuros colonizados/infectados com <i>Ureaplasma</i> spp. • 75% de bebês positivos para <i>Ureaplasma</i> morreram ou desenvolveram DBP. • Uma dose única de 10 mg/kg de azitromicina não suprimiu significativamente (p > 0,05) as citocinas dos neonatos tratados que permaneceram intubados. • Estes resultados sugerem que 10 mg/kg de
<p>Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial (BALLARD <i>et al.</i>, 2011).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliar o uso da azitromicina na prevenção da DBP em prematuros em uso de VM 	<p>Ensaio Clínico randomizado</p>	<p>Placebo</p> <p>220 109/111</p>	<p>0-72 h de vida</p> <p>10mg/kg/dose azitromicina (AZM)</p>	
<p>Pharmacokinetics, safety, and biologic effects of azithromycin in extremely preterm infants at risk for ureaplasma colonization and bronchopulmonary dysplasia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliar a segurança e a farmacocinética da dose única IV da AZM em recém-nascidos pré-termo ventilados mecanicamente e de alto risco para colonização do trato respiratório de <i>Ureaplasma</i> e 	<p>farmacocinético</p>	<p>nada</p> <p>14</p>	<p>47horas de vida ±28</p> <p>10 mg / kg de Azitromicina dose única</p>	

(HASSAN <i>et al.</i> , 2011).	desenvolvimento de DBP. • Avaliar as citocinas inflamatórias pulmonares marcadores de resposta à azitromicina.					azitromicina em dose única ou múltipla é, provavelmente, inadequado <i>Ureaplasma</i> e prevenção de DBP.
Effi cacy of azithromycin for prevention of bronchopulmonary dysplasia (BPD) (GHAREHBAGHI; PEIROVIFAR; GHOJAZADEH; MAHALLEI, 2012).	• Avaliar a eficácia da azitromicina na prevenção da DBP em prematuros com muito baixo peso	Ensaio Clínico randomizado	nada	108 56+52	7º dia de vida azitromicina	<ul style="list-style-type: none"> • 21 (43%) dos 52 desenvolveu DBP no grupo-controle, enquanto 14 (25%) fizeram no grupo de intervenção (P =0,04). • A duração média da necessidade de oxigênio suplementar foi 17,7 ± 2,8 e 23,95 ± 4,2 dias nos grupos intervenção e controle, respectivamente (P = 0,01). • O estudo sugere que a azitromicina em recém-nascidos de muito baixo peso podem reduzir efetivamente a incidência de DBP. • 7 bebês eram Ua positivo e 6 negativos. Os Ua positivo apresentaram maior duração de ventilação mecânica; • Após 21 dias do término do tratamento, todos negativaram as amostras de culturais. • Um dos sete (14%) indivíduos positivos para <i>Ureaplasma</i> desenvolveu DBP em comparação com três dos seis (50%) bebês negativos para <i>Ureaplasma</i> (p=0,164). • Todos os sujeitos do estudo sobreviveram até a alta. • A dose única de azitromicina a 20 mg/kg foi bem tolerada e não foram relatados efeitos colaterais relacionados à azitromicina. • Foi relatado no grupo Ua positivo 3 casos de HIPV, 3 bebês falharam na triagem auditiva em ambos os ouvidos na alta. • Não foram relatadas ocorrências de enterocolite necrosante.
Azithromycin to prevent bronchopulmonary dysplasia in ureaplasma-infected preterm infants: pharmacokinetics, safety, microbial response, and clinical outcomes with a 20-milligram-per-kilogram single intravenous dose (VISCARDI <i>et al.</i> , 2013).	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliar a segurança de tal regime de 20 mg/kg IV e determinar os resultados microbiológicos e clínicos da dose única mais alta; • Avaliar a reposta dos prematuros colonizados por <i>Ureaplasma</i> ao tratamento por AZM nesta dose; • Avaliar se AZM diminui a resposta inflamatória pulmonar do prematuro. 	Farmacocinético		13	0-72h de vida 20 mg / kg dose única azitromicina	<ul style="list-style-type: none"> • Todos os sujeitos do estudo sobreviveram até a alta. • A dose única de azitromicina a 20 mg/kg foi bem tolerada e não foram relatados efeitos colaterais relacionados à azitromicina. • Foi relatado no grupo Ua positivo 3 casos de HIPV, 3 bebês falharam na triagem auditiva em ambos os ouvidos na alta. • Não foram relatadas ocorrências de enterocolite necrosante.
Pharmacokinetics, Microbial Response, and Pulmonary Outcomes of Multidose Intravenous Azithromycin in Preterm Infants at Risk for <i>Ureaplasma</i>	Refinar o modelo de farmacocinética populacional, determinar a depuração microbiana e avaliar os resultados pulmonares a curto prazo do tratamento com azitromicina em doses múltiplas em	Ensaio Clínico não randomizado	nada	15	0-72H de vida dose 20mg/kg dia por 3 dias azitromicina	<ul style="list-style-type: none"> • Dos 15 bebês 7 Ua positivo (todos negativos após 5dias da última dose do macrolídeos). • DBP: 3 em 7 Ua positivo/1 em 8 Ua negativo. • Óbito: 1 Ua positivo decorrente de complicações da DBP. • Na análise farmacocinética, todas as

Respiratory Colonization (MERCHAN <i>et al.</i> , 2015).	bebês prematuros com risco de colonização respiratória por <i>Ureaplasma</i> .					<p>culturas pós-tratamento foram negativas e não houve eventos adversos relacionados ao medicamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> Um curso de 3 dias de azitromicina intravenosa de 20 mg/kg/dia mostrou eficácia preliminar na erradicação de <i>Ureaplasma</i> spp. no trato respiratório prematuro. A incidência de DBP moderada e grave, foi de 45,2% no grupo de estudo e de 40,3% nos controles ($p = 0,65$). Não houve diferença significativa nas morbidades ou mortalidade entre os grupos. Uma abordagem seletiva do tratamento de bebês prematuros com <i>Ureaplasma</i> positivo e sintomáticos com macrolídeos não afetou a incidência de DBP moderada e grave.
Macrolides do not affect the incidence of moderate and severe bronchopulmonary dysplasia in symptomatic <i>ureaplasma</i> -positive infants (CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015).	<ul style="list-style-type: none"> Objetivo comparar a incidência de displasia broncopulmonar (DBP) em prematuros tratados com <i>Ureaplasma</i> sintomático e prematuros assintomáticos. 	Coorte retrospectivo	31 grupo estudo /62 grupo-control e	azitromicina		<ul style="list-style-type: none"> A <i>Urealyticum</i> (UU) foi significativamente associada a SDR (79 vs. 61%, $p = 0,015$), DBP (24 vs. 6%, $p = 0,003$), convulsões (23 vs. 5%, $p = 0,002$) e HIPV (45 vs. 24%, $p = 0,028$) grupos caso e controle respectivamente. Os casos tiveram mais tempo de ventilação mecânica e total de ventilação invasiva e não invasiva (mediana 11 vs. 6 dias $p = 0,006$ e 25 vs. 16,5 dias $p = 0,019$, respectivamente). A infecção por Uu mostrou associação significativa com morbidade pulmonar a curto prazo e comprometimento cerebral leve a longo prazo, apesar do tratamento com antibióticos macrolídeos. O estudo concluiu que eritromicina não foi eficaz na prevenção da morbidade respiratória a curto e longo prazo de prematuros colonizados com UU
Neonatal <i>Ureaplasma urealyticum</i> colonization increases pulmonary and cerebral morbidity despite treatment with macrolide antibiotics (RESCH; GUTMANN; REITERER; LUXNER; URLESBERGER, 2015).	<ul style="list-style-type: none"> Avaliar a influência da colonização por <i>Ureaplasma urealyticum</i> (Uu) na morbidade pulmonar e cerebral neonatal. 	Caso-controle	124 62+62	eritromicina 50 mg/ kg 8/8h por 10 dias		

Fonte: Elaboração própria.

Três dos estudos dessa revisão obtiveram resultados positivos no que se refere à ação dos macrolídeos no pré-termo para diminuir a incidência da displasia

broncopolmonar especialmente em prematuros colonizados por *Ureaplasma* (OZDEMIR *et al.*, 2011; BALLARD *et al.*, 2011; GHAREHBAGHI *et al.*, 2012). Contudo, alguns estudos, como o de Hassan *et al.* (2011), Viscardi *et al.* (2013), Merchan *et al.* (2015) e de Chakkarapani, Paes e Shivananda (2015), que estudaram azitromicina, Resch, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (2016) que avaliou a eritromicina, não encontraram associação entre uso de macrolídeos em RNs prematuros e erradicação do *Ureaplasma* ou prevenção de DBP.

DISCUSSÃO

A presente revisão foi realizada para avaliar o que há de atual na literatura sobre o uso de macrolídeos no tratamento da infecção/colonização por *Ureaplasma* e na prevenção da DBP em prematuros.

O *Ureaplasma* no desenvolvimento da DBP em prematuros

A displasia broncopulmonar é uma doença multifatorial, e há crescentes inferências na comunidade científica, bem como evidências experimentais, de um papel central da infecção/colonização por *Ureaplasma* no desenvolvimento da doença. Os resultados que encontramos são conflitantes pois alguns estudos corroboram (MABANTA; PRYHUBER; WEINBERG; PHELPS, 2003; OZDEMIR *et al.*, 2011; BALLARD *et al.*, 2011; GHAREHBAGHI; PEIROVIFAR; GHOJAZADEH; MAHALLEI, 2012; VISCARDI *et al.*, 2013) e outros se contrapõem (MERCHAN *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2011; CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015). Ballard *et al.* (2011) realizou um estudo randomizado com 220 prematuros administrando azitromicina ou placebo e encontrou uma incidência de 31% (n=33) de Ua positivos no grupo intervenção vs. 40% (n=43) no grupo placebo. Ao analisar o subgrupo *Ureaplasma*, não observou diferença na mortalidade, 21% (7 de 33) no grupo da azitromicina versus 21% (9 de 43) no grupo do placebo. A incidência de DBP foi menor no grupo da azitromicina, 73% (19 de 26) vs. grupo placebo, 94% (33 de 35) (P = 0,03). Ozdemir *et al.* (2011), com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do tratamento com claritromicina na prevenção da displasia broncopulmonar (DBP) em prematuros *Ureaplasma Urealyticum* (Uu) positivos. Observaram que 74 (33%) das crianças do estudo tiveram uma cultura positiva para U urealyticum nos primeiros 3

dias de vida, a DBP foi significativamente maior em pacientes *Ureaplasma* positivo (15,9% X 36,4%; $P < 0,01$) e a incidência de DBP foi significativamente menor no grupo que recebeu claritromicina ($p < 0,001$) (OZDEMIR *et al.*, 2011). Os resultados de Hassan *et al.* (2011) desmostraram que oito dos quatorze bebês incluídos (57%) tinham cultura e PCR positivos para *Ureaplasma spp.*, e observaram que dose única de azitromicina foi inadequada para erradicação do Uu e reduzir DBP. Merchan *et al.* (2015) encontraram que 7 prematuros (47%) apresentaram cultura de aspirado traqueal e/ou PCR positivos para *Ureaplasma spp.* pré-dose de AZM e destes, 3 (43%) desenvolveram DBP, enquanto que no grupo negativo para *Ureaplasma* apenas 1 prematuro (12,5%) desenvolveu a doença ($p =$ não significante segundo os autores). Resch, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (2016) realizou um estudo tipo caso-controle para avaliar a influência da colonização por *Ureaplasma urealyticum* (Uu) na morbidade pulmonar e cerebral em prematuros, e nos seus resultados encontrou que o *Ureaplasma Urealyticum* (Uu) foi significativamente associado à displasia broncopulmonar: 24% (grupo caso $n=62$) vs. 6% (grupo-controle $n=62$), ($p = 0,003$) (CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015). No estudo de Viscardi *et al.* (2013), 7 ($n=13$) bebês eram *Ureaplasma* positivo e 6 ($n=13$) negativos. Contudo, ao contrário dos demais estudos, o maior número de displásicos concentrou-se entre os *Ureaplasma* negativos, 3 de 6 (50%) contra 14% dos displásicos *Ureaplasma* positivos (1 de 7) (VISCARDI *et al.*, 2013). No entanto, Chakkarapani, Paes e Shivananda (2015), em seu estudo, retrospectivo constataram que uma abordagem seletiva com macrolídeos para bebês prematuros sintomáticos por *Ureaplasma* não afetou a incidência de DBP moderada (45,2% no grupo de estudo e de 40,3% nos controles, $p = 0,65$).

A colonização do trato respiratório com as espécies de micoplasma genital *Ureaplasma parvum* e *U. urealyticum* em prematuros é um fator de risco significativo para DBP. A descoberta de que bebês com DBP mais grave tendem a apresentar maior população do microrganismo no início de seu curso perpetua a possibilidade de sua contribuição para a DBP (VISCARDI; KALLAPUR, 2015). O estudo de Wagner *et al.* (2017) teve por objetivo avaliar o microbioma das vias aéreas inferiores em prematuros que necessitam de ventilação mecânica sob a ótica das análises transversal e longitudinal para determinar a existência de uma relação entre o microbioma do trato respiratório inicial e a gravidade da DBP. Foram analisadas amostras de aspirado traqueal de 79 prematuros com diferentes níveis de DBP (23

DBP leve, 27 moderada e 29 grave), sendo estas coletadas entre 5 e 9 dias de idade. O resultado foi a presença de *Ureaplasma* em 18% destes aspirados, perdendo apenas para o *Staphylococcus* (68%). O estudo concluiu que a carga bacteriana nas vias aéreas não revelou um padrão impressionante que estivesse fortemente ligado à gravidade da DBP, isoladamente ou em conjunto com fatores clínicos. No entanto, como o sistema imunológico de bebês prematuros ainda está amadurecendo, a simples colonização por bactérias pode ser suficiente para gerar uma resposta inflamatória que atrapalha o desenvolvimento pulmonar e leva à DBP (WAGNER *et al.*, 2017). Viscardi e Hasday (2009) realizaram uma revisão sumarizando as evidências que suportam um papel causal do *Ureaplasma* spp. na DBP. Eles propuseram que a infecção por *Ureaplasma* é iniciada intraútero e potencializada na vida pós-natal pela exposição à ventilação mecânica e oxigênio que induz uma resposta inflamatória desregulada e sustentada no pulmão imaturo, que prejudica a alveolarização e estimula a proliferação de miofibroblastos, e a deposição excessiva de colágeno e elastina. A elucidação dos mecanismos pelos quais o *Ureaplasma* pode contribuir na patogênese da DBP não apenas fornece evidências de uma relação causal, mas também identifica alvos potenciais para intervenção na prevenção e no tratamento de crianças colonizadas (VISCARDI; HASDAY, 2009).

A relação entre infecção por *Ureaplasma* e DBP foi explorada com diferentes resultados relatados em diferentes estudos (KOH; KIM; KIM; MAENG; LEE, 2009; KALLAPUR; KRAMER; JOBE, 2013). O *Ureaplasma* spp. é o microrganismo mais frequentemente associado à corioamnionite e ao parto prematuro (KALLAPUR; KRAMER; JOBE, 2013). Uma revisão sistemática da literatura constituída de 39 estudos realizada por Lowe *et al.* (2014) observou uma associação significativa entre *Ureaplasma* e desenvolvimento de DBP. O estudo afirmou que bebês com colonização pulmonar com *Ureaplasma* tinham maior probabilidade de desenvolver DBP do que aqueles sem colonização com 36 semanas de idade pós-menstrual (OR 2,22, IC 95% 1,42-3,47) ou aos 28 dias de vida (OR 3,04, IC95% 2,41-3,83).

Efeito dos macrolídeos na prevenção da DBP e erradicação do *Ureaplasma*

Os antibióticos macrolídeos são amplamente utilizados como drogas antibacterianas. Dados clínicos e experimentais, no entanto, indicam que eles também têm propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, e suas indicações

terapêuticas foram ampliadas (NAIR; LOGANATHAN; SORAISHAM, 2014; MABANTA; PRYHUBER; WEINBERG; PHELPS, 2003; KOH; KIM; KIM; MAENG; LEE, 2009). Embora seu uso em bebês prematuros varie entre países e unidades, nas UTIN envolvidas na presente revisão, três macrolídeos foram prescritos para a prevenção e o tratamento da DBP.

A maioria dos prematuros testados foi tratada com azitromicina, apenas um estudo usou eritromicina, outro claritromicina e nenhum evento adverso grave foi relatado relacionado diretamente ao uso dos macrolídeos.

Esta revisão mostra que a azitromicina, em dose adequada, reduz a incidência de DBP em neonatos infectados/colonizados por *Ureaplasma*. Uma revisão sistemática anterior realizada por Nair, Loganathan e Soraisham (2014) também demonstrou a eficácia da azitromicina na prevenção da DBP e, quando administrada profilaticamente, está associada à redução da DBP e da DBP/morte em prematuros. No entanto, segundo os autores da revisão, nas análises combinando os estudos de todos os macrolídeos, quando utilizados profilaticamente ou terapêuticamente em prematuros ventilados com colonização por *Ureaplasma*, não houve uma redução significativa da DBP, do óbito ou do composto DBP/morte (NAIR; LOGANATHAN; SORAISHAM, 2014).

Ozdemir *et al.* (2011), relatam que claritromicina usada em dose de 10 mg/kg/dia por 10 dias demonstrou ser benéfica para bebês com muito baixo peso ao nascer e positivos para o *Ureaplasma urealyticum* (Uu) na redução da incidência do desenvolvimento de DBP. Neste estudo refere, ainda, que todos os resultados de PCR foram negativos após 2 dias da última dose de claritromicina. Dos estudos que usaram azitromicina, apenas Hassan *et al.* (2011) refere problemas nos benefícios do uso dos macrolídeos, mas os autores explicam que suas restrições foram no sentido da dosagem de 10mg/kg/dia em dose única, que seria insuficiente farmacocineticamente. Estes resultados sugerem que 10 mg/kg de azitromicina em dose única é provavelmente inadequado para a erradicação do *Ureaplasma* e prevenção de DBP (HASSAN *et al.*, 2011). No estudo de Ballard *et al.* (2011), a azitromicina não protegeu contra a morte ou a DBP, mas, no subgrupo de bebês que tiveram *Ureaplasma* isolado em aspirados traqueais, a azitromicina diminuiu a DBP de 94% no grupo placebo para 73% no braço antibiótico. Resch, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (2016) afirmam que a eritromicina não é eficaz na prevenção da morbidade respiratória a curto e longo prazo de prematuros colonizados com *U Urealyticum* (Uu). A infecção

por Uu mostrou associação significativa com morbidade pulmonar a curto prazo e acrescenta o comprometimento cerebral leve a longo prazo. Em um estudo de Baier, Loggins e Kruger (2003), a eritromicina não eliminou o *Ureaplasma* das vias aéreas de lactentes e não reduziu a incidência de DBP nos recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP). Os achados da revisão realizada por Mabanta, Pryhuber; Weinberg e Phelps (2003) confirmaram a falta de eficácia da eritromicina no tratamento de infecções por *Ureaplasma* e não mostrou diminuição na incidência ou gravidade da DBP, dados que confirmam os achados atuais de Resch, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (2016).

Merchan *et al.* (2015), mostram que, em dose de 20mg/kg/dia, a azitromicina seria eficaz para erradicar o *Ureaplasma*, após 5 dias da última dose de azitromicina, não havia mais nenhum *Ureaplasma* positivo entre os pacientes do estudo. Viscardi *et al.* (2013) afirmam que essa dose 10mg/kg/dia já seria o suficiente em dose única para tratar o microrganismo onde nas culturas aos 21 dias após tratamento, nenhum resultado foi positivo para ureaplasma. Gharehbaghi *et al.* (2012) não realizaram cultura para *Ureaplasma*, mas administraram azitromicina 10mg/kg/dia por 7 dias e, ao final da intervenção, seus resultados sugeriram que o macrolídeo é eficaz na prevenção da displasia pulmonar, visto que 21 (43%) dos 52 pacientes desenvolveram DBP no grupo-controle, enquanto 14 (25%) o fizeram no grupo de intervenção ($P = 0,04$). A duração média da necessidade de oxigênio suplementar foi $17,7 \pm 2,8$ e $23,95 \pm 4,2$ dias na intervenção e grupos-controle, respectivamente ($p = 0,01$). Contudo, antes do uso rotineiro, os autores sugerem um estudo multicêntrico para avaliar melhor os efeitos da medicação. Os autores alegam que seu estudo teve uma limitação por não terem coletado aspirados traqueais para cultura de *Ureaplasma urealyticum* (GHAREHBAGHI *et al.*, 2012). Chakkarapani, Paes e Shivananda (2015) afirmaram que em seus resultados o uso do macrolídeo não afetou no desfecho DBP. A incidência de DBP moderada e grave foi de 45,2% no grupo de estudo e de 40,3% nos controles ($p=0,65$), ou seja, não houve diferença significativa nas morbidades ou mortalidade entre os grupos, e a abordagem não afetou a incidência de DBP moderada e grave (CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015).

Não há estudos comparando o uso de diferentes os macrolídeos entre recém-nascidos humanos, mas, em modelos animais, a eficácia dos fármacos na profilaxia ou no tratamento foi avaliada e os resultados mostraram que a inflamação pulmonar foi significativamente menor em camundongos tratados com azitromicina do que

naqueles tratados com eritromicina, mesmo se não houvesse diferença estatisticamente significativa na sobrevivência (WALLS; KONG; LEEMING; PLACENCIA; POPEK, 2009).

Foi unânime entre autores dos estudos desta revisão a sugestão de mais pesquisas envolvendo o uso de macrolídeos em recém-nascidos trazendo informações adicionais sobre a segurança e eficácia dos mesmos, atualmente usados *off label* no tratamento neonatal, e a necessidade de melhorar o conhecimento terapêutico nesta população vulnerável (OZDEMIR *et al.*, 2011; BALLARD *et al.*, 2011; GHAREHBAGHI; PEIROVIFAR; GHOJAZADEH; MAHALLEI, 2012; VISCARDI *et al.*, 2013; MERCHAN *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2011; CHAKKARAPANI; PAES; SHIVANANDA, 2015; RESCH; GUTMANN; REITERER; LUXNER; URLESBERGER, 2016).

Eventos adversos do uso de macrolídeos e desfechos do prematuro

Resch, Gutmann, Reiterer, Luxner e Urlesberger (2016) com o uso da eritromicina concluíram que esta não tem efeito sobre os desfechos dos prematuros como sepse tardia 10% caso vs. 14% controle; tempo de ventilação mecânica e Cpap (mediana 11 vs. 6 dias $p = 0,006$ e 25 vs. 16,5 dias $p = 0,019$, grupos caso e controle respectivamente). Gharehbaghi *et al* (2012) observou que a duração média da necessidade de oxigênio suplementar foi $17,7 \pm 2,8$ e $23,95 \pm 4,2$ dias no grupo intervenção que usou azitromicina e controle, respectivamente ($p = 0,01$). Não foi encontrado nenhum efeito adverso a nível hepático ou encontrada nenhuma perda auditiva em neonatos no grupo intervenção em relação ao grupo-controle durante a hospitalização (GHAREHBAGHI; PEIROVIFAR; GHOJAZADEH; MAHALLEI, 2012). Hassan *et al.* (2011) não relataram eventos adversos ligados ao uso de azitromicina. Assim como Viscardi *et al.* (2013), Merchan *et al.* (2015) e Ozdemir *et al.* (2011), os grupos (claritromicina/placebo) não apresentaram diferença significativa na incidência de sepse e pneumonia, enquanto a incidência de DBP foi significativamente menor no grupo da claritromicina (2,9% vs. 36,4%; $P < 0,001$), nenhum evento adverso grave relacionado ao uso de claritromicina foi documentado. Da mesma forma Chakkarapani, Paes e Shivananda (2015) não relataram diferença entre desfechos e nem relato de eventos adversos. Ballard *et al.* (2011) relatam que as causas de morte dos pacientes do estudo incluíram insuficiência respiratória, hipóxia (sete no grupo-

placebo, dois no grupo-azitromicina), sepse confirmada e/ou ECN (16 no grupo- placebo, 11 no grupo-azitromicina), hemorragia pulmonar (1 grupo placebo, 5 grupo azitromicina) e à HIV (2 no grupo azitromicina), mas nenhuma ligada ao uso da azitromicina.

A maioria dos eventos adversos (EAs) relatadas em recém-nascidos prematuros desta revisão estava relacionada à prematuridade e era improvável que fosse causada pelo uso dos macrolídeos. Os resultados de um dos estudos, no entanto, mostraram que a azitromicina tinha um perfil de segurança melhor do que a eritromicina e claritromicina em neonatos. Contudo, cabe ressaltar a escassez de estudos envolvendo drogas como claritromicina e eritromicina.

Os outros EAs relatados nos ensaios clínicos randomizados controlados por placebo/sem tratamento foram, geralmente, associados à prematuridade (hemorragia intraventricular, leucomalácia periventricular, enterocolite necrosante, canal arterial patente e anormalidades auditivas). Eberly *et al* (2015) realizaram uma coorte retrospectiva com lactentes nos primeiros 90 dias de vida e avaliaram a associação entre a exposição à azitromicina oral e eritromicina, e subsequente desenvolvimento de estenose hipertrófica de piloro (EHP). Os autores observaram que os eventos adversos, como diarreia, desconforto abdominal e apetite reduzido, foram menos frequentes em neonatos tratados com azitromicina em relação aos tratados com eritromicina, 2% e 3%, respectivamente, dos neonatos expostos à azitromicina e eritromicina; nos 14 dias de vida desenvolveram estenose hipertrófica do piloro na infância (EHPI). Segundo os autores, a relação entre azitromicina e EHPI requer uma investigação mais aprofundada (EBERLY *et al*, 2015). Em um estudo de Lund *et al*. (2014), o uso de macrolídeos, principalmente eritromicina, durante os primeiros 14 dias de vida, foi significativamente associado à estenose pilórica hipertrófica infantil. Até que novos estudos estejam disponíveis, é necessário cuidado para o uso clínico rotineiro de macrolídeos na prevenção de DBP.

Na metanálise de Nair, Loganathan e Soraisham (2014) embora a incidência de DBP seja variável e apenas um terço dos bebês prematuros eram são colonizados com *Ureaplasma spp.*, assim, os autores sugerem cautela ao usar a terapia profilática com macrolídeos, pois isso pode levar ao tratamento desnecessário de muitos bebês prematuros.

A antibioticoterapia prolongada deve ser evitada em recém-nascidos prematuros, visto que a exposição prolongada a antibióticos tem sido associada a

taxas aumentadas de ECN, sepse de início tardio e morte (2009). Novitsky *et al* (2015) mostraram que o tratamento com > 48 horas de antibioticoterapia empírica na primeira semana de vida foi associado a um risco aumentado de DBP (OR, 2,2; IC95%, 1,4-3,5), usando o *Score for Neonatal Acute Physiology* para controlar a gravidade da doença. O estudo de Cantey *et al.* (2017) apoia esses achados e demonstra um efeito da dose, com o aumento dos dias de terapia, associados ao risco cada vez maior de morte ou DBP. Além disso, usando uma definição de DBP baseada na gravidade, o estudo conseguiu demonstrar uma associação entre a exposição a antibióticos e uma maior gravidade da DBP.

Vários estudos em adultos destacaram a associação entre o uso de macrolídeos e eventos cardiovasculares, notadamente arritmias e morte (CHOI *et al*, 2018). Em 2013, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos emitiu um alerta sobre o uso de azitromicina, especialmente em pacientes de alto risco, como aqueles com síndromes QTc prolongadas conhecidas, sobre medicamentos conhecidos por prolongar o QTc e condições pró-arritmogênicas. Esses eventos não foram descritos na literatura neonatal.

Embora tenha sido relatado esse intervalo QTc prolongado em adultos tratados com azitromicina (HOWARD, 2013), nenhum dos estudos revisados relatou arritmia nos recém-nascidos tratados. Há um caso documentado de arritmia em uma criança após overdose de azitromicina (TILELLI; SMITH; PETTIGNANO, 2006) e a espiramicina, que é um macrolídeo estruturalmente semelhante, foi associada à arritmia neonatal (STRAMBA-BADIALE *et al.*, 1997). O intervalo QT prolongado pode ser normal nos primeiros dias de vida em recém-nascidos prematuros, portanto, é difícil identificar a etiologia induzida por medicamentos durante esse período (ULRICH *et al.*, 2014). Esses eventos não foram descritos nos estudos da nossa revisão.

CONCLUSÃO

A azitromicina ainda mostra-se controversa no que se refere ao efeitos na redução da incidência de DBP em recém-nascidos prematuros. De acordo com os estudos tem um perfil de segurança melhor do que a eritromicina e claritromicina para a população neonatal. Contudo, sugere-se cautela no seu uso e atenta-se para a necessidade de mais estudos avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica com

número maior de pacientes antes do uso da azitromicina nas unidades de terapia intensiva neonatais.

REFERÊNCIAS

AGHAI, Z. H. *et al.* Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. **Pediatric Research**, v. 62, n. 4, p. 483, 2007.

ARAYICI, S. *et al.* The effect of histological chorioamnionitis on the short-term outcome of preterm infants ≤ 32 Weeks: a single-center study. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 27, n. 11, p. 1129-33, 2014.

BAIER, R. J.; LOGGINS, J.; KRUGER, T. E. Failure of erythromycin to eliminate airway colonization with *ureaplasma urealyticum* in very low birth weight infants. **BMC Pediatrics**, v. 3, p. 10, Sep. 2003.

BALLARD, H. O. *et al.* Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Pediatr Pulmonol**, v. 46, n. 2, p. 111-8, Feb. 2011.

BALLARD, H. O.; ANSTEAD, M. I.; SHOOK, L. A. Azitromycin in the extremely low birth weight for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. **Respiratory Research**, v. 8, n. 41, Jun. 2007.

BECK, S. *et al.* The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bull World Health Organ**, v. 88, n. 1, p. 31-8, Jan. 2010.

BEEN, J. V. *et al.* Chorioamnionitis as a risk factor for necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of pediatrics**, v. 162, n. 2, p. 236-242. e2, 2013.

CANTEY, J. B. *et al.* Antibiotic exposure and risk for death or bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. **The Journal of pediatrics**, v. 181, p. 289-293. e1, 2017.

CHAKKARAPANI, A. A.; PAES, B.; SHIVANANDA, S. Macrolides do not affect the incidence of moderate and severe bronchopulmonary dysplasia in symptomatic ureaplasma-positive infants. **Acta Paediatrica**, v. 104, n. 10, p. e427-e432, Oct. 2015.

CHEN, M. L. *et al.* Placenta microbiology and histology and the risk for severe retinopathy of prematurity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 10, p. 7052-8, Sep. 2011.

CHOI, Y. *et al.* Risk evaluation of azithromycin-induced qt prolongation in real-world practice. **BioMed Res Int**, v. 2018, Oct. 2018.

COTTEN, C. M. *et al.* Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 58-66, Jan. 2009.

DATASUS. **MS/SVS/DASIS** - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC. [201-]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Acesso em: 30 ago. 2019.

DE SOUZA, D. M. L. *et al.* Prevalência de prematuridade e fatores associados no estado do rio grande do sul. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4052-70, 2019.

EBERLY, M. D. *et al.* Azithromycin in early infancy and pyloric stenosis. **Pediatrics**, v. 135, n. 3, p. 483-8, Mar. 2015.

EHRENKRANZ, R. A. *et al.* Validation of the national institute of health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1353-60, Dec. 2005.

ERIKSSON, L. *et al.* Prenatal inflammatory risk factors for development of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatric pulmonology**, v. 49, n. 7, p. 665-672, 2014.

GALVÃO, T. F.; PANSANI, T. S. A.; HARRAD, D. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 335-342, 2015.

GHAREHBAGHI, M. M. *et al.* Efficacy of azithromycin for prevention of bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1070-5, 2012.

GUINSBURG, R. *et al.* Death or survival with major morbidity in VLBW infants born at Brazilian neonatal research network centers. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1005-1009, 2016.

HARTLING, L.; LIANG, Y.; LACAZE-MASMONTEIL, T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 97, n. 1, p. F8–F17, Jan. 2012.

HASSAN, H. E. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and biologic effects of azithromycin in extremely preterm infants at risk for ureaplasma colonization and bronchopulmonary dysplasia. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 9, p. 1264-75, Sep. 2011.

HOWARD, P. A. Azithromycin-induced proarrhythmia and cardiovascular death. **Ann Pharmacother**, v. 47, n. 11, p. 1547-51, Nov. 2013.

JAFFÉ, A.; BUSH, A. Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. **Pediatr Pulmonol**, v. 31, n. 6, p. 464-73, May 2001.

JOBE, A. H. The new bronchopulmonary dysplasia. **Current opinion in pediatrics**, v. 23, n. 2, p. 167, 2011.

KALLAPUR, S. G.; KRAMER, B. W.; JOBE, A. H. *Ureaplasma* and BPD. **Seminars in perinatology**, v. 37, n. 2, p. 94-101, Apr. 2013.

KASPER, D. C. *et al.* In Utero, exposure to *ureaplasma* spp. is associated with increased rate of bronchopulmonary dysplasia and intraventricular hemorrhage in preterm infants. **J Perinat Med**, v. 39, n. 3, p. 331-6, May 2011.

KOH, E.; KIM, S.; KIM, I. S.; MAENG, K. Y.; LEE, S. Antimicrobial susceptibilities of *ureaplasma urealyticum* and *mycoplasma hominis* in pregnant women. **Korean Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 159-62, Jan. 2009.

LOWE, J. *et al.* Association between pulmonary *ureaplasma* colonization and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: updated systematic review and meta-analysis. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 7, p. 697-702, 2014.

LUND, M. *et al.* Use of macrolides in mother and child and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis: nationwide cohort study. **Bmj**, v. 348, p. g1908, Mar. 2014.

MABANTA, C. G.; PRYHUBER, G. S.; WEINBERG, G. A.; PHELPS, D. Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with *ureaplasma urealyticum*. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, Oct. 2003.

MALLOY, M. H. Chorioamnionitis: epidemiology of newborn management and outcome United States 2008. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 611-615, 2014.

MERCHAN, L. M. *et al.* Pharmacokinetics, microbial response, and pulmonary outcomes of multidose intravenous azithromycin in preterm infants at risk for *ureaplasma* respiratory colonization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 570-8, Jan. 2015.

MOORE, S. W.; ARNOLD, M.; WRIGHT, C. Necrotizing enterocolitis and the placenta—a key etiological link. **Journal of pediatric surgery**, v. 48, n. 2, p. 359-62, Feb. 2013.

MOSCUZZA, F. *et al.* Correlation between placental histopathology and fetal/neonatal outcome: chorioamnionitis and funisitis are associated to intraventricular haemorrhage and retinopathy of prematurity in preterm newborns. **Gynecol Endocrinol**, v. 27, n. 5, p. 319-23, May 2011.

NAIR, V.; LOGANATHAN, P.; SORAISHAM, A. S. Azithromycin and other macrolides for prevention of bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Neonatology**, v. 106, n. 4, p. 337-47, 2014.

NOVITSKY, A.; *et al.* Prolonged early antibiotic use and bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. **American journal of perinatology**, v. 32, n. 1, p. 43-8, Jan. 2015.

OKOGBULE-WONODI, A. C. *et al.* Necrotizing enterocolitis is associated with *ureaplasma* colonization in preterm infants. **Pediatric Research**, v. 69, n. 5, p. 442-447, May 2011.

OZDEMIR, R. *et al.* Clarithromycin in preventing bronchopulmonary dysplasia in *ureaplasma* urealyticum–positive preterm infants. **Pediatrics**, v. 128, n. 6, p. e1496-e1501, Dec. 2011.

OZDEMIR, R. *et al.* The association between respiratory tract *ureaplasma* urealyticum colonization and severe retinopathy of prematurity in preterm infants \leq 1250 g. **Eye**, v. 26, n. 7, p. 992-996, July 2012.

PERRONE, S. *et al.* Perinatal outcome and placental histological characteristics: a single-center study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, n. sup1, p. 110-3, 2012.

RESCH, B.; GUTMANN, C.; REITERER, F.; LUXNER, J.; URLESBERGER, B. Neonatal *ureaplasma* urealyticum colonization increases pulmonary and cerebral morbidity despite treatment with macrolide antibiotics. **Infection**, v. 44, n. 3, p. 323-7, June 2016.

SCHELONKA, R. L.; KATZ, B.; WAITES, K. B.; BENJAMIN JUNIOR, D. K. Critical appraisal of the role of *ureaplasma* in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, n. 12, p. 1033-9, Dec. 2005.

SEVILLA-SANCHEZ, D.; SOY-MUNER, D.; SOLER-PORCAR, N. Usefulness of macrolides as anti-inflammatories in respiratory diseases. **Arch Bronconeumol**, v. 46, n. 5, p. 244-54, May 2010.

STIMAC, M. *et al.* Effect of chorioamnionitis on mortality, early onset neonatal sepsis and bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates with birth weight of <1,500 grams. **Coll Antropol**, v. 38, n. 1, p. 167-71, Mar. 2014.

STOLL, B. J. *et al.* Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. **Jama**, v. 314, n. 10, p. 1039-51, Sep. 2015.

STRAMBA-BADIALE, M. *et al.* QT interval prolongation and risk of life-threatening arrhythmias during toxoplasmosis prophylaxis with spiramycin in neonates. **American heart journal**, v. 133, n. 1, p. 108-111, 1997

SWEENEY, E. L. *et al.* The Human *ureaplasma* species as causative agents of chorioamnionitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 349-79, Dec. 2017.

TILELLI, J. A.; SMITH, K. M.; PETTIGNANO, R. Life-threatening bradyarrhythmia after massive azithromycin overdose. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 1, p. 147-50, Jan. 2006.

ULRICH, T. J. B. *et al.* Heart-rate-corrected QT interval evolution in premature infants during the first week of life. **Pediatric cardiology**, v. 35, n. 8, p. 1363-1369, 2014.

VISCARDI, R. M. *et al.* Azithromycin to prevent bronchopulmonary dysplasia in ureaplasma-infected preterm infants: pharmacokinetics, safety, microbial response, and clinical outcomes with a 20-milligram-per-kilogram single intravenous dose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2127-33, May 2013.

VISCARDI, R. M. Ureaplasma species: role in neonatal morbidities and outcomes. **Arch Dis in Child Fetal Neonatal Ed**, v. 99, n. 1, p. F87-F92, Nov. 2014.

VISCARDI, R. M.; HASDAY, J. D. Role of Ureaplasma species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. **Pediatric Research**, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 84R-90R, May 2009.

VISCARDI, R. M.; HASHMI, N.; GROSS, G. W.; SUN, C. C.; RODRIGUEZ, A.; FAIRCHILD, K. D. Incidence of invasive ureaplasma in vlbw infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. **Journal of Perinatology**, v. 28, n. 11, p. 1-7, July 2008.

VISCARDI, R. M.; KALLAPUR, S. G. Role of *ureaplasma* respiratory tract colonization in bronchopulmonary dysplasia pathogenesis: current concepts and update. **Clinics in perinatology**, v. 42, n. 4, p. 719-38, Dec. 2015.

WAGNER, B. D. *et al.* Airway microbial community turnover differs by bpd severity in ventilated preterm infants. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. 1e0170120, Jan. 2017.

WALLS, S. A.; KONG, L.; LEEMING, H. A.; PLACENCIA, F. X.; POPEK, E. J.; WEISMAN, L. E. Antibiotic prophylaxis improves *ureaplasma*-associated lung disease in suckling mice. **Pediatric Research**, v. 66, n. 2, p. 197-202, Aug. 2009.

WOO, S. J. *et al.* Effects of maternal and placental inflammation on retinopathy of prematurity. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 250, n. 6, p. 915-23, Jun. 2012.

7.2 ARTIGO 2

Neonatology

DOI: [10.1159/000509462](https://doi.org/10.1159/000509462)

USE OF AZITHROMYCIN FOR THE PREVENTION OF LUNG INJURY IN MECHANICALLY VENTILATED PRETERM NEONATES: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

Cristiane R. Nunes^{a, b} Renato S. Procianoy^{a-c} Andréa L. Corsoa^{-c}

Rita C. Silveira^{a-c}

^a Graduate Program in Child and Adolescent Health, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^b Neonatology Section, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil; ^c Department of Pediatrics, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Keywords: Azithromycin; Bronchopulmonary dysplasia; Interleukins; Newborn; Premature infant.

ABSTRACT

Introduction: Macrolides have anti-inflammatory and immunomodulatory properties that give this class of antibiotics a role that differs from its classical use as an antibiotic, which opens new therapeutic possibilities. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of azithromycin in preventing mechanical ventilation (MV)-induced lung injury in very-low-birth-weight preterm neonates. **Methods:** This is a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of preterm neonates who received invasive MV within 72 h of birth. Patients were randomized to receive intravenous azithromycin (at a dose of 10/mg/kg/day for 5 days) or placebo (0.9% saline) within 12 h of the start of MV. Two blood samples were collected (before and after intervention) for measurement of interleukins (ILs) and PCR for Ureaplasma. Patients were followed up throughout the hospital stay for the outcomes of death and broncho-pulmonary dysplasia defined as need for oxygen for a period of ≥ 28 days of life (registered at ClinicalTrials.gov, No. [NCT03485703](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03485703)). **Results:** Forty patients were analyzed in the azithromycin group and 40 in the placebo group. Five days after the last dose, serum IL-2 and IL-8 levels dropped significantly in the azithromycin group. There was a significant reduction in the incidence of death and O₂ dependency at 28 days/death in azithromycin-treated patients regardless of the detection of Ureaplasma in blood. **Conclusions:** Azithromycin has anti-inflammatory effects, with a decrease in cytokines after 5 days of use and a reduction in death and O₂ dependency at 28 days/death in mechanically ventilated preterm neonates.

Introduction

The overall incidence of bronchopulmonary dysplasia (bpd) in preterm neonates has not decreased significantly in recent decades, which may be attributable to the increased survival

of more ill neonates with lower gestational age. Those born at a gestational age >28 weeks have a lower incidence of bpd, approximately 19%, and, when it occurs, it is usually mild. The incidence of bpd in preterm neonates with birth weight <1,000 g is about 40% [1]. Bpd is a multifactorial disease with prematurity as the main factor; however, the need for endotracheal intubation/mechanical ventilation (mv), use of oxygen, deficiency of pulmonary antioxidants, and infections are the factors most commonly associated with bpd [2].

Lowe et al. [3], in a meta-analysis of 39 studies, suggested that colonization of the respiratory tract with the genital mycoplasma species *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* increased the risk of developing BPD in extremely preterm infants. Chorioamnionitis is a polymicrobial infection that includes urogenital mycoplasma and increases the risk of early neonatal sepsis, often triggering a pulmonary inflammatory cascade even before birth [4]. Among the bacteria most commonly involved in and associated with BPD are ureaplasmas, which colonize more than 11% of pregnancies with preterm labor [5, 6].

Changes in proinflammatory cytokines have been implicated in the pathogenesis of almost all disease processes in preterm infants mainly by modulating damage to the brain, intestines, and lungs. Data have shown increased cytokine levels in sepsis, in mechanically ventilated patients [7–10] and in moderate to severe BPD [8, 11, 12]. In addition, MV is known to be directly related to tissue damage in the immature lung parenchyma [13].

Macrolides have anti-inflammatory and immunomodulatory activity, as demonstrated in in vivo and in vitro studies using human and animal models in different clinical settings [14]. These properties give this class of antibiotics a role that differs from its classical use as an antibiotic, which opens new therapeutic possibilities [15, 16]. We hypothesized that azithromycin as an anti-inflammatory agent may reduce pulmonary inflammation by suppressing the production of MV-induced cytokines and, thus, promoting long-term benefits to the lungs of preterm neonates. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of azithromycin in preventing MV-induced injury mediated by plasma cytokine levels in preterm neonates.

Methods

This randomized, double-blind, placebo-controlled trial is registered at ClinicalTrials.gov, No. NCT03485703. The study was conducted from August 2013 to February 2016 in the neonatal intensive care unit (NICU) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Participantes

Eligible participants were very-low-birth-weight neonates (<1,500 g) admitted to the NICU during the study period who received invasive MV within 72 h of birth and, necessarily, invasive ventilatory support for, at least, 12 h until randomization. Patients with congenital malformations or chromosomal syndromes and those born to HIV-positive mothers were excluded. We did not include twins or multiple siblings.

Gestational age was determined by the best obstetric estimate or by physical examination of the neonate. BPD was defined as the need for oxygen for a period of ≥ 28 days of life [2].

The randomized controlled trial was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, No. 110639, in accordance with Brazilian National Health Council Resolution No. 466/2012.

Randomization

Randomization was by a computer-generated simple allocation sequence (www.randomization.com). Participants were randomly assigned to receive either azithromycin or placebo at the time they had completed 12 h of invasive MV. A professional with no involvement in the trial, in this case, the pharmacist responsible for diluting and dispensing the medication, was also responsible for the computer-generated list of random numbers for patient allocation. The medication was prescribed by the attending physician.

Procedures

After the parents/legal guardians of the preterm neonates consented to the study, just one 500- μ L blood aliquot was collected and separated in an EDTA tube for cytokine analysis and in a PCR tube for Ureaplasma analysis (Real-TM Kit, Sacace Biotechnologies).

Cytokine levels were measured in duplicate using the commercially available Human Cytokine LINCOplex kit (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA). This is a multiplex assay used for the simultaneous quantitative measurement of cytokines, with an intra- and inter-assay precision of 8–12%. The following cytokines were measured: interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, and IL-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α . The readings were performed by Luminex 100 (Austin, TX, USA) with appropriate software.

The blood sample used for detection of ureaplasmas was centrifuged and frozen at -80° . At the time of analysis, the samples were thawed and a U. parvum/urealyticum Real-TM kit (Sacace Biotechnologies) was used for detection of ureaplasmas.

One group of neonates received intravenous azithromycin at a dose of 10 mg/kg/day, and the other group received placebo (0.9% saline) at the same dose. Five days after the first use of azithromycin or placebo (5 doses of medication or placebo), a second blood sample was collected 24 h after the last dose of azithromycin or placebo for serum measurement of cytokines and PCR for detection of ureaplasmas. No blood samples were collected exclusively for the study; an additional blood aliquot was collected during routine blood draws. Patients were followed up throughout the hospital stay.

Blinding

Blinding included all those responsible for the neonates participating in the study, the entire medical team and nursing staff, who were unaware of whether azithromycin or placebo had been assigned to each patient, and the investigators who guided the nursing staff on the administration of the medication/placebo and monitored blood collections.

Statistical Analysis

Qualitative variables were expressed as frequencies and percentages. Quantitative variables were expressed as mean and SD or median and interquartile range. To compare means between groups, the Student t test was applied. In case of asymmetry, the Mann-Whitney test was used. When comparing proportions, Pearson's χ^2 or Fisher's exact tests were applied. In the intra- and intergroup comparisons simultaneously, the Generalized Estimating Equations model complemented by the Least Significant Difference test was applied. To control confounding factors, the Multivariate Poisson Regression model was applied. The criterion for entering the variable in the multivariate model was that the factor had a p value <0.20 in the bivariate association with the outcome. An intention-to-treat analysis was done. The level of significance adopted was 5% ($p < 0.05$), and the analyses were performed using the SPSS version 21.0 program.

Sample Size Calculation

The sample size was calculated using the WinPEPI program (Programs for Epidemiologists for Windows) version 11.43 and based on the study by Ballard et al. [16]. Considering a significance level of 5%, power of 80%, incidence of BPD estimated at 80%, and a relative risk of 0.62 for the group using azithromycin, a minimum total of 38 patients was obtained by group.

Results

During the study period, 953 neonates were admitted to the NICU of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Of these, 222 were assessed for eligibility. However, 142 neonates were excluded: 58 who had congenital malformations, vertical exposure to HIV or positive STORCH, 35 whose parents/legal guardians refused to participate in the study, and 49 who did not require invasive MV or received it for <12 h. The final sample consisted of 80 preterm neonates, 40 in the azithromycin group (intervention group) and 40 in the placebo group (control group). Three newborns, 2 in the intervention group and 1 in the control group, died before completing the 5 days of randomization (Fig. 1).

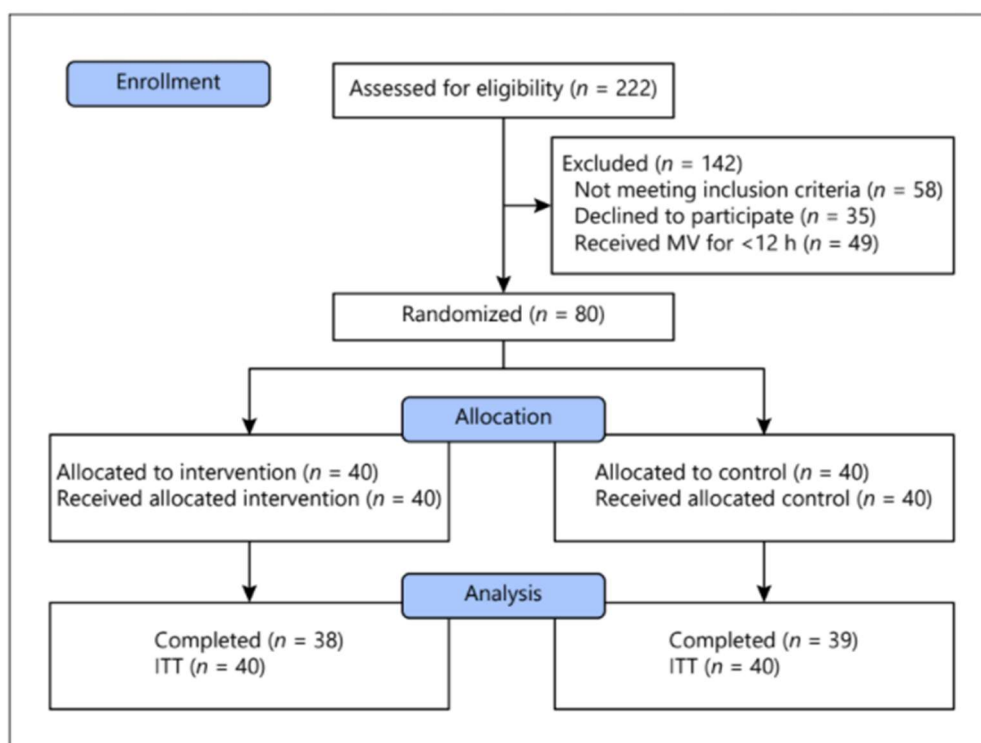


Fig.1. CONSORT flow chart diagram intention to treat (ITT).

The group that used azithromycin showed gestational age and Apgar scores at 5 min significantly higher than the control group (Table 1).

Table 1. Characteristics of neonates included in the study ($n=80$).

Characteristics	Azithromycin ($n = 40$)	Placebo ($n = 40$)	<i>p</i> value
Gestational age (weeks)	28.6±2.99	27.1±2.31	0.010 ^a
Birth weight (g)	1090±575	896±268	0.058 ^a
Female	24 (60.0)	21 (52.5)	0.652 ^b
Antenatal corticosteroids	29 (74.4)	27 (67.5)	0.672 ^b
Cesarean section	32 (80.0)	27 (67.5)	0.309 ^b
Histological chorioamnionitis	17 (43.6)	22 (55.0)	0.430 ^b
Adequate for gestational age	27 (67.5)	29 (72.5)	0.807 ^d
Apgar score			
5th minute	8 (7-9)	7 (6-8)	0.043 ^c
Resuscitation maneuvers in the delivery room	38 (95.0)	39 (97.5)	1.000 ^b
Positive pressure ventilation	26 (65.0)	23 (57.5)	0.646 ^b
CPAP	29 (72.5)	29 (72.5)	1.000 ^b
Use of surfactants			
1st dose	36 (90.0)	38 (95.0)	0.675 ^b
2nd dose	28 (70.0)	30 (75.0)	0.802 ^b

Values are expressed as mean ± SD; absolute numbers and percentages, n (%); and median and interquartile range (p25–p95). CPAP, continuous positive airway pressure. ^a Values obtained by Student t test. ^b Values obtained by Fisher's exact test. ^c Values obtained by the Mann-Whitney U test. ^d Values obtained by Pearson's χ^2 test

In intra-group comparisons, there was a statistically significant reduction in the levels of IL-2, IL-8, and IL-10 in the azithromycin group and a significant increase in IL-2 levels in the control group. In the intergroup comparisons, when adjusted for gestational age, birth weight, and 5-min Apgar score, the group that used azithromycin showed significantly lower IL-2 and IL-8 values after the intervention than the control group. The differences between the groups for the levels of IL-1 β and IL-10 were borderline (Table 2).

Table 2. Plasma interleukin levels before and after azithromycin or placebo.

Cytokines (pg/mL)	Azithromycin		<i>p</i> value ^a	Placebo		<i>p</i> value ^a	Difference between groups	<i>p</i> value ^b
	Before	After		Before	After			
IL-1 β	38.5 ± 5.29	34.0 ± 3.68	0.377	26.2 ± 3.66	36.4 ± 6.01	0.071	-14.6 (-29.3 to 0.2)	0.053
IL-2	50.3 ± 2.91	46.4 ± 2.58	0.044	37.4 ± 3.35	47.0 ± 3.37	0.033	-13.6 (-23.2 to -3.9)	0.006
IL-6	1616 ± 775	193 ± 44.4	0.068	938 ± 361	518 ± 281	0.092	-1002 (-2604 to 599)	0.220
IL-8	2891 ± 547	1476 ± 231	0.006	1760 ± 339	2249 ± 296	0.113	-1904 (-3083 to -725)	0.002
IL-10	375 ± 98.3	174 ± 31.8	0.032	350 ± 95.1	367 ± 99.4	0.827	-218 (-458 to 21.3)	0.074
TNF- α	227 ± 24.4	187 ± 9.98	0.127	172 ± 31.9	193 ± 18.5	0.486	-61.2 (-139 to 17.4)	0.127

Values are expressed as mean ± SE. IL (interleukin); TNF (tumor necrosis factor). ^a Values obtained by LSD (*Least Significant Difference*) test. ^b Values obtained by Generalized Linear Model (GEE) with gamma model adjusted by gestational age, birth weight and 5th minute apgar score.

Table 3. Neonatal characteristics and morbidities in the azithromycin and placebo groups.

Characteristics	Azithromycin (n = 40)	Placebo (n = 40)	p value
Hours of MV at 1st collection			
after randomization	2.75 (2.00-4.75)	3.00 (1.25-4.00)	0.973 ^b
Days of MV	8.0 (3.25- 24)	15.0 (5.5-39.3)	0.112 ^b
Days of oxygen therapy	15.5 (8.25– 56.0)	35.5 (11.3 – 58.5)	0.121 ^b
Days of TPN	14.5 (10.0 – 20.0)	24.0 (12.5 – 53.0)	0.006 ^b
PDA	26 (65.0)	26 (65.0)	1.000 ^a
Pharmacological closure	19 (47.5)	22 (55.0)	0.655 ^a
Surgical closure	0 (0)	4 (10.0)	0.116 ^a
Early sepsis	4 (10.0)	1 (2.5)	0.359 ^a
Late sepsis	10 (25.0)	16 (40.0)	0.233 ^a
Pneumonia	7 (17.5)	10 (25.0)	0.585 ^a
Necrotizing enterocolitis	4 (10.0)	10 (25.0)	0.141 ^a
Cholestasis	3 (7.5)	3 (7.5)	1.000 ^a
ICH	12 (30.0)	8 (20.0)	0.439 ^a
Postnatal corticosteroids	10 (25.0)	18 (45.0)	0.101 ^a
Oxygen dependency at 28 days	14/32 (43.8)	22/29 (75.9)	0.022 ^a
Oxygen dependency at 36 weeks	9/32 (28,1)	9/29 (31.0)	1.000 ^a
Death	8 (20.0)	15 (37.5)	0.138 ^a
Oxygen dependency at 28 days/death	22 (55.0)	34 (85.0)	0.007 ^a
Oxygen dependency at 36 weeks/death	17 (42.5)	23 (57.5)	0.264 ^a
Hospital stay in days	53.5 (17.0 – 90.5)	63.5 (23.3 – 86.5)	0.939 ^b

Values are expressed as absolute numbers and percentages, n (%); and median and interquartile range (p25–p95). MV, mechanical ventilation; TPN, total parenteral nutrition; PDA, patent ductus arteriosus; ICH; intracranial hemorrhage. ^a Values obtained by Fisher’s exact test or χ^2 test. ^b Values obtained by the Mann-Whitney U test.

Table 3 shows a comparison between the 2 groups of the main characteristics and neonatal morbidities of preterm neonates. Total parenteral nutrition days were significantly lower in the azithromycin group when compared to the control group. The proportion of O2 dependency at 28 days and combined O2 dependency at 28 days/death were also significantly lower in the azithromycin group. It is important to highlight that there was no significant difference between the groups in duration of MV after randomization at the time the first blood sample was collected to begin the study.

The PCR for *Ureaplasma* at the first pre-treatment blood collection was positive in 32.5% ($n = 13$; 2 *U. urealyticum* and 11 *U. parvum*) of the preterm neonates receiving azithromycin and in 42.5% ($n = 17$; 6 *U. urealyticum* and 11 *U. parvum*) of those receiving

placebo, and positivity after 5 days of azithromycin or placebo was 15.0% ($n = 6$; 1 *U. urealyticum* and 5 *U. parvum*) and 27.5% ($n = 11$; 2 *U. urealyticum* and 9 *U. parvum*) for the intervention and control groups respectively. It should be noted that the second blood sample for measurements was collected 24 h after the end of the intervention.

Considering only the patients who had positive ureaplasma and completed the study, after adjusting for confounding factors, there was no significant effect of azithromycin on the outcomes shown in Table 4.

Table 4. Outcomes of *ureaplasma*-positive patients ($n= 28$).

Outcomes	Azithromycin (n = 12)	Placebo (n = 16)	RR (95% CI)	p value
Late sepsis	5 (41.7)	8 (50.0)	1.22 (0.54 – 2.76)	0.642 ^a
Pneumonia	4 (33.3)	5 (31.3)	1.87 (0.51 – 6.86)	0.346 ^a
Necrotizing enterocolitis	2 (16.7)	6 (37.5)	0.49 (0.12 – 2.09)	0.338 ^a
ICH	4 (33.3)	8 (50.0)	0.62 (0.22 – 1.71)	0.351 ^a
O2 dependency at 28 days	6 (50.0)	11/14 (78.6)	0.76 (0.46 – 1.25)	0.280 ^a
O2 dependency at 36 weeks	5 (41.7)	6 (37.5)	1.60 (0.57 – 4.49)	0.374 ^a
Death	0 (0)	2 (12.5)	^b	0.492 ^a
O2 dependency at 28 days/death	6 (50)	13 (81.3)	0.79 (0.48 – 1.30)	0.344 ^a
O2 dependency at 36 weeks/death	5 (41.7)	8 (50.0)	1.29 (0.56 – 2.94)	0.548 ^a

Values are expressed as absolute numbers and percentages, n (%). ICH, intracranial hemorrhage. ^a Values obtained by Poisson Regression adjusted by gestational age, birth weight and 5th minute apgar score. ^b the calculation was not performed due to an insufficient number of cases

In the total sample, after adjustment for confounding factors, there was a significant effect of azithromycin on death and the combined outcome O2 dependency at 28 days/death. Patients using azithromycin had a 47% reduction in the risk of death and a 29% reduction in the risk of the combined outcome (O2 dependency at 28 days/death; Table 5).

Table 5. Outcomes of total sample ($n= 80$).

Outcomes	Azithromycin (n = 40)	Placebo (n = 40)	RR (95% CI)	p value
Late sepsis	10 (25.0%)	16 (40.0%)	0.80 (0.44 – 1.46)	0.458 ^a
Pneumonia	7 (17.5%)	10 (25.0%)	0.69 (0.28 – 1.70)	0.419 ^a
Necrotizing enterocolitis	4 (10.0%)	10 (25.0%)	0.38 (0.11 – 1.25)	0.109 ^a
ICH	12 (30.0%)	8 (20.0%)	1.45 (0.63 – 3.33)	0.383 ^a
O2 dependency at 28 days	14/32 (43.8%)	22/29 (75.9%)	0.77 (0.56 – 1.06)	0.114 ^a
O2 dependency at 36 weeks	9/38 (23.7%)	9/39 (23.1%)	1.09 (0.48 – 2.48)	0.829 ^a
Death	8 (20.0%)	15 (37.5%)	0.53 (0.28 – 0.98)	0.044 ^a
O2 dependency at 28 days/death	22 (55.0%)	34 (85.0%)	0.71 (0.58 – 0.87)	0.001 ^a
O2 dependency at 36 weeks/death	17 (42.5%)	23 (57.5%)	0.80 (0.54 – 1.19)	0.267 ^a

Values are expressed as absolute numbers and percentages, n (%). ICH, intracranial hemorrhage. ^a Values

obtained by Poisson Regression adjusted by gestational age, birth weight and 5th minute apgar score.

All patients were monitored for prolonged QT interval, brainstem evoked response audiometry, and hypertrophic pyloric stenosis, and none of them had any of these side effects from the use of azithromycin.

Discussion

In this randomized placebo-controlled trial, we identified an anti-inflammatory effect of 5-day use of intravenous azithromycin at 10 mg/kg/day in mechanically ventilated preterm neonates. After adjustment for gestational age, birth weight, and 5-min Apgar score, the group that used azithromycin showed significantly lower IL-2 and IL-8 values than the control group, and a borderline significant decrease in IL-1 β and IL-10 levels. The occurrence of death and combined O₂ dependency at 28 days/death were significantly lower in azithromycin-treated patients.

IL-6, IL-1 β , and TNF- α are acute-phase cytokines expressed immediately after lung damage occurs [9]. The anti-inflammatory expression of IL-10 occurs later, after the release of IL-8, especially in preterm infants born at a gestational age <30 weeks. Preterm infants may have deficient production of regulatory ILs, such as IL-10, and may therefore be more prone to an increased inflammatory response [17].

The data from the present study are consistent with those reported in the literature indicating that there is a relationship between increased cytokine levels and subsequent development of BPD [18–21]. Merchan et al. [22] administered azithromycin to 15 preterm infants at 20 mg/kg/day for 3 days. They showed a decrease in IL levels in tracheal aspirates 2 days after the last dose, and no differences 4 days after the last dose. Although at a different dose, their results were similar to ours in blood in that IL-1 β , IL-8, and IL-6 levels decreased. It is interesting to note that, because post-treatment blood samples were collected at 2 days after the last dose, 5 days after the last dose, and 21 days' postnatal age, IL behavior could be observed for a longer time [22].

Azithromycin had a protective effect against combined O₂ dependency at 28 days/death. Similarly, Gharehbaghi et al. [23] used azithromycin at 10 mg/kg/day for 7 days suggesting prevention of BPD: 21 (43%) of 52 neonates in the control group developed BPD compared to only 14 (25%) in the intervention group ($p = 0.04$). A meta-analysis of randomized controlled

trials assessing azithromycin in the past 10 years concluded that azithromycin when administered prophylactically is associated with reduction in BPD and BPD/death in preterm infants [24].

Ballard et al. [16] reported that the use of azithromycin was only effective in protecting against BPD in the sub-group of preterm infants with *Ureaplasma* isolated from tracheal aspirates, with a drop in BPD rates from 94 to 73%. Viscardi et al. [25] in a randomized clinical trial involving 121 very preterm newborns with azithromycin showed that mortality was decreased in those initially colonized with *Ureaplasma* that became *Ureaplasma* free after treatment.

Differently from our findings, Glaser et al. [26] studied very premature newborns who had *Ureaplasma* in the respiratory tract or cord blood and they suggested that the increased risk of lung injury was associated with ≥ 5 days of MV. A limitation of our study is the fact that we did not study respiratory tract *Ureaplasma* colonization, but rather the presence of bacteremia. *Ureaplasma* infection rates were high before treatment with azithromycin or placebo compared with those reported in previous studies [27, 28]. Fonseca et al. [27] and Viscardi et al. [28] included in their investigation all ill and non-ill neonates born at a gestational age ≤ 32 weeks, unlike the sample analyzed in the present study, which included only preterm neonates who required MV.

We suggest that azithromycin, due to its anti-inflammatory action, decreases the risk of lung injury secondary to MV in very-low-birth-weight preterm infants regardless of the presence of *Ureaplasma* bacteremia.

Although azithromycin decreased the inflammatory response to MV in extremely preterm newborns, we did not find an association between use of azithromycin and lower occurrence of combined O₂ dependency at 36 weeks/death. We speculate that either a higher dose (20 mg/kg) or a longer treatment period (7–10 days) could have resulted in a significant result on the combined O₂ dependency at 36 weeks/death. The small sample size and the single-center source of data can be seen as limitations of this study.

The potential of azithromycin as a chemoprophylactic agent for oxygen dependency in neonates is still being explored. Treatment with azithromycin reduced death and combined O₂ dependency at 28 days/death in preterm neonates who received invasive MV within 72 h of birth. We suggest that a large, multicenter study be conducted to evaluate treatment in *Ureaplasma*-colonized/-infected preterm neonates before azithromycin can be recommended as a routine therapy in extremely preterm infants in MV.

Statement of Ethics

The randomized controlled trial was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, No. 110639, in accordance with Brazilian National Health Council Resolution No. 466/2012. The parents/legal guardians provided written informed consent prior to inclusion in the study. The study was registered at ClinicalTrials.gov, No. NCT03485703.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

The study was supported in part by a grant from PROAP Capes and by FIPE HCPA.

Author Contributions

All authors were responsible for the conception, design, analysis, and interpretation of data, data collection, writing the draft of the manuscript, and final approval of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the article.

REFERÊNCIAS

1. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *JAMA*. 2015 Sep 8;314(10):1039-51.
2. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;163(7):1723-9.
3. Lowe J, Watkins WJ, Edwards MO, Spiller OB, Jacqz-Aigrain E, Kotecha SJ, et al. Association between pulmonary ureaplasma colonization and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: updated systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Jul;33(7):697-702.
4. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008 Aug 26;3(8):e3056.
5. Cox C, Saxena N, Watt AP, Gannon C, McKenna JP, Fairley DJ, et al. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 Nov;29(22):3646-51.
6. Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, Knox CL. The human ureaplasma species as causative agents of chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jan;30(1):349-79.
7. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. *Crit Care Med*. 2002 Aug;30(8):1693-700.
8. Lal CV, Ambalavanan N. Biomarkers, early diagnosis, and clinical predictors of bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol*. 2015 Dec;42(4):739-54.
9. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr*. 2010 Jan;156(1):16-9.
10. Carvalho CG, Silveira Rde C, Neto EC, Procianoy RS. Plasma cytokine levels fall in preterm newborn infants on nasal CPAP with early respiratory distress. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120486.
11. Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics*. 1994 May;93(5):712-8.

12. Vento G, Capoluongo E, Matassa PG, Concolino P, Vendettuoli V, Vaccarella C, et al. Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Med.* 2006 May;32(5):723-30.
13. Balany J, Bhandari V. Understanding the impact of infection, inflammation, and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Front Med (Lausanne).* 2015;2:90.
14. Ianaro, Angela, et al. "Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics." *Journal of Pharmacology and Exp Ther.* 2000. Jan; 292(1): 156-163.
15. Ballard HO, Anstead MI, Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. *Respir Res.* 2007 Jun 5; 8:41.
16. . Ballard HO, Shook LA, Bernard P, Anstead MI, Kuhn R, Whitehead V, et al. Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Pediatr Pulmonol.* 2011 Feb;46(2):111-8.
17. Ireland SJ, Monson NL, Davis LS. Seeking balance: potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by il-6 and il-10. cytokine. 2015 Jun;73(2):236-44.
18. Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 2009 Apr;123(4):1132-41.
19. Jobe AH. Blood cytokines and BPD. *J Pediatr.* 2009 Jan;154(1):A2.
20. Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R, Herva R, Kaukola T, Hallman M. Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr.* 2009 Jan;154(1):39-43 e3.
21. . Iwatani S, Mizobuchi M, Tanaka S, Fujioka K, Wada K, Sakai H, et al. Increased levels of interleukin-6 in tracheal aspirate fluid are indicative of fetal inflammation in ventilated extremely low gestational age newborns. *Kobe J Med Sci.* 2014 Jun 18;60(1):E19-24.
22. . Merchan LM, Hassan HE, Terrin ML, Waites KB, Kaufman DA, Ambalavanan N, et al. Pharmacokinetics, microbial response, and pulmonary outcomes of multidose intravenous azithromycin in preterm infants at risk for *Ureaplasma* respiratory colonization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):570-8.
23. Gharehbaghi MM, Peirovifar A, Ghojazadeh M, Mahallei M. Efficacy of azithromycin for prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Turk J Med Sci.* 2012;42(6):1070-75.

24. Nair V, Loganathan P, Soraisham AS. Azithromycin and other macrolides for prevention of bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Neonatology*. 2014;106(4):337-47.
25. Viscardi RM, Terrin ML, Magder LS, Davis NL, Dulkerian SJ, Waites KB, et al. Randomised trial of azithromycin to eradicate ureaplasma in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2020, Online ahead of print.
26. Glaser K, Gradzka-Luczewska A, Szymankie-wicz-Breborowicz M, Kawczynska-Leda Ninjury Henrich B, Waaga-Gasser AM, et al. Perinatal ureaplasma exposure is associated with increased risk of late onset sepsis and imbalanced inflammation in preterm infants and may add to lung injury. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Apr; 9:68.
27. Viscardi RM, Othman AA, Hassan HE, Eddington ND, Abebe E, Terrin ML, et al. Azithromycin to prevent bronchopulmonary dysplasia in ureaplasma-infected preterm infants: pharmacokinetics, safety, microbial response, and clinical outcomes with a 20-milligram-per-kilogram single intravenous dose. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2127-33.
28. Fonseca LT, Silveira RC, Procianoy RS. Ureaplasma bacteremia in very low birth weight infants in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Dec;30(12):1052-5.

8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo observamos que os níveis plasmáticos de todas interleucinas foram mais reduzidos após 5 dias de intervenção no grupo azitromicina em relação ao grupo placebo. As citocinas pró inflamatórias IL2, IL-6 e IL-8 foram as que tiveram redução mais significativa em relação ao placebo. Além disso, nos prematuros que receberam placebo, os níveis plasmáticos de IL1- β e IL-8 foram significativamente maiores após 5 dias de tratamento, demonstrando uma ação inflamatória sustentada.

Não encontramos uma diminuição estatisticamente significativa na DBP nos pacientes tratados com azitromicina, embora a incidência tenha sido menor do que nos bebês tratados com placebo. A mortalidade foi menor no grupo azitromicina quando comparado ao grupo do placebo. Observamos que a azitromicina agiu positivamente em vários aspectos analisados no estudo, como menor tempo de VM, menos dias de uso de NPT (que pode ser importante para reduzir o risco de colestase associado ao uso prolongado da NPT), menos tempo de uso de oxigenoterapia e internação hospitalar menor, reduzindo a exposição do pré termo, aos riscos da permanência prolongada no ambiente hospitalar. Não observamos eventos adversos em nenhum paciente relacionado ao uso de azitromicina, confirmando que esta apresenta-se como droga segura para uso em RNPT.

A azitromicina demonstrou um efeito protetor para DBP/morte, pois a nossa incidência de DBP/morte foi significativamente menor com o uso de azitromicina por 5 dias.

De modo geral todos dos resultados do estudo nos apontam que o grupo azitromicina teve melhores desfechos dos prematuros durante o seguimento da internação neonatal, mesmo que estatisticamente não significativos. Podemos pensar que o nosso tamanho de amostra dificulta uma conclusão mais concreta quanto os benéficos da azitromicina, mas é inegável que eles existem.

A corioamnionite materna está associada com desenvolvimento da displasia broncopulmonar, sendo o *Ureaplasma urealyticum* (*Uu*) um dos principais agentes associados. Tivemos uma alta incidência de *Ureaplasma* na nossa amostra, sendo que a positividade de *Uu* pós-intervenção com azitromicina caíram 24 horas depois da última dose apesar de não havermos encontrado significância estatística. Cabe ressaltar que nosso estudo coletou a apenas uma amostra pós intervenção e foi 24 horas após o término. Confirmando o achado de que *Ureaplasma* spp é um dos

principais agentes causadores de corioamnionite e nascimento prematuro, no nosso estudo, tivemos 16 casos de corioamnionite com Ua positivos.

Os nossos dados vão ao encontro com os da literatura que afirmam existir uma relação entre níveis elevados de citocinas, infecção/colonização por *Ureaplasma* e o subsequente desenvolvimento de DBP.

Apesar dos avanços na medicina perinatal terem melhorado muito a sobrevivência dos prematuros com idade gestacional cada vez menores, as complicações inerentes da prematuridade não tiveram redução nas suas taxas, fazendo do nascimento pré-termo um fator muito preocupante para as equipes assistenciais.

APENDICE A - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS PROJETO 110639**CADASTRO amostra ()....**

Nome: RN:.....Registro:.....

DN:.....Local:.....Sexo:.....

Mãe:.....Idade:.....Gesta:.....P.....A.....C..

Pai:.....

Telefones:.....

Endereço:.....

Pré-natal: nr.cons.() exames alterados:.....

Medicações utilizadas

() Pré-eclâmpsia () HAS Previa a Gestação; () Corioamnionite

() DMG; () ITU; () Fumo;

() Uso de corticóide: nr. de doses.....; quando.....

IGO:..... Eco:.....DUM.....

Parto:.....apresentação.....BR:.....LA:.....

Atend. sala de parto (Obs).....

Equipe () neonatologista TEN () r3/r4 de NEO () enfermeira () enf obstetrica ()

tecnica. () r1/r2 ped

PN:..... Apgar: 1':.....5'.....

surfactante sala de parto () VPP balão mascara () TOT

IGP:..... () AIG () GIG () PIG

Internação

SNAPPE.....(colocar valor do escore)

Temperatura do RN na admissao:.....

Sinais vitais:PAM, Sat de oxigenio, avaliação da dor:.....

Diagnósticos.....

Foi à ventilação:.....hrs. de vida, por.....

Uso de surfactante: 1ª dose:.....hs de vida; 2ªdose:.....hs de vida;

3ªdose:.....hs.

Suporte ventilatório/oxigênio:CPAP e ou VNI: descrever

Dias em ventilação mecânica:

Dias em CPAP:

Dias em oxigenoterapia:

Pior resultado de gasometria durante randomização (5 dias placebo/AZI):

Ph..... PCO2..... HCO3.....BE.....O2.....Sat O2.....

Suporte: CPAP/VM:.....descrever parametros: PIP, PEEP e oxigenio ofertado.

Melhor resultado de gasometria durante randomização (5 dias placebo/AZI):

Ph..... PCO2..... HCO3.....BE.....O2.....Sat O2.....

Suporte: CPAP/VM:.....descrever parametros: PIP, PEEP e oxigenio ofertado.

Necessidade de inotropicos (dopa/dobuta) durante randomização (cinco dias):

Diagnósticos/Complicações:

Sepse: Precoce () Tardia () Clínica () HMC positiva ().....

Meningite ()

Enterocolite necrosante: ()

Pneumonia: ()

Persistência do canal arterial: Clínica () Ecocardiograma()

Hemorragia intra/peri-ventricular: () Grau

LPV: ()

Convulsoes ()

Pneumotórax: () Enfisema Intersticial ()

Displasia broncopulmonar () Outras ()

Data randomização:.....

Coletas:

Sangue (1mL): pré-azitromicina/placebo.....

Sangue (1mL): pós azitromicina/placebo:.....

Desfechos

Alta ou óbito

Data da alta:.....Peso:.....IGCo.....

Óbito:..... Causa do obito:.....

Tempo de internação na UTI Neo:dias.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Ensaio Clínico Randomizado: Uso de azitromicina na prevenção de dano pulmonar em recém-nascidos pré-termo submetidos a ventilação mecânica.

O bebê que nasce prematuro muitas vezes necessita de cuidados especiais na UTI Neonatal, sendo que muitos precisam da ajuda de um aparelho (chamado aparelho de ventilação mecânica) enquanto estão doentes e com dificuldade para respirar. A ventilação mecânica é necessária, mas também pode provocar problemas no pulmão do recém-nascido prematuro, que é mais frágil.

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo, em que o objetivo é avaliar o efeito de um antibiótico, a azitromicina, na prevenção dos problemas pulmonares causados pela ventilação mecânica. Para isso, serão necessárias amostras de sangue que serão coletadas juntamente com os exames solicitados de rotina. Não haverá coleta de sangue exclusiva para o estudo. O volume de sangue coletado é de cerca de 0,5 mL, que corresponde 10 gotas de sangue. Esse volume não acarreta riscos adicionais ao bebê. Seu filho poderá receber tratamento com o antibiótico Azitromicina durante cinco dias ou apenas receber soro fisiológico durante cinco dias, isso será determinado por sorteio simples. O soro fisiológico é utilizado habitualmente quando se administram as medicações e não causa nenhum prejuízo ao seu bebê. A Azitromicina é uma medicação que já está liberada para uso assistencial. Neste estudo os bebês receberão este medicamento em doses habituais. Os riscos associados ao uso deste medicamento são raros. Os bebês receberão todo o tratamento de que necessitam, e a Azitromicina está sendo utilizada como possível prevenção dos problemas pulmonares. Este estudo é importante para permitir aprimorar a assistência de bebês prematuros.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento do seu filho. Pela participação de seu filho(a) no estudo, você não terá qualquer custo ou remuneração associada. O nome de seu filho(a) não aparecerá em qualquer momento do estudo, preservando sua identidade.

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

06/08/2012
nº 110639/83

ANEXO B – TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS INSTITUCIONAIS



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto

Ensaio clínico randomizado: uso de azitromicina na prevenção de dano pulmonar em recém-nascidos pré-termo submetidos a ventilação mecânica	Cadastro no GPPG 110639
---	--

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

Porto Alegre, 15 de maio de 2013

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Rita de Cássia dos Santos Silveira	
Renato S. Prociandy	
Andrea Lucia Corso	
Cristiane Raupp Nunes	

ANEXO C - TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110639

Data da Versão do Projeto: 16/04/2012

Data da Versão do TCLE: 16/04/2012

Pesquisadores:

RITA DE CASSIA DOS SANTOS SILVEIRA

RENATO SOIBELMANN PROCIANOY

ANDREA LUCIA CORSO

PAULA ELEXINA CORNELIO

Título: Ensaio clínico randomizado: uso de azitromicina na prevenção de dano pulmonar em recém-nascidos pré-termo submetidos a ventilação mecânica

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 24 de abril de 2012.


Prof. Nadir Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO D - MAPA DE REAÇÃO MULTIPLEX. (IL)

WELL MAP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pg/mL Standard (Background)	400 pg/mL Standard	QC-2 Control	2P								
B	0 pg/mL Standard (Background)	400 pg/mL Standard	QC-2 Control	2P								
C	3.2 pg/mL Standard	2,000 pg/mL Standard	Sample 1 _A	3A								
D	3.2 pg/mL Standard	2,000 pg/mL Standard	Sample 1 _A	3A								
E	16 pg/mL Standard	10,000 pg/mL Standard	Sample 2 _A	3P								
F	16 pg/mL Standard	10,000 pg/mL Standard	Sample 2 _A	3P								
G	80 pg/mL Standard	QC-1 Control	Etc. 2A									
H	80 pg/mL Standard	QC-1 Control	2A									

HCYTOMAG-60K Rev. 18-MAY-2017

PAGE 31

EMD Millipore