

MARCUS VINÍCIUS TELLES FADEL

**USO DE CORTICOSTERÓIDE NA INFECÇÃO GRAVE
DE ORIGEM PERITONEAL POR BACTÉRIAS
GRAM-POSITIVAS OU GRAM-NEGATIVAS,
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Pereira da Cunha

Co-Orientadores:

Prof.^ª Dr.^ª Maria Terezinha Carneiro Leão Leme

Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

CURITIBA
1996

MARCUS VINÍCIUS TELLES FADEL

**USO DE CORTICOSTERÓIDE NA INFECÇÃO GRAVE
DE ORIGEM PERITONEAL POR GERMES GRAM-
POSITIVOS OU GRAM-NEGATIVOS
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Curso de pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, pela comissão integrada pelos eméritos professores:

Orientador: **Prof. Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha**
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Renato Giuseppe Giovanni Terzi
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Júlio César Uili Coelho
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 15 de abril de 1996

As criaturas são reflexos; amemos os reflexos pensando na Luz.
Geneviève Hennet de Goutel

Dedico este trabalho

ao meu pai, Ivan, exemplo ímpar de dedicação à Medicina e à minha mãe, Maria, exemplo raro de dedicação ao Lar, aos quais devo minha formação;
ao meu irmão Ivan, pelo raro e humilde exemplo de vida; às minhas irmãs Cynthia, Cristina, Vânia e Karla, pelo convívio saudável e momentos de alegria constantemente renovados, e por terem trazido ao mundo os meus sobrinhos Gui, Dudu, Tati, Biá, Iara e Mariana;
a Lucia, plácida nascente de amor, dedicação e ternura;

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Cláudio Pereira da Cunha, exemplo raro de dedicação à profissão e ao ensino, orientador constantemente pronto a incentivar e contribuir com conselhos de inestimável valor, sem hesitar em sacrificar seus próprios momentos de lazer em função deste trabalho.

À Prof^a. Maria Terezinha Carneiro Leão Leme, modelo de boa-vontade e fonte segura de conhecimentos, pela inesgotável disposição em contribuir para o presente estudo, sobremaneira enriquecido pela sua primorosa co-orientação.

Ao Professor Dr. João Carlos Domingues Repka, exemplo de retidão profissional e humana, que cedeu seu tempo e empregou seus esforços na realização dos experimentos aqui relatados. Co-orientador incansável, disposto a prestar auxílio mesmo nos piores horários.

Ao Professor Dr. Roberto Pirajá Moritz de Araújo, Coordenador do Mestrado em Medicina Interna, pela excelente administração de suas funções e pelo apoio, fatores que ensejaram a conclusão antecipada deste trabalho.

À minha irmã Cynthia, bioquímica responsável pela cessão de cepas utilizadas nos experimentos desta tese.

A Pablo Fabian Aviles Cabrera e Cláudia Weigartner, acadêmicos da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, pelo excelente trabalho de experimentação em camundongos, sob a supervisão do Doutor Repka, que possibilitou o presente trabalho.

Aos médicos patologistas Joel Takashi Totsugui e Doutor Sérgio Ossamu Ioshii, responsáveis pelo estudo anátomo-patológico.

Ao Professor Paulo Ricardo Bittencourt Guimarães, coordenador do curso de estatística da Universidade Federal do Paraná, responsável pela análise estatística deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Costa, pelos luminosos conselhos, condição indispensável para o presente sucesso.

Às bibliotecárias da Biblioteca do Hospital de Clínicas, mormente Maria Rita de Araújo e Selma Regina Ramalho Conte, que tanto contribuíram com a pesquisa bibliográfica.

Aos amigos Luciano de Paola e Aluisio Cláudio Mentor Neves do Couto Melo Jr., pelo trabalho fotográfico e pelas ótimas sugestões.

Aos amigos Clóvis Arns da Cunha, Marco Aurélio Lacerda, Harri Uhlendorf e José Perrone Giorgio, pela motivação e auxílio, e mais do que isso, pelo inspirador exemplo de retidão profissional.

Aos meus cunhados Carlos e Geraldo, ao meu irmão Ivan, e a Waldir Françolin Júnior, pelo auxílio na informática.

À minha família e à minha namorada, Lucia, pelos auxílios prestados e pela compreensão, nos momentos em que este estudo me privou de suas companhias.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	05
3 REVISÃO DA LITERATURA	06
3.1 FATORES BACTERIANOS DE AGRESSÃO AO HOSPEDEIRO.....	06
3.2 A CASCATA SÉPTICA.....	10
3.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO PARA A SEPSE.....	13
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
4.2 ANIMAIS UTILIZADOS.....	23
4.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS.....	23
4.4 INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	25
4.5 ACOMPANHAMENTO.....	25
4.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES MEDICAMENTOSAS.....	26
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5 RESULTADOS	29
5.1 REFERENTES A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	29
5.2 REFERENTES A BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.....	35
6 DISCUSSÃO	41
6.1 MATERIAL E MÉTODO.....	41
6.2 RESULTADOS.....	44
6.3 POSSÍVEL APLICAÇÃO CLÍNICA.....	48
7 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (PADRÃO AMERICANO DE COLEÇÃO DE CULTURAS)
BGN	BACILO GRAM-NEGATIVO
CGP	COCO GRAM-POSITIVO
FNT	FATOR DE NECROSE TUMORAL
FNT-α	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
IM	INTRA-MUSCULAR
IP	INTRA-PERITONEAL
m/v	MASSA POR VOLUME
ml	MILILITRO
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS

LISTA DE QUADROS

1 ORGANIZAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	22
2 QUADRO DE SOBREVIVÊNCIA NO GRUPO <i>Escherichia coli</i>	29
3 QUADRO DE SOBREVIVÊNCIA NO GRUPO <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
4 QUADRO DE SOBREVIVÊNCIA NO GRUPO <i>Staphylococcus aureus</i>	36

LISTA DE FIGURAS

1 ESTRUTURA DO LIPOPOLISSACARÍDEO.....	08
2 PREPARO DOS INÓCULOS.....	24
3 PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO.....	26
4 SOBREVIVÊNCIA FINAL: GRUPO <i>E.coli</i>	31
5 MORTALIDADE À 24ª HORA E FINAL ENTRE OS SUBGRUPOS <u>CONTROLE DE INFECCÃO E TRATADO EXCLUSIVAMENTE COM</u> <u>ANTIBIÓTICO: GRUPO <i>E.coli</i></u>	32
6 SOBREVIVÊNCIA FINAL: GRUPO <i>K.pneumoniae</i>	34
7 MORTALIDADE À 24ª HORA E FINAL ENTRE OS SUBGRUPOS <u>CONTROLE DE INFECCÃO E TRATADO EXCLUSIVAMENTE COM</u> <u>ANTIBIÓTICO: GRUPO <i>K.pneumoniae</i></u>	35
8 MORTALIDADE À 24ª HORA E FINAL ENTRE OS SUBGRUPOS <u>CONTROLE DE INFECCÃO E TRATADO EXCLUSIVAMENTE COM</u> <u>ANTIBIÓTICO: GRUPO <i>S.aureus</i></u>	37
9 SOBREVIVÊNCIA FINAL: GRUPO <i>S.aureus</i>	39
10 SUMÁRIO : SOBREVIVÊNCIA FINAL NOS TRÊS GRUPOS.....	40

RESUMO

Objetivos: O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos corticosteróides em um modelo experimental de infecção. A hipótese era que, se tais drogas são capazes de inibir a produção e/ou efeito de diversos mediadores da sepse, elas poderiam exercer um efeito benéfico, contanto que sua administração fosse feita antes da liberação maciça de produtos da parede bacteriana (ocasionada, dentre outros fatores, por antibióticos), produtos estes encarados como responsáveis pela sensibilização do hospedeiro, cuja resposta descontrolada parece ser a principal causa de morte em indivíduos infectados. Para alcançar este objetivo, o corticosteróide (metilprednisolona) foi aplicado intraperitonealmente após a indução da infecção bacteriana (intraperitoneal) mas previamente aos antibióticos, de forma que os mencionados produtos de sensibilização presumivelmente não alcançassem quantidades importantes na circulação antes do bloqueio da resposta do hospedeiro, exercido pelos corticosteróides. Um segundo objetivo foi avaliar semelhanças e diferenças no comportamento de infecções por germes gram-negativos e gram-positivos, face aos mesmos tratamentos.

Material e Método: Para realizar este estudo, 720 camundongos Carawarth Farm-1 foram divididos em três grupos principais de acordo com a bactéria em uso, a saber *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*. Cada um dos três grupos foi por sua vez subdividido de maneira a que se formassem seis subgrupos, cada qual com 40 camundongos. De acordo com os procedimentos executados, os subgrupos foram os seguintes: 1) apenas o antibiótico (teicoplanina ou amicacina, na

dependência da bactéria) ; 2) apenas metilprednisolona; 3) apenas a bactéria; 4) bactéria seguida pelo antibiótico; 5) bactéria seguida pela metilprednisolona e posteriormente pelo antibiótico; 6) bactéria seguida pelo antibiótico e posteriormente pelo corticosteróide. Um subgrupo suplementar de 40 camundongos, comum a todos os grupos, teve a função de controle do diluente das drogas utilizadas, de forma que o número total de camundongos tenha sido 760.

Resultados: Em todos os três grupos, a mortalidade no subgrupo controle de infecção foi bastante expressiva e significativamente maior que nos subgrupos tratados, demonstrando assim a gravidade da infecção. O uso de antibióticos isoladamente (sem corticosteróide) foi efetivo em reduzir esta mortalidade nos três grupos ($p < 0,001$), de maneira que no grupo *E. coli* esta tenha sido reduzida de 100% (subgrupo controle de infecção) para 55%; no grupo *K. pneumoniae*, de 100% para 72,5%; e no grupo *S. aureus* de 82,5% para 42,5%. Quando se administrou o corticosteróide previamente ao antibiótico, a redução nas cifras de mortalidade revelou-se ainda mais expressiva nos dois grupos de bactérias gram-negativas (mortalidade de 20% no grupo *E. coli* e de 45% no grupo *K. pneumoniae*; $p < 0,01$ em ambos os casos, quando comparados com o subgrupo em que se utilizou apenas antibiótico), mas não houve redução estatisticamente significativa na mortalidade no grupo *S. aureus* quando se compararam os efeitos do antibiótico isoladamente aos efeitos do antibiótico associado ao corticosteróide.

Quando o corticosteróide foi aplicado após a primeira dose do antibiótico, não houve vantagem com relação aos grupos de bactérias gram-

negativas na comparação com o uso de antibiótico isoladamente ($p=0,2488$ para o grupo *E.coli* e $0,215$ para o grupo *K.pneumoniae*), e houve aumento da mortalidade no grupo *S.aureus* se comparado ao subgrupo que recebeu antibiótico isoladamente ($p<0,001$), com os resultados tornando-se equivalentes aos do grupo controle de infecção($p=0,2877$).

Conclusões: Estes resultados permitiram concluir que 1) o uso de corticosteróide precoce e previamente ao antibiótico foi útil na infecção grave experimental por *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas não apresentou vantagem no caso de infecção grave experimental por *S. aureus*; 2) o uso de corticosteróide após o início do tratamento com antibiótico não foi benéfico no caso dos bacilos gram-negativos utilizados, e piorou a evolução no caso de *S.aureus*.

ABSTRACT

Objectives: The main purpose of this study was to evaluate the role of corticosteroids in an experimental model of infection. The hypothesis was that if such substances are capable of inhibiting the production and/or the effect of several mediators of sepsis, they might exert a beneficial effect, provided that their administration was performed before massive releasing of bacterial cell wall products (released, among other factors, by antibiotics). Such products are thought to be responsible for sensibilization of the host, whose unrestricted response appears to be the major cause of death in infected individuals. To achieve that goal, corticosteroid (methylprednisolone) was given after induction of bacterial challenge (intraperitoneally), but before antibiotics, so that the mentioned sensibilization products presumably had not reached harmful amounts into the circulation until the host response was inhibited by corticosteroids action. Another objective of this study was to compare responses of Gram-positive and Gram-negative microorganisms face the same treatment.

Material and Methods: To accomplish this study 720 Carawarth Farm-1 mice were divided in three main groups: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* groups. Each one of the three main groups was further subdivided in order to constitute 6 subgroups, each subgroup composed by 40 mice. According to the procedures applied, subgroups were as follows: 1) only antibiotics (amikacin or teicoplanin, depending on which bacteria were aimed); 2) only methylprednisolone; 3)

only bacteria (control of infection); 4) bacteria followed by antibiotic; 5) bacteria followed by methylprednisolone and then by antibiotic; 6) bacteria followed by antibiotic and then by methylprednisolone. Another subgroup of 40 mice, common to all groups, was used as a control of the diluent solution of drugs employed, so that the total number of mice was 760.

Results: In all three groups, mortality in the subgroup 3 (control of infection) was very impressive and significantly greater than in the other subgroups, thus showing the severity of the infection. Antibiotics used alone (without methylprednisolone) were effective in reducing this mortality in all three groups ($p < 0,001$): in the *E. coli* group it was reduced from 100 % (found in the subgroup "control of infection") to 55 %; in the *K. pneumoniae* group, from 100% to 72,5%; and in the *S. aureus* group, from 82,5% to 42,5%. When corticosteroid was given previously to the antibiotic, reduction on mortality rates was even more expressive in the two groups of Gram-negative bacteria (mortality of 20% in the *E. coli* group and 45% in the *K. pneumoniae* group; $p < 0,01$ in both cases when compared to the previous subgroup), but no statistically significant reduction in mortality was found in the *S. aureus* group when the effects of antibiotic alone were compared to the effects of antibiotic associated to corticosteroid.

Nevertheless, when methylprednisolone was given after the first dose of antibiotic there was no significant benefit in the Gram-negative groups compared to antibiotics alone ($p = 0,2488$ in the *E. coli* group and 0,215 in the *K. pneumoniae* group).

Conclusions: These results enabled us to conclude that methylprednisolone was useful on this experimental model of severe infection

caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*, provided that it was given before antibiotics. However, there was no significant effect against *S. aureus*. Given after antibiotics, methylprednisolone did not show any significant benefit in treating Gram-negative bacteria, and it was even harmful in *S. aureus* model.

1 INTRODUÇÃO

“It’s our response to their presence that makes the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful, and involve so many different defense mechanisms, that we are in more danger from them than from the invaders. We live in the midst of explosive devices; we are mined.”

Lewis Thomas, Lives of a Cell, 1974

Desde a aurora dos seus tempos a humanidade vem travando um combate desigual contra os micróbios. Porquanto à análise superficial classificados como inferiores, os microorganismos precederam nossa espécie em milhões de anos e possivelmente sobreviverão a ela, reiterando a lúgubre expressão de Pasteur: “Seront les microbes qui auront les derniers mots” (Os micróbios é que falarão por último).

Apenas neste século a Medicina foi abastecida com um arsenal realmente eficaz contra as infecções. Mas ainda assim, contrariamente à euforia que os primeiros antimicrobianos criaram, o curso dos anos mostrou que as bactérias não são seres incapazes de defesa, e com o advento da resistência bacteriana, antibióticos cada vez mais elaborados tiveram que ser sintetizados, na esperança de finalmente dominar nossos agressores invisíveis. Às promessas que acompanham cada nova droga, porém, têm-se seguido as decepções, e os germes que combatemos continuam a desafiar impavidamente o intelecto humano. É bem verdade que hoje o campo de batalha está mais restrito, pois as infecções comunitárias parecem, via

de regra, sob controle. Em todo caso, nossos hospitais encerram no dia-a-dia inúmeros testemunhos da impotência da Medicina em combater as infecções de maior gravidade, freqüentemente arroladas sob o termo "sepse" ou "septicemia", de definição bastante incerta*.

A preocupação com estas infecções mais graves levou os pesquisadores a considerá-las com uma atenção particular, e dos progressos a que as pesquisas conduziram neste campo, possivelmente o mais significativo foi o reconhecimento de um processo de auto-agressão exercido pelo organismo hospedeiro, decorrente da presença do germe agressor (06, 48, 57, 71).

Com efeito, nas últimas duas décadas mais e mais evidências bioquímicas vêm sendo acumuladas, a testemunhar a participação de um sem-número de substâncias na sepse, arroladas no coletivo "cascata séptica", que, se não controladas, ulteriormente acarretam a evolução habitualmente fatídica para a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (14, 38).

* Neste trabalho foi optado por se utilizar preferencialmente o termo "infecção grave" ao invés de "sepse", ao menos quando se fizer menção de infecção em modelo experimental, em virtude da falta de critérios irrefutáveis e universalmente aceitos para a definição de sepse. Mesmo a definição mais difundida no momento parece subestimar o termo, aceitando infecções banais como "sepse" (10), cuja conotoção nos trabalhos prévios costumava ser de um processo sempre grave; além disso, a citada definição não se endereça ao modelo experimental, mas unicamente ao humano, de forma que o termo "infecção grave" foi preferido, por apresentar significado imediato. Em várias passagens, porém, o termo sepse e seus derivados são inevitavelmente requeridos em virtude de expressões bastante arraigadas no meio médico. Partindo-se do pressuposto que desejaremos sempre nos referir a infecções graves, quer usando um ou outro termo, acreditamos que tais casos não trairão os propósitos do trabalho. Saliente-se também que o termo inglês "sepsis" foi traduzido neste trabalho para o português "sepse" por questões de fidelidade ao idioma.

Diversas citocinas pró-inflamatórias participam da referida cascata, dentre as quais o chamado "Fator de Necrose Tumoral Alfa"(FNT- α) parece ser a mais precoce, e cuja presença acarretará o detonar de uma reação de ativação em cadeia dos demais inúmeros mediadores, culminando com as disfunções metabólicas, hemostáticas e hemodinâmicas derradeiras do choque séptico (25). Embora o lipopolissacarídeo dos bacilos gram-negativos seja o mais potente estímulo para a produção do FNT- α , este fator é também produzido face a infecções por gram-positivos, vírus, fungos e protozoários (06, 68). No caso dos gram-negativos (melhor estudados na literatura que os demais), a produção e secreção do FNT é condicionada pela apresentação, ao receptor CD 14 dos macrófagos, do lipopolissacarídeo previamente ligado a uma proteína específica, dita "proteína ligante do lipopolissacarídeo" (59, 79). Desta apresentação depende também a síntese de outra importante citocina pró-inflamatória ainda bastante precoce na cascata, a interleucina 1 (IL-1) (74).

Com base no que foi dito já se afirmou que "nós estamos minados", numa referência a que em verdade não são os microorganismos agressores em si, mas sim a reação de defesa exagerada do próprio hospedeiro que condicionará o desfecho indesejado da sepse. Uma evidência desta premissa está no fato de que o uso de antimicrobianos apropriados, ainda que eliminando os microorganismos despertadores do processo séptico, freqüentemente será insuficiente para prevenir a piora e a morte do hospedeiro (77).

A realidade quanto a estas últimas drogas face a um quadro infeccioso grave já instalado pode ser ainda mais cruel: determinações dos níveis de endotoxinas no sangue em infecções experimentais e humanas por BGN demonstraram um grande aumento das mesmas após o uso de antibióticos (19, 61, 62) permitindo presumir que a rotura dos invólucros bacterianos (induzida pelos antimicrobianos) está associada à liberação de seus fatores sensibilizantes, tendo por consequência o desencadeamento de uma resposta irrefreada por parte do hospedeiro.

Neste ponto cumpre interrogar se o uso de drogas capazes de induzir inibição desta resposta do hospedeiro ao agente infeccioso não poderia impedir o desenlace fatal da sepse. Dentre estas substâncias, podem ser arrolados os corticosteróides, cujos efeitos se mostram antagônicos a diversas fases do processo séptico.

Da associação das idéias supra-expostas, originam-se os objetivos da presente tese.

2 OBJETIVOS

1) Determinar se o uso de corticosteróide (metilprednisolona), precoce e previamente à administração de antibióticos, é capaz de propiciar uma redução na mortalidade provocada por infecção grave em modelo experimental .

2) Determinar se a resposta de germes gram-positivos é coincidente com aquela dos germes gram-negativos face às mesmas drogas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os últimos anos têm sido profícuos em brindar a Medicina com informações inestimáveis acerca da fisiopatologia da sepse e da constituição molecular das bactérias. Com efeito, os conhecimentos decorrentes de tais progressos permitiram estabelecer que na verdade não é o microorganismo infectante em si, mas sim a resposta desenfreada do hospedeiro, que provoca a morbidade e a morte nos casos mal-sucedidos, as quais advém de um processo incontido e generalizado de inflamação (66). Para maior concisão da análise desta tese, convém uma revisão sucinta do assunto.

3.1 FATORES BACTERIANOS DE AGRESSÃO AO HOSPEDEIRO

Sabendo-se que os microorganismos agressores não provocam a morte do hospedeiro pela sua simples presença, mas sim que desencadeiam neste uma reação de auto-agressão que pode culminar com falência de múltiplos órgãos e morte, torna-se importante identificar nos microorganismos quais são os fatores de sua constituição capazes de sensibilizar o hospedeiro a ponto de induzir tal resposta. Neste trabalho, ocupar-nos-emos de bactérias gram-negativas (BGN), e bactérias gram-positivas (CGP), e por este motivo descreveremos sucintamente seus fatores de sensibilização.

A parede celular é um elemento essencial para a sobrevivência bacteriana, pois é graças a ela que a bactéria é protegida contra a rotura apesar das enormes diferenças de osmolaridade entre o seu interior e o meio externo (02). Admite-se que os principais fatores de sensibilização

bacterianos encontrem-se justamente entre os componentes desta camada do envoltório destes microorganismos; adicionalmente, com maior relevância no que tange aos CGP, também devem ser citadas as exotoxinas.

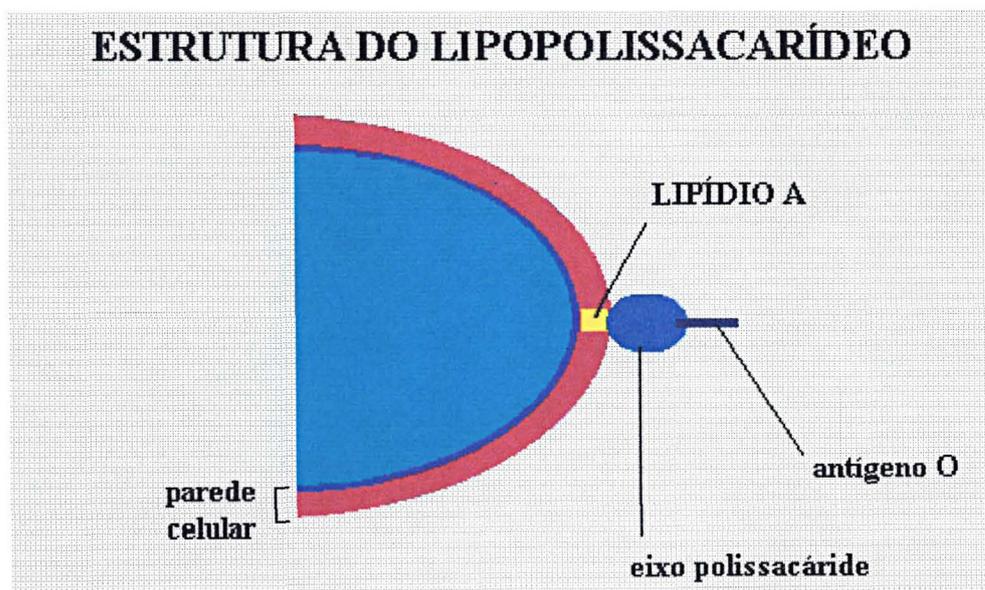
Elemento fundamental da constituição da parede celular de praticamente todas as bactérias, e com base no qual estas são classificadas, é a camada de peptidoglicanos. É esta camada que concede às bactérias resistência contra os referidos gradientes osmóticos, sendo completamente diferente na sua disposição quando se comparam CGP a BGN:

3.1.1 PAREDE CELULAR DOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS(BGN) (40)

Tomando-se como exemplo as enterobactérias - as mais representativas desta categoria, e que serão utilizadas nesta tese - sabe-se que a sua parede celular se compõe de duas camadas externamente apostas à membrana citoplasmática. Dentre estas, a mais interna é constituída por uma camada extremamente fina de peptidoglicanos, muito menos rígida que a dos CGP. Circundando-a, coloca-se a camada mais superficial, dita membrana externa, que no caso das BGN é de significância patogénica muito maior que a camada precedente. É na membrana externa que se aloja o principal fator de sensibilização ao hospedeiro das BGN, ou seja, o lipopolissacarídeo (LPS), freqüentemente referido também como endotoxina. Pela sua localização depreende-se que a endotoxina não é um elemento citoplasmático, em que pese a denominação; o termo foi originalmente aplicado com o objetivo de diferenciá-la das exotoxinas, que, contrariamente a ela, são passíveis de secreção para o meio externo. Dando-se preferência ao termo lipopolissacarídeo (LPS), evita-se qualquer má-interpretação.

O LPS é uma toxina altamente termo-estável, composta por três subunidades, a saber uma cadeia polissacarídica superficial dita “antígeno O” (responsável pela variabilidade antigênica das BGN), uma ponte também polissacarídica de localização intermediária e, finalmente, totalmente inserido na membrana externa, o fosfolípide “lipídio A”, o componente verdadeiramente responsável pela sensibilização do hospedeiro (figura 1).

Figura 1



Devido ao fato de o lipídio A encontrar-se oculto na membrana externa da parede celular, os seus efeitos tóxicos só são observados em situações que ensejem a rotura desta, ou seja, durante lise bacteriana (57), ou durante os processos de crescimento e multiplicação bacterianos, em que o LPS também é liberado para a circulação (25).

3.1.2 PAREDE CELULAR DOS COCOS GRAM-POSITIVOS (CGP) (09)

A parede celular dos CGP é de constituição bem mais simples que a das BGN: ao invés de duas, compõe-se apenas de uma camada, e o papel dos **peptidoglicanos** é aqui muito mais importante. De fato, estas moléculas se organizam para formar subcamadas, originando uma estrutura 20 a 80 vezes mais espessa (02) que a respectiva camada de peptidoglicanos das BGN, e que no caso dos CGP atua por si só como um fator sensibilizante ao hospedeiro.

Outros componentes da parede celular destas bactérias são os **ácidos teicóicos**, que atuam como antígenos de superfície capazes de se ligar a receptores específicos em células de mamíferos (40), e, como os peptidoglicanos, capazes de ativar a resposta imunológica do hospedeiro.

3.1.3. EXOTOXINAS

Embora a endotoxina (LPS) seja exclusividade das BGN, as exotoxinas são encontradas tanto em BGN quanto em CGP. Entre as bactérias que mais comumente provocam infecções graves a nível clínico (enterobactérias, estafilococos), contudo, são as exotoxinas dos CGP que exercem papel fisiopatogênico mais importante. No que se refere a *S. aureus*, também utilizado neste trabalho, este germe é capaz de produzir diversas exotoxinas, como hemolisinas (α , β , δ , γ), leucocidina, e os chamados superantígenos (classe especial de toxinas caracterizadas por provocar ativação de um número muito maior de linfócitos T do que o habitualmente induzido por outros antígenos), como as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico (57, 75).

3.2 A CASCATA SÉPTICA

A presença de microorganismos invasores no organismo hospedeiro desencadeia uma reação relativamente estereotipada de defesa, com o intuito de eliminá-los. Em casos mais graves, porém, a resposta do organismo infectado se torna exageradamente intensa, e a conseqüência disto será não só o ataque aos agressores como também a auto-agressão aos seus tecidos, provocada pela interação de uma plêiade de fatores humorais num processo adequadamente denominado "cascata séptica". Em última análise será esta reação descontrolada, e não os microorganismos em si, a responsável pela evolução para falência de múltiplos órgãos e morte, conseqüências das infecções mais graves. Os eventos que compõem este processo serão sucintamente descritos a seguir.

Considerando-se que os mecanismos de agressão das BGN estão consideravelmente melhor explicados que os dos CGP, tomaremos por exemplo as infecções por aquele tipo de bactérias nesta descrição. Admite-se porém que os demais microorganismos induzem uma reação a rigor idêntica por parte do organismo agredido, embora as interações iniciais com o hospedeiro não estejam ainda tão detalhadas como no caso das BGN.

Conforme previamente afirmado, no caso das BGN o LPS foi identificado como o seu respectivo fator de sensibilização: a injeção desta substância em voluntários ou animais induz um quadro clínico idêntico àquele propiciado por uma infecção por aquele tipo de bactérias (08, 52, 68). Durante um processo infeccioso, o organismo agredido entra em contato com o LPS não só no local de infecção em si, mas também sistemicamente

devido ao envio para a corrente sangüínea, de fragmentos de membranas bacterianas carreando LPS, liberados por ocasião do crescimento e multiplicação bacterianos. Caso esta invasão sangüínea se torne maciça, a probabilidade de evolução para resposta exagerada de defesa por parte do organismo agredido se torna muito maior. Este fenômeno ocorre não só nas infecções descontroladas, como também com o uso de antibióticos em infecções graves, os quais, ao provocar lise bacteriana maciça, liberam subitamente uma quantidade muito grande de endotoxina (19, 61, 62). A observação de piora temporária ou permanente de quadros infecciosos graves com a administração de antimicrobianos remonta aos primórdios da antibioticoterapia, bem antes do surgimento das atuais explicações. Tal fato levou HOPKIN, talvez num exagero, a questionar a premissa tradicional da antibioticoterapia, "*frappez fort*" (numa alusão a que as infecções devam ser agressivamente tratadas), e interrogar se o melhor caminho não seria "*frapper doucement*". Por esta razão postula-se neste trabalho que o uso de drogas inibidoras da resposta imune do hospedeiro (no caso, corticosteróides), previamente ao uso de antimicrobianos, seria bastante sensato.

Uma vez estabelecido o contato inicial entre as células de defesa e a endotoxina, inicia-se a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (13, 70). Dentre estas citocinas, a mais precocemente produzida é o fator de necrose tumoral (FNT) **, cuja liberação induzirá a síntese de diversas outras citocinas (69, 74).

**O Fator de Necrose Tumoral e o hormônio caquexina correspondem à mesma substância (07), o que justifica o exagerado emagrecimento observado em pacientes sépticos, secundário principalmente à inibição, por este hormônio, do catabolismo lipídico, obrigando assim ao consumo preferencial de proteínas, como as proteínas musculares. Tem sido observado que o FNT exerce efeitos deletérios à função de diversos órgãos como coração, pulmões, sistema nervoso central, fígado, intestino, rins e aparelho músculo-esquelético (66).

Também muito precoce é a interleucina-1 (IL-1), que em conjunto com o FNT é capaz de reproduzir inteiramente o quadro clínico de sepse em humanos e animais (48). As citocinas pró-inflamatórias (FNT, IL-1, IL-6, IL-8 dentre as mais significativas) (15, 69) interagem de forma a constituir um ciclo vicioso no seu próprio processo de indução, síntese e liberação. Embora estas substâncias sejam essenciais para a constituição de uma resposta de defesa adequada (17, 31), não havendo um controle efetivo de sua produção elas provocarão um estado de auto-agressão ao hospedeiro, originando numa fase posterior os sinais e sintomas do choque séptico. Paralelamente, porém, também é induzida a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13; do equilíbrio de forças entre os membros pró e anti-inflamatórios destas substâncias parece depender o desenlace da infecção (18, 73). Esta etapa pode ainda ser considerada precoce, visto que as citocinas iniciais (FNT e IL-1) é que devem despertar todas as demais reações que diretamente agredirão o hospedeiro (vide a seguir)(15, 69).

Finalmente, numa fase mais avançada, a reação em cadeia já se encontra bem mais amplificada; as citocinas previamente liberadas desencadeiam a ativação das cascatas intrínseca e extrínseca da coagulação, ativação do sistema fibrinolítico, ativação do complemento, geração de opióides endógenos, síntese de produtos da fosfolipase A2 incluindo fator de ativação plaquetária, leucotrienos e prostaglandinas, ativação do sistema das cininas, ativação de neutrófilos e células endoteliais, geração de radicais livres de oxigênio, ativação da sintetase de óxido nítrico e indução de hormônios de stress. Devido à ação destas substâncias o

hospedeiro é então direta e difusamente atingido, justificando-se desta forma a instalação posterior de disfunção de múltiplos órgãos (49, 71).

Percebe-se então que a chamada "cascata séptica" se constitui num leque a cada momento mais aberto de fenômenos biológicos, cada qual induzindo e re-induzindo outros, num ciclo vicioso cujo único fim é freqüentemente a morte.

Embora até o momento a Medicina não tenha coletado mais do que decepções nesta área, a melhora da nossa compreensão de tais eventos acende a esperança de que consigamos finalmente dominar o problema. Com efeito, por mais que as drogas testadas até o momento tenham reiteradamente falhado na prática clínica, a lógica do seu uso parece em muitos casos irrefutável. Por esta razão, revisaremos brevemente algumas das estratégias atualmente em voga, e em seguida abordaremos os corticosteróides, motivo deste trabalho.

3.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO PARA A SEPSE

Para as várias fases da cascata séptica, existem no campo experimental diversas drogas potencialmente úteis, boa parte das quais introduzidas por avanços nas áreas de imunologia e bioengenharia, que ensejaram a síntese de diversos antagonistas e anticorpos dirigidos contra vários mediadores da sepse (65). No tocante à fase inicial, em que o LPS é liberado na circulação, podem ser arrolados os anticorpos anti - LPS (20, 44) - evidentemente ativos apenas contra germes gram-negativos (77) - e os anticorpos anti - receptor macrófago CD 14, bem como uma proteína humana bactericida com a capacidade de se ligar ao lipídio A impedindo-o de sensibilizar o macrófago (25). Todas estas substâncias teriam por

proposta impedir a subsequente ativação do macrófago, desta forma abortando precocemente a reação inflamatória do hospedeiro.

Outras substâncias têm sido propostas para fases mais avançadas: assim, durante o processo de síntese e secreção de citocinas, como a formação do RNA mensageiro do FNT é dependente de níveis não elevados de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, drogas que elevam tais níveis poderiam reduzir a síntese de FNT. Com este mecanismo de ação destacam-se a amrinona e a pentoxifilina (bloqueio transcricional da ativação do gen do FNT) (26, 58, 67, 81).

Outras terapias foram delineadas para o bloqueio da ação de citocinas após a sua síntese e liberação, ou seja, teoricamente ainda em tempo de se evitar o desencadeamento da etapa mais expandida e detrimental do processo. Considerando-se que o FNT e a IL-1 são as citocinas mais precocemente liberadas, terapias visando inibir o efeito destas substâncias têm merecido maior atenção. No caso do FNT, listem-se os anticorpos monoclonais contra FNT (16, 23, 32) e os receptores sintéticos solúveis de FNT (substâncias de ocorrência natural, mas recentemente sintetizados por tecnologia de DNA recombinante, que reproduzem parcialmente os receptores teciduais de FNT, e capazes de se ligar fortemente a este, mas evidentemente incapazes de ocasionar resposta, visto que não estão ligadas aos tecidos)(69, 70). Concernente à IL-1, o mais significativo avanço vem sendo uma substância também de ocorrência natural, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Trata-se de uma molécula que compete pela IL-1 com o receptor verdadeiro, mas incapaz de induzir

efeito, funcionando portanto como um modulador natural para a cascata. (18, 22, 28).

Mesmo sendo de ação mais tardia no processo, outras drogas também têm sido testadas. Deve ser mencionado o ibuprofeno, droga recentemente aventada para uso na sepse (68, 82). Sua aplicação está embasada em que, havendo nas infecções graves resposta inflamatória severa, o uso de um anti-inflamatório capaz de inibir a ciclo-oxigenase, e por conseguinte a formação de prostaglandinas e leucotrienos, seria bastante coerente. A diversas outras substâncias vem sendo atribuída atenção como potenciais promessas, como por exemplo a antitrombina (47, 72) e outros inibidores da coagulação (24), o fator estimulador de colônia dos granulócitos (21,50), as catecolaminas (74), algumas prostaglandinas, como a PGI₂ (prostaciclina)(53), dentre outras drogas (03, 45). Recentemente tem-se lançado mão inclusive de técnicas dialíticas, visando a retirada de citocinas e diversos outros mediadores da circulação (27).

Todavia a lógica leva a pensar que, quanto mais tardiamente na cascata séptica atuar uma determinada terapia, menos provável será a reversão do processo, visto que o tratamento de etapas mais avançadas deveria abordar simultaneamente um número muito maior de mediadores do que nas fases mais precoces. Alguns autores consideram que a solução seria a associação de múltiplas modalidades terapêuticas (49), pois exatamente devido às características do processo séptico, drogas que atuam apenas em uma ou outra etapa deste, teriam menor possibilidade de sucesso.

Nesta lógica inserem-se os corticosteróides, visto que os mecanismos de ação destes hormônios lhes conferem a propriedade de atuar simultaneamente em diversos momentos da cadeia de eventos da sepse. De acordo com este raciocínio, estas drogas poderiam atuar já nos primórdios da infecção, devido à sua conhecida capacidade de inibição da ativação macrofágica (78), o que significa atuação em um nível ainda mais proximal da cadeia do que os próprios anticorpos anti-LPS.

Adicionalmente estes hormônios podem também inibir a síntese de FNT, mediante bloqueio da ativação transcricional e pós-transcricional (traducional) do RNAm do FNT, de efeito bastante superior às drogas que atuam unicamente sobre a sua transcrição (supra-citadas) (05, 08, 30), e além disso também afetam adversamente a produção de IL-1 (12, 18).

Ademais, como potentes inibidores da fosfolipase A2, e por conseguinte a isso bloqueadores da liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidos das membranas celulares do hospedeiro, os corticosteróides previnem a produção de leucotrienos e prostaglandinas, bem como do fator de ativação plaquetário (46), apresentando assim uma ação ainda mais marcante que os demais anti-inflamatórios, agindo destarte também em etapas mais tardias da sepse, quando inibem ainda a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (55). Finalmente, a sua conhecida interferência sobre a função dos neutrófilos acarreta redução da liberação de enzimas lisossomais e de radicais livres de oxigênio (63).

Paralelamente às vantagens teóricas mencionadas, outras propriedades destes hormônios são bastante providenciais nos quadros sépticos, quais sejam a estabilização da resposta vascular aos

vasoconstritores (78)(a qual freqüentemente é perdida em tais quadros e parece ser importante fator determinante de mortalidade), e a diminuição da suscetibilidade das células endoteliais à ação dos radicais livres de oxigênio (minimizando-se assim o vazamento de fluidos através do endotélio) (63).

O uso de corticosteróides na sepse não se constitui em tema novo. Já nos anos 50 a lógica de se abordar esta entidade mórbida mediante uso de tais drogas parecia racional, partindo-se do pressuposto que toda infecção enseja inflamação, e que o efeito das referidas substâncias se faz em parte graças à potente inibição da reação inflamatória. Na realidade a utilização de corticosteróides já foi sustentada como benéfica em certas infecções humanas específicas, especialmente na febre tifóide, em que o emprego de dexametasona é fortemente advogado por HOFFMANN (34), assim como em pneumonia por *Pneumocystis carinii* em aidéticos e meningites infantis (46).

Nos últimos anos, contudo, devido a estudos fracassados referentes ao uso de corticosteróides em outras formas de infecções graves em seres humanos, estas medicações foram praticamente banidas de pesquisas nesta área, tendo-se voltado as atenções para as drogas anteriormente mencionadas, cuja utilidade, porém, permanece fortemente interrogada (15, 20, 77) e cujos custos vêm obrigando a comunidade científica a repensar os melhores caminhos de pesquisa (01, 49).

O estudo de SCHUMER nos anos 70 tornou-se muito polêmico e acendeu fortes esperanças de que a abordagem da sepse humana tornar-se-ia muito mais efetiva com o uso dos corticosteróides, do que naquele tempo até mesmo o FDA se convenceu, a ponto de liberar estas substâncias

para uso na sepse (FDA: Food and Drug Administration, órgão americano oficial encarregado da liberação de produtos farmacêuticos para a prática médica)(46). Com efeito, este autor relatou cifras de mortalidade marcadamente menores nos pacientes que receberam metilprednisolona ou dexametasona associadas a antibióticos, do que no grupo controle. Infelizmente, porém, tais resultados não foram repetidos em estudos posteriores (11, 33, 64), o que desde então praticamente aboliu a idéia de corticosteróides na sepse. Todavia é importante salientar que nenhum destes autores se preocupou em informar a relação temporal entre a administração dos antibióticos e aquela dos corticosteróides, uma informação importante, que face aos conhecimentos da época não parecia tão significativa. O único dado concernente a isto encontrado nos quatro trabalhos citados foi o "uso precoce" das últimas drogas, sem contudo mencionar a referida relação temporal entre as mesmas e os antibióticos. Este é um dado que pode tornar-se relevante, se for considerado que os antibióticos induzem um súbito aumento de LPS no sangue, fator desencadeante da cascata séptica, a qual teoricamente poderia ser evitada se, previamente ao uso de antibióticos, os macrófagos pudessem ser inibidos pelos corticosteróides.

Em estudos experimentais, porém, os corticosteróides determinavam, reiteradamente, diminuição significativa da mortalidade em infecções por BGN (às infecções experimentais por germes gram-positivos, também abordados no presente trabalho, não se deu atenção naquele tempo), dando origem a vários trabalhos (29, 32, 36, 42, 52). No entanto, a

má-experiência com seres humanos tornou ilógica a continuação das pesquisas mesmo nesta esfera.

Posteriormente, apenas, foram determinadas as ações dos glicocorticóides com maior precisão a nível bioquímico e biomolecular, e também apenas posteriormente foram melhor elucidadas as diversas reações entre invasor e hospedeiro envolvidas na sepse, conforme sucintamente se

explicou acima. Portanto, a informação de que uma vez que a síntese e liberação de FNT e demais citocinas transcenda os controles fisiológicos, a sepse foge ao controle clínico, é relativamente nova, e posterior aos conhecimentos de então. Também é relativamente recente a informação de que a liberação de FNT se inicia em poucos minutos após o contato com o LPS, e o pico sérico de FNT é obtido em um mínimo intervalo de tempo (07). Apesar da falta de tais informações, GREISMAN observou em estudo experimental que os efeitos benéficos dos corticosteróides se faziam sentir quando estas medicações eram aplicadas precocemente e antes dos antimicrobianos. Porém este autor não se preocupou em controlar o estudo com um grupo de animais recebendo o corticosteróide apenas após o antimicrobiano ter sido iniciado.

Em abrangentes revisões sobre o tema, SJÖLIN em 1991, e NEUGEBAUER no mesmo ano, colocaram em dúvida se os estudos que contra-indicaram os corticosteróides na sepse humana teriam seguido a metodologia mais apropriada, e opinavam que a possibilidade de um “erro β ” (incapacidade de se demonstrar um efeito que na realidade existe) em tais estudos seria considerável. Mais recentemente (39) uma meta-análise de

diversas publicações prévias referentes ao mesmo tema concluiu que o choque séptico não parece ser beneficiado por estas drogas, embora fosse identificável um efeito positivo em quadros de septicemia por BGN. Por mais que a crítica tecida por estes autores se concentrasse em considerações estatísticas e metodológicas bastante interessantes, a questão do uso do corticosteróide previamente ao antimicrobiano novamente deixou de ser abordada.

Imagina-se atualmente que, uma vez estimulados os macrófagos de forma maciça, pouco se pode fazer para efetivamente impedir o irromper da cascata séptica. Também se considera que a abordagem do problema talvez deva considerar simultaneamente os diversos passos do processo, mesmo que lançando-se mão de diversas terapias de forma conjunta, visto que o processo séptico se constitui numa rede bastante intrincada e redundante de fenômenos bioquímicos, que estão constantemente se auto-induzindo.

De acordo com o que se comentou acima, a ação dos corticosteróides se faz ao longo de todas as fases da sepse. Porém, é de se ponderar que o seu uso muito tempo após o antibiótico, com conseqüente morte bacteriana em larga escala e por conseguinte liberação maciça de LPS, teria todas as probabilidades de fracassar, dada a produção e liberação quase imediatas de FNT após a entrada do LPS (ou outro fator sensibilizante, caso não se trate de BGN) na circulação.

Postula-se na presente tese, que o uso de corticosteróides precocemente, e previamente ao antibiótico num ambiente de infecção grave experimental, por BGN e CGP, poderia determinar redução da mortalidade.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado nas dependências do laboratório de Microbiologia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), suíços-albinos, não consangüíneos, linhagem CF1 (Carawarth Farm 1), provenientes do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná.

Para dar cumprimento aos objetivos, os animais foram divididos em grupos, conforme a cepa de bactéria a ser inoculada, e ainda em subgrupos conforme o tratamento experimental com antibióticos e/ou corticosteróides, bem como os controles (quadro 1).

Evidentemente, os subgrupos mais importantes para o estudo são os quatro últimos (os que foram experimentalmente infectados), sendo os demais apenas controles das drogas ou do diluente, não tendo recebido inóculo bacteriano. Dentre os quatro últimos, um subgrupo se destinou ao controle da infecção bacteriana induzida, não recebendo portanto qualquer tratamento, e prestando-se desta forma como base para comparação com os resultados obtidos em cada um dos subgrupos infectados e tratados. Estes consistiram em três, a saber: um primeiro, em que se empregou o “tratamento habitual”, ou seja, o antibiótico isoladamente; um segundo, em que foram aplicados antibiótico e corticosteróide, nesta ordem; e um terceiro, em que esta ordem foi invertida, sendo o corticosteróide aplicado previamente ao antibiótico.

Quadro 1 : Demonstrativo da organização do protocolo experimental

GRUPOS DE BACTÉRIAS		
<i>Staphylococcus aureus*</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
subdividido em :	subdividido em :	subdividido em :
<ul style="list-style-type: none"> ◆ 40 camundongos que receberam apenas o antibiótico via I.M. (subgrupo controle do antibiótico); ◆ 40 camundongos que receberam apenas corticosteróide via I.P. (subgrupo controle do corticosteróide); ◆ 40 camundongos que receberam apenas o inóculo de bactérias. (subgrupo controle de infecção); ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo de bactérias e 2 horas após, a primeira dose do antibiótico; ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo bacteriano, duas horas após receberam a primeira dose do antibiótico, e 4 horas após receberam a dose única de corticosteróide; ◆ 40 camundongos que foram inoculados com a suspensão de bactéria; 1 hora após, receberam a dose do corticosteróide; e 2,5 horas após o inóculo bacteriano, foram submetidos à primeira dose do antibiótico; 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 40 camundongos que receberam apenas o antibiótico via I.M. (subgrupo controle do antibiótico); ◆ 40 camundongos que receberam apenas corticosteróide via I.P. (subgrupo controle do corticosteróide); ◆ 40 camundongos que receberam apenas o inóculo de bactérias. (subgrupo controle de infecção); ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo de bactérias e 2 horas após, a primeira dose do antibiótico; ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo bacteriano, duas horas após receberam a primeira dose do antibiótico, e 4 horas após receberam a dose única de corticosteróide; ◆ 40 camundongos que foram inoculados com a suspensão de bactéria; 1 hora após, receberam a dose do corticosteróide; e 2,5 horas após o inóculo bacteriano, foram submetidos à primeira dose do antibiótico; 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 40 camundongos que receberam apenas o antibiótico via I.M. (subgrupo controle do antibiótico); ◆ 40 camundongos que receberam apenas corticosteróide via I.P. (subgrupo controle do corticosteróide); ◆ 40 camundongos que receberam apenas o inóculo de bactérias. (subgrupo controle de infecção); ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo de bactérias e 2 horas após, a primeira dose do antibiótico; ◆ 40 camundongos que receberam o inóculo bacteriano, duas horas após receberam a primeira dose do antibiótico, e 4 horas após receberam a dose única de corticosteróide; ◆ 40 camundongos que foram inoculados com a suspensão de bactéria; 1 hora após, receberam a dose do corticosteróide; e 2,5 horas após o inóculo bacteriano, foram submetidos à primeira dose do antibiótico;
◆ um subgrupo extra, composto por 40 camundongos, foi considerado comum a todos os três grupos, e prestava-se ao controle da solução de diluente utilizada		
Total de animais: 760 camundongos**		

I.M.: intra-muscular I.P.: intra-peritoneal

* A cepa utilizada não era produtora de êntero-toxinas (*S.aureus* não enterotoxigênico).

** O número total de camundongos foi 760 e não 840, porque na realidade o diluente utilizado no subgrupo extra "controle do diluente" foi o mesmo para os três grupos, de forma que foram utilizados apenas 40 (e não 120) camundongos para esta finalidade.

Para serem obtidos resultados comparáveis estatisticamente, os grupos foram organizados de forma a conter o mesmo número de animais, os quais foram definidos para correlacionar a ação da corticoterapia na peritonite experimental antes ou após o início do antimicrobiano. Os demais subgrupos foram controles da ação das drogas utilizadas e da via de inoculação.

4.2 ANIMAIS UTILIZADOS

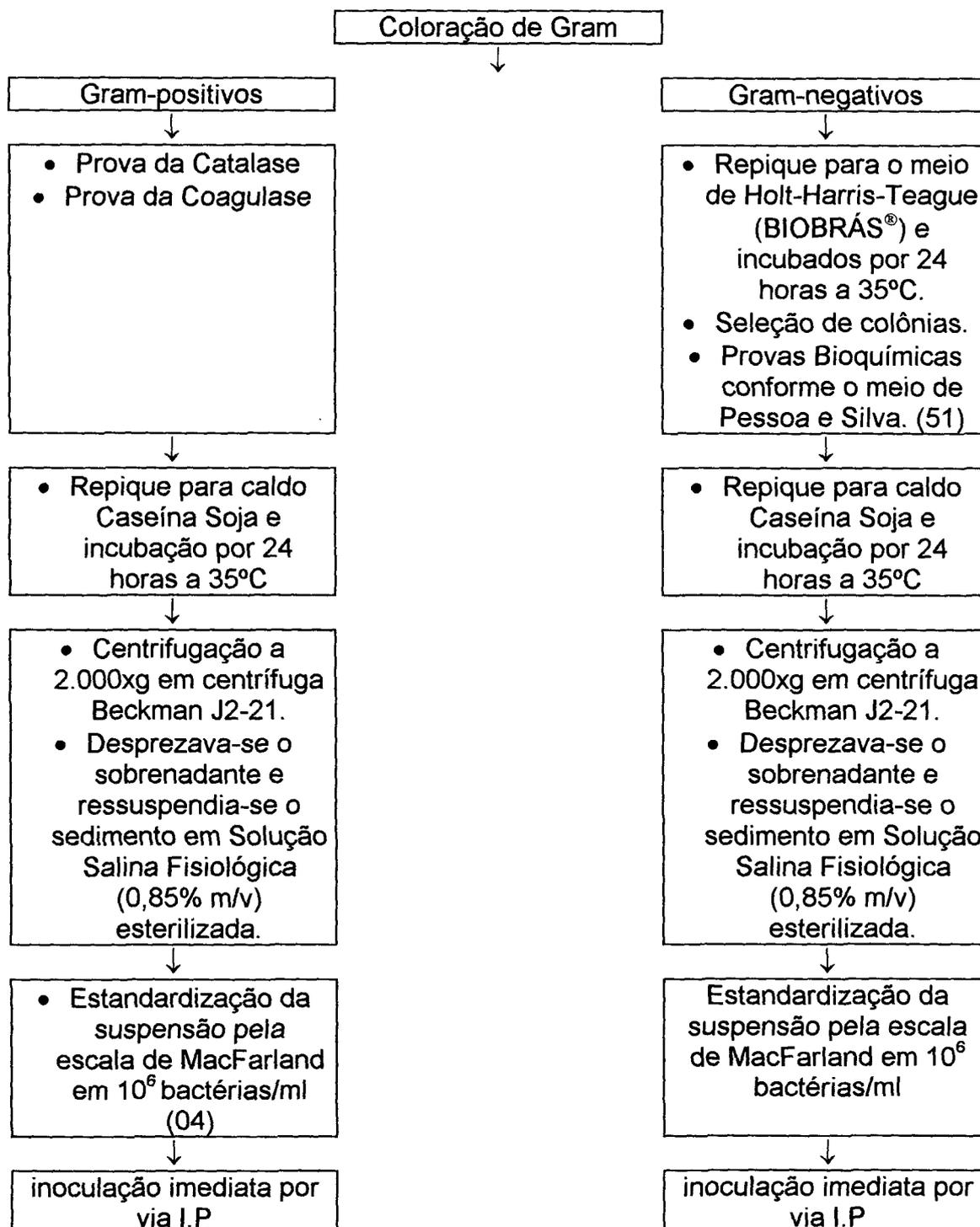
Foram empregados 760 camundongos machos, com 45 dias de vida, pesando entre 18 a 22g. Foram distribuídos em grupos de 10 e colocados em caixas de polipropileno, previamente desinfetadas, contendo sepilho esterilizado, sendo-lhes fornecidas água e ração (Nuvital®) específica para a espécie, *ad libitum*. Os animais assim distribuídos foram mantidos em ambiente climatizado (18-22°C), com ciclos de luz e escuro a cada 12 horas. As caixas eram trocadas a cada 48 horas, com sepilho novo e bebedouros com água fresca, conforme ROMERO e FUENZALIDA (56).

4.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Foram selecionados espécimes de *Klebsiella pneumoniae* da coleção mantida pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, oriundas de casos clínicos, e de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, da coleção mantida pelo laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (ATCC números 25922 e 25923, respectivamente), todos com perfil de sensibilidade a antibióticos compatível com os objetivos do estudo, a saber sensíveis a amicacina (*E.coli* e *K.pneumoniae*) e teicoplanina (*S.aureus*).

As cepas foram ressuspensas em Caldo Caseína Soja (BIOBRÁS®), incubadas por 48 horas a 35°C, e então submetidas aos controles, conforme esquema a seguir (figura 2):

Figura 2 : preparo dos inóculos bacterianos



Após os procedimentos de inoculação, amostras dos inóculos foram submetidas à contagem de UFC/ml em Agar Caseína Soja (BIOBRÁS®), pelo método de diluições e contagem em placas (37). As amostras eram diluídas em diluições decimais (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10.000), semeava-se 0,1 ml de cada diluição em placa de Petri e homogeneizava-se com alça de Drigalsky. Incubava-se a 35°C por 24 horas contava-se as colônias crescidas e transformava-se o resultado em UFC/ml (43).

4.4. INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Para a inoculação das suspensões bacterianas, foram utilizadas seringas de 10ml com agulha 13x4, 5mm, descartáveis. Os animais eram empunhados pela região dorsal e era exposta a sua região abdominal; a seguir eram inoculados no quadrante inferior esquerdo com 1 ml da suspensão de bactérias; procedia-se da mesma forma para a inoculação do corticosteróide. Para a aplicação dos antibióticos, via I.M., foram utilizadas seringas de 1ml tipo tuberculina, com agulhas 13x4, 5mm, no membro posterior esquerdo.

4.5. ACOMPANHAMENTO

Para o acompanhamento da evolução do experimento, formulou-se um protocolo para as leituras diárias e contagem de animais por caixa, conforme o modelo a seguir (figura 3):

Figura 3: Protocolo de acompanhamento do experimento

Grupo: _____		
Subgrupo: _____		
Leituras		
Período	Vivos	Mortos
12 ^a h		
24 ^a h		
36 ^a h		
48 ^a h		
60 ^a h		
72 ^a h		
84 ^a h		
96 ^a h		
5 ^o dia		
6 ^o dia		
7 ^o dia		
8 ^o dia		
9 ^o dia		
10 ^o dia		
final		

Note-se que nos primeiros quatro dias as observações eram feitas a cada 12 horas.

4.6. PREPARO E APLICAÇÃO DAS SOLUÇÕES MEDICAMENTOSAS

Para este estudo foram selecionados os antibióticos **teicoplanina** (Targocid[®]), para o experimento com *S.aureus*, e **amicacina** (Novamin[®]), para os experimentos com *E.coli* e *K.pneumoniae*, de acordo com indicações da literatura médica referentes àquelas drogas (54, 80). Para ambos os antibióticos, a sensibilidade das bactérias empregadas no experimento foi previamente confirmada *in vitro*. O antibiótico teicoplanina foi preparado de acordo com as indicações do fabricante: ao pó presente no frasco-ampola foi adicionada a solução solvente específica, e o conjunto era

homogeneizado com cuidado para se evitar a formação de bolhas. A seguir acrescentava-se solução salina isotônica a 0,85% àquele preparado, de forma a facilitar a administração do produto aos camundongos. Na seqüência procedia-se à aplicação da droga aos animais dos subgrupos que deveriam recebê-la, na dose de ataque de 6mg/kg e na dose de manutenção de 6mg/kg/dia, dividida em duas doses de 3mg/kg em volumes de 0,1ml, via I.M., a cada 12 horas. O antibiótico foi utilizado durante os quatro primeiros dias do experimento e então suspenso.

O antibiótico amicacina foi preparado da seguinte forma: ao conteúdo das ampolas do produto foi acrescentada solução salina isotônica a 0,85%, de forma a facilitar a administração do produto aos animais. Na seqüência procedia-se à aplicação da droga aos camundongos dos subgrupos que deveriam recebê-la, na dose de 15mg/kg/dia, dividida em duas doses de 7,5mg/kg em volumes de 0,1ml, via I.M., a cada 12 horas. O antibiótico foi utilizado durante os quatro primeiros dias do experimento e então suspenso.

O corticosteróide eleito para este estudo foi a metilprednisolona (Solu-medrol®). Para o seu preparo, o conteúdo dos frascos-ampola era homogeneizado com o solvente específico do fabricante, e a seguir o produto era diluído com solução salina isotônica a 0,85%, a fim de facilitar a administração da droga aos animais. O medicamento foi aplicado em dose única de 30mg/kg, no volume de 0,2ml, via I.P., aos camundongos que deveriam recebê-lo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A técnica utilizada para análise foi o teste Z para comparação de duas proporções entre amostras independentes, visando obtenção do “valor p” (probabilidade de significância). Neste estudo aceitou-se valor $p < 0,05$ como necessário para a rejeição da hipótese nula e conseqüente aceitação de significância entre as diferenças testadas.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS COM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Os quadros de sobrevivência n^{os} 2 e 3 abaixo resumem os resultados referentes aos procedimentos com as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente. Os subgrupos-controle de antibiótico, corticosteróide e diluente, apresentaram mortalidades nulas. Em todos os subgrupos, o número inicial de unidades experimentais foi o mesmo, a saber, quarenta. Nas primeiras 12 horas de observação, a mortalidade em todos os subgrupos foi nula.

Quadro 2: sobrevivência no grupo *E. coli*

CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES (n inicial = 40 em todos os subgrupos)															
	dia 01		dia 02		dia 03		dia 04		dia 05	dia 06	dia 07	dia 08	dia 09	dia 10	final
tempo (horas)	12	24	36	48	60	72	84	96	120	144	168	192	216	240	
ctr. dil	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
ctr. a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
ctr. c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
b	40	35	28	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00
b + a	40	28	26	26	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
b+a+c	40	30	21	21	17	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
b+c+a	40	36	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; **ctr. c** = controle do corticosteróide; **ctr. a** = controle do antibiótico; **ctr. dil** = controle do diluente; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

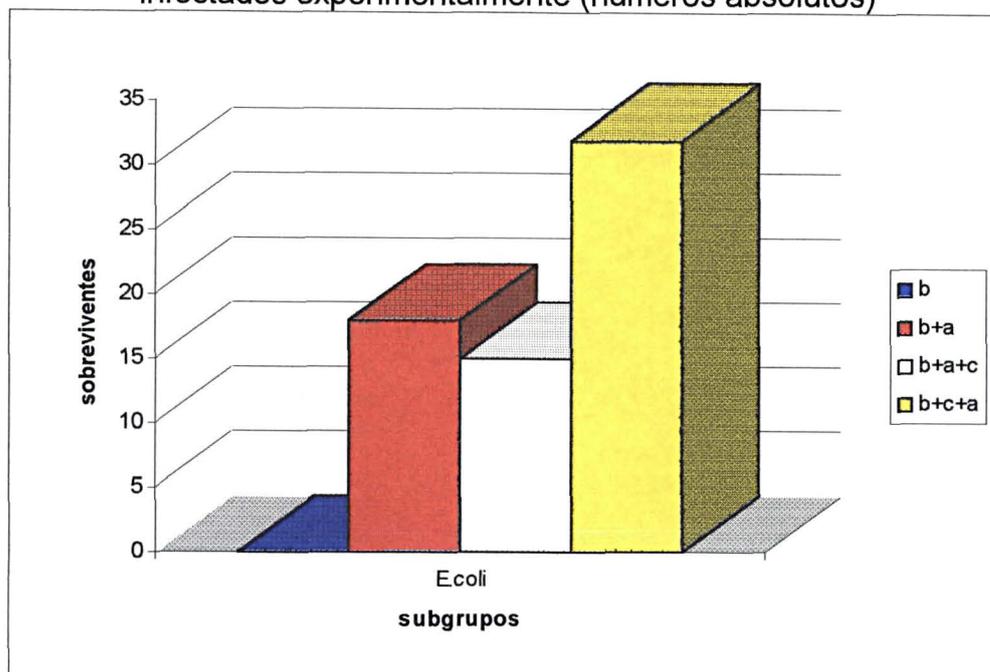
No que tange ao experimento com *E. coli*, observamos que após o terceiro dia de experimentação não houve alteração ulterior nas taxas de mortalidade de nenhum dos subgrupos, indicando que a suspensão do antibiótico após o quarto dia não influenciou os números finais. Observamos

também que a mortalidade final no subgrupo não tratado (controle de infecção) foi de 100%.

Quando se utilizou **antibiótico isoladamente** (amicacina 15mg/kgf/dia durante 4 dias), tal mortalidade decaiu, restando 18 sobreviventes (mortalidade de 55%, e o valor p desta diferença entre o subgrupo controle de infecção e o subgrupo tratado apenas com amicacina resultou menor que 0,00001). O uso do **corticosteróide associado à amicacina**, e administrado **previamente** a ela, reduziu ainda mais a mortalidade, sobrevivendo neste grupo 32 dos 40 camundongos iniciais (mortalidade de 20%), sendo esta diferença entre os subgrupos “amicacina isoladamente” e “amicacina seguida por metilprednisolona” significativa do ponto de vista estatístico ($p < 0,001$). Por outro lado, quando o corticosteróide foi administrado **após** o antibiótico, o resultado final foi bastante inferior ao seu uso **antes** do antibiótico ($p < 0,001$), e não houve diferença estatística quando comparado ao resultado do grupo em que se utilizou apenas amicacina ($p = 0,2488$).

Estes resultados são melhor ilustrados na figura a seguir:

Figura 4: Número final de sobreviventes no grupo *E.coli* nos 4 subgrupos infectados experimentalmente (números absolutos)

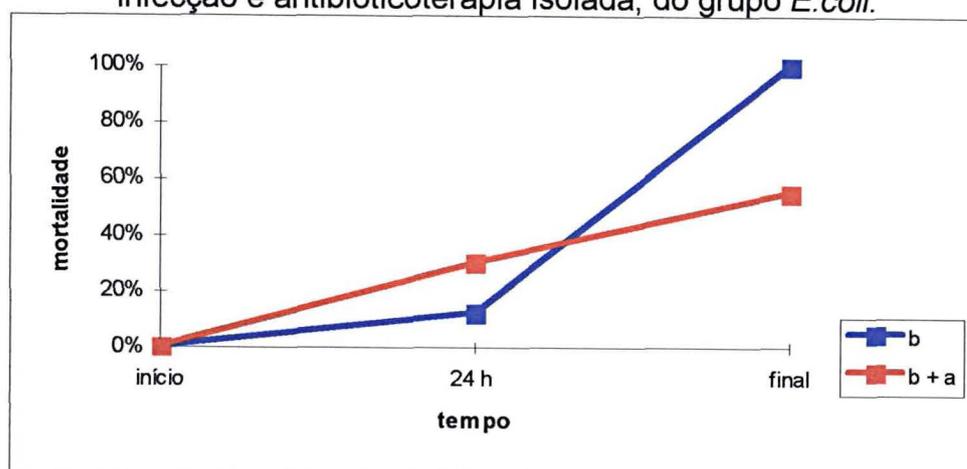


Observar a grande diferença de mortalidade entre os três subgrupos tratados (b+a, b+a+c, b+c+a) e o subgrupo controle de infecção (b) ($p < 0,00001$), havendo mortalidade completa neste último. A diferença entre os subgrupos tratados com amicacina e amicacina precedendo o corticosteróide não resultou significativa ($p = 0,2488$). Já a comparação entre qualquer destes dois últimos subgrupos e o subgrupo abordado com amicacina após o corticosteróide aponta diferença significativa em favor deste ($p < 0,001$).

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

Cumpram também chamar a atenção para o fato curioso registrado na observação feita à 24^a hora do experimento (figura 5): naquele momento, o grupo tratado unicamente com antibiótico apresentava mortalidade maior do que o grupo não tratado ($p < 0,05$), achado aparentemente paradoxal e que merecerá nova consideração sob o item “discussão”.

Figura 5: Mortalidades em função do tempo nos subgrupos controle de infecção e antibioticoterapia isolada, do grupo *E.coli*.



Observar a menor mortalidade, à 24^a hora, no subgrupo sem tratamento em comparação com aquele em que o antibiótico foi empregado isoladamente ($p < 0,05$).

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

A análise do quadro 3, abaixo, referente ao experimento com *Klebsiella pneumoniae*, permite-nos observar resultados similares, embora um tanto mais marcantes:

Quadro 3: sobrevivência no grupo *Klebsiella pneumoniae*

CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES (n inicial = 40 em todos os subgrupos)															
	dia 01		dia 02		dia 03		dia 04		dia 05	dia 06	dia 07	dia 08	dia 09	dia 10	final
tempo (horas)	12	24	36	48	60	72	84	96	120	144	168	192	216	240	
ctr.dil*															
ctr. a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
ctr. c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
b	40	38	21	09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00
b+a	40	25	18	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
b+a+c	40	30	23	21	21	10	08	08	08	08	08	08	08	08	08
b+c+a	40	31	26	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22

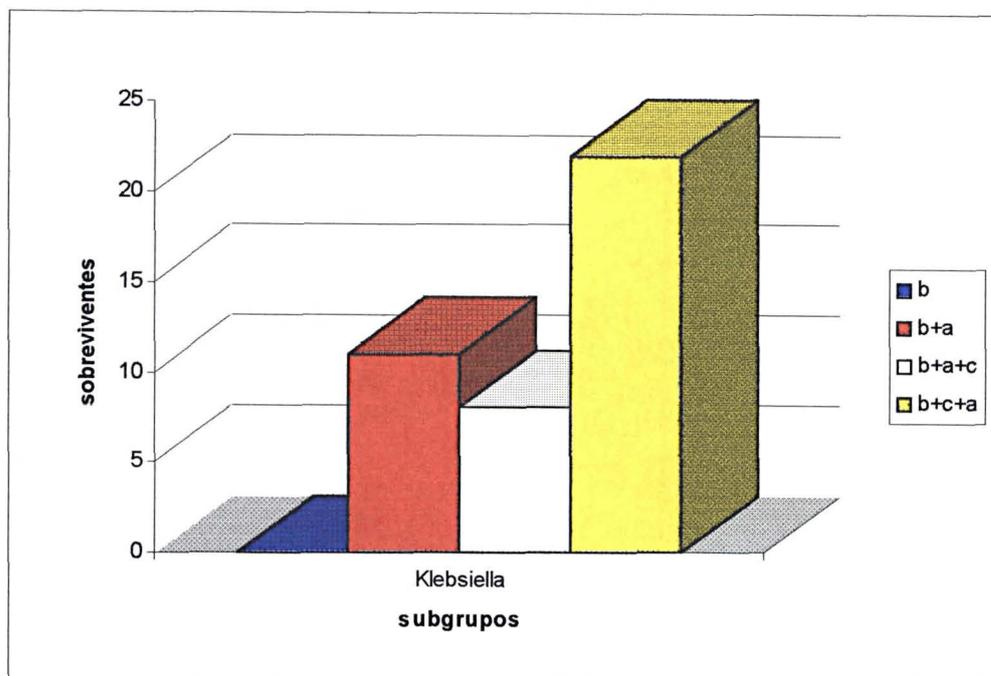
* : em todos os três grupos usou - se o mesmo diluente, de forma que o controle deste é o mesmo para todos.

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; **ctr. c** = controle do corticosteróide; **ctr. a** = controle do antibiótico; **ctr. dil** = controle do diluente; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

Como se vê, a mortalidade provocada por este germe mostrou-se um tanto mais acentuada do que aquela ensejada por *E. coli* (da comparação entre subgrupos “corticosteróide precedendo o antibiótico”, $p < 0,01$; da comparação entre subgrupos “antibiótico precedendo o corticosteróide”, $p < 0,05$; já para o subgrupo “antibiótico isoladamente” esta diferença de mortalidade ocasionada por *E. coli* e *K. pneumoniae* não resultou significativa ($p = 0,051$). No subgrupo controle de infecção, a mortalidade final observada foi igualmente de 100%. Quando a infecção foi abordada com o antimicrobiano, esta mortalidade decaiu para 72,5% (valor p desta diferença $< 0,001$). Também neste experimento verifica-se um efeito protetor adicional exercido pelo corticosteróide, em cujo subgrupo a mortalidade revelou-se significativamente menor do que no subgrupo em que o antibiótico foi utilizado isoladamente (mortalidade de 45%, correspondendo esta diferença a um valor $p < 0,01$). Por outro lado, quando o corticosteróide foi administrado **após** o antibiótico, o resultado final foi bastante inferior ao seu uso **antes** do antibiótico ($p < 0,01$), e **não houve** diferença estatística quando comparado ao resultado do grupo em que se utilizou apenas amicacina ($p = 0,215$).

Estes resultados são melhor ilustrados na próxima figura.

Figura 6: Número final de sobreviventes no grupo *K.pneumoniae* nos 4 subgrupos infectados experimentalmente (números absolutos)

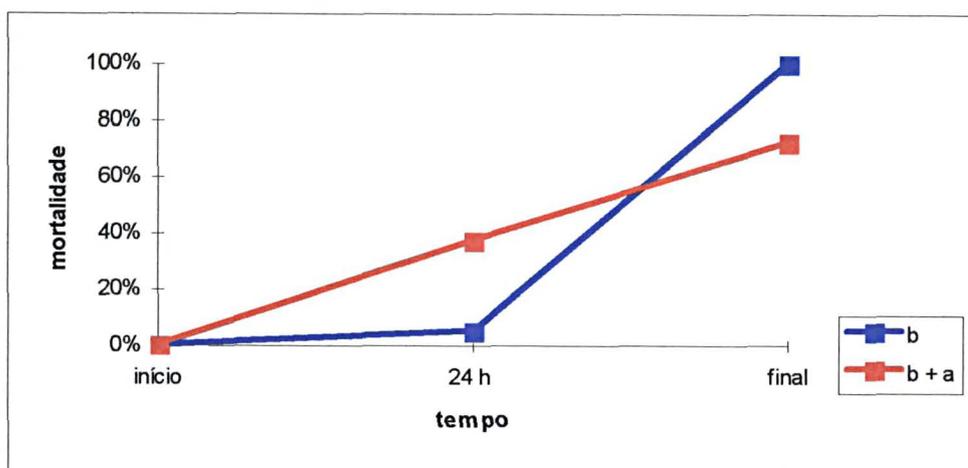


Observar a grande diferença de mortalidade entre os três subgrupos tratados (b+a, b+a+c, b+c+a) e o subgrupo controle de infecção (b) ($p < 0,001$), havendo mortalidade completa neste último. A diferença entre os subgrupos tratados com amicacina e amicacina precedendo o corticosteróide não resultou significativa ($p = 0,215$). Já a comparação entre qualquer destes dois últimos subgrupos e o subgrupo abordado com amicacina após o corticosteróide aponta diferença significativa em favor deste ($p < 0,01$).

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

Também aqui se evidencia o fenômeno de maior mortalidade inicial nas primeiras 24 horas de observação no grupo tratado isoladamente com antibiótico (37,5%), do que no grupo não tratado (5%) ($p < 0,001$) (figura 7).

Figura 7: Mortalidades em função do tempo nos subgrupos controle de infecção e antibioticoterapia isolada, do grupo *K.pneumoniae*.



Note-se a menor mortalidade, à 24^a hora, no subgrupo sem tratamento em comparação com aquele em que o antibiótico foi empregado isoladamente ($p < 0,05$).

b = inóculo bacteriano; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a** e **b** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e o antimicrobiano foram aplicados.

Conforme o que ocorrera com o grupo *E. coli*, a mortalidade após o terceiro dia não mais se alterou, de forma que a suspensão do antibiótico após o quarto dia não possa ter afetado os resultados finais.

5. 2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO COM COCO GRAM-POSITIVO

O quadro de sobrevivência 4, a seguir, reproduz os resultados do experimento com *Staphylococcus aureus*. Também neste caso, como se pode observar, as mortalidades dos grupos-controle de antibiótico, diluente e corticóide, revelaram-se nulas. Nas primeiras 12 horas de observação, a mortalidade em todos os subgrupos era igualmente nula.

Quadro 4: sobrevivência no grupo *S. aureus*

CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES (n inicial = 40 em todos os subgrupos)															
	dia 01		dia 02		dia 03		dia 04		dia 05	dia 06	dia 07	dia 08	dia 09	dia 10	final
tempo (horas)	12	24	36	48	60	72	84	96	120	144	168	192	216	240	
ctr. dil*															
ctr. a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
ctr. c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
b	40	15	07	07	07	07	07	07	07	07	07	07	07	07	07
b + a	40	28	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
b+a+c	40	12	09	09	09	09	09	09	09	09	09	09	09	09	09
b+c+a	40	32	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27

* :em todos os três grupos usou-se o mesmo diluente, de forma que o controle deste é válido para todos.

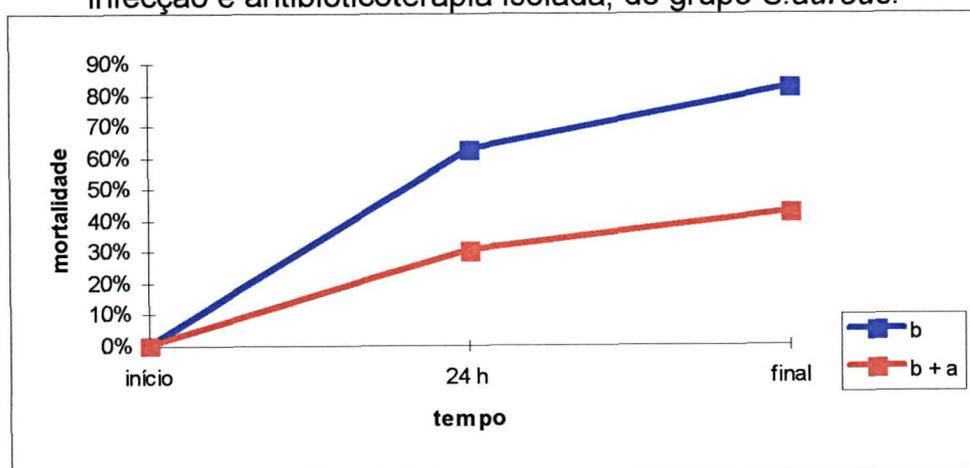
b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; **ctr. c** = controle do corticosteróide; **ctr. a** = controle do antibiótico; **ctr. dil** = controle do diluente; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

Da apreciação do quadro acima pode-se constatar diferenças relevantes com relação aos resultados dos estudos com germes gram-negativos:

- ◆ a comparação entre os subgrupos "tratado com antibiótico isoladamente" e "não tratado", à 24^a hora de experimentação, mostra que a mortalidade foi maior no segundo subgrupo (30% contra 62,5% no subgrupo tratado; $p < 0,001$), ou seja, exatamente o oposto do ocorrido com *E. coli* e *K. pneumoniae* (figura 8).
- ◆ embora quando se considera o subgrupo "controle de infecção" a mortalidade final no grupo *S. aureus* tenha sido menor que nos grupos de BGN, a mortalidade inicial neste mesmo subgrupo foi consideravelmente maior com *S. aureus* do que com *E. coli* ou *K. pneumoniae* ($p < 0,0001$).

- ◆ a diferença de mortalidade entre os subgrupos “tratado com antibiótico isoladamente” (42,5%) e “tratado com corticosteróide previamente ao antibiótico” (32,5%) foi bastante menor do que se observou nos experimentos com germes gram-negativos, e a análise estatística não evidenciou significância no fenômeno ($p = 0,1792$).
- ◆ no subgrupo em que se abordou a infecção com o antibiótico sendo iniciado **antes do corticosteróide**, a mortalidade foi **maior** do que nos subgrupos em que se usou antibiótico isoladamente ou antibiótico após o corticosteróide ($p < 0,0001$), resultado também bastante diverso do evidenciado com BGN.

Figura 8: Mortalidades em função do tempo nos subgrupos controle de infecção e antibioticoterapia isolada, do grupo *S.aureus*.



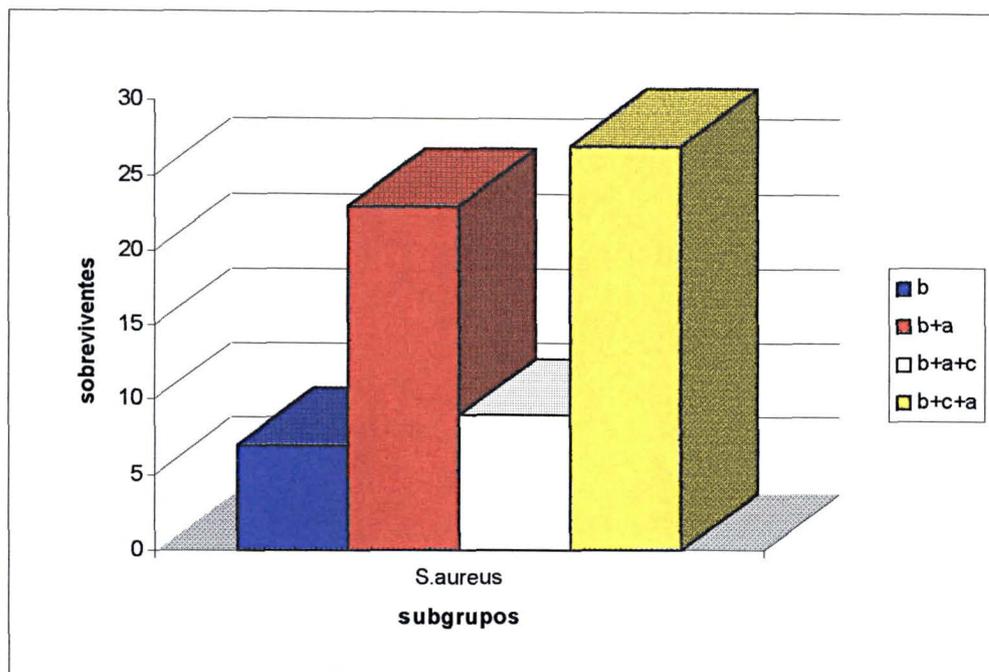
Observar a maior mortalidade, à 24^a hora, no subgrupo sem tratamento em comparação com aquele em que o antibiótico foi empregado isoladamente ($p < 0,05$), diferentemente do que se verificara com os BGN.

b = inóculo bacteriano; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a** e **b** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e o antimicrobiano foram aplicados.

- ◆ a mortalidade nas primeiras 24 horas no subgrupo tratado com o **antibiótico precedendo o corticosteróide** foi a mais expressiva de todas, e estatisticamente equivalente à do grupo controle de infecção (valor p desta comparação = 0,2388, mostrando não haver diferença estatística).
- ◆ também a mortalidade final entre estes dois subgrupos foi equivalente (valor p desta comparação = 0,28774, mostrando não haver diferença estatística).

Pode-se observar que no subgrupo não tratado (controle de infecção) a mortalidade foi bastante expressiva (82,5%), de forma que embora 7 unidades experimentais tenham sobrevivido, evidencia-se mesmo assim a severidade da infecção, sendo também que tal mortalidade resultou muito maior que nos subgrupos "b + a" e "b + c + a" ($p < 0,00001$). Constatase ainda que a mortalidade não mais se alterou a partir do segundo dia de observação em nenhum dos subgrupos, depreendendo-se que a suspensão do antibiótico após o quarto dia não afetou os resultados. A figura a seguir ilustra os principais resultados obtidos, referentes ao número final de sobreviventes:

Figura 9: Número final de sobreviventes no grupo *S.aureus* nos 4 subgrupos infectados experimentalmente (números absolutos)

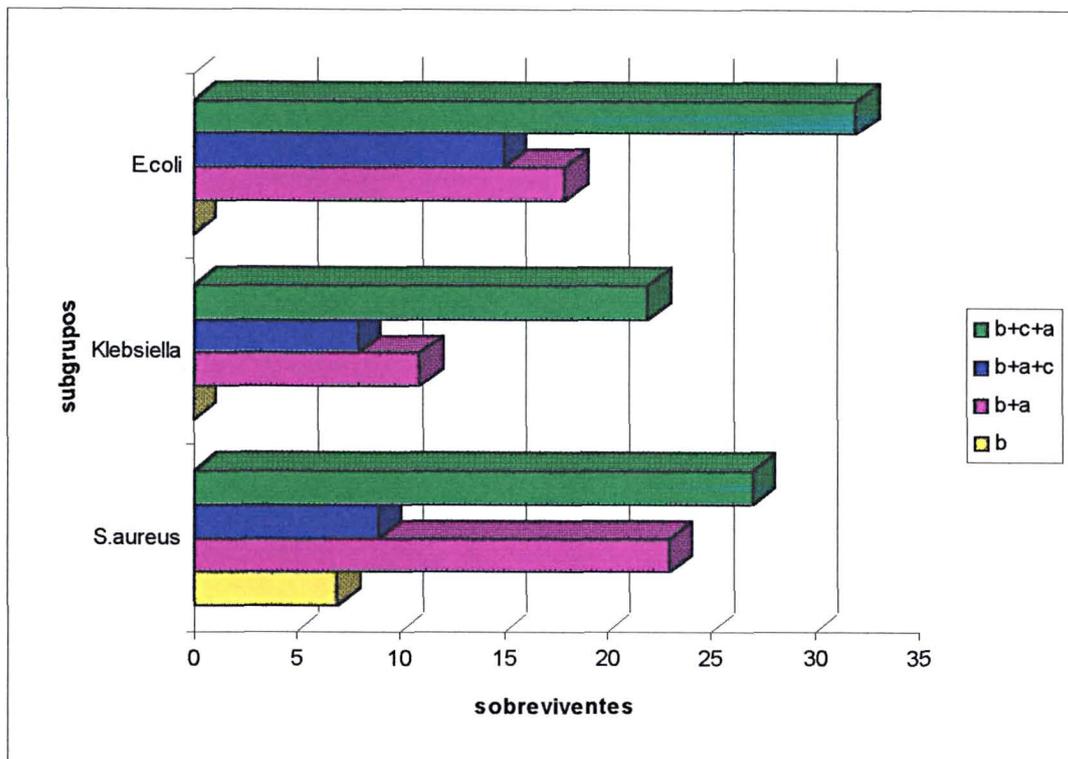


Observar que os subgrupos tratados com antibiótico isoladamente e corticosteroide precedendo o antibiótico apresentaram número de sobreviventes significativamente maior que os outros dois subgrupos ($p < 0,0001$), porém não demonstraram diferença estatística entre si ($p = 0,1792$). Os subgrupos “controle de infecção” e “tratado com antibiótico precedendo o corticosteroide” também se mostraram estatisticamente equivalentes ($p = 0,28774$).

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteroide; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

A figura abaixo resume os principais resultados referentes à sobrevivência final, observados nos três grupos de bactérias:

Figura 10: Sumário dos efeitos dos diversos tratamentos nos subgrupos infectados dos três grupos de bactérias (números absolutos)



Perceba-se a marcante diferença de comportamento entre o grupo *S. aureus* e os grupos dos BGN: no primeiro caso o tratamento com corticosteróide previamente ao antibiótico não mostrou vantagem quando comparado com o uso do antibiótico isoladamente. No caso dos BGN, aquele tratamento foi nitidamente superior ao antibiótico isolado. Note-se ainda que, quando feito após o antimicrobiano, o corticosteróide tornou-se deletério no grupo *S. aureus*, ao passo que nos grupos de BGN esta mudança acarretou apenas equiparação de efeitos (do ponto de vista estatístico) com o subgrupo de tratamento exclusivo com antibióticos.

b = inóculo bacteriano; **c** = corticosteróide; **a** = antibiótico; a ordem das letras **a**, **b** e **c** corresponde à ordem em que o inóculo bacteriano e as medicações foram aplicados.

6 DISCUSSÃO

6.1 MATERIAL E MÉTODO

Como se pode depreender da metodologia aqui adotada, decidiu-se dividir o estudo em dois tópicos principais, ou seja, a pesquisa dos efeitos dos corticosteróides em infecções graves por germes gram-negativos e gram-positivos. O grupo dos bacilos gram-negativos (BGN) foi subdividido em um grupo para *E. coli* e um segundo para *K. pneumoniae*. A intenção que estimulou o uso de três germes diferentes no estudo foi a possibilidade de maior generalização, pelo menos no campo do empirismo, dos eventuais resultados obtidos, às demais BGN e CGP, imaginando-se que os três germes abordados sejam protótipos bastante representativos dos mais significativos mecanismos de interação entre bactéria e hospedeiro na prática clínica, ou seja, BGN encapsuladas ou não, e CGP, das quais as septicemias por *S. aureus* são as mais comuns e de mais difícil abordagem (09).

A subdivisão dos três grupos (*S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) em seis subgrupos e o acréscimo de um subgrupo controle do diluente permitiu que o estudo fosse auto-controlado em todos os seus principais aspectos. Só não se instituiu um subgrupo tratado isoladamente com corticosteróide, porque a literatura informa que tal prática só seria lógica para a abordagem de choque endotóxico, carecendo de efeito na infecção bacteriana grave (52), visto que tal droga não é antimicrobiana. Justamente

pela efetividade dos corticosteróides no choque endotóxico, entendemos como importante excluir

que o inóculo bacteriano contivesse uma quantidade expressiva de endotoxina pré-formada (proveniente do crescimento e multiplicação bacterianos, como explicado na revisão da literatura)(29), pois do contrário poderia ser afirmado que qualquer eventual efeito benéfico da metilprednisolona no presente estudo fosse atribuível apenas à ação deste corticosteróide contra os efeitos da endotoxina (e conseqüentemente, uma possível maior mortalidade nos subgrupos não tratados com esta droga poderia ser atribuída aos efeitos de um grande volume injetado de endotoxina, contra a qual, evidentemente, os antibióticos são inefetivos). Exatamente por este motivo tomou-se a precaução de lavar as bactérias (no intuito de minimizar a quantidade de endotoxinas na suspensão) e proceder à inoculação imediatamente após. É desnecessário dizer que o mesmo procedimento se presta a minimizar a coleção de exotoxinas no inóculo. A inoculação era feita imediatamente após a ressuspensão também com o objetivo de evitar alterações nas características do inóculo. Para se confirmar que tais alterações não tivessem ocorrido, após a inoculação de todos os camundongos, amostras dos inóculos eram submetidas à contagem de UFC/ml em Agar Caseína Soja (BIOBRÁS®), pelo método de diluições e contagem em placas.

A sensibilidade *in vitro* dos microorganismos utilizados era previamente conhecida, e positiva para os antimicrobianos empregados neste trabalho. Isto se explica pelos objetivos da tese, ou seja, testar o uso

do corticosteróide, e não do antibiótico, neste modelo de infecção; desta forma, a escolha de cepas multi-resistentes não se fazia necessária.

A escolha dos antibióticos - amicacina para os BGN e teicoplanina para *S.aureus* - recaiu sobre informação literária e praticidade de administração. Assim, como optamos por aplicar antibióticos aos animais nas mesmas doses, vias e intervalos recomendados para *anima nobile*, selecionamos aquelas duas drogas porque 1) os seus intervalos de administração são amplos (12/12h), o que facilitaria o trabalho dos técnicos; 2) porque são ambas passíveis de administração via IM (o que não seria possível se no caso de *S.aureus* se preferisse, por exemplo, vancomicina), visto ser muito mais laboriosa a administração adequada e repetitiva de drogas via EV em animais do porte dos camundongos; e 3) porque são largamente respaldadas na literatura para infecções pelas bactérias contra as quais foram direcionadas neste trabalho. Os antimicrobianos foram utilizados apenas por quatro dias e então suspensos; esta decisão não afetou a evolução de nenhum dos grupos, visto que em nenhum deles se verificou alteração ulterior de mortalidade após o 3º dia. Pela mesma razão parece justificado o término do experimento após 10 dias de observação.

A metilprednisolona foi preferida entre os corticosteróides por já existirem dados na literatura informando sua dosagem ótima em camundongos infectados (29). Escolheu-se a via IP ao invés da IM por se considerar que pela primeira a absorção seria maior e mais rápida.

6.2 RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos é bastante simples pelos valores marcantes que foram registrados. Em que pese a mortalidade ter sido maior com *K.pneumoniae* do que com *E.coli* (o que atribuímos às particularidades patogénicas desta bactéria, possivelmente a presença da cápsula tendo evitado a fagocitose por macrófagos e polimorfonucleares, propiciando maior proliferação do inóculo no hospedeiro), entendemos que os resultados referentes aos estudos com estas duas bactérias são superponíveis, e por este motivo eles serão estudados em conjunto, e separadamente daqueles obtidos com *S.aureus*.

6.2.1 RESULTADOS REFERENTES AOS BGN

No caso dos BGN, a gravidade da infecção se demonstra pela mortalidade completa no grupo controle (diferenças estatisticamente significativas para ambas as bactérias, com $p < 0,00001$ quando se comparam os subgrupos "controle de infecção" a qualquer dos demais subgrupos arrolados). O efeito dos corticosteróides se fez conforme inicialmente postulado: de fato, a mortalidade final nos subgrupos tratados com **antibiótico precedido pelo corticosteróide** foi significativamente menor do que nos subgrupos abordados unicamente com **antibiótico** (valor p desta diferença correspondendo a 0,0009 para o grupo *E. coli* e a 0,0073 para o grupo *K. pneumoniae*), achados estes coincidentes com resultados de estudos experimentais prévios (29). Porém, quando se inverteu a ordem de administração, ou seja, a primeira dose do antibiótico **sucedida** pelo corticosteróide, tais efeitos foram anulados e os resultados passaram a ser

estatisticamente equivalentes aos dos subgrupos em que apenas amicacina foi aplicada.

É interessante mencionar novamente que a mortalidade nas primeiras 24 horas dos estudos com BGN era maior no grupo não tratado do que no grupo em tratamento exclusivo com antibiótico ($p < 0,05$ no grupo *E. coli* e $p < 0,001$ no grupo *K. pneumoniae*). Embora uma análise superficial pudesse interpretar o achado como “paradoxal”, na verdade ele vem reforçar os postulados previamente discutidos: à luz dos conhecimentos expostos (19, 61, 62), esta mortalidade inicialmente maior no subgrupo tratado com antibióticos pode ser interpretada como secundária à liberação súbita de quantidades maciças de LPS, propiciada pela lise bacteriana induzida pelo antimicrobiano em uso. No subgrupo em que se lançou mão de metilprednisolona, esta droga teria previamente inibido os macrófagos dos camundongos, de forma que as reações subseqüentes tenham sido bloqueadas, determinando-se desta maneira taxas de mortalidade menor neste subgrupo ao longo de todo o estudo (quadros 2 e 3).

Para se analisar a possibilidade de que a infecção grave por BGN em camundongos pudesse determinar uma alta incidência de hemorragia aguda de supra-renais, as glândulas supra-renais de 7 camundongos infectados por BGN, e não tratados, foram submetidas à anatomia patológica após o óbito dos animais. O raciocínio que levou a isto foi a possibilidade de que estas infecções pudessem ocasionar, nesta espécie, hemorragia aguda daquelas glândulas em uma freqüência muito alta, a ponto de por si só justificar o benefício observado com o corticosteróide. Em outras palavras, caso esta possibilidade correspondesse

à verdade, a vantagem da metilprednisolona ter-se-ia imposto apenas pela substituição do hormônio endógeno, cuja ausência sabidamente provoca choque.

Desta forma, 14 supra-renais foram analisadas, mas nada se observou de significativo. Em que pese ter-se tratado de um estudo anatômico e não funcional das glândulas, permitimo-nos inferir pelo que foi observado, que a função supra-renal não foi afetada no presente modelo de infecção por BGN, e por conseguinte, qualquer efeito benéfico produzido pela metilprednisolona será supostamente atribuível às suas ações bloqueadoras da cascata séptica, e não meramente a uma substituição dos hormônios endógenos.

6.2.2 RESULTADOS REFERENTES A *S.aureus*

A análise do grupo *S. aureus* revelou resultados bastante diferentes. Como se verifica, por mais que as diferenças de mortalidade entre os subgrupos tratados com **antibiótico isoladamente** ou **precedido por corticosteróide** e o subgrupo controle de infecção tenham sido significativas ($p < 0,00001$ para estas comparações), a pequena vantagem observada na sobrevivência do subgrupo tratado com antibiótico precedido pelo corticosteróide (27 sobreviventes contra 23 no subgrupo manuseado apenas com antibiótico) não apresentou valor estatístico significativo ($p = 0,0603$).

Diferentemente do que se verificou com os BGN, o grupo *S. aureus* não reproduziu a diferença inicial de mortalidade (nas primeiras 24 horas) favorável ao grupo não tratado em comparação com aquele tratado apenas com antibióticos (figura 8). Ao contrário: a diferença foi bastante

significativa em favor deste último subgrupo ($p = 0,0023$). Porém, no subgrupo tratado com antibióticos **previamente ao corticosteróide**, a mortalidade em 24 horas foi maior que em todos os demais subgrupos infectados e tratados ($p < 0,001$) e estatisticamente não diferente do subgrupo controle de infecção ($p = 0,2388$); efeitos similares foram verificados ao final do estudo. Diante destes dados cabe supor que no caso desta bactéria, o corticosteróide aplicado após o antibiótico exerce apenas os seus efeitos deletérios, de maneira a acelerar a morte dos animais e a anular os efeitos do antimicrobiano, promovendo enfim um comportamento equivalente ao não tratamento da infecção.

Também se observa que a mortalidade no subgrupo controle de infecção durante as primeiras 24 horas foi muito maior no grupo *S. aureus* que nos subgrupos equivalentes das demais bactérias.

A combinação destes resultados induz a pensar que os mecanismos patogénicos desta bactéria são bastante diferentes daqueles das BGN estudadas, e que a resposta do hospedeiro deve seguir caminhos consideravelmente diversos, de forma a não ser afetada (ou sendo piorada) com o uso de corticosteróides. Resultados semelhantes, mas utilizando anticorpos contra o FNT - α e não corticosteróides, e em infecção por outro germe gram-positivo (*Streptococcus pyogenes*), foram referidos por Wayte (76). Não encontramos na literatura outros estudos abordando infecções experimentais por CGP com corticosteróides, talvez porque à época em que estas drogas estiveram mais em voga para este fim, a sepse por CGP era um problema clínico bem menos incidente(09). Mas cabe ressaltar que no estudo em *anima nobile* conduzido por SCHUMER, o benefício dos

corticosteróides foi mais saliente entre os pacientes infectados por BGN do que naqueles infectados por CGP.

Estas diferenças de resultados verificadas entre BGN e CGP (*S. aureus*) torna lógico imaginar que o raciocínio correntemente aceito, de que a evolução da sepse a nível biomolecular seja aproximadamente a mesma para ambos os tipos de bactérias, é bastante frágil e não deva resistir à análise pormenorizada, no tempo em que os nossos conhecimentos acerca da reação orgânica aos estafilococos estejam tão avançados quanto aqueles relativos às bactérias gram-negativas. Possivelmente há, no caso de *S. aureus*, uma ou mais vias paralelas à já identificada e sumariamente descrita via do FNT, que aparentemente não é responsiva aos bloqueios exercidos pelos corticosteróides.

6.3 POSSÍVEL APLICAÇÃO CLÍNICA

Embora não se constitua em objetivo de análise desta pesquisa, no que tange à extrapolação dos resultados aqui expostos para o modelo humano, cumpre referir que o maior empecilho atualmente existente é a quase impossibilidade de se iniciar as medicações inibidoras da resposta auto-agressora em tempo hábil, ou seja, precoce o suficiente (antes de a infecção ter-se desenvolvido demais e liberado LPS em demasia na circulação) e antes dos antimicrobianos (pelo mesmo motivo). Este é, especulativamente falando, o principal motivo de falha de drogas ativas em modelos animais, quando transpostas para o modelo humano. Isto despertou a preocupação relativa ao diagnóstico precoce da sepse em seres humanos e, mais do que isto, pesquisas visando identificar precocemente os pacientes em risco definitivamente especial de “sepse iminente”. Acreditamos que

quando este problema puder ser contornado, a Medicina já terá à sua disposição (ao menos no caso de germes gram-negativos) um arsenal bastante vasto e efetivo de drogas, dentre as quais os corticosteróides, que pelo seu baixo custo, serão possivelmente eleitos.

Queremos todavia lembrar que os serviços de pronto-atendimento podem ser atualmente uma fonte potencial de pacientes portadores de infecção aguda grave e potencialmente letal, e ainda não abordados por antibióticos no momento da admissão hospitalar. Tais pacientes constituem portanto um grupo em teoria beneficiável com o uso de corticosteróides, pois estas drogas poderiam ser aplicadas antes da instituição

da antibioticoterapia (especialmente se se reunissem dados suficientes para presumir infecção por BGN). Embora esta parcela de pacientes seja bastante pequena e consideravelmente diferente dos pacientes previamente internados e que contraem infecção nosocomial, parece-nos o modelo humano mais próximo da infecção grave experimental, e que poderia ser abordado em estudos posteriores.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que:

1) o uso de metilprednisolona precoce e previamente ao antibiótico é capaz de reduzir a mortalidade neste modelo de infecção grave experimental por *E.coli* ou *K.pneumoniae*;

2) a resposta do germe gram-positivo testado (*S.aureus*), face ao uso de metilprednisolona precoce e previamente ao antibiótico, não coincide com aquela observada com os bacilos gram-negativos utilizados, não promovendo redução significativa da mortalidade;

3) o uso de metilprednisolona após o antibiótico já ter sido iniciado não é superior ao uso do antibiótico isoladamente no caso dos bacilos gram-negativos utilizados, e aumenta a mortalidade no caso de *S.aureus*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, E.; RAFFIN, T. A.: Sepsis Therapy Trials : Continued Disappointment or Reason for Hope?. **The Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 1876-1878, 1994.
2. ARCHER, G.L.; POLK, R.E.: Treatment and Prophylaxis of Bacterial Infections. In: ISSELBACHER, BRAUNWALD, WILSON et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 13. ed. New York: McGraw-Hill, p.593-607, 1994.
3. ASTIZ, M. E.; RACKOW, E. C.; STILL, J. G. et al: Pretreatment of Normal Humans with Monophosphoryl Lipid A Induces Tolerance to Endotoxin: a Prospective, Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 9-17, 1995.
4. BALOWS, A.; HAUSLER JR., W.J.; HERRMANN, K., et al: **Manual of Clinical Microbiology**. 5.ed. American Society for Microbiology. U.S.A., 1995.
5. BARBER, A. E.; COYLE, S. M.; MARANO, M. A. et al: Glucocorticoid Therapy Alters Hormonal and Cytokine Responses to Endotoxin in Man. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 1999-2006, 1993.
6. BEUTLER, B. ; GRAU, G.: TNF in the Pathogenesis of Infectious Diseases. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 10, p. S423-S435, Oct. 1993.
7. BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I. W. et al: Control of Cachectin (Tumor Necrosis Factor) Synthesis: Mechanisms of Endotoxin Resistance. **Science**, v. 232, p. 977-980, 1986.

8. BEUTLER, B., MILSARK, I. W.; CERAMI, A. C.: Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effects of Endotoxin. **Science**, v. 229, p. 869-871, 1985.
9. BONE, R. C.: Gram-Positive Organisms and Sepsis. **Archives of Internal Medicine**, v. 154, p. 26-34, 1994.
10. BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B. et al: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992 / **Critical Care Medicine**, v. 20, p. 864-874, 1992.
11. BONE, R. C.; FISHER, C. J.; CLEMMER, T. P. et al: A Controlled Clinical Trial of High-Dose Methylprednisolone in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 653-658, 1987.
12. BOUMPAS, D. T.; PALIOGIANI, F.; ANASTASSIOU, E. D. et al: Glucocorticosteroid Action on the Immune System: Molecular and Cellular Aspects. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 9, p. 413-423, 1991.
13. CANNON, J. G.; TOMPKINS, R. G.; GELFAND, J. A., et al: Circulating Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor in Septic Shock and Experimental Endotoxin Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 79-84, 1990.
14. CHARBONNEAU, P.; SUISSE, A.: Le Syndrome de Défaillance Multiviscérale. **La Revue du Practicien**, v. 40, p.2329-2336, 1990.

15. CHRISTMAN, J. W.; HOLDEN, E. P.; BLACKWELL, T. S.: Strategies for Blocking the Systemic Effects of Cytokines in the Sepsis Syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 955-963, 1995.
16. DHAINAUT, J-F. A.; VINCENT, J-L.; RICHARD, C. et al: CDP 571, a Humanized Antibody to Human Tumor Necrosis Factor- α : Safety, Pharmacokinetics, Immune Response, and Influence of the Antibody on Cytokine Concentrations in Patients with Septic Shock. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 1461-1469, 1995.
17. DINARELLO, C.: Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-1652, 1991.
18. DINARELLO, C. A.: Traditional and Novel Approaches to Interleukin-1 Antagonism. In Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 437-448, 1995.
19. DOFFERHOFF, A. S. M; BUYS, J.: Effects of Antibiotics on Endotoxin Release. In Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 465-472, 1995.
20. EIDELMAN, L. A.; PIZOV, R.; SPRUNG., C. L.: New Therapeutic Approaches in Sepsis: a Critical Review. **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. S269-S272, 1995.
21. FINK, M. P.; O'SULLIVAN. P.; MENCONI, M. J. et al: Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Systemic Pulmonary Responses to Endotoxin in Pigs. **The Journal of Trauma**, v. 34, p. 571-578, 1993.

22. FISHER, C. J.; DHAINAUT, J-F. A; OPAL, S. M. et al: Recombinant Interleukin 1 receptor Antagonist in the Treatment of Patients with Sepsis Syndrome. **The Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 1836-1843, 1994.
23. FISHER, C. J.; OPAL, S. M.; DHAINAUT, J-F. et al: Influence of an Anti-Tumor Necrosis Factor Antibody on Cytokine Levels in Patients with Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 21, p. 318-327, 1993.
24. FOURRIER, F.; JOURDAIN, M.; TOURNOIS, A.: Coagulation Inhibitor Substitution During Sepsis: **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. S264-S268, 1995.
25. GIROIR, B. P.: Mediators of Septic Shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 5, p. 780 - 789, 1993.
26. GIROIR, B. P.; BEUTLER, B.: Effect of Amrinone in Tumor Necrosis Factor Production in Endotoxic Shock. **Circulatory Shock**, v. 36, p. 200-207, 1992.
27. GOTLOIB, L.; SHOSTAK, A.; LEV, A. et al: Treatment of Surgical and Non-Surgical Septic Multiorgan Failure with Bicarbonate Hemodialysis and Sequential Hemofiltration. **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. 104-111, 1995.

28. GRANOWITZ, E. V.; SANTOS, A. A.; POUTSIKA, D. D. et al: Production of Interleukin-1 Receptor Antagonist During Experimental Endotoxaemia. **The Lancet**, v. 338, p. 1423-1424, 1991.
29. GREISMAN, S. E.: Experimental Gram-Negative Bacterial Sepsis: Optimal Methylprednisolone Requirements for Prevention of Mortality not Preventable by Antibiotics Alone. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 170, p. 436 - 442, 1982.
30. HAN, J.; THOMPSON, P.; BEUTLER, B.: Dexamethasone and Pentoxifylline Inhibit Endotoxin-induced Cachectin/Tumor Necrosis Factor Synthesis at Separate Points in the Signaling Pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 391-194, 1990.
31. HAVELL, E.: Evidence that Tumor Necrosis Factor Has an Important Role in Antibacterial Resistance. **The Journal of Immunology**, v. 143, p. 2894-2899, 1989.
32. HINSHAW, L. B.; TEKAMP-OLSON, P.; CHANG, A. C. et al: Survival of Primates in LD100 Septic Shock Following Therapy with Antibody to Tumor Necrosis Factor (TNF alpha). **Circulatory Shock**, v. 30. p. 279-292, 1990.
33. HINSHAW, L.; PEDUZZI, P.; YOUNG, E. et al: Effect of High-Dose Glucocorticoid Therapy on Mortality in Patients with Clinical Signs of Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 659-665, 1987.

34. HOFFMANN, S.L.; PUNJABI, N.H.; KUMALA, S. et al: Reduction of Mortality in Chloramphenicol-Treated Severe Typhoid Fever By High-Dose Dexametasone. **The New England Journal of Medicine**, v.310, p.82-88, 1984.
35. HOPKIN, B.D.A: Frapper Fort ou Doucement: a Gram-Negative Dilemma. **The Lancet**, v. 2, p. 1193-1194, 1978.
36. JANSEN, N. J. G.; VAN OEVEREN W., HOITING, B. H., WILDEVUUR, CH. R. H.: Methylprednisolone Prophylaxis Protects Against Endotoxin - Induced Death in Rabbits. **Inflammation**, v. 15, n. 2, p 91 - 101, 1991.
37. KANEMANN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWEL JR., V.R., et al: Diagnóstico Microbiológico. 2. ed. São Paulo: Editorial Panamericana, 1993.
38. LAMY, M.; DEBY-DUPONT, G.: Is Sepsis a Mediator-Inhibitor Mismatch? **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. S250-257, 1995.
39. LEFERING, R.; NEUGEBAUER, E. A. M.: Steroid Controversy in Sepsis and Septic Shock: a Meta-Analysis. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 1294-1303, 1995.
40. LEPINE, G.: Bacterial Structure. In: MURRAY, P.R.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A., et al . **Medical Microbiology**. 2. ed. St. Louis: Mosby, p.1-16, 1994.
41. LOCKSLEY, R.M.; WILSON, C.B: Cell-Mediated Immunity and its Role in Host Defense. In: MANDELL, G.L., BENNET, J.E.; DOLIN, R.. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, p. 102-149, 1995.

42. LOGGIE, J. M. H., PRIVITERA, P. J., SUGARMAN, S.: Effects of Hydrocortisone on Survival in Neonatal Beagles given Endotoxin. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 128, p. 326-329, 1968.
43. MARCHAL, N.; BOURDON, J.L.; RICHARD, C. L.: **Les Milieux de Culture Pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries**. Paris: Soin Éditeurs, 1987.
44. McCLOSKEY, R. V.; STRAUBE, R. C.; SANDERS, C. et al: Treatment of Septic Shock with Human Monoclonal Antibody HA-1A. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, p. 57-60, 1994.
45. NETEA, M. G.; BLOK, W. M.; KULLBERG, B-J. et al: Pharmacologic Inhibitors of Tumor Necrosis Factor Production Exert Different Effects in Lethal Endotoxemia and in Infection with Live Microorganisms in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 393-399. 1995.
46. NEUGEBAUER, E.; DIETRICH, A.; BOUILLON, B., et al: Glucokortikoide beim Polytrauma und bei Sepsis- Immer noch ein Thema?. **Klinische Wochenschrift**, v.69 (Suppl.XXVI), p.211-223, 1991.
47. OKAJIMA, K; UCHIBA, M.; MURAKAMI K.: Antithrombin Replacement in DIC and MOF. In: Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 457-464, 1995.
48. OKUSAWA, S.; GELFAND, A. J.; IKEJIMA, T. et al: Interleukin-1 Induces a Shock-Like State in Rabbits. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 81, p. 1162-1172, 1988.

- 49.OPAL, S. M.: Clinical Trials of Novel Therapeutic Agents: Why did They Fail? In: Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 425-436, 1995.
- 50.PAJKRT, D.; VAN DEVENTER, S. J. H.: G-CSF and the Inflammatory Response in Sepsis. In: Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 449-456, 1995.
- 51.PESSOA, G.V.; SILVA, M: Proposição de um Meio Simplificado para Identificação de Enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.24, p.29-35, 1975.
- 52.PITCAIRN, M.; SCHULER, J.; ERVE, P. R.; SCHUMER, W. et al: Glucocorticoid and Antibiotic Effect on Experimental Gram-Negative Bacteremic Shock. **Archives of Surgery**, v. 110, p. 1012- 1015, 1975.
- 53.RADERMACHER, P.; BUHL, R.; SANTAK, B. et al: The Effects of Prostacyclin on Gastric Intramucosal pH in Patients with Septic Shock. **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. 414-421, 1995.
- 54.REX N. BROGDEN; DAVID H. PETERS:Teicoplanin: A Reappraisal of its Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy. **Drugs**, v.47, p.823-854, 1994.
- 55.ROCK, S. C.; COYLE, S. M.; KEOGH, C. V. et al: Influence of Hypercortisolemia on the Acute-phase Protein Response to Endotoxin in Humans. **Surgery**, v112, p. 467-474, 1992.
- 56.ROMERO, S.; FUENZALIDA, S.: **Manual de Manejo Y Experimentación Animal**. Instituto de Salud Publica de Chile.Santiago, Chile, 1991.

57. SALYERS A. A.; WHITT, D. D.: Virulence Factors that Damage the Host. In: _____. **Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach**, Washington DC: ASM Press, 1994, p. 47-61.
58. SCHADE, U. F.: Pentoxifylline Increases Survival in Murine Endotoxin Shock and Decreases Formation of Tumor Necrosis Factor. **Circulatory Shock**, v. 31, p. 171-181, 1990.
59. SCHUMANN, R. R.; LEONG, S. R.; FLAGGS G. W. et al: Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein. **Science**, v. 249, p. 1429-1431, 1990.
60. SCHUMER, W: Steroids in the Treatment of Clinical Septic Shock. **Annals of Surgery**, v. 184, p. 333-341, 1976.
61. SHENEP JL, FLYNN PM, BARRETT FF et al: Serial Quantitation of Endotoxemia and Bacteremia During Therapy for Gram-Negative Bacterial Sepsis. **Journal of Infectious Diseases**, 157: 565- 568, 1988.
62. SHENEP JL, MORGAN KA: Kinetics of Endotoxin Release During Antibiotic Therapy for Experimental Gram-Negative Bacterial Sepsis . **Journal of Infectious Diseases**, 150: 380 - 388, 1984.
63. SJÖLIN, J.: High - Dose Corticosteroid Therapy in Human Septic Shock: Has the Jury Reached a Correct Verdict? **Circulatory Shock**, v. 35, n. 3, p. 139 - 151, . 1991.
64. SPRUNG, C. L.; CARALIS, V. P.; MARCIAL, E. H. et al: The Effects of High-Dose Corticosteroids in Patients with Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, p. 1137-1143, 1984.
65. ST. JOHN, R. C.; DORINSKY, P. M.: Immunologic Therapy for ARDS, Septic Shock and Multiple Organ Failure. **Chest**, v. 103, p. 932-943, 1993.

66. STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; BONE, R. C.: Role of Tumor Necrosis Factor - α in Disease States and Inflammation. **Critical Care Medicine**, v. 21, p.S447-S463, 1993.
67. SULLIVAN, T. W.; CARPER, H. T.; NIVICK, W. J. et al: Inhibition of Inflammatory Action of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor(Alpha) on Neutrophyl Function by Pentoxifylline. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 1722-1729, 1988.
68. TERZI, R.G.G.: Choque Séptico. In: TERZI e ARAÚJO: **Monitorização Hemodinâmica e Suporte Cardio-Circulatório do Paciente Crítico**. São Paulo: Atheneu, p. 197-205, 1996.
69. THIJS, L. J.; HACK, C. E.: Time Course of Cytokine Levels in Sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. S258-S263, 1995.
70. TRACEY, K. J.; CERAMI, A. : Tumor Necrosis Factor: an Updated Review of its Biology. **Critical Care Medicine**, v. 21, p. S423-S435, 1993.
71. TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F. et al: Shock and Tissue Injury Induced by Recombinant Human Cachectin. **Science**, v. 234, p. 470-474, 1986.
72. USHIBA, M.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K. et al: Antithrombin III Attenuates Endotoxin-Induced Rat Pulmonary Vascular Injury Through Promotion of Prostacyclin Release from Endothelial Cells. **British Journal of Haematology**, v. 87(suppl. 1), p. 56, 1994.

73. VAN DER MEER, J. W. M.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B. J.: The Interplay of Pro-Inflammatory Cytokines and Anti-Inflammatory Mediators During Severe Infection. In Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 377-384, 1995.
74. VAN DER POLL, T.; LOWRY, S. F: Endogenous Mechanisms Regulating TNF and IL-1 During Sepsis. In Vincent, J-L., **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Brussels: Springer, p. 385-395, 1995.
75. WALDVOGEL, F. A.: *Staphylococcus Aureus* (Including Toxic Shock Syndrome). In: MANDELL, G.L., BENNET, J.E.; DOLIN, R.. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, p. 1754-1777, 1995.
76. WAYTE, J.; SILVA, A. T; KRAUSZ, T. et al: Observations on the Role of Tumor Necrosis Factor- α in a Murine Model of Shock Due to *Streptococcus pyogenes*. **Critical Care Medicine**, v. 21, p1207-1212, 1993.
77. WENZEL, R. P.: Anti-Endotoxin Monoclonal Antibodies: a Second Look. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, 1151-1153, 1992.
78. WILLIAMS, G. H.; DLUHY, R. G.: Diseases of the Adrenal Cortex. In: ISSELBACHER, BRAUNWALD, WILSON et al: **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 13. ed. New York: McGraw-Hill, 1994, p. 1953-1975.
79. WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S. et al: CD 14, a Receptor for Complexes of Lipopolyssacaride (LPS) and LPS Binding Protein. **Science**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

-
80. YOUNG, L.S.: Antimicrobial Therapy. In: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH JR., L.H.; BENNET, J.C.: **Cecil Textbook of Medicine**. 9. ed. New York: W.B. Saunders, p.1596-1608, 1992.
81. ZABEL P.; WOLTER, D. T.; SCHÖNHARTING M. M.: Oxpentifylline in Endotoxaemia. **The Lancet**, v. 2, p. 1474-1477, 1989.
82. ZIMMERMANN, J. J.: Current Perspectives on Molecular Pathophysiology and Treatment of Sepsis. In: **Tópicos de Terapia Intensiva** (II Congresso Paulista de Terapia Intensiva), p. 55-60, 1992.