

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E DA *L*-ARGININA NO
TRATAMENTO DA SEPSE EXPERIMENTAL

Pós-Graduando: Denise Pires Machado

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre/RS

Julho - 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Joaquim (*in memoriam*) e Marta.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, pelo exemplo, pela amizade, pelo incentivo, por me acompanhar e compreender durante toda a minha vida, e por me dar forças para levantar a cabeça e continuar nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pela oportunidade, amizade, paciência, ensinamentos, por ter compreendido minhas dificuldades e principalmente por ter acreditado que eu era capaz.

Aos meus estagiários Rossana e Vasyl pela dedicação e pela parceria em todas as horas do dia e da noite.

A Prof. Dra. Fernanda Bordignon Nunes por toda ajuda e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Luis pela realização da análise estatística dos resultados.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho Adroaldo, Carlos, e José (Bento).

As minhas amigas Aline e Melissa por todo o incentivo e pelo apoio dado ao longo deste ano, principalmente no dia em que a vontade era desistir de tudo.

Ao Dr. Fernando de Queiroz Cunha e ao colega José Carlos Alves Filho do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, pelo auxílio na realização das dosagens dos marcadores inflamatórios.

Ao Dr. Alan Azambuja pelos antibióticos fornecidos para realização dos experimentos.

Ao Dr. Fernando Dias pelas idéias dadas neste trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e a bióloga Bartira Ercília Pinheiro da Costa pelo fornecimento da *L*-arginina utilizada nos experimentos.

A Dra. Susana Barcelos por todo apoio e todas as oportunidades que sempre me proporcionou durante e após a graduação, principalmente por ter tornado real meu grande sonho de trabalhar na Unidade de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sem ter que interromper o mestrado.

Ao Dr. Afonso Luis Barth pelos ensinamentos em microbiologia, pelo incentivo a realização do mestrado, e pelas oportunidades que tem me proporcionado na Unidade de Microbiologia do HCPA.

Aos colegas da Unidade de Microbiologia do HCPA, em especial a amiga Larissa Lutz pelas trocas de horário para que fosse possível a realização dos experimentos.

A farmacêutica Thalita Jacoby pelo apoio.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1. RESUMO.....	1
2. APRESENTAÇÃO DO TEMA.....	3
2.1. Fisiopatologia da sepse.....	3
2.2. Resposta inflamatória na sepse.....	5
2.2.1. Toxinas bacterianas.....	14
2.3. Efeito do uso de antibióticos sobre o quadro séptico.....	16
2.3.1. Mecanismos de ação dos antibióticos.....	19
2.3.1.1. Antibióticos β -lactâmicos.....	25
2.3.1.1.a. Cefalosporinas	26
2.3.1.1.b. Monobactams	29
2.3.1.1.c. Penicilinas.....	30
2.3.1.1.d. Cefamicinas.....	31
2.3.1.1.e. Oxacefemas.....	32
2.3.1.1.f. Carbapenens.....	33
2.3.1.1.g. Inibidores de β -lactamases.....	34
2.4. Referências Bibliográficas.....	35

3. OBJETIVOS.....	42
4. ARTIGO – Effects of β -lactams antibiotics and <i>L</i> -arginine in the treatment of experimental sepsis.....	43
5. DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP/SCCM - *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*

ATP - Adenosina trifosfato

DMO - Disfunção de múltiplos órgãos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

IL - Interleucinas

INF γ - Interferon gama

LPS - Lipopolissacarídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NK - *Natural killers*

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

cNOS - Óxido nítrico sintase constitutiva

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

O₂ - Oxigênio

PAF - Fator ativador plaquetário

PBP - Proteína ligadora de penicilina

RANTES - *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*

RNA - Ácido ribonucleico

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

TRABALHO DE REVISÃO

Figura 1. Síntese do óxido nítrico a partir da <i>L</i> -arginina (FLORA FILHO <i>et al.</i> , 2000).....	13
Figura 2. Liberação de TNF α por monócitos quando incubados com LPS e LPS e diferentes antibióticos. Moxifloxacin e imipenem liberaram uma menor quantidade de TNF α em comparação com a ceftazidima (KRAGSBJERG <i>et al.</i> , 1996).....	18
Figura 3. Configuração da parede celular bacteriana (TAVARES, 2001).....	23
Figura 4. Anel β -lactâmico (TAVARES, 2001).....	26
Figura 5. Núcleo das cefalosporinas (7-ACA) (TAVARES, 2001).	27
Figura 6. Núcleo central dos monobactams (TAVARES, 2001).	30
Figura 7. Núcleo central das penicilinas (6-APA) (TAVARES, 2001).	31
Figura 8. Núcleo das cefamicinas (TAVARES, 2001).	32
Figura 9. Núcleo central das Oxacefemas (TAVARES, 2001).	32
Figura 10. Núcleo central dos carbapenens (TAVARES, 2001).	33

ARTIGO - Effects of β -lactams antibiotics and L-arginine in the treatment of experimental sepsis.

Figure 1. Survival curve of the experimental groups (n=7). Log-rank P<0.05.	63
Figure 2. Number of bacteria in peritoneal cavities in experimental groups (n=7). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (Kruskal Wallis-Man-Withney test).....	64

Figure 3. Nitrite and nitrate of serum in experimental groups (n=6). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).....	65
Figure 4. TNF α of serum in experimental groups (n=6). Values are mean \pm SD (ANOVA- Dunnett test).	66
Figure 5. IL-1 β of serum in experimental groups (n=4). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).	67
Figure 6. IL-10 of serum in experimental groups (n=5). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).	68
Figure 7. Glucose of serum in experimental groups (n=7). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).	69

1. RESUMO

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica frente a uma infecção e é considerada a principal causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva.

O uso de antibióticos é um dos procedimentos mais utilizados pelos hospitais para o tratamento da sepse. Foi observado que antibióticos podem induzir uma maior liberação de constituintes da parede celular bacteriana e com isso agravar a resposta inflamatória, agravando o quadro séptico. Um agente liberado durante a sepse é o óxido nítrico, a partir do aminoácido *L*-arginina, que pode causar vasodilatação e hipotensão, podendo levar a uma lesão tecidual e disfunção de múltiplos órgãos. Alguns estudos recentes descrevem a diminuição de *L*-arginina durante a sepse devido ao seu intenso uso na síntese de óxido nítrico, na síntese de proteínas de fase aguda e para aumentar a proliferação celular. Como consequência ocorre uma modificação no metabolismo da arginina, levando a uma diminuição da concentração plasmática deste aminoácido, sendo então, a arginina um aminoácido essencial na inflamação severa. Isto sugere então que a suplementação de arginina na sepse seria um tratamento eficaz.

Portanto, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito da administração de diferentes antibióticos β -lactâmicos (aztreonam e ceftriaxona) e da *L*-arginina no tratamento da sepse experimental, através da análise da sobrevida e de mediadores inflamatórios.

Observou-se que todos os animais do grupo controle séptico e do grupo tratado com *L*-arginina morreram, enquanto que os animais dos grupos que receberam o tratamento com os antibióticos a sobrevida foi significativamente maior. Nos animais tratados com os antibióticos a contagem de bactérias no líquido peritoneal foi significativamente menor em comparação

com o grupo controle séptico. Não foram verificadas diferenças nos níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$, já os níveis séricos de nitrito e nitrato e de $\text{IL1}\beta$ apresentaram-se significativamente aumentados no grupo tratado com ceftriaxona+*L*-arginina em relação ao grupo controle séptico. Os níveis séricos de IL10 mostraram-se significativamente elevados nos grupos tratados com ceftriaxona+*L*-arginina e aztreonam comparados com o grupo controle séptico. Os animais com sepse experimental tratados somente com *L*-arginina apresentaram um aumento nas concentrações séricas de glicose em comparação com os animais do grupo controle séptico.

Com esses resultados conclui-se que o tratamento com os antibióticos β -lactâmicos, aztreonam e ceftriaxona, pode aumentar a sobrevida dos animais com sepse experimental independentemente da presença de *L*-arginina.

2. APRESENTAÇÃO DO TEMA

2.1. Fisiopatologia da sepse

Sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica frente a uma infecção, secundária à invasão da corrente sanguínea por um grande número de microorganismos tais como bactérias, fungos, parasitas e vírus ou suas toxinas (MALOT et al., 2001; HOTCHKISS & KARL, 2003).

Em 1991, o *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) realizou uma reunião de consenso para estabelecer critérios e definições para síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), infecção, bacteremia, sepse, sepse severa, choque e disfunção de múltiplos órgãos (DMO). A reunião teve por objetivo padronizar estes conceitos para facilitar a detecção da doença o mais breve possível, possibilitando a intervenção terapêutica precoce (BONE et al., 1989; BONE et al., 1991; BONE et al., 1997).

- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): resposta sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves (trauma, infecção, queimadura). A resposta é manifestada por dois ou mais dos seguintes critérios: temperatura ($> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$), frequência cardíaca (>90 bpm), frequência respiratória (>20 mov/min ou hiperventilação verificada pela $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg) e leucócitos (>12.000 cel/ mm^3 ou $>10\%$ formas jovens; bastões).
- Infecção: resposta inflamatória à presença de microorganismos (bactérias, vírus, fungos e parasitas) ou à invasão de um tecido estéril do hospedeiro por esses agentes.
- Bacteremia: presença de bactéria viável no sangue.
- Sepse: quando a SIRS é decorrente de uma infecção.

- Sepses severa: sepsis associada com disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão (pressão arterial sistólica abaixo de 90 mmHg). Caracteriza-se por acidose láctica, oligúria, acidose metabólica, hipóxia e diminuição do nível de consciência.
- Choque: sepsis associada à hipotensão que persiste apesar da reposição volêmica adequada acompanhada de hipoperfusão ou disfunção orgânica. Faz-se necessário o uso de agentes vasopressores.
- Disfunção de Múltiplos Órgãos (DMO): presença de alterações de função orgânica em pacientes com patologia aguda crítica de forma tão grave que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção terapêutica. Pode variar desde uma disfunção leve até falência total do órgão (HEARD et al, 1991).

Os fatores fisiopatológicos da sepsis incluem o local da infecção, sendo os sistemas de coagulação, fibrinolítico e inflamatório os determinantes da evolução (BONE *et al.*, 1997).

Os principais sintomas desta síndrome são febre, pulso arritmico e a pressão arterial baixa em virtude da queda na resistência periférica, aumento da capacidade vascular e conseqüentes variações no débito cardíaco que, mesmo quando normal ou alto, mostra-se insuficiente. A hipotensão é decorrente da vasodilatação periférica e aumento da permeabilidade vascular como conseqüência de substâncias farmacologicamente ativas (histamina e serotonina) que se formam no local do processo inflamatório. Como resultado, há queda da pressão arterial e da velocidade da circulação sanguínea, havendo má oxigenação da área inflamada e de outros tecidos (PARRILO, 1993).

Além destes sintomas, podem ocorrer diarreia, resfriamento das extremidades, pressão venosa central baixa, insuficiência pulmonar progressiva, acidose metabólica, retenção nitrogenada, hemorragia digestiva e sangramentos anormais (ASTIZ & RACKOW, 1998).

Alterações renais e hepáticas, devido à diminuição do aporte de oxigênio nos tecidos, podem ocasionar alterações ou morte celular nestes órgãos. No rim, podem-se desenvolver lesões em todos os níveis dos túbulos, sendo característica a necrose tubular aguda. Já no fígado, devido à sua diversidade de funções, como síntese, metabolismo e excreção, e também à sua capacidade de regeneração, a doença pode afetar em diversos graus (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

No coração, distinguem-se dois grupos de lesões: as necroses e hemorragias subendocárdicas e subepicárdicas e as zonais ou em faixa do miocárdio. A necrose vai desde lesões isquêmicas de fibras miocárdicas isoladas a áreas de micro e macroinfarto (PARRILLO, 1993).

Nos pulmões, o quadro se apresenta por acentuado edema intra-septal, seguido de coleção de líquido de edema e exsudato protéico nos espaços alveolares, além da presença ocasional de membranas hialinas (DAVIES *et al.*, 1997).

Também pode ocorrer encefalopatia hipóxica, dependendo das lesões cerebrais, e hemorragia na mucosa do tubo digestivo (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

A hipoperfusão acarreta acidose metabólica pela redução da oferta de oxigênio e nutrientes para as células com depleção de adenosina trifosfato (ATP) e formação de mecanismo anaeróbico, que utiliza a glicólise anaeróbica como fonte de energia, havendo um aumento na formação de ácido láctico que induz à queda do pH (ASTIZ & RACKOW, 1998).

2.2. Resposta inflamatória na sepse

Quando o organismo sofre alguma agressão, como na sepse, ocorre a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro que tendem a minimizar ou mesmo neutralizar os efeitos

da agressão causada pelos microorganismos. Os mediadores da resposta inflamatória incluem citocinas, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, plaquetas e outras células; sistema em cascata de proteínas plasmáticas, como o complemento, coagulação, fibrinolítico e moléculas de adesão; enzimas proteolíticas; mediadores lipídicos, como eicosanóides e o fator ativador plaquetário; e os radicais do oxigênio e do nitrogênio. Durante este processo, outros agentes são liberados que bloqueiam a resposta inflamatória, como as citocinas antiinflamatórias, receptores solúveis das citocinas, inibidores da proteinase e hormônios de estresse (ASTIZ & RACKOW, 1998; BONE *et al.*, 1997; WHEELER & BERNARD, 1999; MALOT *et al.*, 2001).

Os polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, são as células dominantes nas primeiras 24 a 48 horas após a invasão por microorganismos patogênicos. A seguir, começam a migrar os monócitos do sangue que, ativados nos tecidos, recebem o nome de macrófagos; seguem-se os eosinófilos e as células imunologicamente ativas como os linfócitos. As hemácias migram em menor número, porém, quando a agressão é muito grave, levando ao comprometimento dos vasos, podem ser as células dominantes (DAVIES *et al.*, 1997).

Ocorre leucocitose neutrofílica com a presença de células jovens (desvio à esquerda) e também granulações tóxicas finas ou grosseiras, corpúsculos de Döhle e vacuolização citoplasmática, indicando atividade celular intensa, que tendem a ser mais sensíveis e específicas para o diagnóstico do processo infeccioso (FAILACE, 1995).

Após a inoculação de endotoxina, certas citocinas aparecem rapidamente na circulação sangüínea. A seqüência clássica é a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) seguido das interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 8 (IL-8) e 12 (IL-12), que são chamadas

citocinas pró-inflamatórias (WHEELER & BERNARD, 1999; KARZAI *et al.*, 2003; PETER *et al.*, 2003).

O dano tissular, ou no local de infecção, ativa o complemento e induz os macrófagos tissulares, os monócitos e os mastócitos a produzirem uma série de mediadores. Em aproximadamente 1 hora, o TNF α e a IL-1 são secretadas em grande quantidade na circulação. Ambos possuem efeitos locais e à distância. As células do estroma do sítio da lesão liberam outras classes de mediadores, como a IL-6 e a IL-8, que também apresentam efeitos sistêmicos (WHEELER & BERNARD, 1999; HOTCKISS & KARL, 2003; PETER *et al.*, 2003).

O TNF α e a IL-1 apresentam efeitos sobrepostos e atuam sinergicamente. A ligação deles com seus receptores induz à ativação e à liberação de transdutores de membrana, como as proteínas G, a adenilciclase, as fosfolipases A₂ e C e radicais livres de oxigênio. Elevam a transcrição de um número de genes, incluindo as moléculas de adesão (ex: seletinas), os do fator tissular de coagulação e fibrinólise protéica, óxido nítrico sintase induzível e cicloxigenase (DAVIES *et al.*, 1997; ASTIZ & RACKOW, 1998; WHEELER & BERNARD, 1999).

A interação do TNF α e IL-1 com o endotélio é um dos principais fatores da resposta inflamatória, induzindo os seguintes efeitos: expressão de fatores tissulares e inibidores da trombopoetina, expressão de moléculas de adesão, produção de fatores de crescimento hematopoiéticos, IL-1, IL-6, IL-8, fator de crescimento derivado de plaquetas, a proteína-1 quimiotática dos monócitos e RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted* - quimoquina secretada para regulação da expressão da ativação dos T normais), fator ativador de plaquetas (PAF) e prostaglandinas, liberação dos fatores ativadores de

plasminogênio, e geração de óxido nítrico (NO) (CARVALHO *et al.*, 1999; PETER *et al.*, 2003).

A interação com os macrófagos aumenta a capacidade citotóxica, a produção dos radicais livres de oxigênio e a liberação de outras citocinas. O TNF α e a IL-1 também apresentam efeitos sobre outros mediadores da resposta inflamatória, ativando o processo da coagulação e da fibrinólise, o sistema complemento e a interação leucócito-endotélio. Apresentam efeitos cardíacos, interferindo na homeostase do cálcio durante a contração (DAVIES *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 1999).

O TNF α e a IL-1 juntamente com a IL-6, executam um papel crítico na indução da resposta de fase aguda no fígado como a proteína C reativa, fibrinogênio e as principais antiproteases. além de estimularem a glândula pituitária a liberar os hormônios do estresse como o cortisol. A IL-1 e a IL-6 também estão relacionadas com a indução da febre (MALOT *et al.*, 2001; PETER *et al.*, 2003).

A IL-8 é importante na migração de neutrófilos aos locais da infecção e a IL-12 é uma citocina significativa na ativação dos células *natural killers* (NK) e no desvio de uma resposta de células CD4, face à diferenciação de células T inflamatórias (HOTCKISS & KARL, 2003; PETER *et al.*, 2003).

Também, na fase aguda, há a liberação de interferon gama (INF γ), principalmente pelas células T e células NK, que é capaz de ativar macrófagos, aumentando a transcrição de TNF α e IL-1, interagir com as células endoteliais, potencializando a capacidade de síntese de nitrogênio reativo, afetando o tônus vascular, com aumento da permeabilidade induzida pelo TNF α , e atuar sinergicamente com o TNF α na liberação de citocinas (GUZIK *et al.*, 2003).

Para assegurar que os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios não se tornem destrutivos, o organismo libera mediadores antiinflamatórios, como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10), que normalmente promovem um processo de *downregulation* sobre a resposta pró-inflamatória inicial. A IL-4 e a IL-10 podem bloquear a produção do TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 (PARRILO *et al.*, 1990; WHEELER & BERNARD, 1999; PETER *et al.*, 2003).

Na sepse, esse controle da resposta inicial à infecção é perdido, ocorrendo então uma reação sistêmica exacerbada e extremamente danosa. O excesso dos mediadores inflamatórios, TNF α e IL-1, provoca uma resposta fisiológica inadequada e interfere na função normal tecidual, levando à morte celular pela apoptose ou até mesmo necrose, dependendo do estado metabólico, ocasionando DMO (PARRILO *et al.*, 1990; PINSKY *et al.*, 1993; BONE *et al.*, 1997; ARIAS, 2003; HOTCKISS & KARL, 2003; HOESEL & WARD, 2004).

Estudos recentes têm sugerido que o uso de insulina para controlar a glicemia durante a sepse, pode restabelecer o controle sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios melhorando assim a sobrevida dos pacientes com esta síndrome, já que a glicose encontra-se aumentada nos primeiros estágios da sepse e da endotoxemia (van der BERGHE *et al.*, 2001; van der BERGHE *et al.*, 2003; ANDERSEN *et al.*, 2004; MARIK & RAGHAVAN, 2004).

Também há a liberação do PAF, que é uma molécula fosfolipídica de membrana produzida por inúmeras células e tecidos, incluindo plaquetas, polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos, mononucleares, hepatócitos, células pulmonares e da musculatura lisa. Quando liberado, no processo inflamatório, o PAF apresenta efeitos sobre o sistema cardiopulmonar, ativa uma variedade de mediadores, como as aminas (histamina, serotonina e catecolaminas), metabólitos do ácido araquidônico (tromboxano A₂ e leucotrienos) e outros

produtos humorais e celulares de células ativadas (radicais de oxigênio e enzimas lisossomais). Também atua promovendo a agregação plaquetária e dos polimorfonucleares, vasodilatação sistêmica e aumento da permeabilidade endotelial (CARVALHO *et al.*, 1999).

No processo inflamatório, também são produzidos outros mediadores, como, por exemplo, o fator estimulador de macrófagos e granulócitos, que, são produzidos por macrófagos e células endoteliais, em resposta as endotoxinas, TNF α ou IL-1. Eles têm a função de estimulação e degranulação dos neutrófilos, produção de citocinas e estão envolvidos no agravamento da lesão pulmonar bem como na leucocitose. Destacam-se, também, a fosfolipase A₂, eicosanóides e cininas. A fosfolipase A₂ é um grupo de enzimas que, quando ligado à membrana, catalisa a hidrólise dos fosfolipídeos, resultando na liberação de ácido araquidônico, o substrato para a síntese dos leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas. Também é a principal enzima envolvida na regulação da produção do PAF. Os eicosanóides, como são denominados os metabólitos do ácido araquidônico, incluem: o tromboxano, o qual é sintetizado pelas plaquetas e tem ação vasoconstritora, agregante plaquetário e estimulador dos polimorfonucleares; as prostaglandinas, que são produzidas por células endoteliais, e atuam na vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, inibição de polimorfonucleares, ativação de macrófagos, inibem a síntese do tromboxano e reduzem a pressão arterial; e os leucotrienos, que estão relacionados com adesão e migração de leucócitos, polimorfonucleares e macrófagos e estimulação da hidrolase lisossomal. As cininas são produzidas pela ação de enzimas proteolíticas específicas em proteínas precursoras. São a bradicinina e a calidina, que estão relacionadas com a ativação da cascata da coagulação e do complemento. Elas possuem efeitos pró-inflamatório, como vasodilatação e aumento da permeabilidade celular (CARVALHO *et al.*, 1999; DIAS, 2002; GUZIK *et al.*, 2004).

É importante salientar que, no processo inflamatório, primeiro se observa uma vasoconstrição arterial local, logo seguida por dilatação ativa e intensa das arteríolas e veias circundantes. Ocorre o aumento da permeabilidade capilar como consequência da ação de substâncias farmacologicamente ativas que se formam no local. O endotélio se contrai separando as junções intercelulares e permitindo a passagem sucessiva de líquido, macromoléculas e células do sangue para o interstício. Como consequência do aumento da permeabilidade vascular, ocorre aumento da concentração de elementos figurados do sangue (hemoconcentração), aumentando a viscosidade sangüínea. Estes eventos provocam a queda da velocidade de circulação e a área inflamada passa a ser mal oxigenada. A vasodilatação e o aumento de permeabilidade vascular são controlados pela histamina e pela serotonina. A histamina se encontra em mastócitos, basófilos e plaquetas e a serotonina em plaquetas. A liberação destes componentes no foco inflamatório pode ser desencadeada por dano tecidual, complexo antígeno-anticorpo, sendo este anticorpo de classe IgE, e pelos componentes do sistema complemento (METRANGOLO *et al.*, 1995; DAVIES *et al.*, 1997).

Outro agente muito importante que é liberado em processos infecciosos é o NO, o principal responsável pela hipotensão na sepse e que pode evoluir para o choque (MONCADA & HIGGS, 1993; IGNARRO *et al.*, 2002).

O NO é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devida à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contém o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (SNYDER & BREDT, 1992).

Ele é mediador endógeno de vários processos fisiopatológicos. No sistema nervoso central, ele é um neurotransmissor, atuando na formação da memória e do aprendizado. No endotélio vascular, é responsável pelo tônus vasodilatador, que é essencial para manter a pressão e o fluxo sanguíneo. Está envolvido em algumas funções dos trato genitourinário, gastrointestinal e respiratório como vasodilatador. Ele contribui para controlar a agregação plaquetária e as contrações do músculo cardíaco. Também está presente na imunorregulação, na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade, podendo ser tóxico para as células do organismo (MONCADA & HIGGS, 1993; FLORA FILHO *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2001).

O NO é produzido pela oxidação da *L*-arginina a *L*-citrulina mediada pela óxido nítrico sintase (NOS). Primeiro, a *L*-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-*L*-arginina com presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) e cálcio, sendo necessário mais NADPH e oxigênio (O₂) para a formação de *L*-citrulina e NO (MONCADA & HIGGS, 1993; FLORA FILHO *et al.*, 2000).

A arginina é um aminoácido semi-essencial, que provém da dieta, da quebra de proteínas e da síntese *de novo* a partir da citrulina. Além de ser o substrato para a síntese do NO, este aminoácido também é incorporado a proteínas e é substrato para síntese de uréia e ornitina a partir da enzima arginase. No quadro inflamatório severo, como é o caso da sepse, as concentrações plasmáticas de arginina estão diminuídas devido ao intenso catabolismo para a produção de NO e proteínas inflamatórias, além da síntese *de novo* estar reduzida, assim como a dieta alimentar (LUIKING *et al.*, 2004; LUIKING *et al.*, 2005).

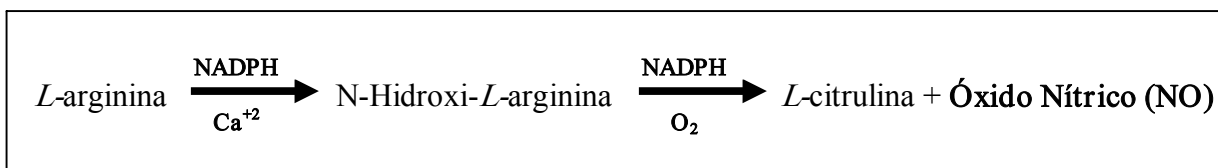


Figura 1. Síntese do óxido nítrico a partir da *L*-arginina (FLORA FILHO *et al.*, 2000).

Muitas células são capazes de sintetizar NO através de heme proteínas da família citocromo P450-like, as NOS. As NOS são dependentes de O₂ e NADPH para exercer sua atividade. São conhecidas três isoformas de NOS, duas constitutivas (cNOS), encontradas no sistema nervoso central (nNOS) e nas células endoteliais (eNOS), e uma induzível (iNOS), encontrada principalmente em macrófagos e neutrófilos. As duas isoformas constitutivas são dependentes do complexo cálcio-calmodulina para serem ativadas e desativadas. O cálcio serve como sinalizador citoplasmático e atua através da ligação com a calmodulina, que é uma proteína intracelular receptora específica, tendo então controle sobre algumas enzimas (MONCADA & HIGGS, 1993; FLORA FILHO *et al.*, 2000; SCHWENTKER *et al.*, 2002).

A iNOS é independente do complexo cálcio-calmodulina para a ativação. Ela é induzida por citocinas e endotoxinas de bactérias gram-negativas promovendo a produção de grandes quantidades de NO e desencadeando um relaxamento vascular que pode não responder ao uso de substâncias vasoconstritoras (MONCADA & HIGGS, 1993; IGNARRO *et al.*, 2002; SCHWENTKER *et al.*, 2002).

Este mecanismo de relaxamento vascular é mediado pela ação da guanilato ciclase solúvel, que é estimulada pelo NO, resultando na síntese de guanosina monofosfato cíclica a partir da guanosina trifosfato, promovendo então o relaxamento vascular e, conseqüentemente, a vasodilatação (MONCADA & HIGGS, 1993; IGNARRO *et al.*, 2002).

Várias evidências sugerem uma hiperprodução de NO durante o quadro séptico, pois estudos em ratos e camundongos detectaram níveis elevados de nitrito e nitrato, que são metabólitos estáveis do NO, no plasma e na urina dos animais após a indução de sepse. Os macrófagos são as principais células envolvidas na liberação de NO na sepse. A sua hiperprodução pode ter efeitos deletérios com lesão tecidual direta ou do ácido desoxirribonucleico (DNA), vasodilatação sistêmica, diminuição da resistência vascular sistêmica até hipotensão refratária e disfunção de múltiplos órgãos (FLORA FILHO *et al.*, 2000).

2.2.1. Toxinas bacterianas

Sob o nome de toxinas bacterianas, compreendem-se dois grupos de substâncias: exotoxinas e endotoxinas. Frequentemente as toxinas fazem parte da estratégia de entrada, propagação ou defesa contra o hospedeiro (MIMS *et al.*, 1995).

As endotoxinas são substâncias liberadas pelas bactérias gram-negativas, constituídas por lipopolissacarídeos (LPS) sendo muito importantes na patogênese do choque séptico (GOSCINSKI *et al.*, 2004). Elas são compostas por uma porção lipídica (lipídio A), um núcleo polissacarídico, evolutivamente conservado, e o polissacarídeo O, altamente variável e responsável pela diversidade destas moléculas detectadas sorologicamente (PETER *et al.*, 2003; MURRAY *et al.*, 2004). São liberadas espontaneamente durante a multiplicação da bactéria, entretanto, esta liberação tem se mostrado maior na desintegração do microorganismo induzida por antibióticos (LEPPER *et al.*, 2002; PETER *et al.*, 2003).

Na circulação, a endotoxina ativa o centro termorregulador e o processo de coagulação, altera o sistema Caliceína/Bradicinina, atrai leucócitos para o local da inflamação

acarretando a queda do tônus esfínteriano da microcirculação e dilatação de capilares e vênulas. Ocorre, então, o aporte insuficiente de oxigênio para os tecidos, acarretando o predomínio de glicólise anaeróbica nos tecidos, com aumento de ácido láctico (acidose láctica) e dano celular (NAKAMURA & BARROS, 1986).

As endotoxinas são responsáveis pela ativação de células e complemento diretamente (fagócitos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos) e pela ativação indireta da cascata inflamatória, induzindo à produção de citocinas pelos macrófagos e monócitos. Ela também induz à secreção de peptídeos endógenos e mediadores lipídicos (tromboxano, leucotrienos e PAF) (GOSCINSKI *et al.*, 2004; MYHRE, 2004).

Uma vez liberado, o LPS se liga rapidamente às proteínas plasmáticas ou a receptores celulares específicos, como os da família CD11b/ CD18, presentes em fagócitos, ou ao receptor CD14, associado à membrana celular dos monócitos, macrófagos e granulócitos ativados, levando à introdução de um complexo para o interior da célula e promovendo a sua ativação (ASTIZ & RACKOW, 1998; OPAL *et al.*, 1999; GINSBURG, 2002; PETER *et al.*, 2003).

A maioria das exotoxinas são proteínas secretadas pela célula bacteriana. Em alguns casos, estas toxinas consistem de duas ou mais subunidades, uma das quais é requisito para ligação e penetração na célula, enquanto a outra inibe ou ativa algumas funções celulares (MIMS *et al.*, 1995).

Esses componentes das bactérias gram-negativas e gram-positivas podem levar o indivíduo a sepse, que é uma resposta inflamatória sistêmica frente a essa infecção (MALOT *et al.*, 2001).

2.3. Efeito do uso de antibióticos sobre o quadro séptico

Os antibióticos foram primeiramente descritos em 1942, sendo definidos como substâncias químicas produzidas por microorganismos capazes de inibir o crescimento ou destruir bactérias e outros microorganismos (BURKHOLDER, 1952). Mais tarde verificou-se que vegetais produziam estas substâncias de ação antimicrobiana (GONÇALVES *et al.*, 1959; CAMARGO *et al.*, 1991; LIMA NETO *et al.*, 1993). Da mesma forma, substâncias antimicrobianas podem ser produzidas pelo próprio organismo animal, como a lisozima ou também as substâncias ácidas da pele e mucosas (KOCH, 2003).

A principal ação dos antimicrobianos é prevenir ou tratar infecções, diminuindo ou eliminando os organismos patogênicos e, se possível, preservando os germes não patogênicos da microbiota normal (ARIAS *et al.*, 2003).

O marco da história dos antibióticos foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1929. Porém, somente em 1943 foi que o uso terapêutico da penicilina tornou-se uma realidade na prática clínica (KOCH, 2003).

A necessidade de combater doenças infecciosas, em tempos de aumento de expectativa de vida para pacientes imunodeprimidos e com diversas patologias de base, tem levado os laboratórios farmacêuticos a produzirem antimicrobianos de forma sintética e semi-sintética. Estas novas drogas produzidas podem ser restritas a um determinado microorganismo, ou ter um amplo espectro de ação sobre uma gama de bactérias, que podem ser tanto gram-positivas como gram-negativas (MALOT, 2001).

Os antibióticos estão entre os fármacos mais utilizados na terapêutica, tanto em ambulatórios como em hospitais. O uso indiscriminado ou não criterioso destas substâncias tem propiciado a seleção de cepas bacterianas com elevada capacidade de sobrevivência, ou

seja, resistentes a estas drogas. Conseqüentemente, ocorre o surgimento de superinfecções causadas por germes multiresistentes (ARIAS *et al.*, 2003).

O uso de potentes agentes antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva tem aumentado a sobrevivência de pacientes com sepse por gram-negativo, porém a mortalidade continua variando de 20 a 50%, especialmente em pacientes com choque. Esta alta taxa de mortalidade pode ser explicada pela reação provocada pelos componentes da parede celular bacteriana, principalmente LPS por parte dos gram-negativos e peptidoglicano e ácido teicóico pelos gram-positivos (RANGEL-FRAUSTO *et al.*, 1995; FRIELING *et al.*, 1997).

O LPS é liberado durante a divisão bacteriana e também quando a bactéria é atingida pelo agente antimicrobiano. A quantidade de LPS liberada depende do mecanismo de ação e da concentração do antibiótico usado (FRIELING *et al.*, 1997).

Entre os antibióticos que levam a liberação de constituintes da parede celular estão os beta-lactâmicos (β -lactâmicos), muito usados para o tratamento de infecções por gram-negativos, que atuam em diferentes proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), responsáveis pela formação da parede celular bacteriana. Dependendo da PBP que eles se ligarem, haverá uma maior liberação de LPS e, conseqüentemente, os níveis de citocinas também serão maiores, resultando numa resposta inflamatória exacerbada que poderá gerar a destruição de órgãos e tecidos e a disfunção de múltiplos órgãos (OPAL *et al.*, 1999; GINSBURG, 2002; LEPPER *et al.*, 2002).

Um estudo, feito por Kraghsbjerg e colaboradores, demonstrou um aumento no nível de LPS durante o tratamento de sepse induzida por *Escherichia coli* em coelhos e porcos, sepse induzida por *Haemophilus influenza* em ratos e meningococemia em camundongos. Outro estudo comparando a quantidade de TNF α liberado por monócitos, quando incubados com

LPS e β -lactâmicos, que atuam em diferentes PBPs, e LPS e uma quinolona, que não tem como mecanismo de ação atingir a parede celular, mostrou haver uma maior produção deste mediador quando houve a incubação de LPS com o β -lactâmico que atua em uma PBP 3 (LEPPER *et al.*, 2002).

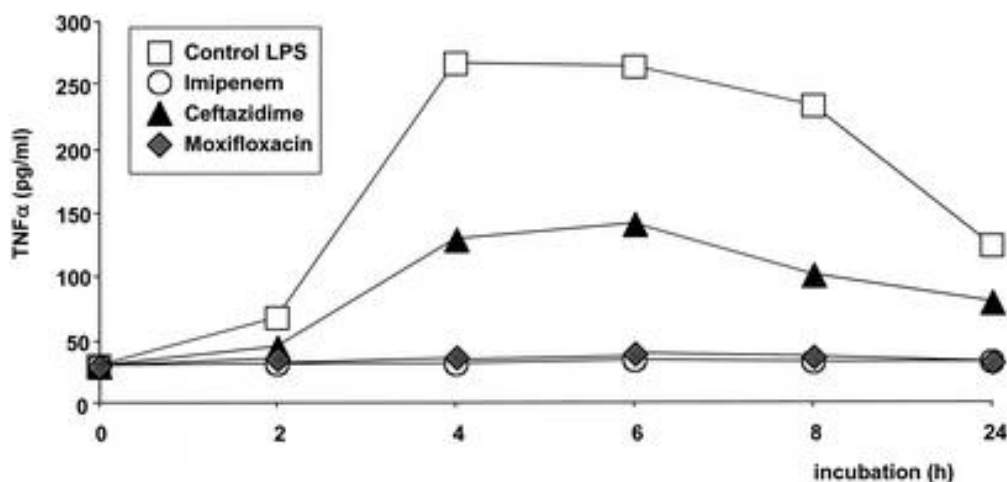


Figura 2. Liberação de $\text{TNF}\alpha$ por monócitos quando incubados com LPS e LPS e diferentes antibióticos. Moxifloxacin e imipenem liberaram uma menor quantidade de $\text{TNF}\alpha$ em comparação com a ceftazidima (KRAGSBJERG *et al.*, 1996).

Pesquisas feitas por Horn *et al* (2000) têm demonstrado que antibióticos β -lactâmicos, liberam uma maior quantidade de endotoxinas, comparados com drogas, como as quinolonas, que agem interferindo na síntese do DNA cromossomal do microorganismo ou até mesmo com os glicopeptídeos, que também atuam na parede celular. O tratamento de uma infecção com um antibiótico que não interfira na síntese da parede celular leva o

microorganismo a perder a sua viabilidade na ausência de lise celular, o que resulta na diminuição dos níveis de endotoxinas liberadas (LEPPER *et al.*, 2002).

2.3.1. Mecanismos de ação dos antibióticos

Os antimicrobianos podem agir em um microorganismo de quatro maneiras: interferindo na síntese proteica, na replicação do DNA, na permeabilidade da membrana citoplasmática e na síntese da parede celular.

Interferindo na síntese protéica:

A síntese protéica é um processo metabólico, feito a partir de genes cromossomais. O cromossoma bacteriano é formado por uma única longa molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico)

A síntese protéica ocorre nos ribossomos, que são estruturas formadas por duas subunidades, uma maior e uma menor. Os ribossomos bacterianos (70S) possuem subunidades que se sedimentam 50S e 30S e os dos mamíferos (80S) se sedimentam em 60S e 40S (NOLLER, 1984).

A síntese protéica envolve três fases: a iniciação, a extensão e a terminação.

A iniciação envolve a reação que precede a ligação entre o primeiro e o segundo aminoácido que irão formar a proteína. Ocorre então a ligação do ribossomo à seqüência que precede a região codificadora do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) formando um complexo que contém o primeiro aminoacil RNA transportador (tRNA). A molécula de mRNA possui códons, que são seqüências específicas formadas por três bases. O tRNA possui

anticódons que se ligam aos códons do mRNA. Os códons especificam a inserção na cadeia peptídica em formação do aminoácido transportado pelo tRNA (SACHS *et al.*, 1997).

A extensão envolve todas as reações com adição de aminoácidos à extremidade carboxila da cadeia polipeptídica em formação. Durante esta etapa, os ribossomos movem-se do 5`terminal ao 3`terminal do mRNA que está sendo traduzido. Este processo chama-se translocação. A formação das ligações peptídicas é catalizada pela peptidiltransferase (SACHS *et al.*, 1997).

A terminação é feita por um códon de terminação e é seguida respectivamente pela liberação da proteína recém sintetizada, dissociação do ribossomo e do mRNA (SACHS *et al.*, 1997).

A síntese proteica pode sofrer interferência em várias fases do seu desenvolvimento como na formação dos RNAs, que ocorre no caso das rifampicinas, que se ligam de maneira irreversível à RNA polimerase. Já o cloranfenicol atua se ligando à fração 30S do ribossoma, impedindo a ligação do tRNA, e inibem a ação da peptidiltransferase. As lincosaminas (clindamicina e lincomicina) atuam da mesma maneira que o cloranfenicol e o tiafenicol, porém ligam-se à porção 50S. As tetraciclinas ligam-se à fração 30S impedindo a ligação do tRNA e conseqüentemente o aporte de aminoácidos. Os macrolídeos também se ligam à porção 50S inibindo a translocação do tRNA e bloqueando a união dos aminoácidos na formação da cadeia peptídica (MURRAY *et al.*, 2004).

Interferindo na replicação do DNA:

Quando as duas fitas da dupla hélice de DNA são separadas, cada uma pode servir como um molde para replicar uma nova fita complementar, produzindo duas novas fitas

idênticas com orientação antiparalela. Este processo é chamado replicação e é feito por polimerases.

Na replicação, ocorrem dois fenômenos físicos: o de desnaturação e o de renaturação da dupla fita, ou seja, fusão da dupla-fita realizada principalmente pela topoisomerase, e reanelamento formando uma nova fita (WAGA *et al.*, 1998).

Antibióticos que têm como mecanismo de ação interferir na replicação do DNA atuam, na grande maioria das vezes, ligando-se às topoisomerasas, como no caso das quinolonas e do ácido nalidíxico (HARDY *et al.*, 2003).

Interferindo na permeabilidade da membrana citoplasmática:

A membrana citoplasmática ou membrana interna, como também é chamada, se localiza abaixo da parede celular e envolvendo o citoplasma, onde encontram-se as organelas essenciais para as funções vitais do microorganismo. Sua constituição é a mesma para gram-negativos e gram-positivos. É constituída por uma dupla camada de lipídeos, principalmente fosfolipídeos, e proteínas, principalmente enzimas vitais para o metabolismo celular (MURRAY *et al.*, 2004).

Ela possui uma permeabilidade seletiva que controla a passagem de soluções para dentro e fora da célula e também apresenta um sistema enzimático de transporte ativo. É aonde ocorre a síntese de ATP por oxidação fosforilativa e onde estão as enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (MURRAY *et al.*, 2004).

Alterações físico-químicas da membrana citoplasmática levam à morte bacteriana, pois a permeabilidade seletiva é rompida, havendo a saída de elementos vitais à célula, como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucleicos, ou entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano. A morte celular pode ser devido a alterações no sistema respiratório da célula.

Estes são os mecanismos de ação das polimixinas e a tirotricina que causam uma desorganização funcional da célula (MURRAY *et al.*, 2004).

Interferindo na síntese da parede celular:

A parede celular é responsável por dar a forma e rigidez à célula bacteriana. Ela serve como uma barreira osmótica, permite que as bactérias retenham nutrientes, proteínas essenciais e ácidos nucleicos no seu interior e mantenham certas moléculas em seu exterior (KOCH, 2003).

A membrana externa tem constituição diferente conforme a bactéria, seja gram-negativa ou gram-positiva. Todas, entretanto, têm uma camada em comum, o peptidoglicano, um polímero mucocomplexo rígido formado pelos açúcares aminados N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligados por pontes peptídicas (KOCH, 2003). Nos microorganismos gram-positivos, este mucopeptídeo compreende 60% da parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teóicos, ribonucleato de magnésio e carboidratos. Já nos gram-negativos, ele constitui 10% da membrana externa, formando, então, uma camada basal sobre a qual se situa uma camada externa composta por lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas (OPAL *et al.*, 1999; GINSBURG, 2002).

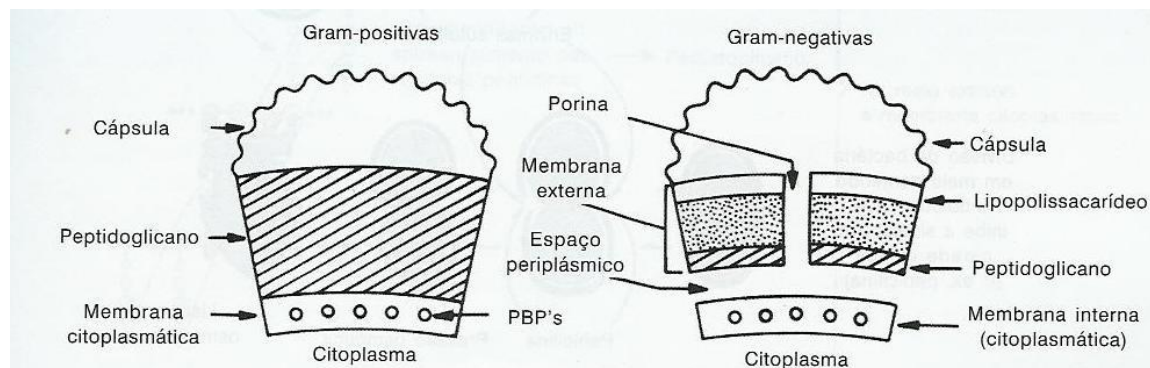


Figura 3. Configuração da parede celular bacteriana (TAVARES, 2001).

É a partir da parede celular ou membrana externa, como é denominada, que ocorre a reprodução binária normal da célula, que se inicia pela formação de um septo a partir dela. Numa bactéria que cresce e se reproduz, a parede celular é constantemente destruída (por enzimas autolíticas) e sintetizada novamente, estabelecendo-se um equilíbrio entre a lise e a síntese. Este equilíbrio permite que a divisão celular ocorra sem destruição celular. A medida em que um septo vai se formando na parede, novas subunidades dissacarídeo-peptídicas vão se formando (MURRAY *et al.*, 2004).

A síntese do peptidoglicano ocorre em três etapas: a primeira ocorre no citoplasma bacteriano e resulta na formação de um derivado do ácido N-acetilmurâmico, o ácido uridino-difosfato-N-acetilmurâmico. Este é um produto da união do fosfoenolpiruvato à uridino-difosfato N-acetil glicosamina, catalizada pela piruvil-transferase. A fosfomicina é um antibiótico que se liga irreversivelmente à piruvil-transferase inibindo a continuação da síntese da parede. Logo após, ligam-se a este derivado aminoácidos que também vão constituir o mucopeptídeo, como: a *L*-alanina, *D*-alanina, ácido glutâmico, lisina e o ácido diaminopimélico. Há a formação de um composto derivado do ácido N-acetilmurâmico com um pentapeptídeo, que será transportado por um fosfolípido para fora da membrana

citoplasmática, juntamente com moléculas de N-acetilglicosamina, constituindo a segunda etapa da síntese da parede celular. No meio externo, ocorrerá a terceira etapa com as reações de transglicosilação e transpeptidação. A transglicosilação compreende a polimerização das duas subunidades, formando longas cadeias polipeptídicas, e a transpeptidação. A transpeptidação é o entrelaçamento das longas cadeias polipeptídicas (MAINARDI *et al.*, 2002). Os glicopeptídeos atuam se ligando ao derivado do ácido N-acetilmurâmico, impedindo a transglicosilação (GRAIG, 2003).

Proteínas ligadoras de penicilina ou PBPs (Penicillin-Binding Proteins) de ação enzimática de transglicosidases, transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, que participam da terceira etapa da biossíntese das novas moléculas de peptidoglicano e a sua incorporação na parede da bactéria em multiplicação (PERITI *et al.*, 1999).

Estas PBPs são os principais alvos dos antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams) inibindo a sua ação e, conseqüentemente, a formação do peptidoglicano havendo lise osmótica (ARIAS *et al.*, 2003; SINGH, 2004).

As PBPs são divididas em sete frações principais, separadas de acordo com o seu peso molecular. As de alto peso molecular (entre 60.000 a 140.000) são as PBPs 1A, 1B, 2 e 3 e estão em menor quantidade na célula porém, são essenciais na síntese do peptidoglicano, enquanto que as de baixo peso molecular (entre 40.000 a 60.000) são as PBPs 4, 5 e 6 e estão em maior quantidade na célula bacteriana porém, na sua ausência, o peptidoglicano é sintetizado normalmente (MURRAY *et al.*, 2004).

As PBPs 1A e 1B são enzimas que participam no alongamento da bactéria em divisão. A ligação de antibióticos β -lactâmicos a estas proteínas impede a formação do

peptideoglicano, tornando a célula em crescimento defeituosa, havendo rapidamente lise osmótica (LEPPER *et al.*, 2002; TSUJI *et al.*, 2003).

A PBP 2 é responsável pela configuração, formato celular dos microorganismos, durante uma parte específica da síntese da parede. Assim, esta PBP é responsável pela manutenção da forma da bactéria e, na sua ausência ou quando é inibida, ocorre a formação de grandes células redondas que terminam por sofrer lise após algumas horas de desenvolvimento ativo. Ligam-se a esta PBP as amidinopenicilinas, o ácido clavulânico, os carbapenens (imipenem e meropenem) e algumas cefalosporinas (cefotaxima e cefepime) (LEPPER *et al.*, 2002; TSUJI *et al.*, 2003).

A PBP 3 é responsável pela formação do peptideoglicano que constitui o septo que divide a bactéria durante a sua multiplicação. Caso seja inibida, a célula continua crescendo, formando longos filamentos, sem divisão septal, sofrendo lise após um período de desenvolvimento variável. Desta maneira, até que ocorra a morte celular, há uma grande liberação de LPS pelos bacilos gram-negativos. Ligam-se a esta PBP cefalosporinas (ceftazidima, cefpiroma) e monobactams (aztreonam) (LEPPER *et al.*, 2002; TSUJI *et al.*, 2003).

2.3.1.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são compostos por um grupamento químico heterocíclico azetidina denominado anel β -lactâmico, que é responsável pela atividade antimicrobiana deste grupo de antibióticos, interferindo na síntese da parede celular. Este anel é formado por uma amida cíclica com quatro lados e o fechamento da cadeia se dá pela

ligação do nitrogênio da amida do carbono situado na posição β (MURRAY *et al.*, 2004) (Figura 4).

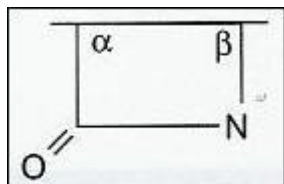


Figura 4. Anel β -lactâmico (TAVARES, 2001).

As principais classes de antibióticos que pertencem a esta família são: as cefalosporinas, os monobactams, as penicilinas, as cefamicinas, as oxacefemas, os carbapenens, e os inibidores de β -lactamases. O que as diferenciam são os radicais ligados ao anel β -lactâmico (NCCLS, 2004).

2.3.1.1.a. Cefalosporinas

Foram primeiramente isoladas do fungo *Cephalosporium acremonium* durante a Segunda Guerra Mundial. Possuem como núcleo central o ácido 7-aminocefalosporânico, que é constituído da ligação do anel β -lactâmico a um anel di-hidrotiazina, sendo esta estrutura denominada núcleo cefêm. Elas podem ser naturais ou semi-sintéticas. Atuam ligando-se a diversas PBP's 1, 2 e 3 (ELANDER, 2003; SINGH, 2004) (Figura 5).

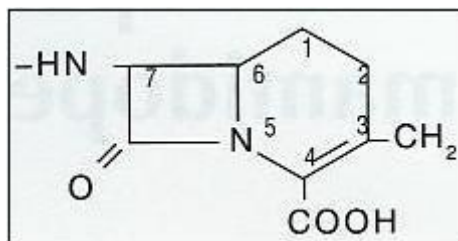


Figura 5. Núcleo das cefalosporinas (7-ACA) (TAVARES, 2001).

As cefalosporinas são divididas em quatro gerações, e o que as diferenciam são os espectros de ação e a resistências as β -lactamases, que são enzimas produzidas pelos microorganismos que degradam o anel β -lactâmico. As cefalosporinas de primeira geração possuem atividade moderada contra gram-negativos e *Staphylococcus aureus*. Sua principal representante é a cefalotina. As cefalosporinas de segunda geração são mais ativas contra gram-negativos, sendo ativas em infecções provocadas por *Haemophilus* sp, *Moraxella* sp. e anaeróbios. São mais estáveis à ação das β -lactamases. São constituintes deste grupo o cefaclor e o cefuroxime. As cefalosporinas de terceira geração possuem amplo espectro de ação, além de serem estáveis à ação das β -lactamases. São efetivas contra gram-negativos, contra gram-positivos e *Pseudomonas aeruginosa*. São suas representantes a ceftazidima, a cefotaxima, cefoperazona, cefpodoxima e a ceftriaxona. As cefalosporinas de quarta geração compreendem o cefepime e o cefpirome. São muito estáveis à ação das β -lactamases e muito ativas contra gram-negativos principalmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. Não são muito ativas contra *Enterococcus* sp. e anaeróbios (GLOOR *et al.*, 2003; NCCLS, 2004; SINGH, 2004).

A maioria das cefalosporinas requerem administração parenteral, mas um crescente número está disponível para administração via oral como o cefaclor, a cefoxitina e o cefpodoxima, que possuem boa absorção gastrointestinal. Atingem boas concentrações nos

diferentes órgãos, sendo que a cefotaxima, o ceftriaxona a cefoperazona e o cefepime atingem ótimas concentrações no sistema nervoso central e são muito utilizadas no tratamento de meningite. Têm eliminação renal e a meia vida é de 4,5 a 8 horas, permitindo uma administração de uma à duas vezes por dia (GLOOR *et al.*, 2003, KIM *et al.*, 2003).

A cefalosporina utilizada neste trabalho foi uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração, a ceftriaxona, que se apresenta sob a forma de sal dissódico, em cristais amarelados, facilmente solúveis em água, mantendo a substância estável por dois anos à temperatura ambiente. As soluções mantêm estabilidade por 6 horas à temperatura ambiente. Cada 1 grama de ceftriaxona contém 83mg (3,6 mEq) de sódio (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

A sua atividade bactericida é devida à inibição da síntese da parede celular. *In vitro* é ativa contra germes gram-positivos e gram-negativos, mas é pobre sua ação contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sua maior atividade relaciona-se a bacilos gram-negativos enterais: *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Enterobacter* sp, *Morganella morganii* (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

A ceftriaxona pode ser administrada por via intramuscular e intravenosa, não sendo absorvida por via oral. A concentração plasmática, depois de dose única de 1 grama intramuscular, é cerca de 81 mg/L e é alcançada de 2 a 3 horas após a administração, tendo uma biodisponibilidade de 100%. Apresentou excelente penetração tecidual, alcançando concentrações acima da concentração inibitória mínima contra a maioria dos patógenos responsáveis pela infecção. A meia vida de eliminação, em adultos sadios, é de aproximadamente 8 horas. Em crianças menores de 8 anos e idosos com mais de 75 anos, a média da meia vida de eliminação é cerca de 2 vezes mais longa. Em adultos cerca de 50-60% é excretada sobre a forma inalterada na urina enquanto 40-50% na bile. Nos recém-nascidos,

70% da dose administrada tem eliminação urinária. Em pacientes com insuficiência renal e hepática, a farmacocinética é discretamente alterada e a eliminação levemente aumentada (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

A dose usual em adultos e crianças acima de 12 anos 1-2 gramas dose única diária, recém-nascidos 20-50 mg/kg. A administração deve ser descontinuada durante um período mínimo de 48-72 horas após o desaparecimento de febre ou após evidências da erradicação da bactéria (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

2.3.1.1.b. Monobactams

Constituem uma classe de antibióticos formados por um único anel, o β -lactâmico, com diferentes radicais ligados a ele. Podem ser naturais ou sintéticos, porém somente o aztreonam, que é obtido por síntese química a partir do ácido 6-aminomonobactâmico, possui atividade clínica se ligando a parede celular (SMITH *et al.*, 2001; LEPPER *et al.*, 2002).

Para cada 1 grama de aztreonam há aproximadamente 780 mg de *L*-arginina, que serve como tampão. Apresenta-se solúvel em água (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

Possui atividade contra amplo espectro de patógenos gram-negativos aeróbios, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacteriaceae* (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

O aztreonam pode ser administrado via intramuscular ou intravenosa. As concentrações séricas após injeções intramusculares atingem níveis máximos após cerca de 1 hora. No soro a meia-vida foi em média 1,7 hora, em pacientes com função renal normal. Em

pacientes com insuficiência renal, a meia-vida é prolongada. A eliminação do aztreonam é renal (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004).

Dose: para o tratamento de infecções graves, em pacientes com 2 anos de idade ou mais a dose recomendada é de 50 mg/kg, em intervalos de 6 a 8 horas (VADEMECUM, 1999; MURRAY, 2004) (Figura 6).

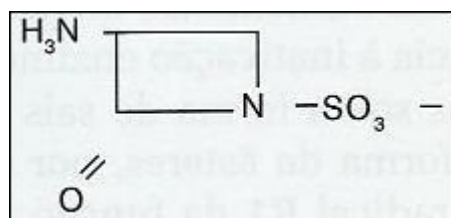


Figura 6. Núcleo central dos monobactams (TAVARES, 2001).

2.3.1.1.c. Penicilinas

As penicilinas são um grupo de antibióticos naturais e semi-sintéticos que possuem em seu núcleo central o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), que é constituído da ligação de um anel β -lactâmico a um anel tiazolidínico com um grupamento amina no carbono 6. A penicilina G e a penicilina V foram as primeiras a serem descobertas a partir da fermentação do fungo *Penicillium notatum*. No processo normal de fermentação do *Penicillium* outras penicilinas foram descobertas apresentando variação no radical ligado ao 6-APA. Já as semi-sintéticas são produzidas por modificações químicas no ácido-6-aminopenicilânico ou interrupção do processo fermentativo do *Penicillium* (ELANDER, 2003). (Figura 7)

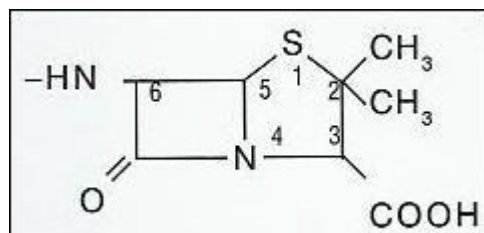


Figura 7. Núcleo central das penicilinas (6-APA) (TAVARES, 2001).

Seu espectro de ação é sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, espiroquetas, actinomicetos e alguns microorganismos anaeróbicos (KLUGMAN, 1990).

A administração oral difere entre as penicilinas, mas a maioria delas tem boa absorção, com exceção da meticilina que é inativa devido aos ácidos gástricos. Elas têm boa distribuição pelos órgãos incluindo pulmões, fígado, rins, músculos, medula e placenta. Estas drogas são eliminadas via renal. A meia-vida é de 0,5 à 1,5 hora, e são usualmente administradas de 4 à 6 horas para manterem a concentração plasmática (MURRAY, 2004).

As penicilinas são divididas da seguinte maneira: penicilinas naturais (penicilina G e penicilina V), penicilinas estáveis (oxacilina, meticilina, nafcilina, dicloxacilina, clixacilina), aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina), carboxipenicilinas (ticarcilina e carbenicilina) e ureidopenicilinas (piperacilina, azlocilina, mezlocilina) (NCCLS, 2004).

2.3.1.1.d. Cefamicinas

São estruturalmente semelhantes as cefalosporinas tendo no carbono 7 do grupo cefém um grupamento metoxílico. São semi-sintéticas, tem espectro de ação farmacocinética e farmacodinâmica semelhante as cefalosporinas de segunda geração e suas principais

representantes são a cefoxitina e ao cefotetam (WEXLER *et al.*, 1988; WU *et al.*, 2004) (Figura 8).

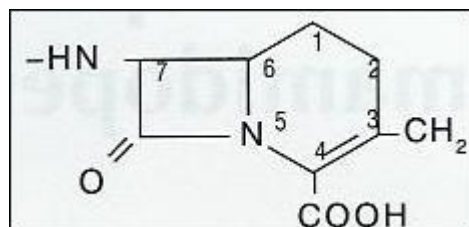


Figura 8. Núcleo das cefamicinas (TAVARES, 2001).

2.3.1.1.e. Oxacefemas

Estruturalmente são semelhantes as cefalosporinas, tendo a substituição da molécula de enxofre da posição 1 por um oxigênio. São sintéticas, têm atividade semelhante as cefalosporinas de terceira geração e são ativas também contra microorganismos anaeróbios. Quando administradas intravenosamente têm uma meia-vida de 2 horas e alcançam ótimas concentrações em líquidos e tecidos atravessando a barreira hematoencefálica. Seu principal representante é o moxalactam (MURRAY *et al.*, 2004) (Figura 9).

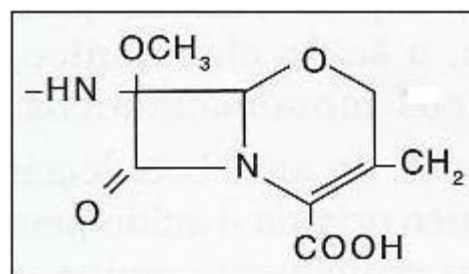


Figura 9. Núcleo central das Oxacefemas (TAVARES, 2001).

2.3.1.1.f. Carbapenems

São formados por um anel carbapenema, que é composto por um anel β -lactâmico unido a um pentaciclo não saturado e tem um átomo de enxofre na posição 1 substituído por carbono. São substâncias naturais ou sintéticas porém, somente as sintéticas têm elevada potência contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos. Possuem elevada estabilidade a maioria das β -lactamases. Atuam se ligando as PBPs 1 e 2 (AYALEW *et al.*, 2003) (Figura 10).

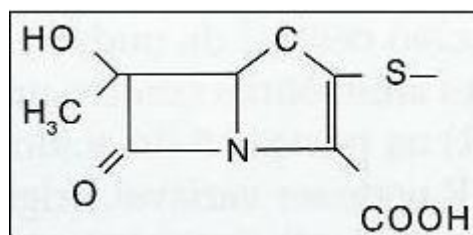


Figura 10. Núcleo central dos carbapenens (TAVARES, 2001).

São principais representantes dos carbapenens o imipenem, o meropenem e o ertapenem (NCCLS, 2004).

Têm administração intravenosa e se distribuem amplamente pelos órgãos e tecidos. O imipenem é metabolizado e inativado nos rins por uma enzima, a diidropeptidase I (DHP-I). Então, para esta droga atingir boas concentrações, ela é combinada com um inibidor da DHP-I a cilastatina. O meropenem e o ertapenem não necessitam estar associados a este inibidor. A farmacocinética do imipenem e do meropenem é semelhante, tendo uma meia-vida de 1 hora. Já o ertapenem tem uma meia-vida de 4 horas, que permite que seja administrado uma vez por dia (AYALEW *et al.*, 2003).

2.3.1.1.g. Inibidores de β -lactamases

β -lactamases são enzimas produzidas pelas bactérias gram-positivas e gram-negativas que tem como função destruírem o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. Elas são produzidas por genes cromossomais ou plasmidiais. A associação de uma penicilina ou cefalosporina com um inibidor, faz com que este inative estas enzimas, e a droga tenha ação para combater o microorganismo (KOCH, 2003).

A inibição pode ser competitiva, quando o inibidor compete pelo sítio de ligação do antibiótico com a enzima; ou não competitiva, quando o inibidor se liga a outro sítio de ligação na enzima que não é o mesmo do antibiótico se liga (KOCH, 2003).

São os principais inibidores:

-Ácido clavulânico: é constituído por um anel β -lactâmico ligado a um anel oxazolidina. Apresenta espectro de ação contra germes gram-positivos e gram-negativos e anaeróbios. A droga só exerce ação antimicrobiana em altas concentrações. Liga-se às β -lactamases de maneira irreversível inativando as enzimas. Apresenta-se ligado a ampicilina, amoxicilina e ticarcilina. Possui boa absorção pelo trato gastrointestinal e uma meia-vida de 1 hora. Tem boa penetração nos tecidos com exceção das meninges (SINGH, 2004).

-Sulbactam: é um fármaco semi-sintético e é uma sulfona do ácido 6-aminopenicilânico. Da mesma forma que o ácido clavulânico se liga às enzimas de maneira irreversível. É muito ativo contra meningococo, gonococo e *Acinetobacter* sp. Na clínica apresenta-se associado a ampicilina e a amoxicilina. Possui uma meia-vida de 1 hora quando é absorvido via oral e atinge boas concentrações em líquidos e tecidos e também nas meninges (SINGH, 2004).

-Tazobactam: é um derivado sulfônico do ácido penicilânico. Possui o mesmo espectro de ação que os outros inibidores e também é capaz de inativar a enzima *Amp C* produzida por genes cromossomais dos gram-negativos. Apresenta-se ligado a piperacilina, tendo uma meia-vida de 1 hora e atingindo altas concentrações em líquidos e tecidos (MURRAY *et al.*, 2004).

2.4. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, S.K. *et al.* The role of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. **J Leuk Biol**, v. 75, p. 431-421, 2004.

ARIAS, C. A. *et al.* Guías para el uso racional de antibióticos β -lactâmicos: mecanismos de resistencia y su interpretación clínica. **Biomédica**, v. 23, p. 134-140, 2003.

ASTIZ, M. E. & RACKOW, E.C. Septic Shock. **Lancet**, v. 351, p. 1501-1505, 1998.

AYALEW, K. *et al.* Carbapenems in pediatrics. **Ther Drug Monit**, v. 25, p. 593-599, 2003.

BAUMANN, H. & GAULDIE, J. The Acute Phase Response. **Immunol Today**, v.15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BONE, R. C. *et al.* Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. **Chest**, v. 112, p. 235-243, 1997.

BONE, R.C. *et al.* Sepsis Syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisole Severe Sepsis Study Group. **Crit Care Med**, v. 17, n. 5, p. 389-393, 1989.

BONE, R.C. *et al.* Sepsis, sepsis síndrome multi-organ failure: a plea for comparable definitions. **Ann Int Med**, v. 114, n. 4, p. 332-333, 1991.

- BURKHOLDER, P.R. Cooperation and conflict among primitive organisms. **Am Sci**, v. 40, n. 4, p. 601-631, 1952.
- CAMARGO, A.S. *et al.* Determinação da atividade antimicrobiana do óleo volátil dos frutos *Zanthorylum rhoifoium Lam Var. Rhoifolium* (Rutáceas). **Rev Bras Farm**, v. 72, n. 2, p. 29-30, 1991.
- CARVALHO, W.B. *et al.* Choque **Séptico em Pediatria**. 2ªed. São Paulo: MEDSI, 1999.
- DAVIES, M.G. *et al.* Systemic Inflammatory Response Syndrome. **J Surg**, v. 84, p. 920-935, 1997.
- DIAS, F.S. **Choque**. 1ª ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2002. 592 p.
- ELANDER, R.P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, n. 5-6, p. 385-392, 2003.
- FAILACE, R.R. **Hemograma : manual de interpretação**. 3ª. ed.rev.aum. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. 198 p.
- FLORA FILHO, R. *et al.* Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, p. 265-271, 2000.
- FRIELING, J.T.M. *et al.* Differential Induction of Pro-and-Anti Inflammatory Cytokines in Whole Blood by Bacteria: Effects of Antibiotic Treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 7, p. 1439-1443, 1997.
- GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **The Lancet**, v. 2, p. 171-179, 2002.
- GLOOR, B. Cefepime tissue penetration in experimental acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 26, n. 2, p. 117-121, 2003.
- GONÇALVES, O. *et al.* Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Ocorrência de antibióticos em madeiras-de-lei do Brasil. **Rev Instit Antibiot**, v. 2, p. 19-33, 1959.

GOSCINSKI, G. *et al.* Endotoxin neutralization and anti-inflammatory effects of tobramycin and ceftazidime in porcine endotoxin shock. **Crit Care**, v. 8, n. 1, p. R35-R41, 2004.

GRAIG, W. A. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides, and linezolid. **Infect Dis Clin N Am**, v. 17, p. 479-501, 2003.

GUZIK, T.J. *et al.* Nitric Oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HARDY, C. D. COZZARELLI, N. R. Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to Novobiocin resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 941-947, 2003.

HEARD, S.O. *et al.* Multiple organ failure syndrome—Part I: Epidemiology, prognosis, and pathophysiology. **Intensive Care Med**, v. 6, p. 279-294, 1991.

HOESEL, L. M. & WARD, P. A. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. **Drug Discov Today**, v. 1, n. 3, p. 345-350, 2004.

HORN, D. L. *et al.* What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? Report on a symposium. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 851-8, 2000.

HOTCHKISS, R.S. & KARL, I.E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1546-1554, 2003.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol**, v. 53, n. 4, p. 503–514, 2002.

KARZAI, W. *et al.* Protection with antibody to tumor necrosis factor differs with similarly lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats. **Anesthesiology**, v. 99, p. 81-89, 2003.

- KIM, B. *et al.* Outcome of antibiotic therapy for third-generation cephalosporin-resistant Gram-negative bacteraemia: an analysis of 249 cases caused by *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* species. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, p. 106-111, 2003.
- KLUGMAN, K. P. Pneumococcal resistance to antibiotics. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, p. 171-196, 1990.
- KOCH, A. L. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 4, p. 673-687, 2003.
- KRAGSBJERG, P. *Et al.* Dynamics of blood cytokine concentrations in patients with bacteremic infections. **Scand J Infect Dis**; v. 8,p. 391-398, 1996.
- LEPPER, P.M. *et al.* Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. **Int Care Med**, v. 28, p. 824-833, 2002.
- LIMA NETO, D.A. *et al.* Atividade antimicrobiana das plantas arnica, bardana e tanchagem. **Folha Med (Br)**, v. 106, n. 3, p. 59-62, 1993.
- LUIKING, Y.C. *et al.* Sepsis: An arginine deficiency state? **Crit Care Med**, v. 32, n. 10, p. 2135-2145, 2004.
- LUIKING, Y.C. *et al.* The role of arginine in infection and sepsis. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 29, n. 1, p. 70-74, 2005.
- MAINARDI, J. *et al.* Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 35801-35807, 2002.
- MALOT, I. *et al.* Guidelines for the Manegement of Severe Sepsis and Septic Shock. **Int Care Med**, v. 27, p.3-9, 2001.

- MARIK, P.E. & RAGHAVAN, M. Stress – hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. **Intensive Care Med**, v. 30, p.748-756, 2004.
- METRANGOLO, L. *et al.* Early hemodynamic course of septic shock. **Crit Care Med**, v. 23, p. 1931-1975, 1995.
- MIMS, C.A. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Manole, 1995.
- MIRANDA, K. M. *et al.* A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.
- MONCADA S & HIGGS E A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **N Engl J Med**, v 329, p 2002-2012, 1993.
- MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 8^a ed. Washington: AMS Press, 2004.
- MYHRE, A. E. *et al.* Organ injury and cytokine release caused by peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1311-1317, 2004.
- NAKAMURA, L.T. & BARROS, I.C. Septicemia. **Prática Hospitalar**, v. 1, n. 2, p. 33 -36, 1986.
- NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement document M100-S14**. Pennsylvania USA, 2004.
- NOLLER, H. F. Structure of ribosomal RNA. **Ann Rev Biochem**, v. 53, p. 119-162, 1984.
- OPAL, S.M. *et al.* Clinical Gram-positive sepsis: Does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? **Crit Care Med**, v. 27, p. 1608-1616, 1999.
- PARRILLO, J.E. Patogenic mechanism of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

- PARRILO, J.E. *et al.* Septic shock in humans. Advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. **Ann Int Med**, v. 113, p. 227-242, 1990.
- PERITI, P. *et al.* New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. **Int J Antimicrob Agents**, v. 12, p. 97-105, 1999.
- PETER, K. *et al.* Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. **Cardiovasc Res**, v. 60, p. 49-57, 2003.
- PINSKY, M.R. *et al.* Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. **Chest**, v. 103, n. 2, p. 565-575, 1993.
- RANGEL-FRAUSTO, M. *et al.* The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **JAMA**, v. 273, p. 117-123, 1995.
- SACHS, A. *et al.* Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. **Cell**, v. 89, p. 831-838, 1997.
- SCHWENTKER, A. *et al.* Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 7, p. 1-10, 2002.
- SINGH, G.S. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheems, oxacephem, penams and sulbactam. **Mini Rev Med Chem**, v. 4, n. 1, p. 93-109, 2004.
- SMITH, P.F. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam and tobramycin in hospitalized patients. **Clin Ther**, v. 23, n. 8, p. 1231-1244, 2001.
- SNYDER, S H & BREDT, D S . Biological role of nitric oxide. **Science Am**, v 266, p 266-68, 1992.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3ªed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TSUJI, M. *et al.* Antimicrobial-induced release of endotoxin from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of *in vitro* and animal models. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, p. 353-359, 2003.

VADE-MÉCUM. Disponível em: <<http://www.prvademecum.com>>. Acesso em: 08 de julho de 1999.

van der BERGHE, G. *et al.* Intensive insulin therapy in critically ill patients. **N Engl J Med** v. 345, p. 1359-1367, 2001.

van der BERGHE, G. *et al.* Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: insulin dose versus glycemic control. **Crit Care Med**, v. 31, p. 359-366, 2003.

WAGA, S. *et al.* The DNA replication fork in eukaryotic cells. **Ann Rev Biochem**, v. 67, p. 721-751, 1998.

WEXLER, H. M. *et al.* In vitro activity of cefotetan compared with that of other antimicrobial agents against anaerobic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, p. 601-604, 1988.

WHEELER, A. P. & BERNARD, G.R. Treating Patients with Severe Sepsis. **N Engl J Med**, v. 340, p. 207-214, 1999.

WU, P. C. *et al.* The characterization and biodistribution of cefoxitin-loaded liposomes. **Int J Pharm**, v. 271, n. 1-2, p. 31-39, 2004.

3. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito dos antibióticos β -lactâmicos e da *L*-arginina na sobrevida de ratos sépticos.
- Determinar o efeito dos antibióticos β -lactâmicos e da *L*-arginina na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em ratos sépticos.
- Avaliar a ação dos antibióticos β -lactâmicos e da *L*-arginina na produção de óxido nítrico em ratos sépticos.
- Avaliar a ação dos antibióticos β -lactâmicos e da *L*-arginina sobre a concentração sérica de glicose em ratos sépticos.

4. ARTIGO – Effects of β -lactams antibiotics and *L*-arginine in the treatment of experimental sepsis.

Denise P. Machado, MD; Rossana E. Ruschel, MD; Fernanda Bordignon Nunes, PhD; Melissa G.S. Pires, PhD; Luis D'Avila, MD; Aline A. da Cunha, MD; Vasyl C. Saciura, MD; José A. T. Poloni, MD; Carlos E. Leite, MD; Adroaldo Lunardelli, MD; José Carlos Farias Alves Filho, MD; Fernando de Q. Cunha, PhD; Fernando S. Dias, MD; Carlos E. Poli de Figueiredo, MD; Jarbas R. de Oliveira, PhD.

Versão enviada para a revista *Critical Care Medicine*

Abstract

Objective: The aim of this research was to investigate the impact of different β -lactam antibiotics and *L*-arginine treatment in septic rats.

Design: Controlled experimental study.

Setting: University experimental laboratory

Interventions: Five experimental septic groups were tested. Six hours after the procedures, the rats received a single intramuscular injection of the following treatments: ceftriaxone; aztreonam; ceftriaxone plus *L*-arginine; and *L*-arginine. The septic control group did not receive any treatment.

Measurements and main results: While all the animals in the septic control group and in the group treated with *L*-arginine died, the survival rates of the groups which received antibiotic were significantly greater. The animals treated with antibiotics presented significantly lower bacterial counts in the peritoneal liquid in comparison with septic control group. We did not find significant differences in the serum levels of $\text{TNF}\alpha$. Serum levels of nitrite and nitrate and $\text{IL1}\beta$ were significantly increased in the group treated with ceftriaxone+*L*-arginine when compared to the septic control group. The levels of IL10 were significantly elevated in the animals of groups treated with ceftriaxone+*L*-arginine and aztreonam comparing with the septic control group. The septic group treated with *L*-arginine presented significantly increased in glucose concentrations in comparison with the septic control group.

Conclusion: The treatment with antibiotics can enhance the survival regardless of the *L*-arginine presence.

Key-words: sepsis, β -lactam antibiotics, *L*-arginine, inflammatory mediators.

INTRODUCTION

Sepsis is defined as a systemic response to an infection, caused by the invasion of a large number of microorganisms or their toxins in the blood circulation (1, 2). When this syndrome results in hypotension and organ dysfunction, it is called septic shock (3). Septic shock is the most common cause of death in intensive care units (3-5). It occurs in 750.000 patients per year in the US with a mortality rate currently 30-70% (4, 6-8).

The hemodynamic alterations that occur during the clinical course of septic shock are attributable to the lipopolysaccharide (LPS) released by the gram-negative bacteria. It seems to be a crucial pathogenic factor in septic shock, unchaining the cascade of inflammatory mediators and disturbing the microcirculation in many organs (2).

It has been shown that in the septic process there is a significant increase in the interleukins (notably tumor necrosis factor- α and interleukin-6) (4, 9, 10) that trigger inducible nitric oxide synthase (iNOS), that generates nitric oxide (NO) from the aminoacid *L*-arginine in high quantity. It is known that NO is a potent vasodilator and that it causes vascular relaxation and consequently shock (10-13). This leads to an insufficiency of oxygen in the tissues, which induces anaerobic glycolysis, a decrease of cellular adenosine-5-triphosphate (ATP), and increase of lactic acid (lactic acidosis), and cellular damage (2, 11). Some studies described that changes in arginine metabolism are present in sepsis and arginine availability is probably limited leading to a arginine-deficiency state, suggesting that arginine supplementation is a logical option in treatment of sepsis (2, 14).

Antibiotic chemotherapy has been the major method for treating septic patients for many decades (15). However, it has become apparent that antibiotics may also play a role in

the pathophysiological immunologically active components of the bacterial cell wall during destruction of the microorganism (8-10).

Some studies reported that different classes of antibiotics vary in the rates and amounts of LPS release through different modes of bactericidal action (16, 17).

Among the studies on antibiotic-induced LPS release from gram-negative bacteria, attention has focused on cell wall-active β -lactams. LPS release by this component correlated well with the variances in affinities for binding to, and inhibition of, penicillin-binding proteins (PBP1, PBP2, PBP3) (8, 15, 18). Inhibition of PBP1 results in rapid bacterial lyses, while inhibition of PBP2 causes the formation of spheroplasts. Antibiotics that convert gram-negative bacteria into spheroplasts are: carbapenems, ceftriaxone, cefepime and glycopeptides (8, 18, 19). Inhibition of PBP3 by antibiotics such ceftazidime and aztreonam, in contrast, leads to the formation of extended bacterial filaments. It has been reported that filamentous cells release significantly higher amounts of LPS than spheroplasts (8, 15, 18, 19).

Some studies suggest that hyperglycemia may potentiate the pro-inflammatory response in sepsis (20). Recent provocative data suggest that tight glycaemic control with insulin may restore the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators and improve the outcome of critically ill patients (20, 21).

In the study reported here, we investigated the impact of different β -lactam antibiotics (ceftriaxone and aztreonam) on the release of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL10 , nitrite and nitrate and glucose in serum of septic rats. Furthermore, it was evaluated the survival of the animals and was measured the bacterial content in peritoneum fluid. It was observed that aztreonam has in its constitution *L*-arginine, the precursor of NO, that could make worse the treatment of

septic patients. The parameters described above also were measured in a group treated only with *L*-arginine.

MATERIALS AND METHODS

Animals: The animals were cared for and used in accordance with the *Guiding Principles in Care and Use of Animals* approved by the Council of American Physiologic Society. Male *Wistar* rats 220g (± 20 g) were submitted to a 12 hours light/dark cycle.

Sepsis: Animals were anesthetized with 50 mg/kg of pentobarbital intraperitoneally. The abdomen of each animal was shaved and cleansed with povidine-iodine solution. A 2 cm midline abdominal incision was made to expose the *linea alba* and a gelatin capsule with fecal sterile content and a suspension of *Escherichia coli* (*E. coli*) was introduced in the peritoneum cavity. This suspension was stored in autoclaved skimmed milk on glass beads at -80°C . Each week, a bead was inoculated into trypticase soy agar and incubated overnight at 37°C . The culture was passed daily for use the next day. Each day, a representative colony was transferred into 10 mL of nutrient broth and incubated at 37°C for 2 h, and diluted in pyrogen-free phosphate-buffered saline to yield a concentration of 1.5×10^9 colony-forming units/mL (22).

Six hours after the procedures, rats received a single intramuscular injection of the following treatments: ceftriaxone (Bristol-Myers Squibb Brasil) (n=7) 50 mg/kg; aztreonam (Bristol-Myers Squibb Brasil) (n=7) 50 mg/kg; ceftriaxone (n=7) 50 mg/kg plus *L*-arginine (Sigma St Louis, MO, USA) 39 mg/kg; *L*-arginine (n=7) 39 mg/kg. The control group did not receive any treatment.

Survival rate: After the procedures all animals were then returned to their cages with free access to food and water. Rats were continuously monitored and followed up for 6 days after sepsis induction to assess the survival. After 6 days the animals that survived were killed by decapitation.

Number of bacteria in peritoneal cavities: Twelve hours after the induction of sepsis and 6 h after the administration of the antibiotics or *L*-arginine, the rats were killed and the peritoneal cavities washed with sterile saline. For peritoneal lavage, the skin of the abdomen was cut open in the midline after thorough disinfection and without injury to the muscle. Sterile PBS buffer (10 mL) was injected into and aspirated out of the peritoneal cavities. Aliquots of serial log dilutions of these peritoneal lavage fluids were plated on Mueller-Hinton agar dishes (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England); colony-forming units were counted after overnight incubation at 37°C, and the results were expressed as the number of colony-forming units (CFU) (23).

Cytokine, nitrate and nitrite, glucose measurements: Twelve hours after the induction of sepsis and 6 h after the administration of the antibiotics or *L*-arginine, the rats were killed and the blood were collected for the measurements.

The concentration of TNF α , IL1 β and IL10 in the serum were determined by using a double-ligand ELISA. Briefly, each well of flat-bottomed 96-well microtiter plates was coated with 100 μ L of antibody specific to one of the above cytokines at a dilution of 2 μ g/mL (TNF α and IL1 β) or 1 μ g/mL (IL10) in coating buffer and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed, and nonspecific-binding was blocked for 120 min at 37°C with 1% bovine serum. Samples and standards were loaded into plates. Recombinant murine (rm) TNF α , IL1 β and IL10 standard curves were used to calculate the cytokine concentrations. The plates were

thoroughly washed, and the appropriate biotinylated polyclonal or monoclonal anti-cytokine antibody was added. After 1 h, the plates were washed, avidin-peroxidase (diluted 1:5000) was added to each well for 15 min, and each plate was thoroughly washed again. Next, substrate (0.4 mg of o-phenylenediamine and 0.4 μg of H_2O_2 in 1 mL of substrate buffer) was added, the reaction was stopped with H_2SO_4 (1 M), and the optical density (OD) was measured on an ELISA plate scanner (Spectra Max 250, Molecular Devices, Menlo Park, CA) at 490 nm. The results were expressed as picograms of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ and IL10 per milliliter of the serum supernatant, comparing the OD in the samples with standard curves.

The nitrate concentrations in serum samples were determined by enzymatically reducing nitrate to nitrite with nitrate reductase, as previously described (20). Briefly, 40 μL of non-diluted serum samples was incubated with the same volume of reductase buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7,5 containing 1 mM NADPH, 10 mM FAD, and 4 U of nitrate reductase/mL) for 20 hours at 37°C. A standard nitrate curve was performed by incubating sodium nitrate (1 to 200 μM) with the reductase buffer. The total amount of nitrite was then determined by the Griess method (21). Absorbance at 550 nm was determined with a plate reader (Spectra Max 250-Molecular device, Sunnyvale, CA). The results are reported as micromolar (μM) amounts of $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$.

Blood glucose concentration was determined by a commercial assay kit (Glucose PAP Liquiform – Labtest Diagnóstica S. A., Brazil), and the results were obtained spectrophotometrically at 505 nm.

Statistical analysis: Data analysis was performed using the SPSS v. 11.5.0 software (SPSS Inc. USA), considering “*P*” value less than 0.05 as significant. Parametric data were evaluated by One-Way ANOVA using Dunnett post-hoc to determine de differences between

the control group and the experimental groups. Non parametric data were evaluated through Kruskal-Wallis and Man-Whitney analysis. Survival functions was determined using Kaplan-Meier procedure, with Log-Rank test for significance.

RESULTS

Survival functions of the animals in the experimental groups

Antibiotics represent the most commonly used treatment for bacterial infection. In order to verify the efficacy of these drugs in an experimental model of sepsis, we evaluated the survival of animals in different treated or untreated groups. While all the animals died in the septic control group and the septic group treated with L-arginine, in the groups that received treatment with the antibiotics aztreonam, ceftriaxone, and ceftriaxone+L-arginine, the survival rates were significantly greater, with values of 71%, 85% and 100%, respectively (Figure 1). Thus, these results demonstrate the efficacy of these drugs in the treatment of sepsis.

Quantification of bacteria in the peritoneal liquid

As the model of sepsis used to induce sepsis in this experiment involved the introduction of a capsule containing bacteria into the abdominal cavity, the viable bacteria were quantified in the peritoneal liquid. The animals treated with ceftriaxone, aztreonam and ceftriaxone+L-arginine presented significantly lower bacterial counts in comparison with septic control ($P<0.002$, $P<0.009$, $P<0.002$, respectively). No significant difference was found between the group treated with L-arginine and the septic control group (Figure 2).

Serum nitrite and nitrate levels

Nitric oxide is a powerful vasodilator that is found in increased volumes in the plasma of individuals with sepsis. In order to evaluate the effect of β -lactams antibiotics in

the treatment of this syndrome, the serum concentrations of nitrite and nitrate, were evaluate which can reflect the production of nitric oxide. The serum nitrite and nitrate levels were only found to be significantly increased ($P=0,001$) in the group treated with ceftriaxone+*L*-arginine when compared with the septic control (Figure 3). In the other groups there were no significant statistical differences.

Serum TNF α levels

One of the inflammatory mediators released after the initiation of the infectious process is TNF α . The serum levels of this mediator in the animals in the groups treated with ceftriaxone, aztreonam, ceftriaxone+*L*-arginine and *L*-arginine were not increased when compared with those of septic control (Figure 4).

Serum IL1 β levels

Another inflammatory mediator released during inflammation is IL1 β . It was observated a significant increase of IL1 β levels ($P<0,001$) in the group treated with ceftriaxone+*L*-arginine when compared to the septic control. In the other groups there were no significant differences when compared with septic control (Figure 5).

Serum IL10 levels

IL10 is known to be a cytokine with anti-inflammatory action that may be found in increased in systemic infections. The levels of IL10 were significantly enhanced in the animals of groups treated with ceftriaxone+*L*-arginine ($P<0,001$) and aztreonam ($P=0,039$) in comparison with the septic control group. In the other groups there were no significant statistical differences (Figure 6).

Serum glucose levels

In order to assess a possible role for glucose as an inflammatory marker, the serum glucose concentrations of animals from different groups were determined. The septic group treated with *L*-arginine presented significantly increased concentrations ($P=0,004$) in comparison with the septic control. In the other groups there were no significant statistical differences when compared with the septic control (Figure 7).

DISCUSSION

The introduction of new antimicrobial agents in the treatment of sepsis has reduced the mortality rate in patients with gram-negative bacteria induced septic shock, though the rate still remains high (10, 24). Several authors have suggested that the high mortality rate with sepsis may be the result of the LPS release, which can be accentuated by the use of β -lactams antibiotics. These, it is known, act by destroying the bacterial cell wall, so increasing the release of LPS and consequently the systemic inflammatory response, leading the individual to shock and multiple organ dysfunction (8, 18, 19, 25).

In analyzing the formulation of antibiotics used in this study, it was noted that aztreonam has *L*-arginine in the formulation, which is used as a buffer. As *L*-arginine is a NO precursor, a powerful vasodilator, the possibility that this quantity of *L*-arginine could have an influence on the septic condition was investigated. As there is no formulation of aztreonam without *L*-arginine, the same concentration was added to another antibiotic without this aminoacid in the formulation. The antibiotic used in this experiment was ceftriaxone. In order to evaluate only the effect of the *L*-arginine on the septic condition, we administered this aminoacid to a group of animals.

To evaluate the efficacy of the treatments used in this study we initially analyzed the survival of the animals after they had been submitted to sepsis. Increased survival was obtained in all the groups treated with antibiotics, and reached 100% in the group that received ceftriaxone+*L*-arginine. The mortality in the septic control group rate was 100%, as observed to the group that received only *L*-arginine, demonstrating that this substance did not present an adequate therapeutic effect, which led to the high mortality rate (Figure 1). Regarts to *L*-arginine, our studies differed from that carried out by Poeze *et al.*, in which sepsis was induced in pigs that received a continuous infusion of arginine, and showed improved blood perfusion, reduced pulmonary artery pressure and an increase in the metabolism of proteins in the hepatic and muscular tissues, leading to an increase in survival among the animals (26).

In the groups treated with antibiotics ceftriaxone, aztreonam and ceftriaxone+*L*-arginine, where survival was increased, a significant reduction in the bacterial count in the peritoneal liquid from the animals was observed 6 hours after the administration of the antibiotics. However, in those animals treated only with *L*-arginine, the bacterial count remained the same as that of the untreated animals (Figure 2). These data indicate that antibiotics, whatever their action mechanism, are still the most efficient mechanisms of controlling bacterial infections.

Several authors have discussed the importance of *L*-arginine in sepsis, as recent studies have shown that serum concentrations of this aminoacid in patients with severe inflammatory diseases are decreased, because the catabolism is higher than the anabolism (27, 28). In sepsis, demand for arginine is increased for the synthesis of acute phase proteins, and mainly for the production of NO (14). Arginine is the only substrate for the synthesis of NO, which is increased in sepsis due to the intense activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS). The latter being an independent calcium enzyme present in phagocytary, muscular

and endothelial cells that, when stimulated by LPS and cytokines, produces large quantities of NO (12, 14). Upon analyzing our findings, the hypothesis that the *L*-arginine present in the antibiotics could have some influence on the condition due the enhanced NO production, was not proven. The only group that presented increased serum nitrite and nitrate levels was the ceftriaxone+*L*-arginine treated group, suggesting that the combination of the antibiotic and the *L*-arginine may lead to greater release of nitrate and nitrate (NO) (Figure 3).

Despite the obvious importance of the use of antibiotics in managing sepsis, there may be a correlation between them and the physiopathology of this syndrome, given that they release immunologically active components from the bacterial cell wall during the destruction of the microorganism. These components from the cell wall lead to the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (8, 29).

Of particular note among the pro-inflammatory cytokines directly involved in sepsis is TNF α , which is the first mediator to have its levels increased in inflammatory diseases, as demonstrated by Waage *et al.* and Grau *et al.*, in results obtained with patients with sepsis provoked by meningococcus and severe malaria respectively (30, 31). However, TNF α has a dual behavior. When produced at the infection site, it acts as an antimicrobial agent, as shown in the study carried out by Rijneveld *et al.* that assessed the survival of mice after induce pneumonia and later treatment with ceftriaxone, ceftriaxone+anti-TNF α and only anti-TNF α . In the group that received only anti-TNF α , the mortality rate was 100% and in the group received that received ceftriaxone survival was 60%, while in the group that received ceftriaxone+anti-TNF α it was 40%, showing that TNF α is important in the combat of infection, mainly when used with ceftriaxone (32). However, its systemic release may cause cell damage to the host, as has been shown in some studies where anti-TNF α was used, that

prevented death in the fatal sepsis (33). $\text{TNF}\alpha$ can stimulate the synthesis of the iNOS enzyme and consequently, NO release, which causes vasodilatation and hypotension during septic shock (34). The study developed by Kragstjerg *et al.* (2003), showed an increase in the levels of $\text{TNF}\alpha$ when monocytes were incubated with the supernatant of LPS of *E.coli* and antibiotics that acted on different PBPs. The levels of $\text{TNF}\alpha$ were significantly higher when used an antibiotic that acts on the PBP3 in comparison with that which acts on PBP2 (35). In our study, there was no significant difference in the serum $\text{TNF}\alpha$ levels between the groups that received aztreonam, which acts on the PBP3, and ceftriaxone, which acts on the PBP2, in relation to the septic control group, indicating that the release of $\text{TNF}\alpha$ in the septic control was the same as that in the groups treated with antibiotics (Figure 4).

Like $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ is also high during the initial stages of inflammatory response. It is involved in the producing fever and like $\text{TNF}\alpha$, stimulates the production of acute phase proteins by the liver: reactive C protein, fibrinogens, etc (36, 37). A study by Gill *et al.* showed that $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$ in combination with LPS, can stimulate the iNOS enzyme and *L*-arginine uptake, increasing the accumulation of nitrite in cell culture (38).

When analyzing our results we observed an increase in the levels of $\text{IL1}\beta$ (Figure 5) in septic animals treated with ceftriaxone+*L*-arginine, which acts on PBP2. This data challenges some studies that showed there to be greater release of pro-inflammatory mediators when use is made of antimicrobial agents that act on PBP3 (35). As mentioned earlier, the group that received treatment with ceftriaxone+*L*-arginine, presented a significant increase in the production of nitrite and nitrate. Based on these data it is possible to suggest that there was an increase in iNOS stimulation and/or an increase in *L*-arginine uptake by the cationic aminoacid transporter of *L*-arginine CAT2B, which is enhanced as a consequence of the

increase in IL1 β (38). Given this, it is suggested that the increase in nitrite and nitrate in this group be due to the higher levels IL1 β .

Together with the release of pro-inflammatory mediators, there is an attempt to controlling the immune response through the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL10. Normally it provokes a process of “downregulation” of the initial inflammatory response, having a protective effect in lethal and sub-lethal endotoxemia in mice, and is found to be increased within 2 to 5 hours after the initiation of the inflammatory response (39,40). The study carried out by Poll *et al.* showed that the administration of IL10, together with *Streptococcus pneumoniae* in the induction of pneumonia, increased mortality of this group by inhibiting the initial inflammatory response (39). While Wang *et al.* showed that when the IL10 is administered together with ceftriaxone, in a period after the induction of pneumonia, survival increased in comparison with groups that received only ceftriaxone or IL10 (40). In our research there was a significant rise in the serum IL10 concentrations in the septic groups treated with ceftriaxone+ *L*-arginine and treated with aztreonam (Figure 6). Our results show that IL10 is increased significantly in those groups in which the antibiotic contains *L*-arginine, suggesting that this aminoacid, in some way, stimulates an anti-inflammatory response. Therefore, when analyzing the levels of IL1 β , nitrite and nitrate, and IL10, it is possible to observe, that the IL1 β and nitrite and nitrate are only increased in the ceftriaxone+*L*-arginine group, showing a potentializing effect of *L*-arginine in the inflammatory process, leading to suggestion that the concomitant increase in IL10 in this group may be due to an attempt to control this process.

Glucose has also been shown to be a very important pro-inflammatory marker (20). Studies report that hyperglycemia may have some influence in the production of pro-

inflammatory cytokines (41) and that the use of high doses of insulin in experimental sepsis reduces the levels of TNF α and IL6 (42). However, our results do not corroborate those found in the literature. The serum glucose levels were found to be significantly increased in the septic group treated with *L*-arginine, but there was no correlation with the pro-inflammatory cytokines (Figure 7).

Although a number of studies have shown that the use of antibiotics in the treatment of sepsis may lead to enhanced release of endotoxins and, consequently, higher production of cytokines and NO, generating the dysfunction of multiple organs, our study showed that the antibiotics, besides not increasing the release of TNF α , IL1 β and serum concentrations of glucose, significantly improved the survival of the rats.

We also observed that, although some authors recommend the use of *L*-arginine in the treatment of sepsis, that this aminoacid did not have a positive influence on the septic condition and failed to raise the survival rate of the animals. However, when *L*-arginine is administered together with antibiotics, they generate an enhanced anti-inflammatory response, displayed by the increase in IL10 that can be extremely beneficial in the treatment of sepsis.

REFERENCES

1. Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, *et al*: Sepsis: An arginine deficiency state? *Crit Care Med* 2004; 32(10):2135-2145.
2. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCF, *et al*: Physiological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-biphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30(9):2069-2074.
3. Parrilo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 20:1471-1477.

4. Hoesel LM, Ward PA: Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discov Today* 2004; 1(3):345-350.
5. Salvo I, Cian W, Musicco M, *et al*: The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock *Intensive Care Med* 1995; 21:244-249.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, *et al*: Epidemiology of severe sepsis in the United States : Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1303-1309.
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, *et al*: The Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.
8. Lepper PM, Held TK, Schneider EM, *et al*: Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 2002; 28:824-833.
9. Peters K, Unger RE, Brunner J, *et al*: Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res* 2003, 60:49-57.
10. Hotchkiss RS, Karl IE: The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2):138-150.
11. Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of Vasodilatory Shock. *N Engl J Med* 2001; 345(8):588-595.
12. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329 (27):2002-2012.
13. Ignarro LJ: Nitric oxide as a unique signaling molecular in the vascular system: A historical overview. *Journal of Physiology and Pharmacol* 2002; 53(4):503-514.
14. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, *et al*: The Role of arginine in infection and sepsis. *J Parenter Nutr* 2005; 29(1):70-74.

15. Cui W, Lei MG, Silverstein R, *et al.*: Differential modulation of the induction of inflammatory mediators by antibiotics in mouse macrophages in response to viable Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Research* 2003; 9(4):225-236.
16. Simon DM, Koenig G, Trenholme GM: Differences in release of TNF from THP-1 cells stimulated by filtrates of antibiotic-killed *E.coli*. *J Infect Dis* 1991; 164: 800-802.
17. Dofferhoff ASM, Nijland JH, de Vries-Hospers HG, *et al.*: Effects of different types and combinations of antimicrobial agents on endotoxin release from Gram-negative bacteria in vitro and in vivo study. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 745-754.
18. Periti P, Mazzei T: New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12:97-105.
19. Ginsburg I: Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet* 2002; 2: 171-179.
20. Marik PE, Raghavan M: Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med* 2004; 30: 748-756.
21. Andersen SK, Gjedsted J, Christiansen C, *et al.*: The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2004; 75:413-421.
22. Nelson D, Kuppermann N, Fleisher GR, *et al.*: Recombinant endotoxin neutralizing protein improves survival from *E.coli* sepsis in rats. *Crit Care Med* 1995; 23:92-98.
23. Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ: Role of Nitric Oxid in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 2000; 182:214-223.
24. Frieling JTM, Mulder JA, Hendriks T, *et al.*: Differential induction of pro-and anti-inflammatory cytokines in whole blood by bacteria: effects of antibiotic treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(7):1439-1443.

25. Simpson AJH, Opal SM, Angus BJ, *et al*: Differential antibiotic-induced endotoxin release in severe Melioidosis. *J Infect Dis* 2000; 181:1014-1019.
26. Poeze M, Bruins MJ, Vriens I, *et al*: Selective iNOS inhibition decreases in vivo NO production but increases mortality during porcine endotoxaemia [abstract]. *Intensive Care Med* 2001; 27(Suppl):S43.
27. Garcia-Martinez C, Llovera M, Lopez-Soriano FJ, *et al*: The effects of endotoxin administration on blood aminoacid concentrations: Similarities with sepsis. *Cell Mol Biol* 1993; 34:537-342.
28. Bruins MJ, Lamers WH, Meijer AJ, *et al*: In vivo measurement of nitric oxide production in porcine gut, liver and muscle during hyperdynamic endotoxaemia. *Br J Pharmacol* 2002; 137:1225-1236.
29. Nooteboom, van der Linden C, Hendriks T: Whole blood-mediated endothelial permeability and adhesion molecule expression: a model study into the effects of bacteria and antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:150-156.
30. Waage A, Halstensen A, Espevit T: Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987; 1(8529): 355-357.
31. Grau GE, Heremans H, Piquet PF, *et al*: Monoclonal antibody against interferon gama can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(14):5572-5574.
32. Rijneveld AW, Florquin S, Hartung T, *et al*: Anti-tumor necrosis factor antibody impairs the therapeutic effect of ceftriaxone in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2003; 188:282-285.

33. Hinshaw LB, Tekamp-Olson P, Chang AC, *et al.* Survival of primates in LD100 sepsis shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF alpha). *Circ Shock* 1990; 30:279-92.
34. Weitzberg E: L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49:434-436.
35. Kragstjerg P, Holmberg H, Vikerfors T: Dynamics of blood cytokine concentrations in patients with bacteremic infections. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:391-398.
36. Friedland JS, Porter JC, Daryanani S *et al.* Plasma proinflammatory cytokine concentrations, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE III) scores and survival in patients in an intensive care unit. *Crit Care Med* 1996 24(11):1755-1781.
37. Damas P, Canivet JL, de Groote D *et al.* Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med* 1997 25(3): 405-412.
38. Gill DJ, Low BC, Grigor MT: Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate the *cat-2* gene of the L-arginine transporter in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271(19):11280-11283.
39. Van der Poll T, Marchant A, Keogh CV, *et al.* Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1996; 174: 994-1000.
40. Wang E, Simard M, Ouellet N, *et al.* Modulation of cytokines and chemokines, limited pulmonary vascular bed permeability, and prevention of septicemia and death with ceftriaxone and interleukin-10 in pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2000; 182:1255-1259.
41. Esposito K, Nappo F, Marfella R, *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106:2067-2072.

42. Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, *et al*: Euglycemic piperinsulinemia attenuates endotoxin-induced systemic TNF- α and glucagon release in pigs [abstract] European Federation of Endocrine Societies, 6th European Congress of Endocrinology, Lyon, France 2003.

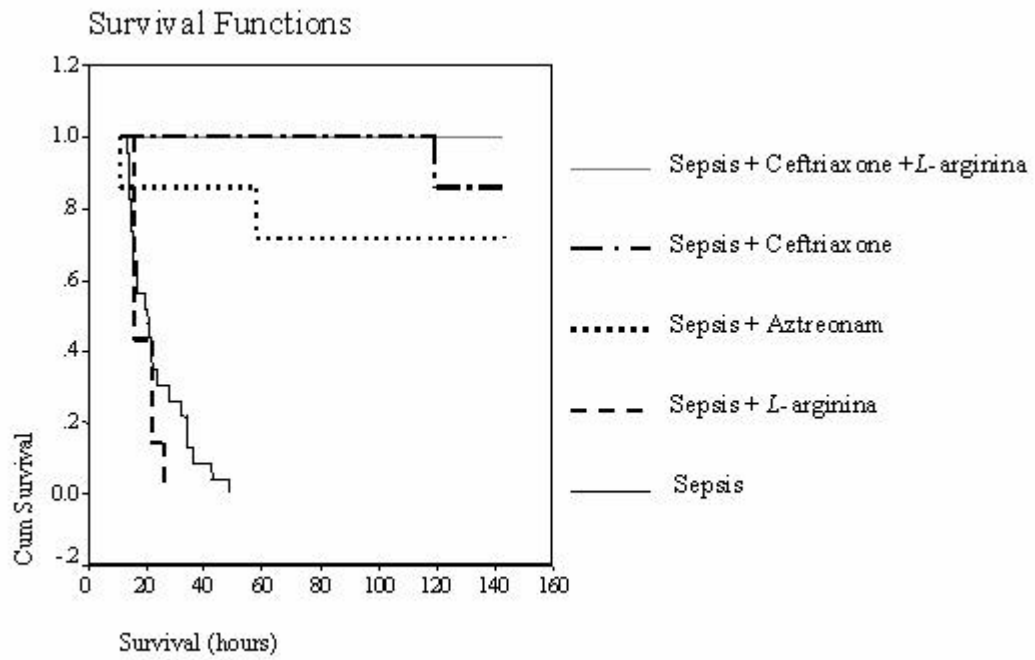


Figure 1. Survival curve of the experimental groups (n=7). Log-rank $P < 0.05$.

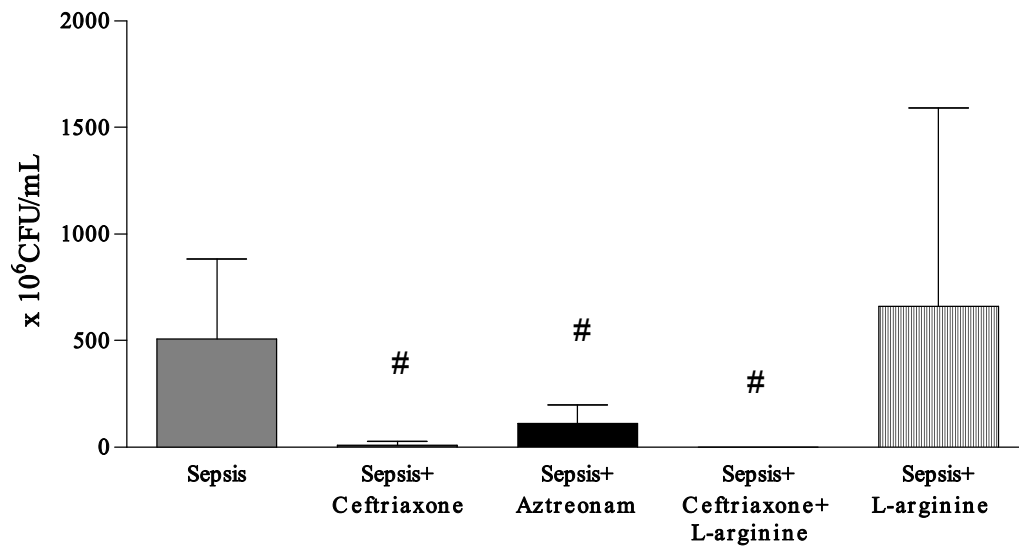


Figure 2. Number of bacteria in peritoneal cavities in experimental groups (n=7). Values are mean \pm SD. #P<0.05 compared with septic group (Kruskal Wallis-Man-Withney test).

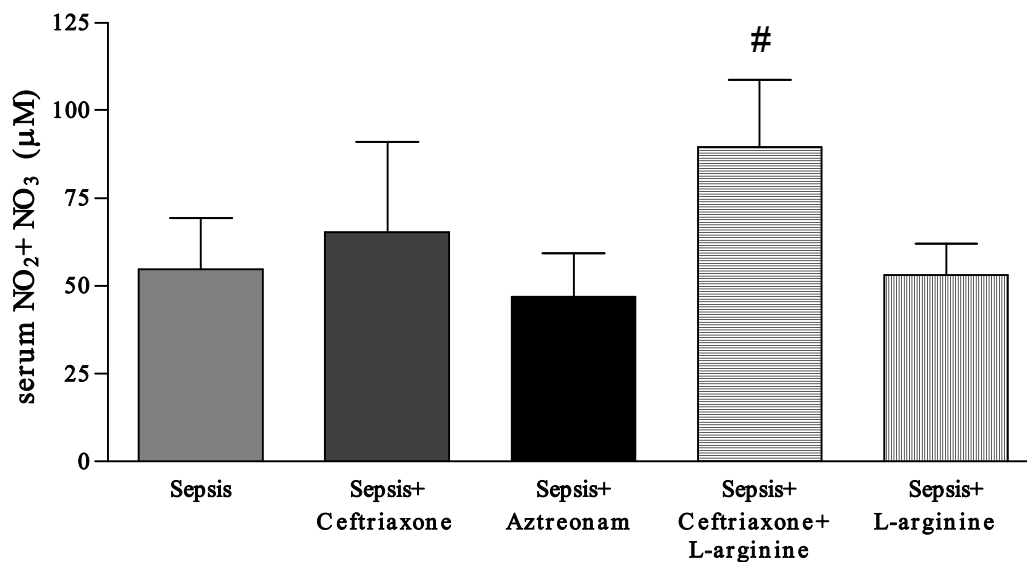


Figure 3. Nitrite and nitrate of serum in experimental groups (n=6). Values are mean \pm SD. [#]P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).

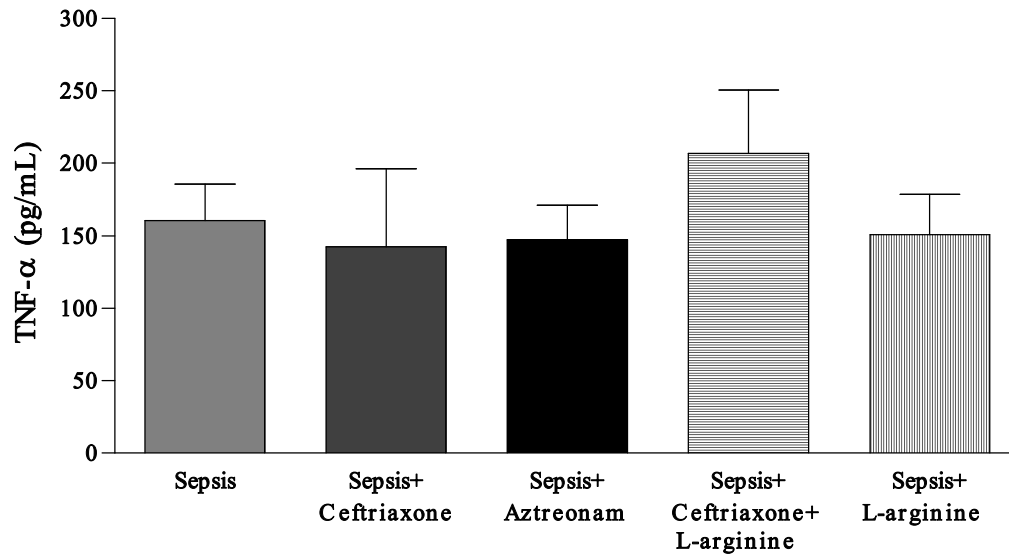


Figure 4. TNF α of serum in experimental groups (n=6). Values are mean \pm SD (ANOVA- Dunnett test).

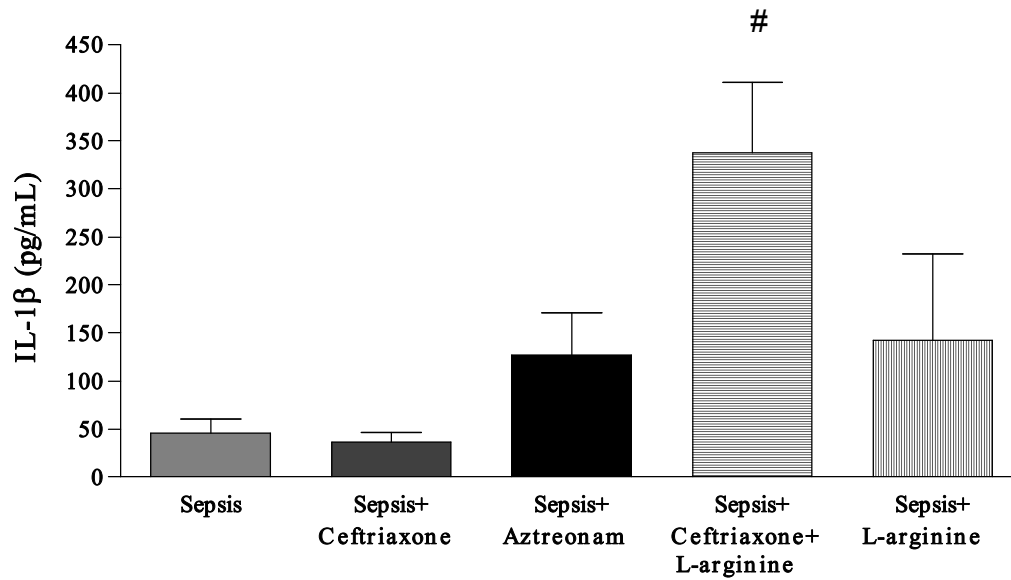


Figure 5. IL-1 β of serum in experimental groups (n=4). Values are mean \pm SD.

[#]P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).

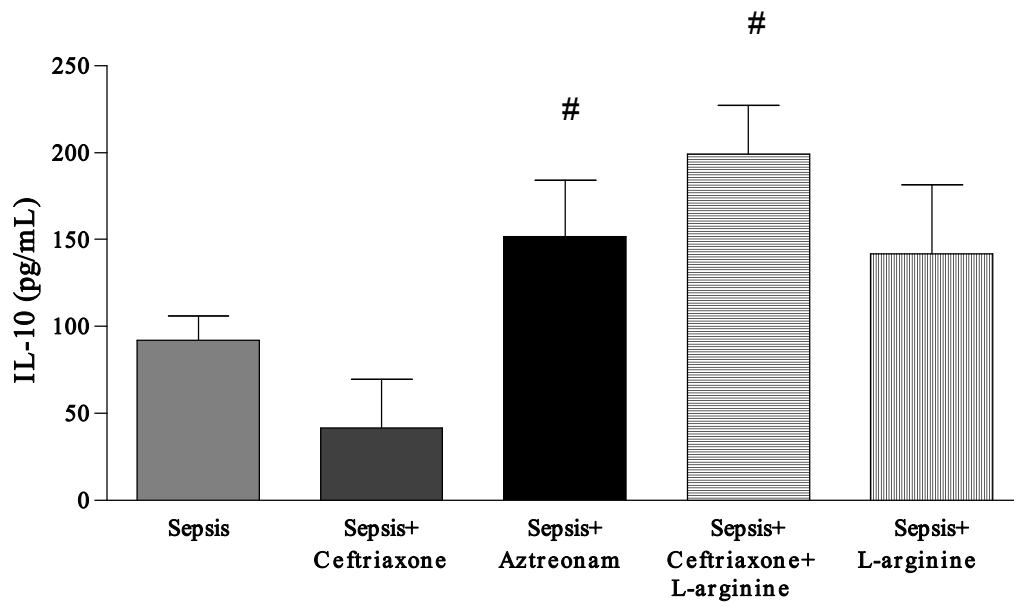


Figure 6. IL-10 of serum in experimental groups (n=5). Values are mean \pm SD.

#P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).

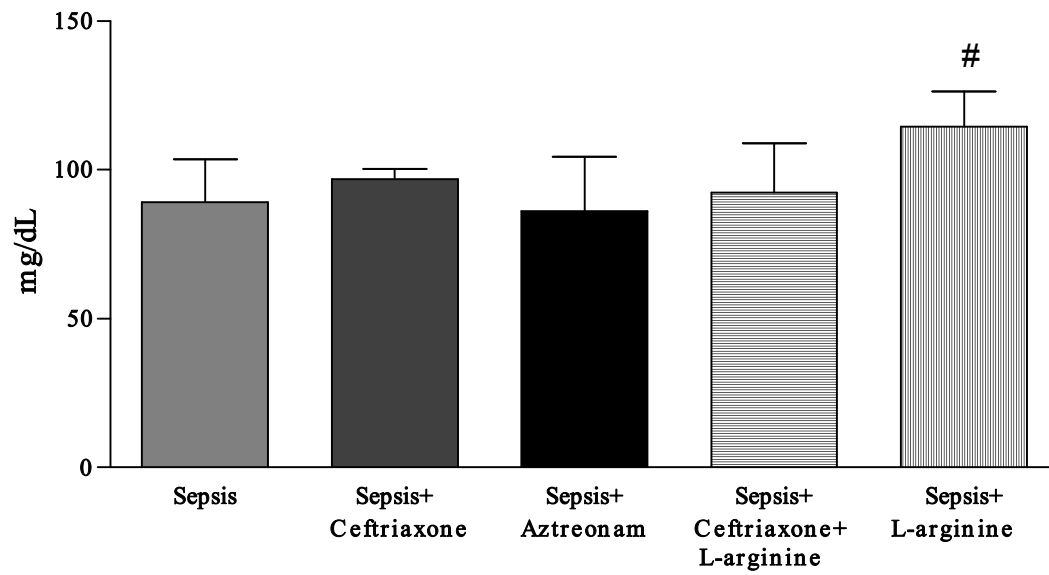


Figure 7. Glucose of serum in experimental groups (n=7). Values are mean \pm SD.

[#]P<0.05 compared with septic group (ANOVA- Dunnett test).

5. DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

16/06/05 21:01

Data:

De: journals@sccm.org [Bloquear endereço](#)

Para: denpires@terra.com.br

Assunto: Critical Care Medicine: Manuscript CCM-00854-2005

June 16th, 2005

Dear Dr. Machado:

This e-mail is to inform you that the following manuscript for which you are a contributing author has been submitted for consideration for publication in Critical Care Medicine.

Manuscript Number: CCM-00854-2005
Manuscript Title: Effects of b-lactams antibiotics and L-arginine in the treatment of experimental sepsis.

Please make a note of this manuscript number, as it will be referred to in all future correspondence. As a co-author to this manuscript, and not the corresponding author, you will not have access to this manuscript in Manuscript Central. You will need to contact the corresponding author to find out the status.

If you have not already done so, please send us signed FINANCIAL DISCLOSURE FORMS from each of the contributing authors. Please note this form must be completed even if an author has no financial disclosures. This form is located in "Instructions and forms" in Manuscript Central.

This manuscript will be sent to the Editor-in-chief, Dr. Joseph Parrillo, for peer review. Initial editorial reviews are usually completed within eight weeks of manuscript submission. Last year, approximately 25% of the original manuscripts submitted to the journal for publication were accepted.

If you have received this message in error, or if one of your co-authors did not receive this message, please contact us using the information given below.

Thank you for your interest in Critical Care Medicine. We appreciate the opportunity to review your manuscript.

Sincerely,

Lynn Retford
Managing Editor
Society of Critical Care Medicine
E-mail: journals@sccm.org
Telephone: 847-827-6869
Fax: 847-827-6886

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.
Scan engine: McAfee VirusScan / Atualizado em 16/06/2005 / Versão: 4.4.00 - Dat 4515
Proteja o seu e-mail Terra: <http://mail.terra.com.br/>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou o efeito dos antibióticos β -lactâmicos e da *L*-arginina no tratamento da sepse experimental em ratos.

Para avaliar a eficácia dos diferentes tratamentos utilizados neste estudo, analisamos a sobrevivência dos animais após a indução de sepse. Nossos resultados sugerem que o uso de ceftriaxona e aztreonam aumenta a sobrevivência dos animais, independentemente da presença de *L*-arginina.

Analisando os níveis de IL1 β , nitrito e nitrato e IL10 foi possível observar que os níveis séricos de IL1 β , nitrito e nitrato apresentaram-se elevados somente no grupo ceftriaxona+*L*-arginina, mostrando uma potencialização do efeito da *L*-arginina no processo inflamatório. O aumento concomitante da concentração sérica de IL10 neste grupo pode demonstrar uma tentativa de controlar o processo inflamatório inicial. Também houve um aumento da IL10 no grupo tratado com aztreonam, sugerindo que, de alguma maneira, a *L*-arginina presente no antibiótico aumenta a resposta anti-inflamatória.

A glicose tem se mostrado um importante marcador pró-inflamatório, estando relacionada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto isto não foi verificado em nosso estudo, em que os níveis de glicose mostraram-se elevados somente no grupo tratado com *L*-arginina.

Dessa forma, abre-se mais uma frente a ser pesquisada sobre o efeito do uso de diferentes classes de antibióticos bem como seus mecanismos de ação, e da utilização de *L*-arginina no tratamento de patologias graves como a sepse.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)