



Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse

Fracasso, J.F.^{1*}

¹Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 10/07/2008 - Aceito 01/09/2008

RESUMO

O choque vasodilatador mais freqüente resulta de sepse, uma inflamação sistêmica em resposta a uma infecção que se caracteriza por hipotensão, hiporreatividade às catecolaminas e coagulação intravascular disseminada. A causa mais comum de sepse é a infecção por bactérias Gram-negativas, principalmente de *Escherichia coli*, resultando na liberação de lipopolissacarídeos (endotoxinas) da parede celular, quando da morte ou lise do microrganismo, com o envolvimento de muitos mediadores, incluindo o óxido nítrico. Mais tarde descobriu-se que os níveis sanguíneos de vasopressina, em pacientes com sepse, eram anormalmente baixos, e observou-se que alguns destes pacientes, com choque séptico avançado, eram extremamente sensíveis às ações pressóricas da vasopressina exógena.

Palavras-chave: endotoxina; vasopressina; choque séptico; sepse; hiporreatividade; choque vasodilatador.

INTRODUÇÃO

O termo sepse é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) decorrente de infecção por bactérias, fungos, helmintos e vírus. A denominação de SRIS foi criada para incluir tanto a sepse quanto as doenças semelhantes provenientes de causas não-infecciosas, como trauma, isquemia, queimadura, pancreatite e hemorragia. Define-se um quadro de SRIS quando o paciente manifesta duas ou mais das seguintes condições: hipertermia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos/minuto); taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações/minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg) e contagem das células totais sanguíneas maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³ ou mais de 10% de formas imaturas (Bone et al., 1992). Uma das seqüelas da SRIS ou da sepse é a síndrome da falência múltipla de órgãos que acomete 30% dos pacientes com a síndrome (Davies & Hagen, 1997).

Em um quadro de sepse devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local

e generalizada. Até hoje, o tratamento de pacientes com sepse e choque séptico é feito por meio de antibióticos e fármacos que atuam nas alterações cardiovasculares, não interferindo na resposta inflamatória, podendo ser esse um dos motivos da alta mortalidade de pacientes com choque séptico (Bone et al., 1992).

Apesar de ter ocorrido um aumento de casos de sepse por bactérias Gram-positivas, infecções por bactérias Gram-negativas ainda são as mais freqüentes, sendo o choque séptico um agravamento do quadro de sepse. Assim, a maior parte dos estudos tanto clínicos quanto experimentais refere-se a sepse causada pelas bactérias Gram-negativas ou por endotoxemia.

ENDOTOXINAS

Endotoxinas (Etx) são lipopolissacarídeos, constituintes normais da parede celular de bactérias Gram-negativas; são liberadas na corrente circulatória após a morte ou lise destas bactérias; freqüentemente produzem no homem e em animais de experimentação um estado patológico conhecido pelo nome de choque séptico, endotoxêmico, Gram-negativo ou bacteriano (Thomas, 1954; Morrison & Ulevitch, 1978). Em 1954, Thomas já descrevia os distúrbios fisiológicos provocados por estas endotoxinas, mas até a década de 80, os livros didáticos denominavam de “pirógeno exógeno” alguma substância da bactéria que liberava do organismo o “pirógeno endógeno” que produzia febre. Mais tarde, o pirógeno exógeno foi isolado como sendo a endotoxina e o pirógeno endógeno como sendo a interleucina-1.

Estas substâncias tóxicas são designadas de “endotoxinas” para diferenciá-las de outras substâncias tóxicas sintetizadas e excretadas para o meio pela célula íntegra e denominadas de “exotoxinas”. A extração seletiva das substâncias endotóxicas das bactérias estabeleceu as bases para um avanço significativo no entendimento da sua biologia e química (Morrison & Ulevitch, 1978).

As Etx são derivadas somente de bactérias Gram-negativas; nestas, a superfície bacteriana consiste basicamente de uma membrana citoplasmática interna formada por proteína e fosfolípidos e uma camada externa, constituída de glicopeptídeo, um complexo formado por fosfolípide, proteína e lipopolissacarídeo

*Autor correspondente: José Francisco Fracasso - Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara-Jau, km 01 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil
Telefone: (16) 3301-6984 - Fax (16) 3301-6980
e-mail: fracasso@fcfar.unesp.br

(LPS). Esta porção LPS da parede celular é quimicamente particular para cada linhagem de bactéria, sendo utilizada para a classificação sorológica das várias espécies destes microrganismos. Para revisão ver Rietschel & Brade (1992). Através de técnicas especiais de extração, foram isolados e definidos os componentes biologicamente ativos da Etx; extratos compostos de proteínas, polissacarídeos e lipídeos foram identificados; tinham alta toxicidade e ativavam o sistema imune. A dissociação do lipídeo A da porção polissacarídeo do LPS resultou no entendimento dos efeitos fisiopatológicos das bactérias Gram-negativas. As atividades biológicas das endotoxinas estão associadas com o LPS. A toxicidade é associada com o componente lipídico (lipídeo A) e a imunogenicidade esta associada com o componente polissacarídeo. Os antígenos da parede celular (antígeno O) das bactérias Gram-negativas, fazem parte do LPS (Rietschel & Brade, 1992).

Alguns autores sugerem que o lipídeo A é capaz de liberar substâncias dos mastócitos e a Etx intacta, não; esta secreção é seletiva em pequenas doses de lipídeo A e não-seletiva em grandes doses (Morrison & Betz, 1977). Outros autores verificaram que a Etx, por si, é capaz de provocar a extrusão granular de mastócitos, com liberação de mediadores químicos para a circulação (Glauser et al., 1977).

CHOQUE SÉPTICO

O termo “choque” tem sido utilizado ao longo dos anos para definir uma série de situações em que o exuberante quadro clínico é desproporcional ao agente causal. No choque, ocorre disparidade entre o volume sanguíneo e a capacidade do leito vascular. Como consequência, instala-se perfusão tissular reduzida, com hipóxia celular e, finalmente, morte celular. Vários autores, inclusive os de nosso grupo, estudaram intensamente a síndrome estereotipada de reações fisiopatológicas, provocadas por endotoxinas, que leva, numa fase adiantada do processo, ao choque irreversível; esta fase é caracterizada por coma, anúria e insuficiência cardíaca e respiratória. Corresponde geralmente a lesão celular irreversível devido a falta de substrato energético. Estas alterações hemodinâmicas e fisiológicas causadas pelas Etx levam ao quadro clínico denominado de choque séptico. (Thomas, 1954; Hinshaw et al., 1967; Morrison & Ulevitch, 1978; Fracasso, 1978; Bradley, 1979; Fracasso, 1981; Fracasso & Rothschild, 1983a; 1983b; Fracasso, 1985; Vicent, 2001). Um dos primeiros sinais do choque é a queda da pressão arterial, considerada como hipotensão quando valores sistólicos abaixo de 80 mmHg são mantidos por mais de 30 minutos (Neme & Nestarez, 1978). Além das alterações cardiovasculares do choque séptico como a queda gradual na pressão sanguínea, há uma falta de resposta aos vasoconstritores e uma hiperreatividade aos vasodilatadores, conforme dados de nosso laboratório (Rodrigues & Fracasso, 2007). Os mecanismos fundamentais da hipotensão mediada por LPS

não estão plenamente compreendidos porém, a mediação destas alterações por um vasodilatador endógeno, o óxido nítrico (NO), recebeu atenção considerável (Thiemermann & Vane, 1990; Moncada et al., 1991; Thiemermann, 1997; Titheradge, 1999).

As Etx, para agirem, ativam células específicas no organismo hospedeiro, induzindo-as a secretar moléculas mediadoras. Estes mediadores agem localmente ou através do sangue para ocasionar uma diversidade de respostas. Os macrófagos são as células defensivas mais afetadas; englobam e destroem substâncias prejudiciais ao hospedeiro. Quando eles se tornam ativados, secretam moléculas diferentes que trabalham em conjunto, seqüencialmente ou independentemente, para estimular ou ampliar respostas imunes específica e não-específica contra uma invasão. Vários trabalhos (Flohé et al., 1991; Rietschel & Brade, 1992; Ferreira et al., 1993; Ebisui et al., 1994) revelaram que uma pequena proteína chamada fator de necrose tumoral (TNF) é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos, induzidos pela Etx. Foi verificado que o TNF mimetiza várias das respostas atribuídas as Etx, incluindo febre e, em altas doses, choque irreversível e morte. O TNF também pode atrair várias células de defesa para os sítios de infecção e destruir células tumorais. Os macrófagos quando estimulados pela Etx, produzem outros mediadores derivados das proteínas, como interleucinas (IL) 1, 6 e 8; derivados dos lipídeos, como as prostaglandinas (PGs); também produzem radicais livres, como o NO. Assim, quando uma bactéria Gram-negativa invade o tecido e libera quantidades moderadas de Etx, a formação de produtos de macrófagos pode ajudar a erradicar a infecção imediata, gerando uma resposta localizada e controlada. Os efeitos típicos - febre branda, recrutamento de componentes micróbio-específicos e componentes imunes menos específicos - servem para o restabelecimento e ajudam a proteger o organismo hospedeiro contra outros ataques microbianos. As Etx podem entrar na circulação através do próprio tecido danificado. Em 1963, Herring et al., estudaram o destino e eliminação das endotoxinas na circulação. Contudo, geralmente ocorrem efeitos letais quando a bactéria tem acesso à corrente circulatória. Neste meio, elas se multiplicam rapidamente e, quando a infecção é severa, acumula grande quantidade de Etx no sangue, induzindo macrófagos por todo o organismo. Assim, há uma liberação maciça de mediadores que dão início à hipotensão, hipóxia tissular e morte, caracterizando o choque séptico (Rietschel & Brade, 1992; Titheradge, 1999). Desta forma, a descoberta de que os mediadores derivados do hospedeiro causam sintomas como dor, febre, hipotensão, sugere outros métodos de terapia. Por exemplo, é possível um bloqueio da atividade ou síntese destes mediadores ou bloqueio de receptores nas células endoteliais, neurônios, macrófagos, etc. Substâncias que inibem a produção de TNF ou que suprimem a ação do TNF já sintetizado podem prevenir as Etx de causar febre em voluntários humanos e a morte de animais (Rietschel & Brade, 1992).

É relatado que o choque séptico permanece entre as causas mais difíceis de serem tratadas, e as taxas de mortalidade permanecem acima de 50% (Russel, 2007; Russel et al., 2008). A incidência continua aumentando, devido à elevada natureza invasiva das operações modernas, ao crescente número de acidentes graves de trânsito e de pacientes imunodeprimidos ou em idade avançada. Apesar dos cuidados aos pacientes em estado crítico e do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos terem progredido significativamente nos últimos 50 anos, a mortalidade associada com a sepse permanece indesejavelmente alta. Além disso, a síndrome da falência múltipla de órgãos é freqüentemente a causa do choque séptico com mortalidade maior que 50% (Klosterhalfen & Bhardwaj, 1998).

O choque séptico é uma das doenças de mortalidade mais alta; geralmente são pessoas de classe média baixa ou pobres, que por ignorância, medo ou falta de condições para locomover-se, procuram os hospitais ou ajuda médica numa fase adiantada do processo, dito choque séptico irreversível; o agravamento da doença também ocorre devido à desnutrição e mecanismos de defesa deficitários. O aborto séptico constitui uma das causas que leva quase que irremediavelmente à morte, visto ser ilegal, pois a assistência médica é procurada tardiamente. Desta maneira, estudos que contribuem para a elucidação dos mecanismos pelos quais as Etx produzem o choque séptico são importantes para diminuir o índice de mortalidade (Fracasso, 1985).

MEDIADORES QUÍMICOS NO CHOQUE SÉPTICO

Quando começamos nossos estudos sobre as ações das endotoxinas, em animais de laboratório, em 1975, quase nada era conhecido sobre os mediadores envolvidos no choque séptico. As prostaglandinas haviam sido descobertas em 1935 pelo pesquisador sueco Ulf S. von Euler, que ganhou o prêmio Nobel em 1970, por esta pesquisa; John Vane ganhou o prêmio Nobel em 1982, por descobrir o mecanismo da inibição das prostaglandinas pela aspirina, em 1971. Até então, os pesquisadores investigavam o que se conhecia de melhor no momento, ou seja, receptores alfa e beta adrenérgicos, tendo sido propostas várias substâncias vaso-ativas como mediadores dos efeitos cardiovasculares provocados pelas endotoxinas (Thomas, 1954; Hinshaw et al., 1967). Em nosso laboratório, bloqueadores alfa e beta adrenérgicos mostraram-se ineficazes em bloquear a fibrinólise causada pela endotoxina ou adrenalina, no rato. A dose destes bloqueadores foi suficiente para inibir os efeitos pressóricos causados pela injeção de adrenalina nestes animais (Fracasso, 1981).

Vários autores, incluindo os do nosso grupo, estudaram intensamente os efeitos causados pelas Etx bacterianas no homem e no animal de experimentação que incluem: vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, vasoconstrição periférica, hipotermia, leucopenia seguida de granulocitose, indução

das enzimas microssomais do fígado, ativação do Fator de Hageman (Fator XII) com conseqüente liberação de cininas, coagulação intravascular disseminada (CID), fibrinólise e ativação do sistema complemento (Thomas, 1954; Hinshaw et al., 1967; Fracasso, 1978; Morrison & Ulevitch, 1978; Bradley, 1979; Thiemermann, 1997; Titheradge, 1999).

Desta maneira, realizamos um estudo (Fracasso 1978) com fármacos vaso ativos como carbacol e adrenalina, que sabidamente liberam ativador de plasminogênio das paredes dos vasos, aumentando a atividade fibrinolítica, fato relatado por Fearnley (1973) quando realiza-se exercícios físicos os quais liberam adrenalina e aumentam esta atividade. No estudo acima citado (Fracasso, 1978) comparou-se os efeitos da Etx e estes fármacos injetados em ratos, com o objetivo de tentar estabelecer as bases comuns ou diferentes às quais estas substâncias devem suas ações, sobre o sistema coagulação-fibrinólise; os resultados mostraram que a Etx aumenta a fibrinólise por liberar adrenalina ou ativador de plasminogênio das adrenais uma vez que ratos adrenalectomizados ou adrenodemedulados não apresentam este efeito após a Etx. A possibilidade de a Etx estar ativando a fibrinólise por romper o equilíbrio hemostático “coagulação- fibrinólise”, foi descartado em experimentos realizados em nosso laboratório (Fracasso, 1981; Fracasso & Rothschild, 1983b).

Sasaki & Takeyama (1974) verificaram que a fibrinólise desenvolvida em ratos pela injeção de adrenalina, era inibida por bloqueadores alfa adrenérgicos. Nossos estudos não conseguiram repetir estes efeitos, mesmo usando doses altíssimas de bloqueadores alfa ou beta adrenérgicos (Fracasso & Rothschild, 1983a). Demonstramos (Fracasso, 1985) que o tratamento de animais com aspirina era útil em algumas ações produzidas pelas Etx, como edema pulmonar e ativação da fração euglobulina do plasma do rato. Naquela ocasião não se conheciam os efeitos da indução da óxido-nítrico sintase (NOS) pela Etx, nem da relevância da super produção de óxido nítrico (NO) no desenvolvimento do choque séptico, demonstrado por Titheradge em 1999.

No homem e em animais de experimentação, as Etx de bactérias Gram-negativas causam rápida leucopenia, provavelmente devido a um seqüestro destas células pelos capilares, principalmente pulmonares. Após um período de quatro a seis horas, a leucopenia é seguida de leucocitose pela liberação de granulócitos da medula óssea (Morrison & Ulevitch, 1978).

Os indivíduos ficam predispostos ao choque séptico após o enfraquecimento de seus mecanismos de defesa, por exemplo, quando há trauma, queimadura, diabetes, cirrose ou tratamento com agentes imunossupressores ou quimioterápicos (Bone et al., 1992). Estes pacientes exibem ainda um aumento nas concentrações circulantes de catecolaminas, cortisol e glucagon (Titheradge, 1999), resultando em vasoconstrição periférica e taquicardia. Esta fase é seguida por uma vasodilatação progressiva associada com aumento do débito cardíaco e resistência vascular diminuída e, em alguns casos, vasoplegia. Subseqüente a isto, o déficit cardíaco se desenvolve com uma queda

do débito cardíaco e ocorrem marcantes distúrbios na oxigenação e perfusão tecidual (Thiemermann, 1997).

PRESSÃO ARTERIAL

A Etx, administrada intravenosamente em ratos, produz imediata queda na pressão arterial média (PAM), a qual retorna quase a níveis normais 30 minutos após, quando então a PAM começa a cair gradualmente até a morte do animal, conforme demonstram nossos experimentos (Fracasso & Rothschild, 1983b). Heiffer et al. (1960) verificaram estes mesmos efeitos em cão, após injeção intravenosa de Etx; estes autores verificaram que na hipotensão não há liberação de adrenalina e não há diminuição do conteúdo deste hormônio das adrenais; porém, quando a pressão começa a retornar ao normal, aumenta a concentração de adrenalina circulante e diminuição deste hormônio na medula adrenal; quando a PAM cai novamente, os níveis da catecolamina são altos, sugerindo que o animal tenha se tornado refratário à adrenalina. Heiffer et al. (1960), já haviam então descoberto a hiporreatividade às catecolaminas, que passou despercebido por outros autores, devido ao desconhecimento do óxido nítrico e outros mediadores envolvidos no choque séptico. Nossos estudos mostraram que a adrenodemedulação ou adrenalectomia não impede a hipotensão pela Etx, mas impede o recobro da PAM aos níveis normais; estes resultados sugerem a liberação de adrenalina das adrenais, pela Etx (Fracasso, 1978; 1981; Fracasso & Rothschild, 1983b). Hinshaw et al. (1964) verificaram também que a adrenalectomia não impede a hipotensão após infecção de Etx em cães, gatos e macacos, bloqueando, porém, o retorno da pressão aos níveis basais. Estes dados indicam que a catecolamina circulante não é necessária para iniciar o choque séptico; porém, de acordo com estes autores, a ação letal da Etx pode ser acelerada na ausência da adrenalina.

CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células endoteliais têm participação importante na resposta do hospedeiro às infecções por bactéria Gram-negativa. Apesar de ser possível demonstrar a interação direta da Etx com as células endoteliais *in vitro*, as respostas do endotélio durante a infecção Gram-negativa são provavelmente mediadas na sua maioria por citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1, liberadas de macrófagos. O dano endotelial e a resposta inflamatória causados pela Etx contribuem significativamente para a falência múltipla de órgãos, complicando a sepse. Por outro lado, a ativação das células endoteliais pela Etx, TNF- α ou IL-1 estimula a aderência de leucócitos, promove atividade pró-coagulante e induz a liberação de mediadores inflamatórios e substâncias vasoativas. Assim, as células endoteliais, sendo

um alvo crítico das reações inflamatórias destrutivas e como células efetoras potenciais na resposta inflamatória, podem influenciar profundamente o curso de uma septicemia; para boa revisão sobre o assunto ver Pohlman & Harlan (1992).

SISTEMA DE COAGULAÇÃO-FIBRINÓLISE

A reação do corpo à Etx leva à ativação da cascata de coagulação e de cininas, que ocasiona uma hipóxia tecidual e liberação de PGs dos vasos sanguíneos, a fim de manter a hemostasia, como mostra a ótima revisão de Hofman (1990). O endotélio controla o tonus da musculatura lisa subjacente e libera fatores como o óxido nítrico (NO) e sintetiza o ativador de plasminogênio tecidual (AP-t), que inicia a fibrinólise. O endotélio pode ser ativado por bradicinina ou H₂O₂ e liberar o AP-t (Winnerkvist et al., 1997). Resultados obtidos em nosso laboratório com aorta isolada de rato, sugerem que o NO aumenta a liberação de AP-t, aumentando a atividade fibrinolítica, e que isto pode ser uma importante defesa para o organismo, em situações de hipóxia, como no caso de coagulação intravascular disseminada, no choque séptico (Fracasso et al., 2003). É sabido que a hipóxia causa relaxamento de uma variedade de vasos sanguíneos, mesmo na ausência de células endoteliais; estas respostas à hipóxia são prevenidas por inibidores da ciclooxigenase (COX) e são atribuídas à liberação de PGs (Moncada & Higgs, 1986). A COX existe em pelo menos duas isoformas: uma ciclooxigenase constitutiva (COX-1) que está presente nas células em condições fisiológicas, e uma outra que é induzida por algumas citocinas, mitógenos e Etx (COX-2), presumivelmente em condições patológicas, como na inflamação e na septicemia (Mitchell et al., 1994). É sabido também, que o fator XII (fator de Hageman) é ativado por contato com superfícies carregadas negativamente, como a Etx (Hofman, 1990; Fracasso, 2007). Assim, na presença de Etx, o fator XII ativado leva à ativação em cascata do sistema de coagulação, promovendo hipóxia tecidual com liberação de PGs, que amplifica o processo inflamatório. Por outro lado, a cascata das cininas também é ativada pelo fator XII, que aumenta esta substância no local injuriado, contribuindo de maneira importante para a gênese dos sinais e sintomas da inflamação (Ferreira et al., 1993). O Fator XII ativado também é capaz de ativar o sistema fibrinolítico, que potencializa o ativador de plasmina tecidual (AP-t), mantendo a balança homeostática “coagulação-fibrinólise”, numa tentativa de impedir danos maiores aos tecidos (Fracasso, 1978; Fracasso et al., 2003). Ferreira et al. (1993) estudaram a habilidade de várias citocinas em causar hiperalgisia e mostraram que uma característica geral de várias citocinas é que elas induzem a liberação de outras citocinas, atuando assim como um

mecanismo de amplificação na resposta inflamatória. É sabido também que as Etx ativam o sistema fibrinolítico de animais de experimentação, porém, a fibrinólise parece estar associada à resposta hipercoagulante das Etx no hospedeiro (Fracasso, 1978; Fracasso, 1981; Fracasso & Rothschild, 1983b).

HIPORREATIVIDADE E ÓXIDO NÍTRICO

É discutido se o TNF- α tem um papel central na indução de hiperalgesia pela carragenina ou Etx, e se sua liberação é essencial para a liberação de outras citocinas. Com o uso de antagonistas da IL-1 β , foi demonstrado que na hiperalgesia produzida pela carragenina, a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) era precedida pela liberação de IL-1 β , e o uso de fármacos antiinflamatórios são importantes para diminuir a intensidade do edema (Ferreira et al., 1993). Ainda que a PGE₂ cause edema quando injetada na pata de ratos, não está claro se ela aumenta a permeabilidade venular sem a participação de outros mediadores inflamatórios, como a bradicinina (BK), serotonina (5-HT) ou histamina. Assim, a liberação de PGs durante o processo inflamatório serve como um sistema de amplificação para o mecanismo de formação de edema.

Thiemermann & Vane (1990) mostraram que a hipotensão, a produção de edema e o aumento da permeabilidade vascular no choque séptico eram reflexos da produção aumentada de NO, pois sua inibição, atenuava os sintomas do choque e hipotensão. Assim, pensava-se que a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular no choque séptico seriam mediados apenas pelo NO, que depende da ativação da guanilil-ciclase (GC) e do acúmulo intracelular de GMPc. Existem no mínimo três diferentes isoformas de NO sintase (NOS) em células de mamíferos: NOS endotelial (NOSe ou NOS III) encontrada em células endoteliais, células epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (NOSn ou NOS I) encontrada em células neuronais e músculo esquelético e NOS induzida (NOSi ou NOS II) encontrada em macrófagos, hepatócitos, músculo liso e uma variedade de outros tecidos. Todas as enzimas NOS contêm vários cofatores em suas formas ativas – calmodulina, dinucleotídio flavina adenina, mononucleotídio flavina e tetrahydrobiopterina. A NOSe e a NOSn são expressas constitutivamente e são ativadas por um aumento no Ca⁺² intracelular e estão envolvidas na regulação do tônus vascular e neurotransmissão respectivamente, ao passo que a expressão da NOSi é encontrada em macrófagos ativados e polimorfonucleares (PMNs), é induzida por Etx, carragenina e substâncias pró-inflamatórias, é cálcio-independente e está envolvida na defesa imune. As enzimas constitutivas, NOSn e NOSe são capazes de produzir pequenas quantidades de NO, que ativam a GC solúvel no músculo liso vascular, regulam o tônus vascular fisiológico, a pressão sanguínea e a perfusão tecidual, ao passo que a expressão da NOSi, induzida no endotélio vascular e no músculo liso de animais e células

da musculatura lisa do homem por Etx e algumas citocinas, resulta em produção de grandes quantidades de NO por longos períodos, mantendo a vasodilatação e a resistência a vasoconstritores, mediando as alterações no sistema vascular e o dano tecidual, causando disfunção múltipla de órgãos. Estas alterações podem ser prevenidas pelo pré-tratamento com glicocorticóides, os quais inibem a expressão da NOSi, mas não afetam a atividade da enzima constitutiva (Moncada et al., 1991; Thiemermann, 1997; Titheradge, 1999).

Estas diferentes linhas de evidências indicam claramente que na vasculatura de várias espécies, uma utilização contínua de L-arginina para a produção de NO representa um papel essencial no equilíbrio da pressão sanguínea (Rees et al., 1989). Por outro lado, a indução da NOS, com produção excessiva de NO, contribui para a fisiopatologia do choque séptico e disfunção múltipla de órgãos, e tem sido proposta ser o maior fator envolvido na vasodilatação patológica e no dano tecidual (Thiemermann, 1997). A hiporreatividade cardiovascular às catecolaminas e outros fármacos vasoconstritores é um dos efeitos mais pronunciados do choque séptico humano e contribui para a alta taxa de mortalidade associada ao choque Gram-negativo. É sabido que a Etx reproduz a hiporreatividade em animais de laboratório, e uma alta produção de NO é implicada no efeito da Etx em alterar a reatividade vascular. Foi descrito que a Etx induz a NO sintase, que produz NO a partir da L-arginina em tecidos de ratos e que a dexametasona (DX) e o inibidor desta enzima (N ω NLA), previnem sua indução e a hiporreatividade vascular associada em aorta de rato (Rodrigues & Fracasso, 2007). Todavia, alguns efeitos da Etx sobre a pressão sanguínea e reatividade vascular podem preceder a indução da NOS, a qual leva várias horas em modelos animais. Parece porém, segundo outros autores, que a hiporreatividade rápida a norepinefrina (NE), se deve à estimulação rápida da sintase de óxido nítrico constitutiva (NOSc) pela Etx e a hiporreatividade tardia à NE, se deve à indução da sintase de óxido nítrico induzida (NOSi) pela Etx. Foi verificado também que, uma vez estabelecida a hiporreatividade à NE, o tratamento com DX não produz efeito. Portanto, a DX só é eficaz em prevenir a hiporreatividade à NE quando o tratamento é a priori (Paya et al., 1993; Rees et al., 1990; Thiemermann & Vane, 1990; Ambrosio & Fracasso, 2000; Fracasso et al., 2003).

A relevância da produção excessiva de NO para o desenvolvimento do choque endotóxico foi demonstrada pelo uso de inibidores da NOS e agentes os quais bloqueiam a expressão da NOSi. A administração de inibidores da sintase de óxido nítrico, em modelos animais e no homem, com choque séptico, restaura a pressão sanguínea e a hiporreatividade a agentes vasoconstritores induzida por Etx. Porém, doses suficientes para inibir ambas as enzimas, constitutiva e induzida, diminuem a produção de NO, responsável pelo tonus vasodilatador, e, na presença de vasoconstritores durante a sepse, leva a danos fatais nos órgãos (Titheradge, 1999; Landry &

Oliver, 2004; Rodrigues & Fracasso, 2007). Além disso, está bem estabelecido que a expressão da NOS_i em resposta a Etx é negativamente regulada pela DX "in vivo" e glicocorticóides endógenos, e esses aumentos nos níveis plasmáticos de esteróides foi proposto para contribuir com o desenvolvimento da tolerância cardiovascular a injeções repetidas de Etx (Szabo et al., 1994; Fracasso et al., 1999; Ambrósio & Fracasso, 2000).

Os glicocorticóides inibem a indução da enzima dos macrófagos e PMNs, mas não afetam a NOS endotelial e cerebral. Sabe-se também que quando ratos adrenalectomizados (Adx) são submetidos à Etx, produzem uma forma de choque muitas vezes mais severo, em comparação com ratos normais, provavelmente por falta destes hormônios na circulação (Ambrósio & Fracasso, 2000). Foi verificado que a inibição da NOS por análogos da L-arginina reduz a hipotensão induzida pela Etx e restitui a reatividade à NE, enquanto a dexametasona quando administrada antes da Etx restitui também a reatividade à NE, mas não previne a hipotensão causada pela Etx, dado que não está de acordo com os resultados obtidos por outros autores, que verificaram que este corticóide é capaz também de prevenir a hipotensão pela Etx (Szabo et al., 1993; Paya et al., 1993, Rodrigues & Fracasso, 2007). A inibição do NO restituindo a pressão em pacientes com sepse, foi recebida com entusiasmo; supôs-se que com a supressão desse vasodilatador, os vasoconstrictores (noradrenalina e angiotensina II) fariam o seu papel. No entanto, os resultados foram trágicos, pois o NO tem atuação muito diversificada e pouco compreendida no corpo humano, e sua inibição levou a problemas graves e imprevistos (Landry & Oliver, 2004).

É sabido também, que os corticóides são inibidores da produção de TNF- α e protegem contra o choque endotóxico em modelos animais. Tem se tornado evidente porém, que o TNF- α é um efêtor necessário, mas não suficiente para desencadear a letalidade em animais de experimentação (Flohé et al., 1991).

TOLERÂNCIA E PATOGENICIDADE

As Etx podem influenciar de maneira não-específica o curso de uma infecção. O aumento ou diminuição da patogenicidade depende da via de injeção da Etx e do intervalo entre sua administração e a dose subsequente. A resistência ao patógeno não está relacionada com o tipo de bactéria da qual a Etx foi isolada. O aumento na resistência é observado quando a Etx é administrada num período de 24 horas antes da infecção ou de doses letais da mesma. Porém, se a Etx é administrada imediatamente antes do patógeno, os animais experimentais se tornam mais suscetíveis à infecção (Flohé et al., 1991). Parece que esta tolerância está associada a uma redução da habilidade da Etx em induzir a NOS_i ou associada com um marcante aumento nos níveis de glicocorticóides endógenos (Szabo et al., 1994). Portanto, é mais uma evidência da importância

dos corticóides na proteção dos efeitos tóxicos da Etx. O TNF- α quando administrado em ratos, produz muitas das condições fisiopatológicas observadas durante o choque séptico letal. Foi verificado também, que doses não-tóxicas de TNF- α , 24 horas antes de uma infusão letal de Etx, previne completamente a hipotensão aguda produzida pela Etx. As condições nas quais o TNF- α exerce seus efeitos benéficos são complexas, e dependem da dose, via de administração e outras condições fisiológicas do experimento (Alexander et al., 1991). Resultados obtidos por outros autores confirmam que a injeção de Etx em ratos aumenta, de maneira dose-dependente, os níveis de corticosterona e que estes resultados são revertidos pela injeção posterior de anti-soro anti-TNF- α (Ebisui et al., 1994).

VASOPRESSINA NO CHOQUE VASODILATADOR

Na sepse, o coração funciona normalmente e o sistema circulatório tem sangue o suficiente, mas as arteríolas não funcionam corretamente; elas permanecem dilatadas nos braços e pernas, deixando-os quentes ao toque, o que impede que o sangue seja levado aos órgãos vitais. Em 1992, descobriu-se um modo alternativo de contrair as arteríolas durante o choque vasodilatador (Landry & Oliver, 2004). Em síntese, o comportamento dos músculos arteriulares é comandado pelos canais de cálcio, que dependem dos canais de potássio para controlar adequadamente a polarização da membrana. Quando os níveis de ATP caem, como é o caso do choque séptico, determinados canais de potássio se abrem, permitindo a saída de grandes quantidades de potássio da célula, tornando a membrana exterior mais positiva que o normal, os canais de cálcio se fecham e a célula relaxa. O uso de inibidores destes canais sensíveis à ATP, como a glibenclamida, de fato elevou a pressão arterial na sepse, mas de efeito fugaz e causava efeitos colaterais (Landry & Oliver, 2004). Landry et al. (1997) ao administrarem vasopressina à um paciente com sepse, para estancar uma hemorragia do esôfago, para sua surpresa, verificaram que a pressão arterial subiu. Posteriormente, verificaram que em pacientes com sepse, os níveis de vasopressina são muito baixos, pois seus estoques liberados da pituitária no início do choque, são degradados na corrente circulatória e a síntese para sua substituição é muito demorada. Por outro lado, níveis elevados de noradrenalina, durante o choque séptico, possui um efeito inibitório central sobre a inibição de vasopressina. Assim, desde essas descobertas iniciais, a vasopressina foi analisada pelos cientistas e revelou-se um método alternativo para recuperar a pressão arterial (Landry et al., 1997; Landry & Oliver, 2001; 2004). Landry et al. (1997) verificaram que pacientes em choque eram sensíveis a doses baixas de vasopressina (infusão de vasopressina de 0,01 a 0,04 unidades/ml, alcançando níveis de concentração plasmática de 25 a 100pg/ml). Segundo Landry & Oliver (2004), a vasopressina estimula receptores que regulam a vasoconstrição, bloqueia os canais de potássio sensíveis à ATP e potencializa as catecolaminas endógenas e infundidas no paciente.

Apesar desta euforia inicial apontando a vasopressina em conjunto com às catecolaminas, para manter a pressão arterial no choque séptico refratário, como uma alternativa segura, não são conhecidos seus efeitos sobre as taxas de mortalidade e efeitos adversos e novos estudos devem ser realizados para aumentar os conhecimentos dos efeitos benéficos da vasopressina e seu uso adequado no choque séptico (Obristsch et al., 2004; Delmas et al., 2005).

Russel (2007) mostrou que apesar da utilização de doses baixas de vasopressina permitir a melhora das funções renais e de outros órgãos, no choque séptico, seus efeitos colaterais que incluem arritmias, isquemia miocárdica, do esôfago, pele e aumento de bilirrubina, sugerem efeitos potencialmente benéficos e/ou adversos.

Um teste amplo com pacientes de sepse, envolvendo vários centros ao redor do mundo, foi realizado para determinar mais definitivamente se a recuperação da pressão, com doses baixas de vasopressina aliado à infusão de catecolaminas, reduz os sintomas do choque e as mortes. Os tratamentos foram sendo modificados, mas a sobrevivência destes pacientes tratados apenas com noradrenalina ou noradrenalina em conjunto com a dobutamina, não diferem significativamente daqueles pacientes tratados com baixas doses de vasopressina combinada com noradrenalina. Assim, os autores não recomendam o uso de vasopressina como rotina, em pacientes de sepse, como idosos, ou com problemas cardíacos, mas apenas em pacientes selecionados, sugerindo que novas pesquisas devam ser realizadas para este método ser usado com mais segurança do que o uso de outros agentes vasopressores tradicionais (Russel, 2007; Russel et al., 2008; Leone & Martin, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da vasopressina ser uma poderosa arma no combate à sepse, já foram identificados vários elementos na cascata da inflamação, que acaba levando ao choque. Portanto, as várias pesquisas multinacionais devem resultar num conjunto de terapias na tentativa de amenizar os efeitos deletérios da sepse e choque, que possam salvar vidas e diminuir a alta taxa de mortalidade no fenômeno.

O tratamento tradicional de pacientes do choque séptico com os agentes vasopressores como a adrenalina, noradrenalina ou noradrenalina mais dobutamina não diferem significativamente da sobrevivência dos pacientes tratados apenas com adrenalina. O tratamento com noradrenalina e doses baixas de vasopressina tem melhorado a sobrevivência de pacientes com choque séptico moderado e permanece como única opção para choque séptico refratário. Portanto, o choque séptico deve ser tratado o mais cedo possível para obter-se os benefícios do uso combinado dessas substâncias.

Porém, os poucos pacientes que sobrevivem a uma sepse, devem ter uma rotina igual a pacientes imunossuprimidos, pois caso tenham nova infecção, o organismo da pessoa reagirá com baixa resistência, como se fosse portador de doença que enfraquece o sistema imunológico, como o câncer, sendo potencialmente mais letal numa segunda vez.

ABSTRACT

A contribution to the understanding of the pathogenesis of sepsis

The most frequent cause of vasodilatory shock is outcome from sepsis, a systemic inflammatory response to infection, characterized by hypotension, hyporeactivity to the catecholamines and disseminated intravascular coagulation. The commonest cause of sepsis has reported to be infection with Gram-negative bacteria, typically *E. coli*, resulting in the release of lipopolysaccharide (endotoxin) from the bacterial outer membrane during autolysis or death of these microorganisms, with the involvement of many mediators, including nitric oxide. Later it was found that plasma levels of vasopressin in sepsis patients were abnormally low and observed that some patients with advanced septic shock were extremely sensitive to the activity actions of exogenous vasopressin.

Keywords: endotoxin; vasopressin; septic shock; sepsis; hyporeactivity; vasodilatory shock.

REFERÊNCIAS

- Alexander HR, Sheppard BC, Jensen JC, Langstein HN, Buresh CM, Venzon D, Walker, EC, Fraker DL, Stovroff MC, Nort JA. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension and hypothermia of gram negative sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88(1):34-9.
- Ambrosio AE, Fracasso JF. Effect of N ω NLA or dexamethasone on vascular hyporeactivity induced by *e. coli* endotoxin in sham and adrenalectomized rats. *Rev Ciênc Farm* 2000; 21(2):265-75.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101(6):1644-55.
- Bradley SG. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. *Annu Rev Microbiol* 1979; 33:67-94.

- Davies MG, Hagen P. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84:920-35.
- Delmas A, Leone M, Rousseau S, Albanese J, Martín C. Vasopressin and terlipressin in septic shock patients. *Crit Care* 2005; 9(2):212-22.
- Ebisui O, et al. Effect of IL-1 receptor antagonist and antiserum to TNF- α on LPS-induced plasma ACTH and corticosterone rise in rats. *Am J Physiol* 1994; 266(6):E986-E92.
- Fearnley GR. Fibrinolysis. *Adv Drug Res* 1973; 15:107-63.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Cunha FQ, Poole S. Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents Actions* 1993; 38:c7-c9.
- Flohé S, Heinrich PC, Schneider J, Wendel A, Flohé L. Time course of IL-6 and TNF- α release during endotoxin-induced tolerance in rats. *Biochem Pharmacol* 1991; 41:1607-14.
- Fracasso JF. *Efeito de adrenalina, carbamilcolina e endotoxina de E. coli sobre a ativação do sistema fibrinolítico do plasma do rato*. [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, USP; 1978.
- Fracasso JF. *Participação de adrenalina na ativação fibrinolítica do plasma do rato por endotoxina de E. coli*. [Tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, USP; 1981.
- Fracasso JF. *Inter-relação entre o processo de coagulação-fibrinólise e alterações hemodinâmicas provocadas por endotoxina de E. coli ou adrenalina, no rato: influência da aspirina, heparina e vitamina A no fenômeno*. [Tese Livre-Docência] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 1985.
- Fracasso JF, Rothschild AM. Alpha and beta adrenergic blocker-resistant release of fibrinolytic activity from rat venae cavae by epinephrine *in vitro*. *Thromb Haemost* 1983a; 49(1):63.
- Fracasso JF, Rothschild AM. Contribution of adrenaline to the fibrinolytic activity evoked by *E. coli* endotoxin in the rat. *Thromb Haemost* 1983b; 50(2):557-9.
- Fracasso JF, Silva RFP, Lepera EJP. Importância dos corticóides na inibição da sintase de óxido nítrico pelo N ω NLA, em ratos tratados com endotoxina. *Rev Ciênc Farm* 1999; 20(2):494-5.
- Fracasso JF, Silva RFP, Lepera EJP. Effect of N ω NLA, an inhibitor of NO-synthase, on the release of tissue-plasminogen activator from rat aorta. *Rev Ciênc Farm* 2003; 24(1):23-5.
- Fracasso JF. Cininas. In: DeLucia R, Oliveira-Filho RM. (eds.) *Farmacologia integrada*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2007. p.327-31.
- Glaser FL, Palmer J, Cecconi S, Schoolcraft W, Wells I, Novey H, Egan P, Smeltzer D. The effect of endotoxin on the mast cell camp system. *Ann Allergy* 1977; 38(2):104-7.
- Heiffer MH, Mundy RL, Mehlman B. Effect of lethal doses of bacterial endotoxin *E. coli* on sympathetic neurohormones in the rabbit. *Am J Physiol* 1960; 198:1307-11.
- Herring WB, Herion JC, Walker RI, Palmer JG. Distribution and clearance of circulating endotoxin. *J Clin Invest* 1963; 42:79-87.
- Hinshaw LB, Brake CM, Emerson TE, Jordan MM, Masucci FD. Participation of the sympathoadrenal system in endotoxin shock. *Am J Physiol* 1964; 207:925-30.
- Hinshaw LB, Solomon LA, Erdös EG, Reins DA, Gunter BJ. Effects of acetylsalicylic acid on the canine response to endotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 1967; 157:665-71.
- Hofman J. Bacterial endotoxins. In: Shier T, Mebs D. (eds.). *Handbook of toxicology*. New York: Marcel Dekker; 1990. p.655-82.
- Klosterhalfen B, Bhardwaj RS. Septic shock. *Gen Pharmacol* 1998; 31:25-32.
- Landry DW, Oliver JA. Decifrando os mecanismos do choque. *Sci Am Brasil* 2004; 22:80-5.
- Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001; 345(8):588-95.
- Landry DW, Levin HR, Gallant EM. Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock. *Crit Care Med* 1997; 25:1279-82.
- Leone M, Martin C. Vasopressor use in septic shock: an update. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008; 21(2):141-7.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 90:11693-7.
- Moncada S, Higgs EA. Arachidonate metabolism in blood cells and the vessel wall. *Clin Haematol* 1986; 15:273-92.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology e pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
- Morrison DC, Betz SJ. Chemical and biological properties of a protein-rich fraction of bacterial lipopolysaccharides. *J Immunol* 1977; 119:1790-5.
- Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 1978; 93:527-618.
- Neme B, Nestarez JE. Choque séptico em obstetrícia. *Clín Geral* 1978; 12:9-20.

- Obritsch MD, Bestul DJ, Jung R, Fish DN, MacLaren R. The role of vasopressin in vasodilatory septic shock. *Pharmacotherapy* 2004; 24(8):1050-63.
- Paya D, Gray GA, Fleming I, Stoclet JC. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by *E. coli* lipopolysaccharide in rats. *Circ Shock* 1993; 41:103-12.
- Pohlman TH, Harlan JM. Endotoxin-endothelial cell interactions. In: Morrison DC, Ryan JL. (eds.) *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides: molecular biochemistry and cellular biology*. Boca Raton: CRC Press; 1992. p.347-71.
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric-oxide in the regulation of blood-pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3375-8.
- Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: An insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173:541-7.
- Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267:26-33.
- Rodrigues LA, Fracasso JF. Vascular hyporeactivity to angiotensin II induced by *Escherichia Coli* endotoxin is reversed by N ω -Nitro-L-Arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; 28(3):341-5.
- Russel JA, et al. Vasopressin vs norepinephrine infusion in patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008; 358:877-87.
- Russel JA. Vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35(9):9609-16.
- Sasaki Y, Takeyama S. Inhibition of adrenaline induced fibrinolysis by alpha-adrenergic blocking agents in the rat. *Jpn J Pharmacol* 1974; 24:737-45.
- Szabo C, Thiemermann C, Vane JR. Inhibition of the production of nitric-oxide and vasodilator prostaglandins attenuates the cardiovascular-response to bacterial-endotoxin in adrenalectomized rats. *Proc R Soc Lond B* 1993; 253:233-8.
- Szabo C, Thiemermann C, Wu CC, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:271-5.
- Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 1997; 29:159-66.
- Thiemermann C, Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 1990; 182:591-5.
- Thomas L. The physiological disturbances produced by endotoxins. *Annu Rev Physiol* 1954; 16:467-91.
- Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:437-55.
- Vincent, JL. Hemodynamic support in septic shock. *Intensive Care Med* 2001; 27:S80-S92.
- Winnervik A, Wiman B, Valen G, Vaage J. Oxidative stress and release of tissue plasminogen activator in isolated rat hearts. *Thromb Res* 1997; 85(3):245-57.