MONIQUE THAÍS COSTA FONSECA

HIPOTERMIA NA SEPSE:
DESENVOLVIMENTO NATURAL E VALOR BIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

MONIQUE THAÍS COSTA FONSECA

HIPOTERMIA NA SEPSE:
DESENVOLVIMENTO NATURAL E VALOR BIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre A. Steiner

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fonseca, Monique Thaís Costa
Hipotermia na sepse: Desenvolvimento natural e valor biológico / Monique Thaís Costa Fonseca; orientador Alexandre Alarcon Steiner. -- São Paulo, 2017.
88 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Temperatura. 2. Febre. 3. Hipotermia. 4. Macrófagos. 5. Neutrófilos. I. Steiner, Alexandre Alarcon, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Monique Thaís Costa Fonseca

Título da Tese: Hipotermia na sepse: Desenvolvimento natural e valor biológico

Orientador: Prof. Dr. Alexandre A. Steiner

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado (a) **( ) Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da hipotermia associada à sepse: um estudo retrospectivo
Pesquisador: Alexandre Alarcon Steiner
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 10638012.4.0000.5467
Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 197.596
Data da Relatoria: 15/02/2013

Apresentação do Projeto:
De acordo com parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:
De acordo com parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
De acordo com parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
De acordo com parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
De acordo com parecer anterior.

Recomendações:
aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
aprovar

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este é um estudo de metanálise de dados constantes em prontuários e documentos sob cuidado do HU - USP que não vai envolver o recrutamento, manipulação ou acompanhamento de seres humanos. Será mantido completo sigilo sobre a identidade dos dados. No entanto a CEP do ICB acompanha a CEP do HU e informa de acordo com o ítem II.2 da resolução 196/96 que cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com a resolução 196/96 conselho Nacional da Saúde, ítem IX.2 letra c. Em não havendo um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

15 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Paolo Marinho de Andrade Zanotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:**
Telefone: (113)091--7733 **Fax:** (113)091--8405 **E-mail:** pzanotto@usp.br; cep@icb.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **128** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Alexandre A.Steiner,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Mecanismos envolvidos na diminuição do infiltrado neutrofílico no pulmão de ratos com sepse frente à virada de febre para hipotermia*" do qual participam o(s) aluno(s) **Monique Thais Costa Fonseca,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.10.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 30 de outubro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Neuro Imunologia da Sepse do departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. O trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2012/03831-8 e 2016/04921-1, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coorenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que condeceu a bolsa de estudos.

Agradecimentos

Dedico esta tese á minha família maravilhosa, minha mãe Daice, meu pai Moacir, minha avó Zilá e minha irmã Sthéfany. Vocês são meu porto-seguro.

Agradeço ao meu mentor Alexandre Steiner, por caminhar ao meu lado, e não a minha frente e também pela paciência nesses 4 anos.

Muitas pessoas queridas tiveram participações positivas durante esses 4 anos de caminhada intensa, dedicação e trabalho duro, e eu gostaria de agradecer a cada uma delas individualmente, porém qualquer menção de nome acabaria sendo injusta com aqueles que, por motivos de espaço ou memória, ficariam fora da lista. Portanto, sem mencionar nomes, expresso minha sincera gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos que recebi de todos vocês, professores, colegas de laboratório e amigos leais. Muito obrigada!

E (o Pequeno Príncipe) voltou, então, à raposa:

– Adeus... – disse ele...

– Adeus – disse a raposa. – Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.

– O essencial é invisível aos olhos – repetiu o principezinho, para não se esquecer.

– Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante.

– Foi o tempo que eu perdi com a minha rosa... – repetiu ele, para não se esquecer.

– Os homens esqueceram essa verdade – disse ainda a raposa. – Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela tua rosa...

– Eu sou responsável pela minha rosa... – repetiu o principezinho, para não se esquecer.

O Pequeno Príncipe – página 69, de Antoine de Saint-Exupéry, 1986

Resumo

Fonseca MT. Hipotermia na sepse: desenvolvimento natural e valor biológico. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A sepse é sempre acompanhada de mudanças na temperatura corporal, seja esta febre ou hipotermia. A resposta termorregulatória depende da gravidade da inflamação e da temperatura ambiente (T_A), sendo que o aparecimento natural de hipotermia prevalece em casos mais graves de sepse e acomete cerca de 10% dos pacientes hospitalizados. Na maioria dos casos, esta resposta é vista como algo desregulado e progressivo, mesmo na ausência de uma avaliação significativa sobre o curso natural deste fenômeno em humanos, uma vez que, estudos experimentais mostraram que animais em choque endotóxico preferem permanecer em ambiente frio e desenvolver hipotermia. O presente trabalho tem como objetivos principais *(i)* caracterizar o curso temporal de hipotermia em um grupo raro de pacientes sépticos; *(ii)* desenvolver um modelo experimental bem controlado de sepse grave monobacteriana, *(iii)* avaliar como a hipotermia decorrente de uma peritonite induzida por *E. coli* altera a função pulmonar dos ratos, com ênfase no papel de neutrófilos e macrófagos e, *(iv)* elucidar como a hipotermia regula a resposta imune inata e, consequentemente o controle da infecção . Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a hipotermia em pacientes sépticos é um fenômeno transitório, não terminal e que disfunções fisiológicas ou farmacoterapia não desencadeiam o início dessa resposta. Além disso, foi desenvolvido um modelo experimental de sepse grave monobacteriana, no qual, quando submetidos a ambientes frios os ratos desenvolveram uma hipotermia regulada e duradoura. A hipotermia preservou a função pulmonar dos ratos sépticos e diminuiu o infiltrado de neutrófilos para os pulmões e peritônio, sendo que essa célula passou a expressar menos o receptor CCR2, envolvido na migração e ainda apresentou dificuldade na motilidade. Apesar de todos esses contratempos, a infecção estava controlada nos pulmões e no peritônio 20 h após a sepse, provavelmente devido ao aumento da atividade microbicida dos macrófagos na hipotermia. Logo, podemos concluir que a hipotermia é um fenômeno regulado, transitório, auto-limitante e não terminal em humanos, diferente da resposta desregulada e progressiva que se acreditava existir. Ainda, a hipotermia diminui a ação inflamatória dos neutrófilos ao mesmo tempo em que potencializa a atividade microbicida dos macrófagos. Essas células matam mais ao mesmo tempo em que favorecem um perfil menos inflamatório, mostrando que há um refinamento mecanístico seletivo dos macrófagos na hipotermia.

Palavras-chave: Temperatura. Hipotermia. Febre. Sepse. Macrófagos. Neutrófilos. Ratos. Humanos.

Abstract

Fonseca MT. Hypothermia in sepsis: natural development and biological value. [Ph. D. Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Sepsis is always accompanied by changes in body temperature, fever or hypothermia. The thermoregulatory response depends on the severity of the inflammation and the ambient temperature (T_A), and the natural onset of hypothermia prevails in more severe cases of sepsis and affects approximately 10% of hospitalized patients. In most cases, this response is seen as something deregulated and progressive, even in the absence of a significant assessment of the natural course of this phenomenon in humans, since, experimental studies have shown that animals in endotoxic shock prefer to remain in a cold environment and develop hypothermia. The present study has as main objectives *(i)* to characterize the temporal course of hypothermia in a rare group of septic patients; *(Ii)* to develop a well-controlled experimental model of severe monobacterial sepsis; *(iii)* to assess how hypothermia, resulting from E. coli-induced peritonitis, alters the lung function of rats, with emphasis on the role of neutrophils and macrophages; and *(iv)* elucidate how hypothermia regulates the innate immune response and hence the infection control. Our results showed for the first time that hypothermia in septic patients is a transient, non-terminal phenomenon and that physiological dysfunctions or pharmacotherapy does not trigger the onset of this response. In addition, an experimental model of severe monobacterial sepsis was developed in which, when submitted to cold environments, the rats developed regulated hypothermia. Hypothermia preserved the pulmonary function of septic rats and decreased the neutrophil infiltrate to the lungs and peritoneum, and this cell expressed less the CCR2 receptor, involved in migration, and still had difficulty in motility. Despite all these setbacks, the infection was controlled in the lungs and peritoneum 20 h after sepsis, probably due to the increased microbicidal activity of macrophages in hypothermia. Therefore, we can conclude that hypothermia is a regulated, transient, self-limiting and non-terminal phenomenon in humans, unlike the deregulated and progressive response that was believed to exist. Furthermore, hypothermia decreases the inflammatory action of neutrophils at the same time as it potentiates the microbicidal activity of macrophages. These cells kill more at the same time as they favor a less inflammatory profile, showing that there is a selective mechanistic refinement of macrophages in hypothermia.

Keywords: Temperature. Hypothermia. Fever. Sepsis. Macrophages. Neutrophils. Rats. Humans.

Lista de abreviaturas

Ac	Anticorpo
APACHE II	*Acute physiology and chronic health disease classification system II*
APC	Aloficocianina
bpm	Batimentos por minuto
BSA	Albumina do soro bovino
$CaCl_2$	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidades formadoras de colônias
CFU/GM	*Colony-forming units of granulocytes/macrophages*
CO_2	Gás carbônico
COX	Cicloxigenase
CXCL	Ligante quimiocina (motivo C-X-C)
CXCR	Receptor quimiocina (motivo C-X-C)
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMH	Núcleo dorsomedial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	*Enzyme linked immunonosorbent assay*
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL1	Intensidade de fluorescência 1
FSC	*Forward scatter*
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCO_3	Bicarbonato
HOCL	Ácido hipocloroso
HSP70	Proteínas de choque térmico 70
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon *gamma*
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRAP-1	Proteína antagonista do receptor de IL-1
LB broth	Meio líquido *Luria-Bertani*
LFA-1	Antígeno 1 associado à função leucocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
Mac-1	Antígeno macrófago 1
MFI	Intensidade média de fluorescencia

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-2	*Macrophage inflammatory protein 2*
MMP9	Metaloproteinase 9
MOI	Multiplicidade de infecção
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene 88*
NETs	*Neutrophil extracelular traps*
NF-κB	Factor nuclear *kappa* B
NK	*Natural killer*
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OH^-	Radicais hidroxila
$PaCO_2$	Pressão parcial de gás carbônico
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PaO_2	Pressão parcial de oxigênio arterial
PBS	Tampão fosfato-salino
PBST	PBS *Tween*
PE	Ficoeritrina
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína quinase C
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
Poly I:C	*Polyinosinic-polycytidylic acid*
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
RT	Transcriptase reversa
SaO_2	Saturação de oxigênio arterial
SFB	Soro fetal bovino
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOFA	*Sequential organ failure assessment*
SSC	*Side scatter*
T_A	Temperatura ambiente
T_{CORP}	Temperatura corporal
T_{CULT}	Temperatura de cultivo
TF	Fator tecidual
TICAM1	*Toll like receptor adaptor molecule 1*
TLRs	Receptores do tipo toll
TNFR	Receptor de TNF

TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
UTI	Unidade de terapia intensiva
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VLA-4	Antígeno tardio 4
VO_2	Consumo de oxigênio

Lista de ilustrações

Figura 1 – Imunopatologia da sepse..... 20
Figura 2 – Compostos com ação microbicida..... 23
Figura 3 – Dicotomia entre febre e hipotermia..... 27
Figura 4 – Efetores da febre e da hipotermia na sepse..... 28
Figura 5 – Curva de crescimento bacteriano..... 37
Figura 6 – Purificação celular..... 40
Figura 7 – Curva de T_{CORP} completa de paciente séptico..... 46
Figura 8 – Episódios de hipotermia espontânea em pacientes sépticos não submetidos a aquecimento ativo..... 48
Figura 9 – Mapa de calor (*heat map*) que descreve o número de episódios de hipotermia em função tanto do escore APACHE II quanto da permanência na UTI..... 49
Figura 10 – Relação entre o desenvolvimento de hipotermia e a fase de hospitalização..... 50
Figura 11 – Presença ou ausência de choque circulatório ou angústia respiratória no início do episódio de hipotermia..... 51
Figura 12 – Relação entre tempo de resposta da dipirona e início da hipotermia na sepse.. 52
Figura 13 – Relação entre o VO_2 e T_A..... 54
Figura 14 – Curso temporal da hipotermia em sepse induzida por *P. aeruginosa* ou *E. coli..* 56
Figura 15 –T_A de preferência por ratos com sepse grave..... 57
Figura 16 –Curso temporal de hipotermia e febre em ratos com sepse..... 58
Figura 17 –Função pulmonar..... 60
Figura 18 – Estratégia para estudo dos neutrófilos por citometria de fluxo..... 61
Figura 19 – Recrutamento e viabilidade de neutrófilos..... 62
Figura 20 – Viabilidade celular *in vitro*..... 63
Figura 21 - Estratégia para estudo dos neutrófilos por citometria de fluxo..... 64
Figura 22 – Moléculas envolvidas na migração de neutrófilos..... 65
Figura 23 – Teste de quimiotaxia..... 66
Figura 24 – Carga bacteriana..... 67
Figura 25 – Infiltrado de macrófagos..... 68
Figura 26 – Crescimento bacteriano..... 69
Figura 27 – Atividade microbicida..... 70
Figura 28 – Ensaio de fagocitose..... 71
Figura 29 – Produção de ROS..... 71
Figura 30 – Expressão do mRNA de iNOS..... 72
Figura 31 – Citocinas produzidas *in vivo*..... 73
Figura 32 – Citocinas produzidas *in vitro*..... 74

Lista de tabelas

Tabela 1 – Sequências de *primers*..... 45
Tabela 2 – Características do grupo de pacientes sépticos que apresentaram um ou mais episódios de hipotermia..... 47
Tabela 3 – Medicamentos usados no dia em que houve desenvolvimento de hipotermia em comparação com os dias adjacentes (dias sem hipotermia)..... 53
Tabela 4 – Tratamentos para indução de sepse..... 55
Tabela 5 – Dados de gasometria arterial 5 h e 20 h após a indução de sepse..... 59
Tabela 6 – Expressão de moléculas envolvidas na migração de neutrófilos..... 65

Sumário

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA 19
1.2 SEPSE: FISIOPATOLOGIA E RESPOSTA IMUNOLÓGICA 20
1.2.1 Importância dos neutrófilos no contexto inflamatório 21
1.2.2 Importância dos macrófagos no contexto inflamatório 24
1.3 A SEPSE E SUAS MANIFESTAÇÕES TÉRMICAS 25
1.4 REGULAÇÃO DA T_{CORP} 26
1.5 FEBRE E HIPOTERMIA 29
1.6 IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A IMUNIDADE 30
2 OBJETIVOS 33
3 MATERIAL E MÉTODOS 34
3.1 ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO 34
3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL 35
3.2.1 Animais 35
3.2.2 Padronização do inóculo para indução do modelo de sepse 36
3.2.3 Cirurgia para inserção de cateter peritoneal, arterial e sensor de telemetria 37
3.2.4 Sistema experimental e indução da sepse 38
3.2.5 Gradiente térmico 38
3.2.6 Coleta de sangue e tecido 39
3.3 CULTURA CELULAR 39
3.3.1 Purificação de neutrófilos 40
3.3.2 Purificação de macrófagos 40
3.3.3 Cultura celular e estímulos 41
3.4 MEDIDAS 41
3.4.1 Gasometria 41
3.4.2 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo 41
3.4.3 Avaliação de migração celular por quimiotaxia 42
3.4.4 Determinação de carga, crescimento e *killing* bacteriano 42
3.4.5 Ensaio de fagocitose 43
3.4.6 Dosagem da produção de ânion superóxido (ROS) 43
3.4.7 Expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) 44
3.3.7.1 Extração do RNA 44
3.3.7.2 Transcrição do cDNA 44
3.3.7.3 Reação em cadeia da polimerase (qPCR) quantitativa em tempo real 44
3.4.8 Dosagem de citocinas 45
3.4.9 Análise estatística 45
4 RESULTADOS 46

4.1 OBJETIVO 1: ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO 46
4.1.1 Caracterização geral dos pacientes sépticos que desenvolveram hipotermia. 46
4.1.2 Curso temporal da hipotermia em pacientes com sepse 48
4.1.3 Associação entre hipotermia, gravidade da sepse e óbito 49
4.1.4 Influência do choque circulatório e da disfunção respiratória no desencadeamento da hipotermia 51
4.1.5 Influência da farmacoterapia no desenvolvimento de hipotermia 52
4.2 OBJETIVO 2: DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE 54
4.2.1 Escolha da T_A adequada para permitir ou impedir o aparecimento de hipotermia 54
4.2.2 Microrganismo infectante e dose adequada para indução de sepse grave 55
4.2.3 Validação do modelo de sepse grave monobacteriana 57
4.3 OBJETIVO 3: IMPACTO DA HIPOTERMIA SOBRE O RECRUTAMENTO, A VIABILIDADE E A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS 59
4.3.1 Função pulmonar dos ratos com sepse 59
4.3.2 Recrutamento e viabilidade de neutrófilos no sangue e nos sítios de infecção 61
4.3.3 Migração dos neutrófilos 64
4.4 OBJETIVO 4: IMPACTO DA HIPOTERMIA SOBRE O CONTROLE DA INFECÇÃO 67
4.4.1 Carga bacteriana nos pulmões e peritônio 67
4.4.2 Presença de macrófagos nos sítios infecciosos 68
4.4.3 *E. coli* na febre *versus* hipotermia 69
4.4.4 Atividade microbicida dos neutrófilos e macrófagos 70
4.4.5 Perfil de citocinas produzidas por macrófagos 73
5 DISCUSSÃO 75
6 CONCLUSÃO 79
6.1 ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO 79
6.2 ESTUDO EXPERIMENTAL 79
REFERÊNCIAS 80

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A cada ano, a inflamação sistêmica decorrente de infecção (sepse) adquire maior importância epidemiológica e é uma das principais causas de mortalidade em pacientes hospitalizados em diversos países [1]. E diante da grande quantidade de termos e sinônimos para designar a mesma condição clínica foi necessária a realização de uma conferência de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*, em 1991 [2, 3]. Nesta conferência, a sepse ficou então definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um estado inflamatório sistêmico manifestado por pelo menos dois dos seguintes critérios: (**i**) temperatura corporal (T_{CORP}) > 38 °C ou < 36 °C; (**ii**) frequência cardíaca > 90 batimentos/min; (**iii**) taxa respiratória > 20 respirações/min ou $PaCO_2$ > 32 mmHg e (**iv**) contagem de leucócitos > 12.000 ou < 4.000 células/mm^3 no sangue ou >10% as formas imaturas [4].

Mais recentemente, tal conceito vem recebendo críticas por ser pouco discriminativo, uma vez que os critérios de SIRS são geralmente observados em pacientes com gripe ou pneumonia mais forte. Logo, um novo consenso internacional sobre critérios diagnósticos para sepse e choque séptico foi realizado em 2015 no *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Ele foi desenvolvido pela *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Intensive Care Medicine*, justificadas pela necessidade de uma melhor definição baseada nos avanços para melhorar os critérios diagnósticos da sepse. Na nova definição, a sepse ficou definida como uma disfunção de órgãos potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, sendo disfunção de órgão identificada pelo aumento agudo maior ou igual a 2 pontos no escore SOFA [5].

Os casos mais comuns de sepse são de origem bacteriana, das quais 60% são de bactérias Gram negativas e 40% de bactérias Gram positivas [6, 7], mas também pode ser causada por fungos, parasitas e vírus [8]. Essa resposta inflamatória sistêmica pode levar à sepse grave, acompanhada pela disfunção de órgãos, podendo ainda evoluir para choque séptico, definido como sepse grave associada à hipotensão persistente e refratária a vasoconstritores.

A incidência da sepse aumentou cerca de 90% nas últimas décadas, com ocorrência de 751.000 novos casos de sepse por ano nos Estados Unidos, dos quais 32,2% para sepse grave e 54,1% para choque séptico, evoluem para óbito [9, 10]. No Brasil, cerca de 25% dos pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) apresentaram diagnóstico de sepse grave e choque séptico, com taxa de mortalidade de 34,7%, 47,3% e 52,2% para sepse, sepse grave e choque séptico, respectivamente [11].

Apesar dos avanços científicos em diversas áreas nas últimas décadas, a taxa de mortalidade dos pacientes sépticos não mudou e a dependência de antibióticos e intervenções de apoio para o controle de distúrbios hemodinâmicos têm sido as únicas estratégias terapêuticas [12]. Esta realidade tende a piorar com a possível era pós-antibióticos e

resistência dos agentes infecciosos. Outro ponto relevante relacionado a esta enfermidade é o elevado custo do tratamento. Estima-se um gasto anual de 18 bilhões de dólares nos Estados Unidos [13]. Neste sentido, a elevada incidência, o auto custo hospitalar, a gravidade da doença e ausência de tratamento adequado destacam a importância de estudos nesta área.

1.2 SEPSE: FISIOPATOLOGIA E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A patogênese desta síndrome está resumida na **Fig. 1** e envolve: o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) presentes nos microrganismos invasores via receptores de reconhecimento padrão (PRR) por células da imunidade inata. Na sepse, além da presença de PAMPs há também a liberação aguda de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que também são reconhecidos por PRRs e acabam por exacerbar ainda mais a resposta inflamatória. O reconhecimento antigênico desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação e translocação dos fatores de transcrição AP-1 e NF-κB, via MyD88 ou TICAM1/TRIF, para o núcleo. No núcleo ocorre ativação de uma variedade de genes, incluindo proteínas de fase aguda, enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), fatores da coagulação, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Dentre essas citocinas, as primeiras a serem produzidas e liberadas são o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e a interleucina (IL) 1β. Posteriormente também há liberação de IL-6, IL-8 e IL-12 [14-16].

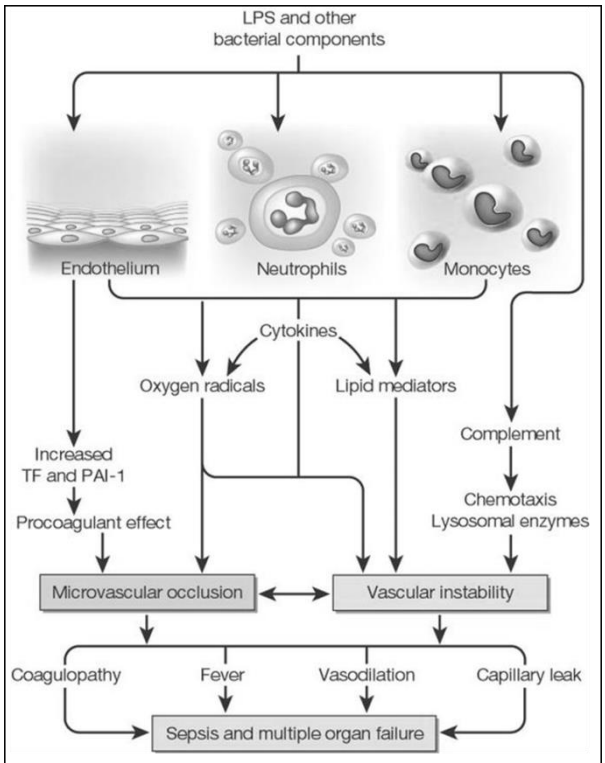

Figura 1 – Imunopatologia da Sepse. A inflamação exacerbada observada na sepse se inicia com o reconhecimento antigênico pelas células da imunidade inata, que leva a ativação simultânea de múltiplas cascatas paralelas. Ao final dessas cascatas, fatores de transcrição modulam a expressão de genes que desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios e proteínas microbicidas, que em excesso levam a danos teciduais e falência de órgãos. Abreviações: TF, tissue factor; PAI-1, plasminogen activator innibitor type 1. Figura reproduzida de Cohen J, 2002 [16].

O TNF-α é predominantemente produzido por macrófagos ativados e células T, porém mastócitos, células B, células natural killer (NK), neutrófilos, células endoteliais, osteoblastos e fibroblastos também podem contribuir. Muitas das características clássicas da inflamação podem ser atribuídas às ações do TNF-α sobre o endotélio, com aumento na produção de iNOS e cicloxigenas (COX) 2 que desencadeiam vasodilatação e diminuição do fluxo sanguíneo local [17]. TNF-α também estimula a expressão de moléculas responsáveis pela adesão endotelial, tais como E-selectina, molécula de adesão intracelular (ICAM) 1 e a molécula de adesão celular vascular (VCAM) 1 [18, 19]. Essas 3 moléculas levam à ligação dos leucócitos com a parede endotelial e sua transmigração para o interstício, acompanhados de fluido e macromoléculas do plasma [20]. Além de aumentar iNOS, COX2 e moléculas de adesão, TNF-α também induz a expressão de proteínas da coagulação, como a tromboplastina (também conhecida como fator tecidual (TF)) e diminui fatores anti-coagulantes como a trombomodulina, levando a ativação da cascata de coagulação [21].

A citocina IL-1β age em sinergismo com TNF-α na fase "hiperaguda" da sepse após a estimulação da resposta imune inata [22, 23]. A IL-1β induz a síntese de moléculas de adesão e citocinas por células endoteliais, contribuindo com a ativação de leucócitos, adesão endotelial e a transmigração para o interstício [24, 25]. IL-1β também aumenta a produção de iNOS e COX2, atuando como indutor de febre e aumentando a liberação de corticosteroides via efeitos hipotalâmicos [24, 26].

A concentração sérica de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, também é aumentada na sepse [27, 28]. Essa citocina age, não somente inibindo a liberação de TNF-α, IL-1β e IL-6 por monócitos e macrófagos, mas também induzindo a produção da proteína antagonista do receptor de IL-1 (IRAP-1) e do receptor de TNF (TNFR) solúvel, que reduzem as concentrações circulantes dessas citocinas [29]. O papel crítico de IL-10 mediando o balanço entre os processos pró e anti-inflamatórios pode ser visto em modelos experimentais onde camundongos nocautes de IL-10 foram muito susceptíveis a indução de sepse, ao passo que a administração de IL-10 previne essas consequências [30].

1.2.1 Importância dos neutrófilos no contexto inflamatório

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleados essenciais no funcionamento do sistema imunológico. Quando estimulados, expressam receptores de membrana responsáveis pela aderência e migração através do endotélio vascular, se dirigindo por quimiotaxia ao sítio da infecção. Após o neutrófilo realizar a fagocitose, no interior do endolisossomo há a morte do agente infeccioso via enzimas e agentes oxidantes. Por ser a primeira linha de defesa contra os microrganismos, qualquer falha no recrutamento dos neutrófilos está associada à permanencia da infecção, invasão do agente à corrente circulatória e reação inflamatória sistêmica culminando com a morte do indivíduo [31]. O entendimento das vias de ativação, sinalização e mobilização dos neutrófilos auxiliam na identificação de alvos terapêuticos para seletivamente inibir ou ativar determinadas funções [32]. Essas células são constitutivamente geradas na medula óssea por precursores mielóides. Sua produção diária pode chegar a 2 X 10^{11} células

em um humano adulto [33]. Humanos e murinos têm diferentes quantidades de neutrófilos circulantes. Em humanos, 50-70% dos leucócitos circulantes são neutrófilos, enquanto nos murinos e ratos são apenas 10-25% [34, 35].

Durante uma infecção há liberação local e sistêmica de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, histaminas e prostaglandinas. As primeiras citocinas encontradas no sítio inflamatórios são TNF-α e IL-1β, que juntas são responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos e, consequentemente pelos principais sintomas da inflamação. Esses mediadores promovem vasodilatação e consequente redução na velocidade do fluxo sanguíneo que resulta no deslocamento dos neutrófilos para a periferia dos vasos, fenômeno denominado marginação. Após a marginação, há o rolamento dos neutrófilos, por meio da expressão de receptores nas membranas das células endoteliais denominadas selectinas, que interagem com grupos de carboidratos específicos na superfície dos leucócitos [36]. Existem selectinas endoteliais (E), plaquetárias (P) e leucocitárias (L). A P-selectina é sintetizada constitutivamente pelas células e secretada em grânulos citoplasmáticos, enquanto a E-selectina é produzida somente quando há indução via citocinas como IL-1β e TNF-α [37]. Posterior ao rolamento acontece a adesão firme entre o endotélio e os leucócitos mediada por integrinas. Este último evento decorre da maior afinidade entre o heterodímero constituído por α e β-integrinas dos leucócitos com seus respectivos ligantes no endotélio, tais como LFA-1 e VLA-4 pelos neutrófilos, que interagem com ICAM e VCAM das células endoteliais.

Após saírem dos vasos sanguíneos, os neutrófilos migram para o sítio infeccioso guiados por um gradiente quimiotático, o qual pode ser formado por quimiocinas, leucotrieno B4 (LTB4), C5a (anafilatoxina) e componentes bacterianos, como formilpeptídeos [38]. Além disso, os receptores para quimiocinas exercem grande importância no recrutamento de neutrófilos para o foco da infecção por atuarem aumentando a afinidade entre integrinas do endotélio e leucocitárias, e ainda guiam os leucócitos para o local da inflamação. Dentre essse receptores o CXCR2 é o principal receptor quimiotático para os neutrófilos e interage com as quimiocinas CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC (murinho) e CXCL8 (humanos). A migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse não grave é dependente do CXCR2. Entretanto frente à sepse grave ocorre internalização do CXCR2 em neutrófilos e esta internalização é responsável pela falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso [39, 40]. Normalmente, os neutrófilos não expressam os receptores da família CCR, porém estudos prévios demonstraram que em determinadas condições inflamatórias essas células passam a expressar diferentes receptores e a responder a diferentes quimiocinas [41-43]. Logo, o receptor CCR2 merece destaque nesse contexto, pois é um dos exemplos de receptores da família CCR aumentados na sepse. Já foi demonstrado que o aumento da expressão desse receptor em neutrófilos durante a sepse tem importante papel na migração dessas células para órgãos distantes. Os animais deficientes para CCR2 quando submetidos a protocolos de sepse apresentam menor mortalidade em relação aos animais falso-operados, devido à redução do infiltrado neutrofílico nos pulmões, rins e coração, com menor disfunção nesses órgãos, mesmo não havendo falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso [44].

Já no sítio da infecção, os formilpeptídeos derivados de bactérias, C5a, LTB4 e citocinas liberadas localmente estimulam os neutrófilos a sofrerem uma "explosão respiratória", na qual uma grande quantidade de oxigênio molecular é consumida para geração de superóxido via complexo NADPH oxidase. A partir do superóxido são geradas outras espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^-) e ácido hipocloroso (HOCL) (**Fig. 2**) [45, 46]. As ROS são consideradas altamente reativas e são inicialmente liberadas no interior dos fagolisissomos, onde se combinam rapidamente com proteínas microbianas e lipídeos, resultando na oxidação dos mesmos [47]. Eles também são liberados no citosol, onde alteram o estado "redox" da célula e oxidam componentes celulares, alterando sua função [48]. Sob condições patológicas, tais radicais são liberados no meio extracelular, onde são responsáveis, em partes, pelo dano tecidual durante uma resposta inflamatória não controlada [49].

Além de ROS, os neutrófilos produzem compostos derivados de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito. O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da L-arginina, e ao reagir com o ânio superóxido gera peroxinitrito, que é a substância derivada de nitrogênio com ação microbicida (**Fig. 2**). Existem três isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), sendo a última expressa nos fagócitos sobre estímulo de citocinas, tais como IL-1β e INF-γ, além de outros mediadores pró-inflamatórios [50].

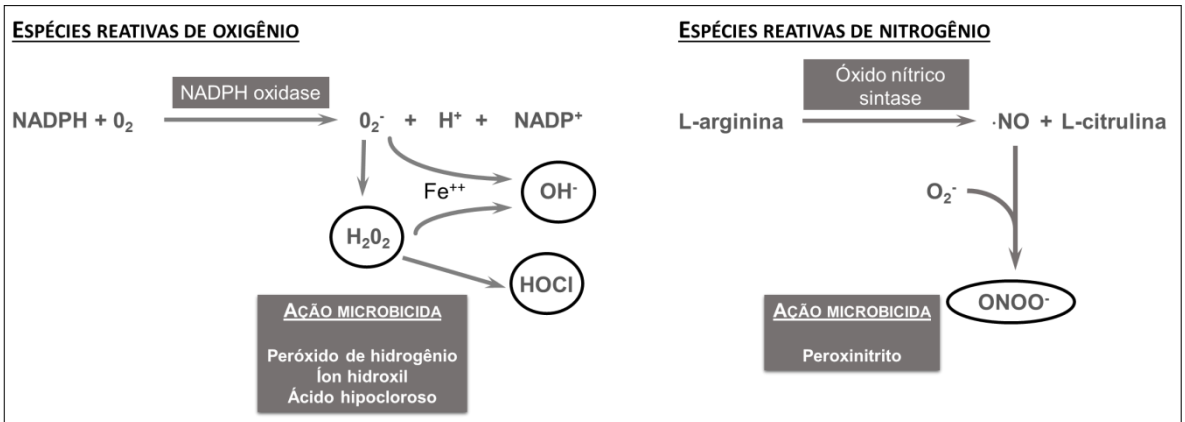

Figura 2 – Compostos com ação microbicida. Espécies reativas de oxigênio e hidrogênio são produzidas por neutrófilos e macrófagos durante a sepse.

Os neutrófilos, diferente dos macrófagos, ainda são capazes de eliminar os patógenos por meios extra-celulares. Existem três tipos de grânulos que são formados consecutivamente durante a maturação dos neutrófilos, e eles estão cheios de proteínas pró-inflamatórias. São os grânulos azurófilos, que contém mieloperoxidase (MPO); grânulos específicos, que contém lactoferrina; e grânulos gelatinase, que contém metaloproteinase 9 (MMP9). Essas proteínas antimicrobianas podem ser liberadas no fagolisossomo e também no meio extracelular, eliminando microrganismos extracelulares [33, 51, 52].

Além disso, em um contexto de sepse, neutrófilos altamente ativados são capazes de lançarem redes para o meio extracelular compostas por proteínas derivadas do citoplasma celular, e surpreendentemente, por DNA. O mecanismo de extrusão destas redes foi

denominado NETose, e as redes em si, NETs (*neutrophil extracelular traps*). As NETs são estruturas complexas, compostas por milhares de filamentos de aproximadamente 15nm de diâmetro que se entrelaçam formando redes extracelulares [53]. Vários estímulos são capazes de induzir a liberação das NETs, tais como IL-8, IFN-γ, GM-CSF; PMA, lipopolissacarídeo (LPS), *Escherichia coli*, entre outros. As NETs possuem duas funções efetoras, elas podem apenas aprisionar o patógeno, impedindo sua disseminação, ou podem ainda ter uma ação microbicida direta sobre os microrganismos aprisionados [53-55].

1.2.2 Importância dos macrófagos no contexto inflamatório

Os macrófagos são produzidos na medula-óssea, a partir de uma célula progenitora comum aos neutrófilos (CFU/GM) [56]. Essa célula inicial dá origem ao monoblasto, que embora pouco diferenciada, já apresenta alguns receptores característicos de macrófagos, tais como o receptor para porção Fc da imunoglobulina IgG e o receptor de C3b. Essas células por sua vez se diferenciam em pró-monócito que se dividem e dão origem aos monócitos. Cerca de 1 dia após serem diferenciados, os monócitos caem na circulação sanguínea onde migram constantemente para os diferente tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais e adquirem propriedades funcionais tecido-específicos, permanecendo como células residentes [57, 58]. Macrófagos peritoneais (cavidade peritoneal), células de kupfer (fígado), micróglia (sistema nervoso central) e células de langerhans (epiderme) são exemplos de macrófagos residentes que se diferenciaram via produtos secretados pelo próprio tecido, por células vizinhas ou pela matrix extracelular [59].

Durante o processo inflamatório ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea [60], assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão [61]. Esse processo geralmente ocorre após os primeiros neutrófilos se infiltrarem. No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por um processo de ativação, que o capacita a executar funções complexas. Essas células se tornam aptas para quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares, capacidade de morte tumoral [62].

Diferente dos neutrófilos, os macrófagos somente são capazes de matar microrganismos intracelulares e, por esse motivo, eles apresentam uma grande atividade secretória tanto de proteínas microbicidas quando de substâncias moduladoras da inflamação. Dentre as mais de cem substâncias biologicamente ativas estão enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que regulam a função e crecimento de outras células (citocinas, colagenase, prostaglandinas, entre outras) [63-65]. Além disso, os macrófagos exercem quatro funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos, imunomodulação via produção de várias citocinas e fatores de crescimento e remodelamento tecidual. Os macrófagos infiltrantes diferem dos macrófagos residentes especialmente pelo aumento da capacidade fagocítica e pela habilidade aumentada de gerar metabólitos tóxicos derivados de oxigênio e nitrogênio (**Fig. 2**) [66].

Os macrófagos podem ser polarizados de acordo com diferentes estímulos que posteriormente os dividem em duas populações principais: macrófagos clássicos M1 e alternativos M2. Resumidamente os macrófagos M1 são pró-inflamatórios, diferenciados na presença de INF-γ e TNF-α, apresentam expressão elevada de iNOS e são grandes produtores de ROS, NO e citocinas, tais como IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-23 [67]. Já os macrófagos M2 são ativados principalmente por IL-4 e IL-13, produtores de IL-10 e TGF-β, e ainda geram ornitina e ureia, que levam a produção de colágeno e proliferação celular [68, 69]. Porém, no contexto de inflamação sistêmica, é raro encontrar macrófagos tipicamente M1 ou M2, o que possivelmente reflete um expectro contínuo de macrófagos pró-inflamatórios a anti-inflamatórios [70].

Em conjunto, os potentes mecanismos microbicidas de macrófagos e neutrófilos na sepse estão associados à liberação excessiva de substâncias pró-inflamatórias em resposta ao patógeno, que ao mesmo tempo em que tentam controla a infecção, podem levar a danos teciduais e disfunção de órgãos. Logo, estratégias anti-inflamatórias foram incansavelmente testadas em pacientes sépticos, porém todos os mais de 100 ensaios clínicos falharam [71]. Além disso, quando se trata de sepse não é exagero afirmar, parafraseando Bernard & Bernard, que as pesquisas atuais, embora tenham avançado consideravelmente, deixaram mais perguntas do que respostas [72], portanto a associação das respostas imunológicas com as respostas fisiológicas, conservadas filogeneticamente, mereça um olhar mais aprofundado. Entre essas respostas fisiológicas podemos enfatizar mudanças na T_{CORP}, uma vez que a inflamação sistêmica, infecciosa ou não, é usualmente acompanhada de febre ou hipotermia.

1.3 A SEPSE E SUAS MANIFESTAÇÕES TÉRMICAS

A temperatura, um fator crítico em todos os processos bioquímicos ou biofísicos, está entre os determinantes mais importantes da transferência de matéria e energia em qualquer célula, organismo e ecossistema vivos [73]. Portanto, não é surpreendente que a termorregulação seja quase tão antiga quanto à própria vida, estando presente mesmo em organismos unicelulares em um gradiente térmico [74]. Um elaborado sistema termorregulador parece proporcionar vantagens adaptativas, uma vez que o progresso da ectotermia à endotermia é considerado um marco na evolução dos vertebrados [75-77]. Os animais endotérmicos (mamíferos e aves) são capazes de manter sua T_{CORP} relativamente constante em uma ampla faixa de temperatura ambiente (T_A). Tal capacidade é devido ao surgimento de mecanismos termo-efetores mais eficientes de perda de calor e, ainda mais importantes, de mecanismos especializados na produção de calor [76]. Todavia, quando submetidos a condições adversas, como infecção, a T_{CORP} dos animais endotérmicos pode variar temporariamente.

Dentre as condições adversas às quais um organismo pode ser submetido, pode-se destacar a sepse, que como já dito acima é uma síndrome que usualmente é acompanhada de febre. A febre é uma resposta regulada e benéfica do organismo que já teve seu papel biológico demostrado em animais de experimentação e até em humanos com sepse [78-80]. Um aumento na T_{CORP} favorece diversas funções do sistema imune, tais como fagocitose [81, 82], migração leucocitária [83, 84], apresentação antigênica [85, 86] e proliferação linfocitária [87, 88], além

de também retirar grande parte dos microrganismos patogênicos de sua temperatura ótima de crescimento [89, 90], embora existam exceções [91, 92].

Para complicar o problema ainda mais, a febre não é o único tipo de manifestação térmica, 9-16% dos pacientes com sepse [78, 93-95] e 13-21% dos pacientes com choque séptico [79] desenvolvem hipotermia. O aparecimento dessa resposta no momento da internação na UTI prediz um mal diagnóstico, pois pacientes com sepse e hipotérmicos tem maior taxa de mortalidade [78, 93-97]. No entanto, esses mesmos pacientes apresentam também maiores índices de APACHE II e SOFA (indicativos de gravidade e prognóstico da doença) [94, 95, 97]. A associação desses índices com o aparecimento de hipotermia evidencia que pacientes sépticos e hipotérmicos estão mais doentes do que aqueles sem hipotermia, logo a ideia de que hipotermia é ruim pode simplesmente estar refletindo a maior prevalência desse fenômeno nos casos mais graves de sepse. Dessa forma, a simples associação de hipotermia com mortalidade não deve ser tomada como uma indicação de que a hipotermia em si piora o quadro do paciente [94]. Contudo, o reaquecimento imediato de pacientes sépticos e hipotérmicos ainda é uma prática comum em vários centros médicos [98].

A percepção em torno do papel desregulado da hipotermia na sepse não se restringe somente a clínica. É comum pressupor que a hipotermia, mesmo em modelos experimentais, seja consequência de respostas hemodinâmicas. Porém, os estudos em animais nos últimos anos evoluíram significativamente e produziram evidencias que mostraram que a hipotermia é um fenômeno regulado. Em primeiro lugar, a hipotermia que aparece em ratos endotóxicos é uma resposta transitória, que ocorre pouco tempo após a administração de LPS e não é consequência de choque circulatório [99]. Em segundo lugar, a hipotermia no choque endotóxico é provocada pela diminuição regulada da termogênese quando a capacidade termogênica não se encontra comprometida [94, 95]. Em terceiro lugar, os ratos com choque endotóxico não tentam restaurar a normotermia quando a possibilidade de selecionar um ambiente mais quente é oferecida a eles, na verdade o comportamento do animal é exatamente o contrário: o rato busca um ambiente mais frio (*cold-seeking behavior*) [97]. Por último, mas não menos importante, a hipotermia espontânea demonstrou ser mais vantajosa do que a febre em ratos com formas graves de endotoxemia e sepse induzida por *E. coli* [100, 101].

A hipotermia regulada é diferente da hipotermia acidental ou forçada. O termo regulado se refere a um processo no qual um organismo "quer" se tornar hipotérmico e ajusta a atividade termo-efetora para alcançar esse objetivo. Por outro lado, os termos acidental e forçado se referem a uma situação em que um organismo é incapaz de manter sua T_{CORP} no nível desejado, geralmente devido a um resfriamento extremo ou falha na termorregulação. Existem dados que mostraram que a hipotermia espontânea foi mais vantajosa do que a hipotermia forçada em ratos com endotoxemia grave [102]. Logo, a virada de febre para hipotermia pode ser uma estratégia adaptativa para lidar com demandas competitivas que surgem diante de uma resposta inflamatória sistêmica [103, 104].

1.4 REGULAÇÃO DA T_{CORP}

Os mecanismos de regulação da T_{CORP} podem ser autonômicos (involuntários) e comportamentais (voluntários). Os mamíferos, por serem animais endotérmicos são capazes de utilizar esses dois mecanismos para termorregular, enquanto animais ectotérmicos

dependem mais de mecanismos comportamentais. Embora os mecanismos autonômicos de controle da T_{CORP} sejam vitais, os mecanismos comportamentais são essenciais para a adequada manutenção da T_{CORP} e, inclusive, são recrutados antes dos mecanismos autonômicos, frente a um ambiente adverso, por serem eficientes e econômicos a longo prazo [105-107]. Podemos dividir os mecanismos comportamentais existentes em sofisticados (uso de vestimentas, manipulação do fogo e utilização da eletricidade para fornecimento de calor) e primitivos (construção de ninhos, alteração da atividade locomotora e escolha da T_A de preferência). A importância da termorregulação comportamental é demonstrada com sucesso em um estudo prévio onde ratos idosos, quando mantidos a uma T_A constante, não desenvolveram febre em resposta ao LPS, porém quando foram colocados em um gradiente térmico (sistema onde o animal pode se mover livremente e escolher o ambiente térmico de sua preferência) escolhiam uma T_A mais quente e para desenvolverem febre [108].

Os mecanismos autonômicos termorregulatórios incluem aqueles destinados a produzir/conservar calor e aqueles destinados a promover a perda de calor. Os mecanismos efetores para produção de calor incluem a termogênese por tremor nos músculos esqueléticos e termogênese sem tremor no tecido adiposo marrom [109]. Os mecanismos de perda de calor, por sua vez, são divididos em evaporativos e não evaporativos.

O tremor é fonte de calor em animais expostos ao frio, pois desencadeia aumento do metabolismo basal, uma vez que o resfriamento do corpo induz atividade dos músculos esqueléticos em repouso. Já a termogênese sem tremor produz calor sem atividade muscular via ativação simpática do tecido adiposo marrom. Este tecido está presente na região interescapular de mamíferos de pequeno porte e humanos neonatos e, em humanos adultos, encontra-se espalhado na forma de depósitos localizados nas regiões cervical, clavicular e para-espinhal [110, 111]

Por outro lado, a perda de calor depende de mecanismos não evaporativos e evaporativos. O mecanismo não evaporativo é basicamente via vasodilatação cutânea, que permite a disponibilização de sangue quente para a troca de calor com o ambiente [112, 113]. Já os mecanismos evaporativos variam muito de acordo com a espécie estudada, nos humanos

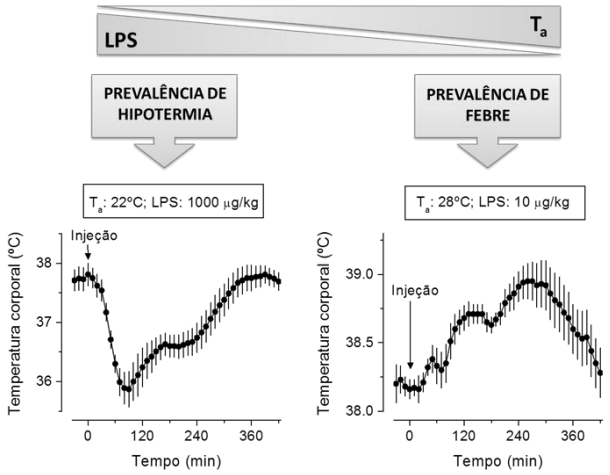

Figura 3 - Dicotomia entre febre e hipotermia. Abreviações: LPS, lipopolissacarídeo; T_a, temperatura ambiente. Reproduzida com autorização de *Steiner AA, livre docência*.

e cavalos ocorre via sudorese [114, 115]; ratos e camundongos espalham saliva pelo corpo [105] e a ofegação é vista em cães e ovelhas [116], porém todos esses mecanismos têm como objetivo perder calor para o ambiente.

A resposta termorregulatória dos ratos e camundongos é dependente não só da dose de LPS, mas também da T_A (**Fig. 3**). Os mecanismos efetores da febre e da hipotermia estão esquematizados na **Fig. 4**, a qual mostra que na normotermia, o corpo mantém a T_{CORP} em torno de 37,0 °C, uma vez que quedas na T_A ativam os mecanismos de produção de calor, enquanto que um aumento na T_A ativam os mecanismos de perda de calor. Porém, frente a uma inflamação sistêmica moderada, os ratos têm preferência por permanecerem em um ambiente com temperaturas mais altas e desenvolverem febre. Neste caso o organismo ainda é capaz de termorregular, porém os limiares de produção/perda de calor são modulados em um limiar mais alto do que o observado na normotermia. No caso de uma inflamação sistêmica grave, os ratos têm preferência por permanecerem em um ambiente com temperaturas mais baixas para que a hipotermia apareça. Neste caso o organismo também é capaz de termorregular, porém os limiares de produção/perda de calor são modulados em um limiar mais baixo do que o observado na normotermia [117-124].

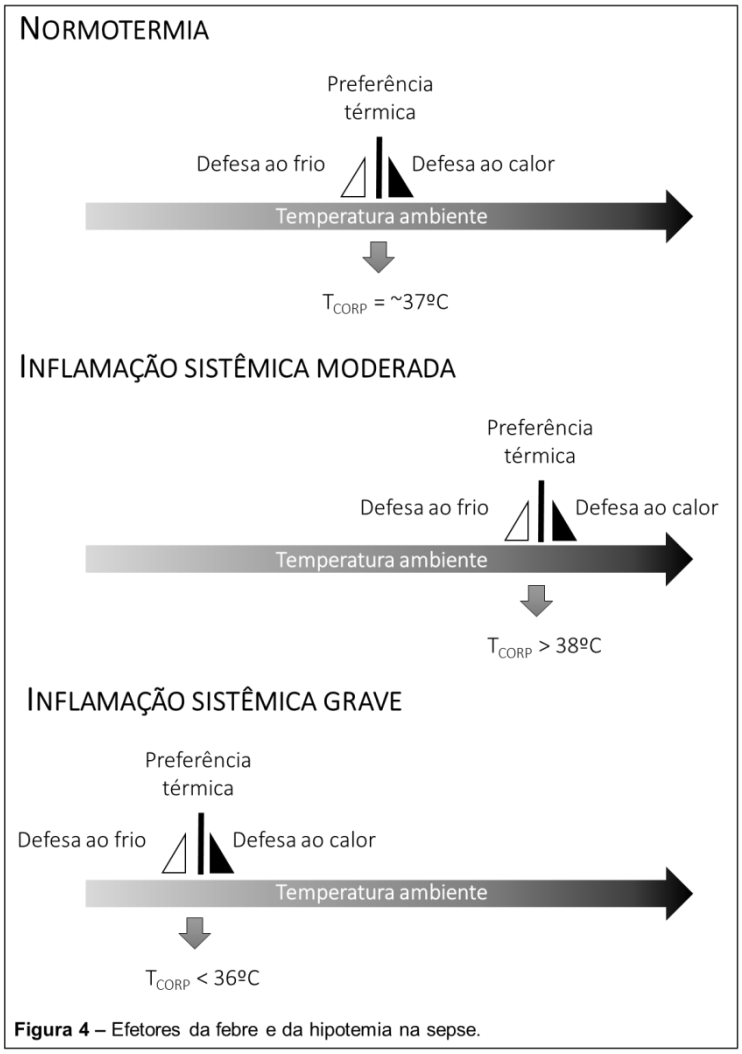

Figura 4 – Efetores da febre e da hipotemia na sepse.

Com base no exposto acima, nosso grupo vem utilizando a dependência da T_A sobre a resposta termorregulatória ao LPS para isolar o seu componente febrigênico do criogênico [124-130]. Em um estudo recente [125], esta estratégia permitiu ao grupo demonstrar, pela primeira vez, que a ocorrência natural de hipotermia é mais vantajosa do que a febre em casos graves de inflamação sistêmica induzida por LPS ou E. coli, e ainda, que um dos principais órgãos preservados nesta virada de febre para hipotermia foi o pulmão. Além disso, a influência da temperatura neste caso só foi observada em modelos de sepse, por E. coli, onde se observou menor edema e infiltrado neutrofílico [125]. Porém, os mecanismos envolvidos na melhora do quadro pulmonar desses animais ainda são desconhecidos.

1.5 FEBRE E HIPOTERMIA

A febre é a elevação regulada da T_{CORP} durante a resposta inflamatória [131], e é mediada inicialmente via prostaglandina (PG) E2, derivada principalmente de células de *Kupfer* e macrófagos alveolares [132]. Este mediador inflamatório é derivado do ácido araquidônico e COX-2 e induz, via neurônios específicos, o sistema nervoso simpático a liberar norepinefrina, que aumenta a termogênese e vasoconstrição, e acetilcolina, que estimula a termogênese sem tremor pelos músculos esqueléticos levando ao aumento da taxa metabólica, ambos os mecanismos resultam no aumento da T_{CORP} [133]. Um estudo mostrou que um inibidor específico da COX-2 (NS398) bloqueou a febre bem como a elevação da PGE2 no cérebro em resposta a injeção intraperitoneal de LPS. Outro trabalho demonstrou que camundongos deficientes do gene da COX-2, ao contrário de camundongos deficientes no gene da COX-1, não desenvolveram febre quando injetados sistemicamente com LPS [134].

Sabe-se que o desenvolvimento da febre é dependente do sistema nervoso central, mais especificamente da área pré-óptica [135]. Quanto ao desenvolvimento de hipotermia, Almeida e colaboradores [136] demonstraram que a resposta hipotérmica também pode ter um componente central. Neste estudo, a inflamação sistêmica foi induzida por injeção intravenosa de LPS em uma dose baixa, que induz a febre, e uma dose alta capaz de induzir choque e hipotermia, para avaliar o efeito de lesões em estruturas hipotalâmicas no comportamento termorregulatório dos animais. A região do núcleo dorsomedial (DMH) lesado, inibiu o comportamento de preferência pelo frio e o desenvolvimento da hipotermia, mas não afetou a febre. Estas evidências sugerem, portanto, que ambas as respostas termorregulatórias evoluíram paralelamente e não uma dependendo da outra.

Em contraste com os mecanismos imune-neurais febrigênicos já bem conhecidos, os mecanismos imune-neurais que desencadeiam a hipotermia ainda são pouco esclarecidos. O que se sabe até então, é que o mediador inflamatório TNF-α parece ser relevante para o desenvolvimento dessa resposta, tanto no modelo de endotoxemia como no modelo de sepse induzida por ligação cecal e perfuração. Um estudo demonstrou que [137] enquanto baixas doses de TNF-α causam febre, doses intermediárias a altas causam hipotermia. Além disso, outro estudo [138] demonstrou que camundongos nocautes para receptor de TNF-α desenvolviam febre e uma hipotermia mínima durante a sepse, demonstrando um possível

papel do TNF-α como um mediador criogênico ou antipirético endógeno. Diante desses fatos, pode ser que a hipotermia seja decorrente de uma amplificação pró-inflamatória e não de uma ativação de mecanismos antipiréticos endógenos. Como exemplo, tem-se que substâncias anti-inflamatórias como os glicocorticoides limitam não só o desenvolvimento de febre, mas também o desenvolvimento de hipotermia frente à inflamação sistêmica [139, 140].

Outro ponto relevante a ser mencionado é a participação de prostanoides em respostas termorregulatórias. Como mencionado anteriormente sobre o papel chave da PGE_2 produzida via COX-2 na indução da febre, já existem algumas poucas evidências do papel de mediadores lipídicos na promoção da hipotermia. Em um trabalho ainda não publicado, mas apresentado em forma de resumo, foram avaliadas as propriedades termorregulatórias dos prostanoides primários e de alguns de seus produtos, todos administrados intravenosamente ligados à albumina. A PGD2 e a PGI2 apresentaram atividade criogênica, porém, a hipotermia induzida pela PGD2 foi a mais pronunciada e consistente. A propriedade criogênica da PGD2 foi inicialmente descrita por Ueno e colaboradores [141] e, desde então, foi reproduzida algumas vezes, inclusive em um estudo do nosso laboratório no qual a PGD2 foi administrada intracerebroventricular [124].

O primeiro estudo bem controlado que mostrou que ratos preferem permanecer em um ambiente mais frio e desenvolver hipotermia só foi feito em 2006, ou seja, é um estudo relativamente recente, mas que foi importante para embasar a hipótese de que a hipotermia pode ser uma resposta natural e, possivelmente, uma estratégia do organismo que permite conservação de energia, frente a formas mais graves de inflamação sistêmica, quando o custo energético da febre se torna uma ameaça ao hospedeiro [136]. Posteriormente, o valor biológico da virada de febre para hipotermia foi demonstrado em 2012, quando Liu e colaboradores tiraram vantagem da dependência da T_A para impedir o aparecimento de febre em ratos sépticos. Neste experimento foi visto que a hipotermia diminuiu a mortalidade, protegeu fígado, rins e pâncreas, além de atenuar a lesão pulmonar por diminuir o infiltrado inflamatório neste órgão [142].

Com base nos dados desse trabalho, desenvolvido previamente por nosso grupo, buscamos entender como a temperatura poderia estar alterando a resposta imunológica, e encontramos na literatura ou dados controversos, ou abordagens de aquecimento ou resfriamento forçado, que não refletem o que acontece na sepse.

1.6 IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A IMUNIDADE

Todos os processos que ocorrem em um organismo necessitam de uma temperatura adequada, inclusive a ativação do sistema imunológico. Por isso, inúmeros experimentos buscaram elucidar o impacto da temperatura sobre a imunidade, porém a grande maioria deles focou nos efeitos da febre. Estes trabalhos apontaram que o estresse térmico mediado por altas temperaturas atua nos neutrófilos, estimulando a liberação dessas células da medula-óssea para a circulação [143-145], e promovendo o recrutamento de neutrófilos para os pulmões e outros sítios infecciosos de maneira dependente de CXCL8 [146]. Ainda, o estresse térmico

atua sobre os neutrófilos aumentando a produção de ROS e, consequentemente a atividade microbicida dos neutrófilos [147, 148]. O calor potencializa a fagocitose por macrófagos e células dendríticas e aumenta a responsividade dessas células contra patógenos invasores, uma vez que aumenta a expressão de TLR2 e TLR4 [149, 150]. O estresse térmico mediado por altas temperaturas também induz a liberação de moléculas imunomoduladoras como TNF-α, NO e HSP70. Foi também observado aumento na expressão de moléculas de MHC de classe I e II, assim como moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) em macrófagos [151-154]. Células dendríticas expostas ao calor são apresentadoras de antígeno mais eficientes e direcionam a polarização para uma resposta Th1 (121). Juntos, esses dados sugerem que a febre exacerba todas as funções do sistema imune inato, sem nenhum mecanismo seletivo aparente. Porém, esses trabalhos utilizaram metodologias de aquecimento que fogem ao que é observado na febre em um contexto de inflamação. Eles empregaram modelos denominados *febrile-range temperatures* ou *heat stress*, nos quais, as células são submetidas a T_A que variam de 39,5 °C até 43 °C, ou ratos permanecem em ambientes com temperaturas iguais ou maiores que 40 °C [155-157]. Além dessas temperaturas não serem comumente observadas em ratos com sepse, esse aumento que é observado na T_{CORP} do animal não é uma febre regulada em resposta à indução de inflamação sistêmica, é um fenômeno desregulado, pois o animal simplesmente não está termorregulando, uma vez que não tem mais capacidade de perder calor para o ambiente.

Por outro lado, os poucos trabalhos dedicados a entender os impactos da hipotermia na função imune aplicaram abordagens de resfriamento que pode não refletir a situação na sepse, pois utilizaram como referência uma classificação clínica, comumente relacionada à hipotermia forçada terapêutica ou acidental, na qual a hipotermia pode ser denominada como branda (32°C ≤ T_{CORP} ≤ 34°C), moderada (31°C ≤ T_{CORP} ≤ 28°C) ou profunda (T_{CORP} ≤ 27°C). O grande problema de utilizar essas faixas de temperatura para estudar parâmetros imunes é que elas não correspondem a uma faixa fisiológica, uma vez que frente a uma infecção, a T_{CORP} raramente cairá mais do que 2 °C abaixo da T_{CORP} normal em ratos com sepse [125]. A utilização de hipotermia forçada como metodologia para estudar a influência da temperatura sobre o sistema imune gerou inúmeros estudos com dados muito contraditórios. Noguchi e colegas [94] e Abdul-Khaliq e colegas [95] relataram que a indução de hipotermia branda, em células desafiadas com LPS, resultou na diminuição da expressão de NF-kB e consequentemente diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1β e TNF-α o que levou a atenuação da inflamação. Por outro lado, estudos que utilizaram a mesma abordagem de resfriamento [96, 97] mostraram o oposto: aumento na fosforilação de IKKα e IKKβ, aumento na expressão de NF-kB e aumento de IL-1β e TNF-α. Além disso, outro grupo [93] observou que embora a expressão de NF-kB estivesse diminuída na hipotermia branda, a liberação de IL-6 e a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 estavam aumentadas, indicando que além de potencializar a inflamação a hipotermia ainda estava mantendo a viabilidade celular por mais tempo que o normal.

Este trabalho propõe uma abordagem experimental inovadora capaz de tirar vantagem da dependência da T_A e da gravidade da sepse para permitir ou impedir o desenvolvimento da hipotermia. Mais especificamente, foram introduzidas alterações não extremas de temperatura que permitiram ao rato termorregular e desenvolver febre, quando submetidos a T_A de 30 °C, ou hipotermia regulada, quando expostos a T_A de 22 °C. Outra metodologia diferencial deste trabalho foi manter as células acondicionadas em estufas com T_A que correspondiam a T_{CORP} observada no rato quando este apresentou febre ou hipotermia. Portanto, foram aplicadas temperaturas de cultivo com apenas 2,5 °C de diferença para estudar a influência da febre ou da hipotermia na função das células, o que difere bastante dos trabalhos prévios que utilizam um delta de temperatura de até 13 °C [155, 158].

2 OBJETIVOS

Este trabalho apresenta quatro objetivos cuja finalidade foi entender melhor a hipotermia na sepse. Pra isso, foi inicialmente realizado um estudo clínico retrospectivo, em pacientes sépticos, hipotérmicos e que não foram submetidos a protocolos de aquecimento ativo. Em seguida, um modelo experimental de sepse grave monobacteriana foi desenvolvido com o intuito de compreender os mecanismos pelos quais a resposta hipotérmica impacta a imunopatologia da sepse grave.

OBJETIVO 1: Caracterizar a dinâmica da resposta hipotérmica em um grupo raro de pacientes sépticos que não foram submetidos ao aquecimento ativo. Averiguar se disfunções fisiopatológicas comuns (choque circulatório e disfunção respiratória) ou intervenções farmacológicas desencadearam o início da hipotermia.

OBJETIVO 2: Desenvolver um modelo experimental de sepse grave monobacteriana bem controlado, reproduzível e sem mortalidade, no qual o aparecimento da hipotermia fosse regulado e duradouro. Este seria um modelo de sepse experimental ideal para avaliar a relação entre mecanismos imunológicos e respostas termorreguladoras.

OBJETIVO 3: Avaliar como a hipotermia decorrente de uma peritonite induzida por *E. coli* altera a função pulmonar dos ratos. Ainda, o impacto sobre o recrutamento e a viabilidade dos neutrófilos no sítio primário e também nos pumões dos ratos foi investigado.

OBJETIVO 4: Elucidar como a hipotermia regula a resposta imune inata e, consequentemente o controle da infecção. O efeito da temperatura sobre a regulação da atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos foi avaliado *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO

Com a aprovação do Comitê de Ética Institucional, os dados utilizados foram extraídos dos prontuários da UTI adulta do Hospital da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Consecutivamente, cinquenta pacientes que atenderam ao critério de inclusão tiveram os dados de seu prontuário coletados a partir de um banco de dados aleatório de pacientes diagnosticados com sepse de acordo com os critérios da *Surviving Sepsis Campaign* [2, 159-161], durante o período de 03/2005 a 08/2012. O critério de inclusão foi a presença de hipotermia, quer no momento do diagnóstico da sepse ou em uma fase posterior da permanência na UTI. A termometria axilar foi o método padrão de medida da T_{CORP} utilizado. Foi utilizado um termômetro digital com intervalo de 32,0 a 42,9 °C. De acordo com as atuais orientações, o limiar da T_{CORP} para aparecimento de hipotermia na sepse é 36.0 °C [161], sem restrições a algum método específico de termometria. No entanto, porque a termometria axilar poderia subestimar a T_{CORP} em até 0,5 °C [162], foi adotada uma abordagem mais conservadora para a detecção de hipotermia, segundo a qual os valores entre 35,5 °C e 36,0 °C foram considerados como hipotermia somente quando precedidos, no mesmo episódio, de pelo menos uma medição de 35,5 °C ou menor. Dados de frequência cardíaca e pressão arterial foram compilados temporalmente. Dados de frequência respiratória também foram coletados, mas somente quando a hipotermia aparecia em um paciente que não estava sob ventilação mecânica. Conforme a política adotada pela UTI, o reaquecimento ativo não foi empregado para combater a hipotermia espontânea nos pacientes sépticos. Métodos de resfriamento forçado para a indução de hipotermia "terapêutica" também não foram usados. Um critério de exclusão pré-determinado foi a presença de tumores cerebrais ou queimaduras extensas, mas nenhum dos pacientes apresentou qualquer uma dessas condições. As seguintes características gerais dos pacientes foram reunidas: sexo, raça, idade, fonte de infecção, microrganismo infectante, escore APACHE II na admissão, duração da permanência na UTI, e o estado geral no momento da alta da UTI. As tabelas com os dados foram construídas de modo a avaliar se qualquer uma das características gerais previam um menor ou um maior número de episódios hipotérmicos por paciente, e os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de qui-quadrado de *Pearson*. Além disso, um modelo de correlação tridimensional foi criado pelo método de *Krigagem* para avaliar o potencial de interação entre o escore APACHE II, o período de internação na UTI e o número de episódios de hipotermia por paciente.

Os dados de T_{CORP} estavam relatados a cada 2 h, com medições ocasionais em intervalos de 4 h. Cada episódio hipotérmico foi classificado como transitório ou terminal, onde "transitório" foi definido como a hipotermia seguida por T_{CORP} acima de 36,0 °C durante pelo menos 2 h antes da alta da UTI, e "terminal" foi definido como um episódio de hipotermia a partir do qual um paciente nunca se recuperou. Episódios transitórios foram ainda caracterizados de acordo com a T_{CORP} mínima alcançada e o tempo de recuperação, este último definido como o espaço de tempo entre a menor medida de T_{CORP} até uma medida de 36,0 °C ou

maior. Foi investigado também se o desenvolvimento de hipotermia foi relacionado com a hora do dia.

Para avaliar a relação entre o período de internação e o desenvolvimento de hipotermia, foram realizadas duas análises. A primeira análise consistiu em comparar o número de episódios de hipotermia observados durante as primeiras 24 h e as últimas 24 h de internação na UTI; sobreviventes e não sobreviventes foram incluídos nesta análise. Um procedimento de *bootstrap* (geração de amostras aleatórias computorizada) foi utilizado para construir o intervalo de confiança de 95% para cada grupo. A segunda análise foi focada em não sobreviventes, e avaliou se as tendências de redução nas temperaturas corporais precederam o momento da morte.

Em seguida, foi investigado se o início de hipotermia foi temporalmente associado ao choque ou disfunção respiratória. O primeiro ponto de cada episódio hipotérmico foi utilizado para esta análise; episódios incompletos foram excluídos (episódios em curso no momento do diagnóstico de sepse). A presença de choque foi inferida quando a pressão arterial média estava ≤ 60 mmHg, apesar de reanimação adequada com líquidos, ou da utilização de vasopressores como a noradrenalina. A presença de disfunção respiratória foi inferida a partir da utilização de ventilação mecânica de pressão positiva através de um tubo endotraqueal. Um procedimento de *bootstrap* foi executado para estimar os intervalos de confiança de 95% para a frequência de episódios hipotérmicos que foram desenvolvidos na ausência ou presença de choque ou disfunção respiratória.

Em seguida, foi pesquisada as relações entre o uso de medicamentos e o início da hipotermia. O intervalo de tempo entre a última administração de uma droga antipirética e o início do episódio hipotérmico que se seguiu foram calculados. O ponto de corte do tempo de resposta da droga foi fixado em 12 h. Uma análise diferente foi empregada para todos os outros medicamentos: tal análise foi menos precisa em relação ao tempo, pois comparou o uso de drogas no dia de um episódio de hipotermia em relação ao uso em dias adjacentes, livres de hipotermia (anteriores e posteriores). Os intervalos de confiança de 95% para o uso de drogas foram construídos por um procedimento *bootstrap*. As análises estatísticas foram realizadas no *software Matlab*, com exceção da correlação tridimensional, que foi feita em *Origin Pro 7.5*.

3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (peso médio 260 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo Comitê de Ética 128, folha 11, livro 03) para a realização dos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas com maravalha (2 a 4 animais/caixa) com água e ração *ad libitum* em sala com temperatura média de 26 °C e ciclo de claro/escuro (12:12 h). Após o procedimento cirúrgico até o final do experimento, cada rato ficou em caixa individual. Todos os animais foram manuseados diariamente.

3.2.2 Padronização do inóculo para indução do modelo de sepse

Para a padronização do modelo de sepse, foram testadas duas cepas de bactérias gram negativas: *E. coli* (cepa ATCC 25992) e *Pseudomonas aeroginosa* (cepa ATCC 27853), sendo ambas isoladas de pacientes com sepse. Antes de utilizar as bactérias, a curva de screscimento bacteriana foi padronizada, pois é com esta curva que se determina a fase de crescimento exponencial da bactéria (período de crescimento ideal para inoculação da bactéria). Para isso, o tempo de crescimento bacteriano em relação à quantidade de bactéria foi determinado: as bactérias foram inicialmente colocadas em 5 mL de meio líquido *Luria-Bertani* (*LB broth*) e incubadas por 15 h à 37 °C sob agitação constante. Em seguida foi feito o repique: 10 µL da solução (meio *LB broth* + *E. coli*) foram adicionados a 4.900 µL de meio *LB broth*. Esta nova solução foi também colocada em estufa à 37 °C sob agitação constante e 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h após a incubação, esta solução foi coletada e plaqueada em ágar *McConkey* para contagem de colônias de bactéria. Após 24 h a quantidade de colônias presentes na placa é contada e calculada, sendo que o cálculo leva em consideração a diluição, a quantidade de solução utilizadas no plaqueamento e o número de colônias contabilizadas. Na **Fig. 5**, está exemplificada a curva de crescimento da *E. coli*, sendo que na **Fig. 5A** foi plotada a curva de absorbância em relação ao tempo do crescimento. Neste caso, a fase de crescimento exponencial estava entre 4 e 5 h, com absorbância entre 0,7 a 0,9. Com esta absorbância conseguimos cerca de 1 x 10^9 CFU/mL de *E. coli* em cada alíquota (**Fig. 5B**). Porém, para calcular com precisão a quantidade de bactéria foi feita uma regressão linear no *software Origin Pro 7.5*, esta regressão proporcionou os valores das constantes *slope* (ou coeficiente angular) e *intercept* (ou interceptação da reta com o eixo vertical) utilizados para concluir a equação linear **y = a+bx**; onde **y** representa logCFU; **a** representa o coeficiente linear; **b** representa o coeficiente angular e **x** representa a densidade óptica que foi lida no espectrofotômetro (**Fig. 5C**). Foi padronizada uma curva de crescimento para *E. coli* e uma outra curva para *P. aeruginosa*.

Para preparar o inóculo que seria utilizado no dia da indução da sepse ou na cultura celular, uma alíquota da bactéria (que já havia sido previamente congelada em meio *LB broth)* foi descongelada e 10 µL desta solução foi adicionada a 4.900 µL de meio *LB broth*. Esta solução foi incubada à 37 °C sob agitação constante por 15 h. Em seguida, 10 µL dessa nova solução foi novamente adicionada a 4.900 µL de meio *LB broth* e incubada por 5 h à 37 °C sob agitação constante. Ao final, foi retirado 1 mL desta solução e lido em espectrofotômetro na densidade óptica de 600 nm. O valor obtido foi adicionado a equação, previamente padronizada, para calcular a quantidade de CFU/mL necessários para inocular a quantidade de bactéria que correspodesse a dose de interesse.

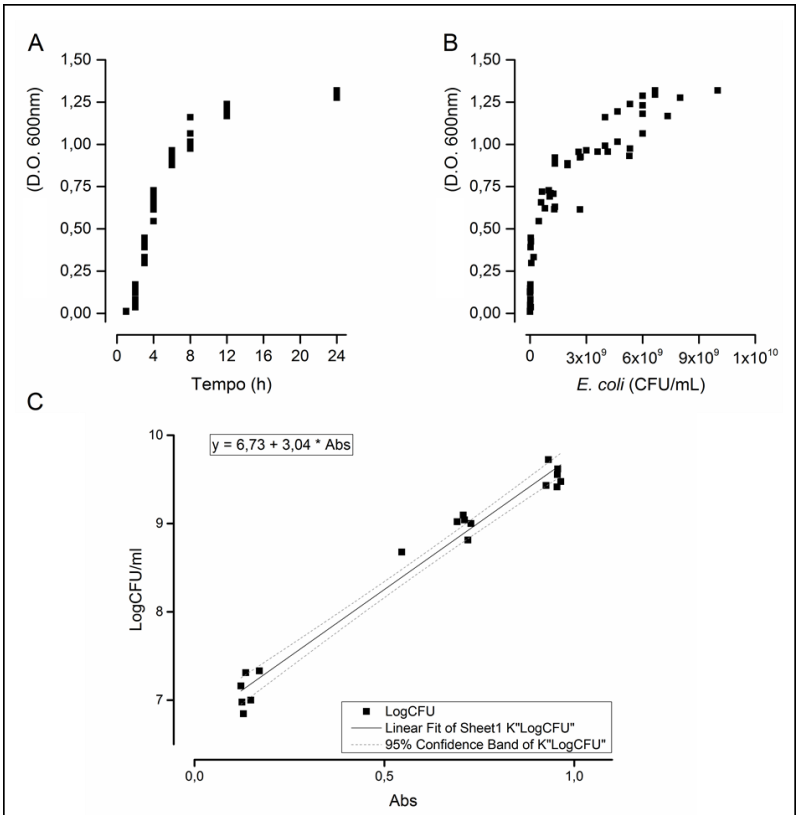

Figura 5 - Curva de crescimento bacteriano. A relação da absorbância, lida em densidade óptica (D.O.) de 600 nm, com o tempo que a *E.coli* leva para crescer está representada em **(A)**, já a relação entre a absorbância e a quantidade de bactéria está mostrada em **(B)**. E em **(C)** está representada a regressão linear utilizada para calcular a quantidade de bactéria em função da absorbância.

3.2.3 Cirurgia para inserção de cateter peritoneal, arterial e sensor de telemetria

Sete dias antes do experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para implantação do probe de telemetria i.p.: dados de T_{CORP} em tempo real; cateter i.p.: inoculação de *Poly I:C* e bactéria; e cateter arterial: coleta de sangue para gasometria. Para tal procedimento, os animais foram anestesiados por sistema a gás contendo 5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio e mantidos em mesa cirúrgica com temperatura e volume de anestesia controlados (2 - 2,5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio). No início da cirurgia, todos os animais receberam o antibiótico Enrofloxacino (5 mg/kg s.c.) e o anti-inflamatório analgésico Cetoprofeno (5 mg/kg s.c.). Uma incisão longitudinal foi feita na região ventral esquerda do pescoço. A artéria carótida esquerda foi exposta para implantação de cateter de poliuretano (*BPU-T30, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA*) até a aorta descendente. O cateter, posteriormente utilizado para coleta de sangue arterial, foi fixado por meio de suturas à artéria, exteriorizado pela nuca e preenchido por solução de glicerol heparinizado 500 U/mL (*lock solution*) para evitar coagulação sanguínea e entupimento.

No mesmo procedimento, foi inserido também um catéter i.p. para a inoculação bacteriana e um sensor de telemetria necessário para o monitoramento de T_{CORP} e atividade locomotora (modelo TA10TA-F40, *Data Sciences International, St. Paul, MN, EUA*). Para isso, uma laparotomia foi realizada e os músculos da cavidade abdominal separados. O modelo

TA10TA-F40 requer apenas que o sensor fique acomodado na cavidade abdominal. Nesse momento, o cateter i.p. atravessando o músculo foi colocado e exteriorizado sob a pele até a nuca do rato. Em seguida, o abdômen foi fechado por sutura em camadas (músculo e pele).

Os animais ficaram em câmaras climáticas com T_A de 27 °C para recuperação da cirurgia por 24 h. No dia seguinte à cirurgia, os ratos receberam Enrofloxacino (5 mg/kg s.c.) e Cetoprofeno (5 mg/kg s.c.). Os cateteres de poliuretano foram lavados com solução salina 0,9% e preenchidos novamente com solução de glicerol heparinizado 500 U/mL no primeiro e quinto dias pós-cirurgia.

3.2.4 Sistema experimental e indução da sepse

Exatamente 24 e 48 h antes da inoculação da bactéria, os animais receberam *Poly I:C* 0,5 mg/animal/dia como *"priming"* para indução da resposta inflamatória, sendo que durante estas inoculações os animais permaneceram em T_A de 25 °C. No dia de indução da sepse, os cateteres i.p. e arterial dos animais saindo pela nuca foram conectados a extensões de polietileno (*BPE-T50, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA*) preenchidos com solução salina 0,9% e conectados a uma seringa de 1 mL. Em cada rato foi vestido uma jaqueta contendo uma mola de metal (*CIH105 Covance Infusion Harness, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA*) para proteger os cateteres de mordidas. A extensão menor (0,1 mL) do cateter saindo pela mola foi conectada à parte inferior do *swivel* (*Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA*) preso a um braço móvel conectado às cubas experimentais. A extensão maior (0,3 mL) saiu da parte superior do *swivel* para o exterior da câmara. Cada cuba experimental contendo um rato foi colocada sobre um receptor de sinal de frequência de rádio dentro da câmara climática (*Environmental Growth Chambers, Chagrin Falls, OH, EUA*) com temperatura ajustada para 22 °C ou 30 °C, de acordo com o delineamento experimental.

A indução da sepse foi feita por administração i.p. de *E. coli* com prévia sensibilização de *Poly I:C*. No dia anterior ao experimento, o inóculo de *E. coli* foi preparado como descrito anteriormente e a dose de 1×10^8 CFU/mL/animal, em volume final de 0,5 mL, foi preparada. O volume final foi colocado em seringas estéreis conectados aos cateteres i.p. e infundido durante 5 h a uma taxa de 0,1 mL/h.

A T_{CORP} e atividade locomotora foram monitoradas telemetricamente através do sinal emitido pelo sensor implantado na cavidade abdominal e recebido pelo receptor de sinal sob as cubas experimentais ligados ao *software* de aquisição da *Data Sciences International*. Os dados da telemetria foram coletados desde o início do experimento até 20 h após o início da indução da sepse.

3.2.5 Gradiente térmico

Um gradiente térmico de seis canais foi utilizado para verificar a T_A de preferência dos animais com sepse. As paredes e chão do gradiente foram construídos de alumínio (12 mm de espessura) soldado para formar seis canais paralelos, cujas extremidades faziam contatos com

dois tanques (banhos). Cada corredor (200 cm comprimento x 12 cm largura x 20 cm altura) possuía uma grade (que servia como piso para os ratos a serem testados), cuja altura em relação ao chão de alumínio era ajustável e era coberto por uma tampa feita de acrílico. No presente estudo, a altura entre a grade e a tampa de acrílico foi ajustada para ser de 10 cm. O banho em uma das extremidades do aparato permaneceu cheio com água e foi equipado com duas unidades aquecedoras (*PolyScience, Niles, IL*); o banho da outra extremidade era constantemente perfundido com uma solução de etilenoglicol a 10% em água através de um banho com circulação externa capaz de aquecer ou resfriar (*PolyScience*). A mudança da temperatura do líquido presente em cada banho, permitiu o estabelecimento de um ambiente heterotérmico (gradiente de temperatura). A sala na qual o aparato foi mantido tinha um controle independente de T_A. Ao ser usado para criar um ambiente heterotérmico (T_A dentro do aparato de 22 °C na extremidade fria a 30 °C na extremidade quente), a T_A da sala era ajustada para ser igual a T_A desejada no meio dos canais (26 °C). Dentro de cada corredor, a T_A foi monitorada por cinco termopares, espaçados de maneira semelhante (50 cm), e localizados abaixo do chão de grade. A posição dos animais foi monitorada através de 56 pares de LED espaçados por 3,5 cm.

3.2.6 Coleta de sangue e tecido

A coleta de sangue arterial foi realizada via cateter pré-implantado na artéria carótida 5 h e 20 h após a indução de sepse. O sangue coletado foi imediatamente colocado em cartucho específico para medir gasometria.

O sangue venoso foi coletado implantando cateter na veia jugular após a eutanásia do rato com tiopental sódico 100 mg/kg i.p. Esse sangue foi colocado em tubo com heparina e o plasma foi separado para posteriores dosagens de citocinas. Ainda, os leucócitos totais foram isolados para marcação com anticorpos e análise de citometria. Essa metodologia foi utilizada também com intuito de coletar sangue para isolamento de neutrófilos que posteriomente foram colocados em cultura.

Para coleta de lavado peritoneal, foi introduzido 60 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal no rato, e esta foi então massageada intensamente por cerca de 90 seg. Em seguida foi utilizada seringa estéril para coleta deste líquido que teve suas células totais isoladas e marcadas para análise em citometro de fluxo ou colocadas em cultura para posterior purificação de macrófagos. O líquido proveniente do peritônio foi também congelado para posteriores análises de citocinas.

Após a coleta do lavado peritoneal, o animal foi aberto, e o coração e os pulmões foram expostos. Foi então feita perfusão no pulmão do rato com salina gelada e esse órgão foi em seguida coletado e congelado para futuras dosagens de citocinas ou processado para extração de células totais que posteriormente foram analisadas em citometro de fluxo.

3.3 CULTURA CELULAR

3.3.1 Purificação de neutrófilos

Os neutrófilos de ratos *Wistar*, anestesiados por sistema a gás contendo 5% de isofurano em 1 L/min de oxigênio, foram obtidos do sangue. Após o rato ser anestesiado, o sangue foi coletado via cateter jugular. Cerca de 10 mL de sangue foram retirados, via seringas revestidas com heparina, e transferidos para tubos cônicos de 50 mL contendo 90 µL de heparina em cada tubo. Inicialmente foi acrescentado ao sangue 10 mL de Dextran 6% para que a separação fosse realizada por sedimentação durante 40 min em T_A. Após esse período, a maior parte das hemácias foram sedimentadas e o material em suspensão foi coletado, transferido para tubo cônico de 15 mL e centrifugado (300 g; 10 min; 4 °C). O *pellet* resultante foi ressuspenso em 3 mL de tampão *Hank's* e colocado sobre 3 mL de *Ficoll* (1,077 g/mL), seguido de centrifugação (400g; 45min; 25 °C) para concluir a separação por gradiente de *Ficoll*. O *pellet* formado foi ressuspenso em tampão de lise (*ACK Lyses Buffer – Gibco*) e os neutrófilos contados na câmara de Neubauer. A confirmação da pureza dos neutrófilos foi feita por citometria de fluxo com anticorpo anti-RP1 (*BD PharMingen, Oxford, UK*) específico para neutrófilos de rato e a taxa média de pureza dos neutrófilos foi de 82% (**Fig. 6A**).

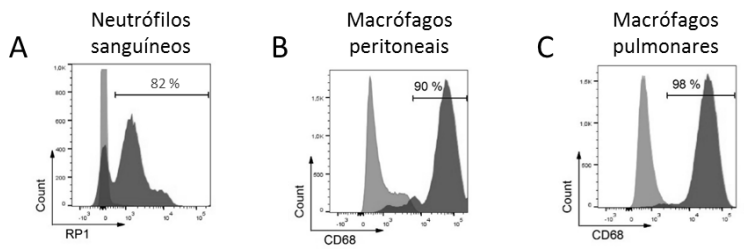

Figura 6 - Purificação celular. Média de purificação obtida para neutrófilos extraídos do sangue periférico (A), e macrófagos oriundos do peritônio (B) e pulmões (C).

3.3.2 Purificação de macrófagos

A coleta de macrófagos foi feita após a eutanásia dos animais com com tiopental sódico (100 mg/kg). Os macrófagos peritoneais foram coletados através da injeção de 60 mL de PBS gelado estéril no peritônio, seguidos de massagem da cavidade abdominal e aspiração do conteúdo peritoneal através de seringa acoplada em agulha 18G. Os macrófagos pulmonares foram coletados após lavagem alveolar. Para isso, os pulmões foram removidos da caixa torácica do animal e cuidadosamente acoplado em um o "conector T" com 2 seringas de 60 mL: uma contendo de PBS gelado estéril para injetar na cavidade pulmonar e a outra vazia para coletar o conteúdo lavado. Ambos os conteúdos lavados (peritônio e pulmões) foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL e centrifugados a 500 g, 10 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* incubado com tampão de lise (*ACK Lyses Buffer – Gibco*) para a lisar as hemácias. Após centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI para contagem dos macrófagos viáveis em *Trypan blue* na câmara de Neubauer. As células (1 x 10^6 células/poço) foram plaqueadas em 1 mL de meio RPMI

suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico em placas de 12 poços. Após 2 h de incubação a 37 °C e 5% de CO_2, as células não aderidas foram descartadas e novo meio RPMI suplementado com 10% SFB foi adicionado às células aderentes. Após incubação de 24 h, as células que não aderiram foram descartadas e um novo meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB foi adicionado. A confirmação da pureza dos macrófagos foi feita por citometria de fluxo com anticorpo anti-CD68 (*Novus, Littleton, USA*) específico para macrófagos de rato após permeabilização celular. A viabilidade também foi confirmada pela baixa incorporação de 7-AAD (*Biolegend, San Diego, UK*). A taxa média de pureza dos macrófagos peritoneais foi de 90% (**Fig. 6B**), enquanto dos macrófagos pulmonares foi de 98% (**Fig. 6C**).

3.3.3 Cultura celular e estímulos

Os neutrófilos purificados do sangue e os macrófagos purificados do lavado peritoneal foram colocados em placas de cultura de 12 poços. A quantidade final de 1 x 10^6 células por poço foi colocada em 1 mL de meio RPMI ou tampão *Hank´s* e permaneceram por 30 min à T_{CULT} de escolha para o experimento (T_{CULT} = 36,0 °C; mimetizando hipotermia e T_{CULT} = 38,5 °C; mimetizando febre). Em seguida o estímulo adequado foi adicionado a cultura que permaneceu incubada por 1h ou 4h, dependendo do ensaio a ser realizado. Foram utilizados como estímulo *E. coli* (Multiplicidade de infecção (MOI) igual a 1), LPS - cepa 0127:B8 (500 ng/mL) ou PMA (100 nM), sendo que células incubadas com *E. coli* não foram cultivadas em meio com antibiótico.

3.4 MEDIDAS

3.4.1 Gasometria

Após 5 e 20 h do início da infusão, 100 µL sangue arterial foi coletado via cateter previamente implantado e colocado em cartucho capaz de mensurar níveis de pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de gás carbônico ($PaCO_2$), saturação de oxigênio arterial (SaO_2), bicarbonato (HCO_3), pH, hematócrito e hemoglobina. Essas medidas foram feitas através de sistema de análise portátil para gasometria *iSTAT-1* e cartuchos *EG7+* (*Abbott Point of Care, Abbott Park, EUA*).

3.4.2 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Para avaliar as diferentes populações de células ou o estado funcional pela expressão de moléculas membranosas ou intracelulares, as células dos diferentes compartimentos (sangue, pulmões, lavado peritoneal e pós cultura celular) obtidas dos animais com sepse foram primeiramente neutralizadas com *Stain buffer* (*BD PharMingen, Oxford, UK*) por 30 min a 4 °C. Em seguida foram lavadas com meio RPMI e centrifugadas a 400 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI e

incubadas por 30 min a 4 °C no escuro com anticorpos marcados com diferentes fluorocromos tais como anti-RP1 PE (*BD PharMingen, Oxford, UK*), anti-CD68 PE (*Novus, Littleton, USA*), anti-Anexina V FITC (*BD PharMingen, Oxford, UK*), anti-CCR2 FITC (*R&D, Littleton, USA*), anti-CXCR2 APC (*R&D, Littleton, USA*), anti-CD18 FITC (*R&D, Littleton, USA*) e anti-CD62L APC (*Biolegend, San Diego, UK*). Após nova lavagem e centrifugação as células foram ressuspensas com PBS e deixadas a 4 °C até a leitura, com excessão do marcador de viabilidade 7AAD (*Biolegend, San Diego, UK*) que foi adicionado às céulas 20 min antes da leitura e sem posterior lavagem. Para marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas por 20 min no gelo com a solução *Cytofix/Cytoperm* (*BD PharMingen, Oxford, UK*). Em seguida, foram centrifugadas com a solução de lavagem específica e incubadas por 30 min a 4 °C com anticorpos específicos. Após incubação, essas células foram ressuspensas PBS e deixadas a 4 °C até a leitura no citometro de fluxo *FACsCanto* (*BD PharMingen, Oxford, UK*). As células não foram fixadas ao final da marcação, foram lidas no citometro no mesmo dia do procedimento, principalmente devido as marcações de morte celular. Os eventos (50.000) adquiridos foram analisados com o programa *FlowJo*. As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem ou pela intensidade média de fluorescência por célula (densidade).

3.4.3 Avaliação de migração celular por quimiotaxia

O efeito da hipotermia (T_{CULT} = 36,0 °C) e da febre (T_{CULT} = 38,5 °C) sobre a migração de neutrófilos foi observado em placas de *Transwel* (membrana porosa de 3 µM) de 24 poços com câmaras superior e inferior (*Corning Life Science, EUA*). Os procedimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por Glynn et a., *2008* [163] com algumas modificações. Os neutrófilos purificados de sangue periférico foram colocados na densidade 1 x 10^5 células em 100 µL na porção superior da câmara. Na porção inferior da câmara foi colocada 590 µL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 30 min de pré-incubação, foi adicionado 10 µL do estímulo quimioatrator (50 nM de LTB4) ou apenas o diluente nos poços controle. Após 2 h de incubação, a câmara superior contendo a membrana foi cuidadosamente removida e o conteúdo superior foi descartado. As células que migraram, atravessaram a membrana e ficaram na parte inferior da mesma. Essa membrana foi fixada em metanol 80% por 20 min e coradas com 0,2% de cristal violeta por 20 min. Após remoção do excesso de corante, a membrana foi visualizada em microscópio e as células contadas manualmente na objetiva de 40 X. Os resultados expressos são referentes a contagem celular de toda a membrana.

3.4.4 Determinação de carga, crescimento e *killing* bacteriano

Para determinação da carga bacteriana, foi utilizada uma alíquota de 200 µL de sangue periférico, homogenato pulmonar e lavado peritoneal, 5 e 20 h após a indução de sepse. Este material foi espalhado, com auxílio de alça *drigalski*, em ágar *McConkey* e esta placa foi

incubada por 24 h à 37 °C. Após incubação o número de colônias de bactéria foi contabilizado e o CFU/mL foi calculado em relação à diluição, quantidade de material colocado na placa e quantidade final de colônias que cresceram na placa.

Para calcular o crescimento bacteriano, foi colocado 1 X 10^6 CFU/poço de *E. coli* em placa de 12 poços com volume final de 1 mL de meio RPMI (sem antibiótico) em estufa com T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C) e incubado por 5 h. Ao final da incubação o sobrenadante da cultura foi plaqueado em ágar *McConkey* e contabilizado como descrito anteriormente. A taxa de crescimento foi calculada como sendo a quantidade de bactéria recuperada ao final de 5 h de incubação menos a quantidade de bactéria colocada inicialmente no poço. Esses dados foram plotados como *fold change*, que representa a quantidade de vezes que a bactéria cresceu em relação a quantidade inicial.

Para calcular o *killing* bacteriano, foi colocado em cultura 1 X 10^6 CFU/poço de *E. coli* com 1 x 10^6 neutrófilos ou macrófagos em placa de 12 poços com volume final de 1 mL de meio RPMI (sem antibiótico). Essa placa foi colocada em estufa com T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C) e incubada por 5 h. Ao final da incubação o sobrenadante da cultura foi plaqueado em ágar *McConkey* e contabilizado como descrito anteriormente. A taxa de morte bacteriana foi calculada como sendo a taxa de crescimento menos a quantidade de bactéria recuperada ao final de 5 h de incubação na presença do neutrófilo ou do macrófago. Esses dados foram plotados como média de porcentagem.

3.4.5 Ensaio de fagocitose

Para avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, essas células foram inicialmente isoladas conforme descrito acima. No dia do experimento, uma suspensão de 1 X 10^6 células/mL em RPMI 10% SFB foram incubadas sem estímulo durante 30 min a T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C). Em seguida foi adicionada *E. coli* fluorescente do *kit* comercial *EZCell™ Phagocytosis Assay Kit Green E. coli (BioVision, San Francisco, USA*) à cultura, que foi incubada por mais 60 min, 5% CO_2, à T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C). Ao final do ensaio as bactérias fagocitadas foram adquiridas em citometro de fluxo *FACsCanto* (*BD PharMingen, Oxford, UK*), no canal FL1 e quantificadas em *software FlowJo*.

3.4.6 Dosagem da produção de ânion superóxido (ROS)

A estimação da produção de ânion superóxido *in vitro* está baseada na quantificação espectrofotométrica da redução do ferricitocromo c para ferrocitocromo c mediada pelo ânion superóxido, segundo descrito originalmente por McCord e Fridovich [164]. Brevemente, uma suspensão de 1 x 10^6 macrófagos ou neutrófilos/ml em meio Hanks (pH 7.4) foi incubada na presença de ferricitocromo c (80 mM) e estimuladas com LPS (500 ng/mL) ou PMA (100 nM). Antes do estímulo, 1mM de $CaCl_2$ também foi adicionada à cultura. No controle negativo ou ao final da incubação, foi adicionado, além do estímulo, superóxido dismutase (120 U/ml) que inibe a formação de ferrocitocromo c. As células foram incubadas 60 min, 5% CO_2, à T_{CULT} de

interesse (36,0 °C ou 38,5 °C). Ao final, as células foram separadas por centrifugação e as absorbâncias dos sobrenadantes a 550 nm foram registradas e convertidas para nmols de ânion superóxido gerados considerando para o ferrocitocromo c um coeficiente de extinção molar de 29500 M^{-1} cm^{-1} [165].

3.4.7 Expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

A presença de RNAm para o gene iNOS (ou controle interno β-actina) em macrófagos foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (qPCR) em tempo real. Para isso, uma suspensão de 1 X 10^6 macrófagos/mL em RPMI 10% SFB foi incubada sem estímulo durante 30 min a T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C). Em seguida a cultura foi estimulada com LPS (500 ng/mL), durante 4 h, 5% CO_2, à T_{CULT} de interesse (36,0 °C ou 38,5 °C).

3.3.7.1 Extração do RNA: Ao final da cultura, o RNA total dos macrófagos foi extraído de acordo com as orientações do fabricante do *kit* de purificação *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*), utilizando as colunas *QIAshreder* para homogenização das amostras. Todo o processo detalhado pode ser encontrado no endereço: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f9b2e5ef-9456-431a-85ed-2a2b9fbd503d&lang=en. Ao final do processo o RNA total foi dissolvido em água tratada com DEPC (30 ml) e as amostras foram quantificadas em NanoDrop (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA*). A integridade do RNA isolado foi verificada via eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio para revelação das bandas sob luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram mantidas a -80 °C até o uso.

3.3.7.2 Transcrição do cDNA: A transcrição do cDNA foi realizada em reação contendo 400 mg de RNA total em volume de 10 ml, previamente tratado com 1 ml de DNAse (Promega) a 37° C por 15 min, 75 °C por 15 min e 42 °C por 2 min. Em seguida, cada amostra recebeu 8 ml da mistura que continha 1 ml de oligo dT (*100 mM, Exxtend*), 4 ml de tampão de reação (*5X first strand buffer*), 1,5 ml de dNTPs (*10 mM, Thermo Fischer Scientific*), 0,5 ml de inibidor de RNAses (*Ribolock, Thermo Fischer Scientific*) e 1 ml da enzima RT (*transcriptase reversa – MMLV, Promega*); e foram aquecidos a 42 °C por 1 h, 70 °C por 5 min, 37 °C por 2 min e finalmente 4 °C por 15 min. Os produtos de cDNA obtidos foram mantidos a –20 °C até serem utilizados.

3.3.7.3 Reação em cadeia da polimerase (qPCR) quantitativa em tempo real: Os primers para iNOS e β-actina (utilizado como gene normalizador) foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (desenvolvido por Steve Rozen e Helen J. Skaletsky) e as sequências selecionadas foram analisadas com relação à especificidade do gene utilizando o programa BLAT (http://genome.ucsc.edu).

Tabela 1 - Sequências de *primers*. Expressão gênica.

Gene	Sequência (5'- 3')	Tm (°C)	Produto (pb)
β-actina	F: CACCCGCGAGTACAACCTTC R: CCCATACCCACCATCACACC	60	207
iNOS	F: AAAATGGTTTCCCCCAGTTC R: GTCGATGGAGTCACATGCAG	60	82

Como controle negativo, reações foram realizadas na ausência de cDNA. Cada reação foi realizada em duplicata e continha 3 µL de cDNA diluído 5 vezes, 6 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (*Promega*) e 300 nM (concentração final) de primers. O protocolo consistiu de uma etapa de 2 min de desnaturação a 95 °C e 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min utilizando termociclador Rotor gene Q (*Qiagen*). A expressão gênica relativa do gene de interesse foi normalizada em relação à β-actina, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de acordo com Livak e Schmittgen [166].

3.4.8 Dosagem de citocinas

Para a detecção dos mediadores inflamatórios TNF-α, IL1-β e IL-10 no homogenato dos pulmões, lavado peritoneal e sobrenadante da cultura de macrófagos, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA *sandwich*) padronizado (*R&D, Littleton, USA*). Para isso, o anticorpo de captura (1º Ac) foi diluído em PBS, plaqueado 100 µL/poço e incubado *overnight* à T_A. O excesso de anticorpo foi removido com PBS *Tween* (PBST). O bloqueio foi feito com PBS 1% BSA (300 µL/poço) e incubação por 1 h à T_A. As amostras ou a curva padrão diluída seriadamente (100 µL/poço) foram adicionadas após lavagens com PBST e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção (2° Ac) foi adicionado e após 2 h de incubação e lavagens com PBST a Streptoavidina –HRP foi adicionada por 20 min à T_A no escuro. A adição da solução substrato permite uma reação colorimétrica capaz de ser detectada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.4.9 Análise estatística

Comparações estatísticas foram feitas com auxílio do programa *Statistica Advanced 8.0* (*StatSoft, Tulsa, OK, EUA*). Os dados foram comparados usando testes com níveis de significância de 5% ($p < 0,05$). Inicialmente foi aplicado o *Teste Kolmogorov-Smirnov* para testar se os dados eram paramétricos ou não. [1] Para dados paramétricos com 2 grupos foi utilizado *Teste t para amostras independentes*; [2] para dados paramétricos com 3 ou mais grupos foi utilizado *ANOVA*; [3] para dados não paramétricos com 2 grupos foi utilizado *Teste de Mann-Whitney* e, [4] para dados não paramétricos com 3 ou mais grupos foi utilizado *Teste de Kruskal-Wallis*. Após os testes paramétricos e não paramétricos com 3 ou mais grupos foi aplicado o teste post hoc para identificar quais dos pares de grupos foram diferentes. *ANOVA* para medidas repetidas também foi utilizado nas análises.

4 RESULTADOS

4.1 OBJETIVO 1: ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO

4.1.1 Caracterização geral dos pacientes sépticos que desenvolveram hipotermia

A princípio, foi conduzido um estudo clínico retrospectivo para caracterizar o curso temporal da hipotermia em um grupo raro de pacientes sépticos, que não foram submetidos a protocolos de aquecimento ativo quando desenvolveram hipotermia. De todos os 93 prontuários revisados para este estudo, foram selecionados 50 que correspondiam a pacientes sépticos que tiveram um ou mais episódios de hipotermia durante a internação na UTI adulta do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). A T_{CORP} dos pacientes foi medida a cada 2 h, durante toda a permanência do paciente na UTI, via termometria axilar. O aparecimento de hipotermia foi considerado quando a T_{CORP} do paciente atingiu valores menores que 35,5 °C ou valores entre 35,5 °C e 36,0 °C, desde que estes fossem precedidos, no mesmo episódio, de pelo menos uma medição de 35,5 °C ou menor (**Fig. 7**), um valor que é pelo menos 0,5 °C abaixo do limiar atualmente estabelecido para o diagnóstico de hipotermia na sepse [2].

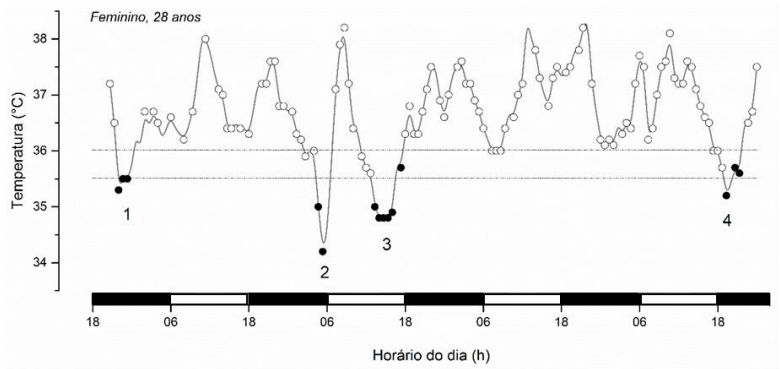

Figura 7 - Curva de T_{CORP} completa de paciente séptico. Os 4 episódios de hipotermia estão numerados e indicados com círculos fechados. Foram considerados como hipotermia valores menores que 35,5 °C ou episódios onde os valores entre 35,5 °C e 36,0 °C foram precedidos, no mesmo episódio, por pelo menos uma medida de 35,5 °C ou menor.

Os pacientes foram avaliados quanto ao momento em que se tornaram hipotérmicos e, dos cinquenta pacientes estudados, 6 (6,5% dos prontuários revisados) exibiram hipotermia exclusivamente na admissão (momento em que a sepse foi diagnosticada), 15 (16,1%) tiveram episódios de hipotermia na admissão e em alguma outra fase posterior da sepse e 29 pacientes (31,2%) não estavam hipotérmicos na admissão, mas desenvolveram hipotermia em alguma fase posterior. É importante ressaltar que um número substancial de pacientes (31,2% dos prontuários revisados) não estava com hipotermia no momento da admissão, mas desenvolveram este fenômeno térmico em fases posteriores da sepse. Logo, a hipotermia parece ser mais comum na sepse do que geralmente se pensa, uma vez que estudos clínicos até

o momento têm avaliado o aparecimento de hipotermia somente no momento em que a sepse é diagnosticada [78, 93, 95-97, 167].

Os pacientes foram caracterizados quanto à quantidade total de episódios de hipotermia que tiveram durante toda a internação na UTI e, foi observado que o número médio por paciente foi igual a dois, e o número máximo de episódios desenvolvido por um único paciente foi de 12. Na **tabela 2**, os pacientes foram divididos entre aqueles que apresentaram menor (≤ 2) ou maior (≥ 3) quantidade de episódios de hipotermia e, foram então classificados de acordo com as características gerais do grupo. Porém, o número de episódios de hipotermia não foi relacionado a sexo, raça, idade, origem da infecção, classe do microrganismo infectante, escore APACHE II e período de internação. Além disso, a taxa de mortalidade foi de 52%, e não houve evidência para concluir que existiu diferença na mortalidade entre os subgrupos de pacientes com maior ou menor quantidade de episódios de hipotermia.

Tabela 2 - Características do grupo de pacientes sépticos que apresentaram um ou mais episódios de hipotermia.

	Episódios de hipotermia		
	≤ 2	**≥ 3**	
	N° Pacientes (%)	**N° Pacientes (%)**	**Valores *p***
Sexo			
Masculino	21 (42%)	11 (22%)	1.000
Feminino	12 (24%)	6 (12%)	
Raça			
Branca	23 (46%)	12 (24%)	
Negra	0 (0%)	2 (4%)	0.102
Outra	10 (20%)	3 (6%)	
Idade			
18-45 anos	6 (12%)	4 (8%)	
46-65 anos	11(22%)	7 (14%)	0.672
> 65 anos	16 (32%)	6 (12%)	
Origem da infecção			
Pulmão	9 (18%)	8 (16%)	
Peritoneo	9 (18%)	4 (8%)	0.355
Outra	15 (30%)	5 (10%)	
Agente infeccioso			
Bactéria G-	12 (31%)	8 (21%)	
Bactéria G+	6 (15%)	8 (21%)	0.540
Fungo	1 (2%)	4 (10%)	
Escore APACHE II			
≤ 19	20 (40%)	8 (16%)	0.239
> 19	13 (26%)	9 (18%)	
Período de internação			
≤ 10 dias	13 (26%)	5 (10%)	0.269
> 10 dias	20 (40%)	12 (24%)	
Visão geral			
Sobreviventes	17 (34%)	7 (14%)	0.693
Falecidos	16 (32%)	10 (20%)	

Abreviações: G-, Gram negativa; G+, Gram positiva; APACHE, *acute physiology and chronic health evaluation*.

4.1.2 Curso temporal da hipotermia em pacientes com sepse

Outro dado expressivo notado foi que apenas quatro episódios, de um total de 138, foram terminais. A grande maioria dos episódios (97,1%) foi transitórios, autolimitantes e caracterizados por oscilações bidirecionais na T_{CORP} (**Fig. 8A**). Dos 138 episódios de hipotermia revisados, aqueles com início após o diagnóstico de sepse (117 episódios) foram incluídos em todas as análises, enquanto que aqueles episódios que se iniciaram na admissão (21 episódios) foram incluídos apenas nas análises que não exigiram nenhuma informação relacionada ao início da hipotermia. No presente estudo, ainda foi observado que a magnitude e o tempo de recuperação dos episódios de hipotermia seguiram distribuições não normais exibindo respostas menos pronunciadas e mais curtas. Além disso, não houve diferença óbvia nos perfis de distribuição para esses episódios de hipotermia que ocorreram no momento do diagnóstico da sepse (**Fig. 8B**) e para aqueles com um início mais tardio (**Fig. 8C**). Os 10°, 50° e 90° percentis para as temperaturas corporais mínimas alcançadas durante um episódio estavam em 34,3, 35,1 e 35,5 °C, respectivamente, enquanto os 10°, 50° e 90° percentis para o tempo de recuperação estavam em 2, 6 e 15 h, respectivamente.

Durante os episódios de hipotermia, a frequência cardíaca caiu junto com a T_{CORP} em 76,6% dos pacientes; a mediana do coeficiente angular da correlação linear foi positiva (4,6 bpm/°C) e significativamente diferente de zero (p = 0,0004). Não houve relação detectável da T_{CORP} com a pressão arterial ou a frequência respiratória.

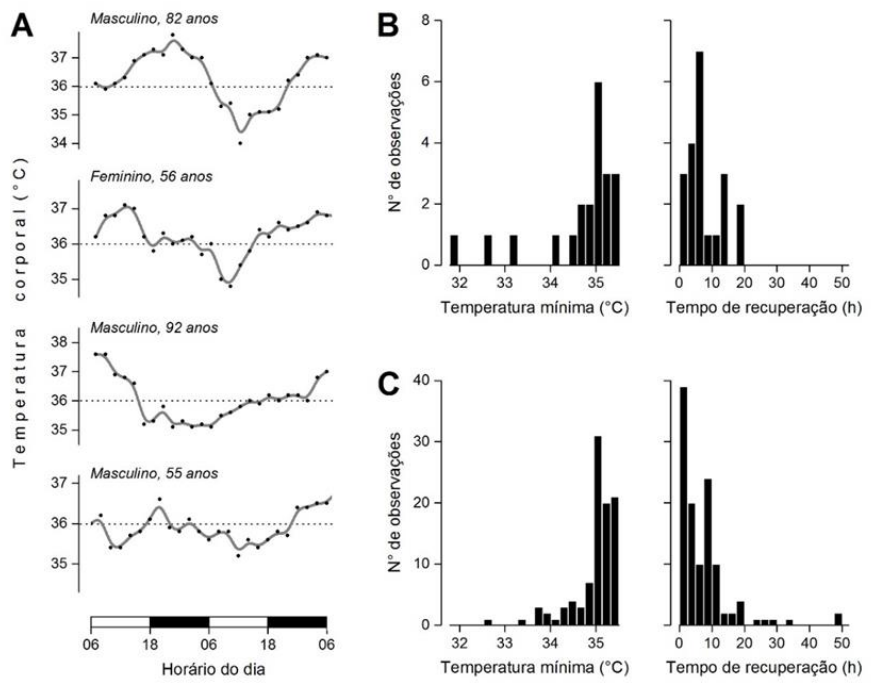

Figura 8 - Episódios de hipotermia espontânea em pacientes sépticos não submetidos a aquecimento ativo. (A) Curvas de temperatura representando os episódios transitórios de hipotermia. (B) Histograma para magnitude e duração dos episódios de hipotermia que já estavam acontecendo quando o paciente foi diagnosticado (21 episódios) e (C) aqueles episódios que tiveram início após o diagnóstico (117 episódios).

4.1.3 Associação entre hipotermia, gravidade da sepse e óbito

Já foi mencionado anteriormente que o sistema de pontuação utilizado para estimar mortalidade (escore APACHE II) e o tempo de permanência na UTI não tiveram relação com o número de episódios de hipotermia quando considerados de forma independente (**Tabela 2**). Curiosamente, quando avaliados juntos, os dois foram correlacionados diretamente ao número de episódios de hipotermia, indicando que pacientes sépticos mais graves que permaneceram mais tempo na UTI apresentaram mais episódios de hipotermia (**Fig. 9**). Em outras palavras, este resultado incute que a associação entre uma maior taxa de mortalidade em pacientes sépticos e aparecimento de hipotermia, observada em vários estudos prévios [94, 95, 97], seja simplesmente devido ao fato de que a hipotermia apareceu com maior frequência em pacientes mais graves que perduraram mais tempo na UTI, e, obviamente, o aumento da gravidade da sepse está diretamente relacionado a um maior número de óbitos. Os estudos citados acima, embora não tenham correlacionado, mostraram inclusive que os pacientes com hipotermia apresentaram maiores escores APACHE II ou SOFA, reforçando que a hipotermia não parece estar "piorando" a doença.

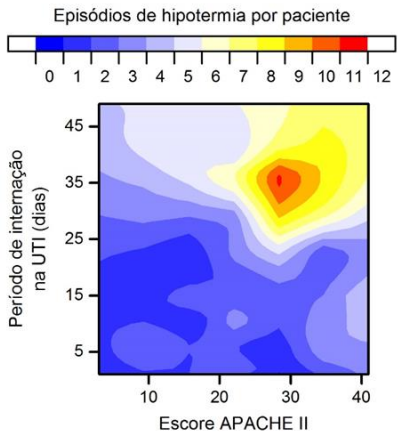

Figura 9 - Mapa de calor (*heat map*) que descreve o número de episódios de hipotermia em função tanto do escore APACHE II quanto da permanência na UTI. O modelo utilizado foi desenvolvido pelo método de correlação de *Kriging*.

As contradições entre o presente estudo, que mostrou que a grande maioria dos episódios não foram terminais, e aqueles que relataram consistentemente que há uma associação positiva entre hipotermia e mortalidade [78, 94-97, 167, 168] parecem ser devido ao fato de que a hipotermia não foi avaliada no momento da morte, mas sim dentro das primeiras 24 h após o diagnóstico. Logo, a fase de hospitalização em que o paciente se encontrava foi analisada, no presente estudo, e se mostrou relevante para o desenvolvimento da hipotermia, pois os episódios se concentraram mais nas primeiras 24 h de internação na UTI em comparação com as últimas 24 h (**Fig. 10A**). Além disso, as tendências para reduções na T_{CORP} foram raras próximo ao momento da morte (**Fig. 10B**), e durante um período de 12 h que precediam o óbito, as tendências para reduções na T_{CORP} foram observadas em apenas seis pacientes, enquanto que as tendências para aumento na T_{CORP} foram observadas em 18 pacientes (**Fig. 10C**). O coeficiente angular médio para as tendências foi significativamente

diferente de zero (p = 0,022), e apenas dois dos seis pacientes terminais com tendências negativas atingiram um nível hipotérmico no momento do óbito, definido como valores de 35,5 °C ou menores (**Fig. 10B**).

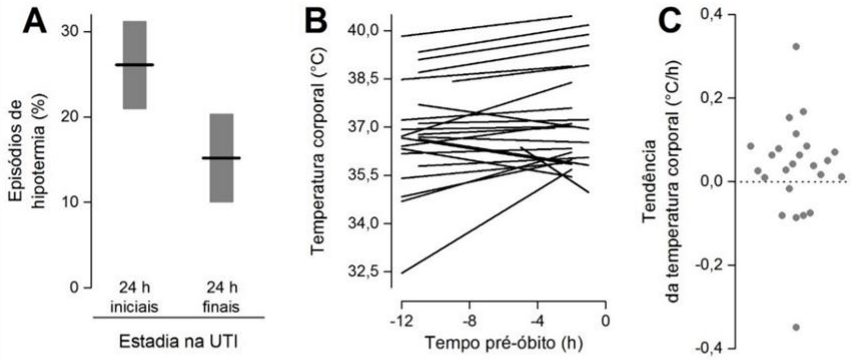

Figura 10 - Relação entre o desenvolvimento de hipotermia e a fase de hospitalização. A prevalência de hipotermia em todos os pacientes sépticos (sobreviventes e não sobreviventes) foi determinada durante o primeiros e o último dia de permanência na UTI. Os valores observados (linhas) e intervalos de confiança de 95% (barras de flutuação) foram mostrados em (A). Os pacientes não sobreviventes foram ainda avaliados para a ocorrência de hipotermia como um evento terminal. Regressão linear para T_{CORP} durante as últimas 12 h de vida foram apresentados em (B); e a distribuição dos coeficientes angulares da regressão foi mostrado em (C).

Ainda foi avaliada a relação do período do dia com o início de hipotermia e não foram observadas diferenças, sendo que 52,1% dos episódios tiveram início entre 00:00-11:59 enquanto 47,9% dos episódios se iniciaram entre 12:00-23:59. Ao mudar o período do dia analisado não foi alterado o resultado; 57,3% dos episódios tiveram início entre 06:00-17:59 enquanto 42,7% dos episódios se iniciaram entre 18:00-05:59. Por outro lado, quando foi analisada a relação da época do ano com o início da hipotermia foi visto que apenas 38% dos pacientes desenvolveram hipotermia nos meses quentes do ano, enquanto 62% desenvolveram hipotermia nos meses frios do ano, mostrando uma tendência de aparecimento de hipotermia quando a T_A está mais baixa (a UTI estudada não era climatizada no período em que os pacientes estavam internados).

4.1.4 Influência do choque circulatório e da disfunção respiratória no desencadeamento da hipotermia

As relações temporais entre o início de hipotermia e a presença de choque circulatório ou disfunção respiratória foram os próximos dados a serem avaliados, pois estudos anteriores relataram maior incidência de choque em pacientes que desenvolvem hipotermia [78, 95]. Os resultados demonstraram que quase metade dos episódios hipotérmicos começou quando os pacientes não estavam nem em estado de choque circulatório e nem com disfunção respiratória. Além disso, a probabilidade de desenvolver hipotermia não foi aumentada pela presença de disfunção respiratória e, surpreendentemente, durante o choque circulatório essa possibilidade não estava simplesmente inalterada, mas sim reduzida. A razão para essa redução não é clara, mas pode ter algo a ver com o fato de que pacientes em estado de choque, muitas vezes receberam norepinefrina, um medicamento com ações termogênicas [169] (**Fig. 11**).

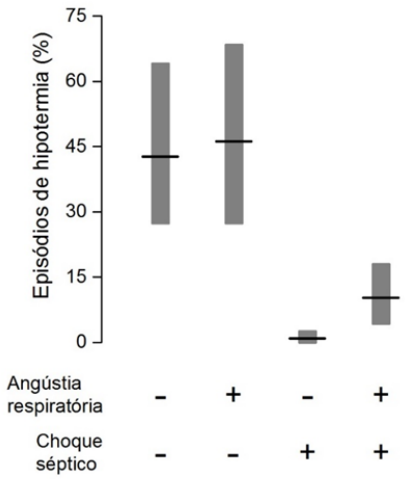

Figura 11 - Presença ou ausência de choque circulatório ou angústia respiratória no início do episódio de hipotermia. Os valores observados (linhas) e intervalos de confiança de 95% (barras de flutuação) estão representados. Os 117 episódios que tiveram início após o diagnóstico de sepse estão incluídos nesta análise.

4.1.5 Influência da farmacoterapia no desenvolvimento de hipotermia

Por fim, foi avaliado se a hipotermia pode ser um evento relacionado à administração de medicamentos ao paciente com sepse. As drogas com ação antipirética foram as primeiras a serem avaliadas. A Dipirona foi o antipirético utilizado com mais frequência, porém, houve pouca ou nenhuma sobreposição entre o tempo de administração da dipirona e o tempo do início da hipotermia (**Fig. 12**). Apenas 5,1% dos episódios tiveram início dentro do prazo esperado para os efeitos terapêuticos da dipirona, que acontece por cerca de 5 h em adultos jovens [170] e pode ser prolongada por até 75% nos idosos [171]. Infelizmente, a mesma análise não pôde ser empregada para os demais medicamentos, uma vez que a informação com o horário exato de administração destes não estava clara nos prontuários avaliados. Como alternativa, a frequência de uso de cada fármaco nos dias de início de hipotermia foi comparada com a frequência de uso em dias adjacentes, ou seja, dias livres de hipotermia. Além da dipirona, 113 drogas foram administradas aos pacientes, que incluem sedativos, neurolépticos, anticonvulsivantes, agentes paralisantes, antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e medicamentos cardiovasculares. Para nenhum medicamento, independentemente de classe, a frequência de uso foi diferente nos dias de início de hipotermia em relação aos dias adjacentes aos episódios. Em outras palavras, o desenvolvimento de hipotermia foi independente do uso de qualquer medicamento. Os resultados para as drogas mais utilizadas estão na **Tabela 3**.

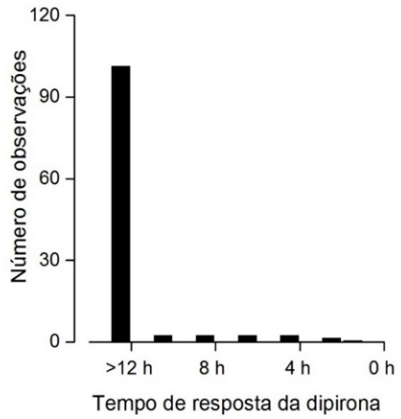

Figura 12 - Relação entre o tempo de resposta da dipirona e o início da hipotermia na sepse. Os 117 episódios que tiveram início após o diagnóstico estão incluídos nesta análise.

Tabela 3 - Medicamentos usados no dia em que houve desenvolvimento de hipotermia em comparação com os dias adjacentes (dias sem hipotermia).

Medicamentos	Frequência de uso (95% intervalo de confiança)	
	Dias com hipotermia	Dias sem hipotermia
Sedativos, neurolépticos & anticonvulsivantes		
Midazolam†	0.30 (0.20 - 0.42)	0.23 (0.12 - 0.36)
Fenitoína†	0.09 (0.01 - 0.24)	0.14 (0.01 - 0.31)
Diazepam†	0.09 (0.03 - 0.16)	0.12 (0.03 - 0.25)
Haloperidol†	0.07 (0.01 - 0.14)	0.08 (0.03 - 0.13)
Fenobarbital†	0.04 (0.00 - 0.13)	0.07 (0.00 - 0.20)
Agentes paralizantes		
Cisatracúrio besilato†	0.06 (0.01 - 0.12)	0.04 (0.00 - 0.11)
Pancurônio†	0.01 (0.00 - 0.04)	0.01 (0.00 - 0.02)
Antibióticos		
Ceftriaxona	0.36 (0.24 - 0.48)	0.33 (0.22 - 0.45)
Vancomicina	0.20 (0.09 - 0.32)	0.30 (0.14 - 0.47)
Clindamicina	0.18 (0.08 - 0.31)	0.14 (0.05 - 0.25)
Metronidazol	0.17 (0.07 - 0.29)	0.17 (0.09 - 0.26)
Ciprofloxacina	0.14 (0.06 - 0.26)	0.08 (0.03 - 0.14)
Anti-inflamatorios & analgésicos		
Fentanil†	0.34 (0.22 - 0.46)	0.29 (0.17 - 0.42)
Hidrocortisona	0.30 (0.17 - 0.45)	0.28 (0.16 - 0.41)
Tramadol†	0.14 (0.05 - 0.29)	0.08 (0.00 - 0.21)
Ácido acetilsalicílico	0.10 (0.02 - 0.20)	0.12 (0.03 - 0.25)
Metadona†	0.07 (0.01 - 0.14)	0.10 (0.02 - 0.20)
Medicamentos cardiovasculares		
Heparina	0.59 (0.42 - 0.76)	0.70 (0.49 - 0.93)
Noradrenalina	0.22 (0.16 - 0.30)	0.28 (0.19 - 0.39)
Amiodarona	0.21 (0.05 - 0.41)	0.22 (0.05 - 0.45)
Furosemida	0.17 (0.08 - 0.30)	0.20 (0.08 - 0.36)
Hidralazina†	0.12 (0.01 - 0.28)	0.12 (0.01 - 0.31)
Outros		
Omeprazol	0.61 (0.39 - 0.87)	0.68 (0.43 - 0.97)
Insulina†	0.41 (0.25 - 0.61)	0.46 (0.27 - 0.69)
Metoclopramida	0.22 (0.13 - 0.33)	0.22 (0.13 - 0.32)
Ranitidina	0.17 (0.11 - 0.25)	0.17 (0.10 - 0.25)
Alizaprida	0.14 (0.04 - 0.28)	0.17 (0.05 - 0.32)

Medicamentos com qualquer potencial para reduzir a T_{CORP} ou para suprimir a defesa ao frio estão marcadas com uma cruz (†).

4.2 OBJETIVO 2: DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

4.2.1 Escolha da T_A adequada para permitir ou impedir o aparecimento de hipotermia

Após os surpreendentes resultados obtidos com o trabalho clínico retrospectivo, o próximo passo foi desenvolver um modelo experimental de sepse grave monobacteriana bem controlado, reproduzível e sem mortalidade, no qual o aparecimento da hipotermia fosse duradouro e transitório. Sabendo que o surgimento de hipotermia em animais com sepse depende diretamente da gravidade da infecção e da T_A na qual o animal está inserido [123], o primeiro experimento realizado teve por objetivo determinar as T_{As} adequadas para permitir ou impedir o desenvolvimento da hipotermia. Para isso, foi necessário determinar o limite inferior da zona termoneutra (ZTN) do rato, dentro das condições na qual este animal estaria inserido durante o experimento. A ZTN é a faixa da T_A na qual o metabolismo normal fornece calor suficiente para manter a T_{CORP} essencialmente constante, tendo um gasto energético mínimo com a termorregulação [172-174]. Para determinar a ZTN, ratos *Wistar* foram colocados dentro de cubas experimentais ligadas a um sistema de medição de taxas metabólicas, e estas foram acondicionadas em câmaras climáticas, onde a T_A poderia ser adaptada à escolha do experimentador. Os ratos foram mantidos em diferentes T_A (19 °C, 20 °C, 22 °C, 23 °C, 25 °C, 26 °C, 28 °C e 29 °C) por 12 h, enquanto o consumo de oxigênio (VO_2) foi medido minuto a minuto. Ao fim do experimento a relação entre a T_A e o VO_2 foi avaliada e o limite inferior da ZTN foi definido como 25 °C. O aumento no consumo de VO_2 observado indica que os mecanismos de produção de calor estavam ativados nessa faixa de T_A, e que a manutenção da T_{CORP} estava ocorrendo por meio de um gasto energético considerável, uma vez que o animal não se encontrava mais em uma T_A confortável (**Fig. 13**).

A T_A de escolha para o aparecimento de hipotermia foi definida como 22 °C, ou seja, 3 °C abaixo do limite inferior da ZTN. Por outro lado, a T_A de escolha para impedir a hipotermia e permitir o desenvolvimento de febre foi definida como 30 °C, ou seja, 5 °C acima do limite inferior da ZTN. Todo o estudo experimental *in vivo* foi desenvolvido utilizando essas duas temperaturas.

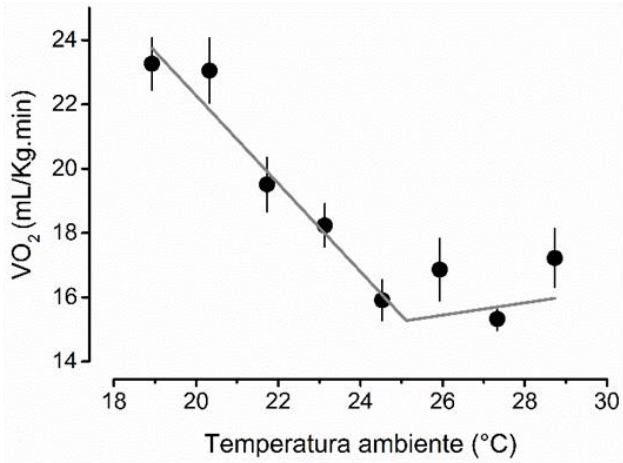

Figura 13 - Relação entre VO_2 e T_A. Ratos *Wistar* foram mantidos em caixas de acrílico (utilizadas em todos os experimentos) em diferentes T_A enquanto o VO_2 era medido minuto a minuto. Regressão linear foi usada para VO_2 nas diferentes T_A.

4.2.2 Microrganismo infectante e dose adequada para indução de sepse grave

O aparecimento de hipotermia só é observado em casos graves de inflamação sistêmica, logo a escolha da dose e do microrganismo infectante é importante para o desenvolvimento de um modelo adequado de sepse grave monobacteriana. Para tal, ratos *Wistar* foram previamente implantados com cateter i.p. e probe de telemetria. No dia anterior ao experimento, estes animais foram acondicionados nas cubas experimentais e colocados em câmaras climáticas a T_A de 25 °C, e a T_{CORP} do rato foi medida a cada minuto. A indução da sepse ocorreu via administração i.p. de *E. coli* ou *P. aeruginosa* por meio de cateter pré implantado. Assim que a bactéria foi administrada no rato, a T_A da câmara climática foi alterada para 22 °C (temperatura adequada para aparecimento de hipotermia se a inflamação sistêmica fosse grave o suficiente). Várias combinações de dose, microrganismo e prévio-tratamento foram testadas e estão resumidas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Tratamentos para indução de sepse.

Pré tratamento	Bactéria		Prevalência de hipotermia	Características da hipotermia			Mortalidade
	Espécies	Dose		ΔT_{CORP} máx. (°C)	Duração (min)	Latência (min)	
Nenhum	*P. aeruginosa*	1 x 10^8 CFU	1/4	0,8	90	60	1/4
Nenhum	*P. aeruginosa*	2 x 10^8 CFU	0/4	--	--	--	0/4
Nenhum	*E. coli*	1 x 10^8 CFU	3/9	0,7±0,2	82±20	55±26	1/9
Nenhum	*E. coli*	5 x 10^8 CFU	3/6	1,3±0,1	123±22	57±4	2/6
Nenhum	*E. coli*	1 x 10^9 CFU	3/4	1,1±0,2	253±92	157±125	0/4
P. aeruginosa	*P. aeruginosa*	5 x 10^8 CFU/h, 5h	4/4	1,2±0,2	183±11	63±31	0/4
E. coli	*E. coli*	1 x 10^9 CFU	2/4	0,8±0,1	320±226	555±120	0/4
Poly I:C	*P. aeruginosa*	5 x 10^8 CFU/h, 5h	3/3	1,3±0,1	180±51	47±11	0/3
Poly I:C	*E. coli*	5 x 10^8 CFU/h, 5h	7/7	2,2±0,7	650±197	96±20	0/7

Os ratos foram mantidos em T_A de 22 °C.
Abreviações: CFU, unidades formadoras de colônia; ΔT_{CORP}, amplitude da temperatura corporal; Máx., máxima; Min, minuto.

Com a administração de *P. aeruginosa* na dose de 1 x 10^8 CFU/animal, apenas 1 rato apresentou hipotermia e foi observado mortalidade no grupo. Quando a dose foi aumentada para 2 x 10^8 CFU/animal, a hipotermia não apareceu em nenhum animal. Em seguida foi testada a inoculação de *E. coli* nas doses de 1 x 10^8 CFU/animal e 5 x 10^8 CFU/animal, mas em ambos os testes a hipotermia apareceu em pouco menos da metade do grupo e também houve mortalidade. Foi testada ainda uma dose um pouco mais alta de *E. coli*, 1 x 10^9 CFU/animal, e foi observado que a hipotermia apareceu em 75% do grupo e não houve mortalidade, porém a duração e a amplitude da hipotermia ainda não eram o desejado.

A estratégia seguinte foi pré-tratar o animal, no dia anterior ao desafio principal, com uma dose menor da bactéria. Foi testado inicialmente um tratamento prévio com dose baixa de *P. aeruginosa* seguida de indução de sepse também por *P. aeruginosa* na dose de 5 x 10^8 CFU/h durante um período de 5 h. Neste caso a dose foi administrada por infusão, e a hipotermia apareceu em 100% do grupo, porém, assim como ocorreu com a dose mais alta de *E. coli*, a hipotermia não teve duração e amplitude satisfatória. A *E. coli* também foi testada desta mesma forma, sendo feita uma sensibilização com dose baixa de *E. coli*, 24 h antes da inoculação de 1 x 10^9 CFU/animal. Com essa abordagem a hipotermia só apareceu em 50% do grupo. Finalmente, foi utilizado um mimético viral, o *Poly I:C*, como *priming* na dose de 0,5 mg/animal/dia, também via i.p., sendo administrado 24 e 48 h prévias ao desafio com bactéria. Neste caso, tanto a sepse por *P. aeruginosa* (5 x 10^8 CFU/h, durante 5 h) quanto por *E. coli* (5 x 10^8 CFU/h, durante 5 h) resultaram no aparecimento de hipotermia em 100% do grupo e sem mortalidade. Neste caso, o *Poly I:C* foi capaz de mimetizar uma situação clínica altamente relevante, na qual infecções virais predispõe pacientes à sepse bacteriana [175]. As curvas da T_{CORP} dos animais mantidos a T_A de 22 °C, sensibilizados com *Poly I:C* e desafiados com *E. coli* ou *P. aeruginosa* estão mostradas na **Fig. 14**. A sensibilização com *Poly I:C* seguida de infecção por *E. coli* foi o método de indução de sepse escolhido para este trabalho, pois desencadeou uma hipotermia mais duradoura (cerca de 10 h) e com amplitude maior (cerca de 2,2 °C).

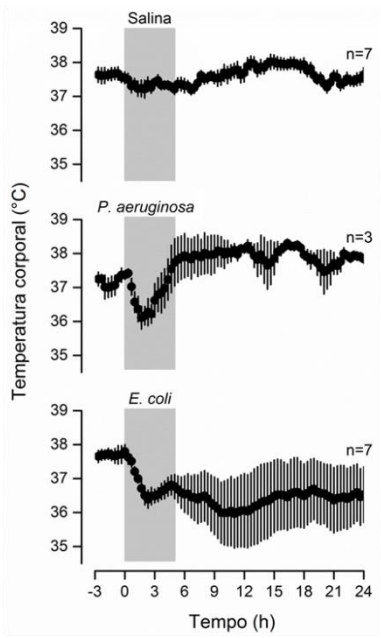

Figura 14 - Curso temporal da hipotermia em sepse induzida por *P. aeruginosa* ou *E. coli*. Ratos *Wistar* foram sensibilizados com *Poly I:C* (0,5 mg/animal/dia; administrado por dois dias anteriores ao experimento). *P. aeruginosa* ou *E. coli* foram inoculadas via i.p. na dose de 5 x 10^8 CFU/h durante 5 h; o tempo de infusão das bactérias está indicado em cinza. Os ratos foram mantidos em uma T_A de 22 °C. Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado.

4.2.3 Validação do modelo de sepse grave monobacteriana

Para finalizar o desenvolvimento do modelo de sepse experimental, os ratos administrados com *Poly I:C* e *E. coli* foram colocados em um gradiente térmico, que é um sistema composto geralmente por longos corredores, cuja T_A varia linearmente. Nesse sistema o animal por se mover livremente e escolher o ambiente térmico de preferência. O objetivo deste experimento foi determinar, pelo comportamento do rato, se a hipotermia que aparece no rato séptico é acidental ou regulada. E foi observado que, ao serem sensibilizados com *Poly I:C* e desafiados com *E. coli*, os animais preferiram permanecer em um ambiente mais frio (**Fig. 15B**) e desenvolver hipotermia (**Fig. 15A**). É importante observar que a escolha pelo ambiente de preferência precede a queda na T_{CORP} do rato. Este resultado é um forte indício de que a hipotermia que aparece não é acidental, mas sim uma resposta térmica regulada, uma vez que o comportamento do rato séptico se assemelha ao comportamento do rato com choque endotóxico. Neste modelo onde o rato é inoculado com LPS, tanto a febre quanto a hipotermia já foram consideradas respostas naturais ao LPS, pois os ratos injetados com baixas doses de LPS, quando estão livres para selecionar a T_A de preferência, escolhem um ambiente quente onde podem desenvolver febre, e ratos injetados com doses moderadas ou altas de LPS preferem um ambiente frio onde podem desenvolver hipotermia [123].

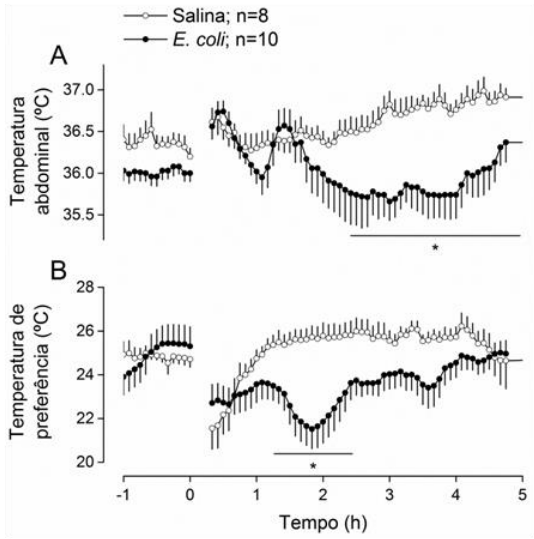

Figura 15 – T_A de preferência por ratos com sepse grave. Efeitos da sepse sobre a temperatura abdominal (A) e a T_A de preferência (B) de ratos inoculados com *E. coli* que permaneceram em um gradiente térmico. Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Outro detalhe importante foi verificar se o desenvolvimento natural de hipotermia poderia ser evitado pela exposição dos ratos a um ambiente quente. Esse pressuposto foi confirmado, pois na **Fig. 16** pode ser observado que quando os ratos foram colocados em uma T_A de 30 °C a hipotermia foi impedida de ocorrer, dando lugar ao aparecimento da febre. Logo o modelo de sepse onde ratos receberam um *priming* com duas doses de *Poly I:C* (0,5 mg/animal/dia) e, posteriormente, foram inoculados via i.p. com *E. coli* (1×10^8 CFU/h, 5 h) foi validado e utilizado em todo o estudo experimental *in vivo* que se segue.

Este trabalho foi pioneiro em desenvolver um modelo de sepse experimental monobacteriana que permitiu uma virada de febre para hipotermia de forma natural e

regulada, pois até o presente momento somente trabalhos com modelo asséptico de inflamação sistêmica haviam mostrado este fenômeno [123, 136, 176].

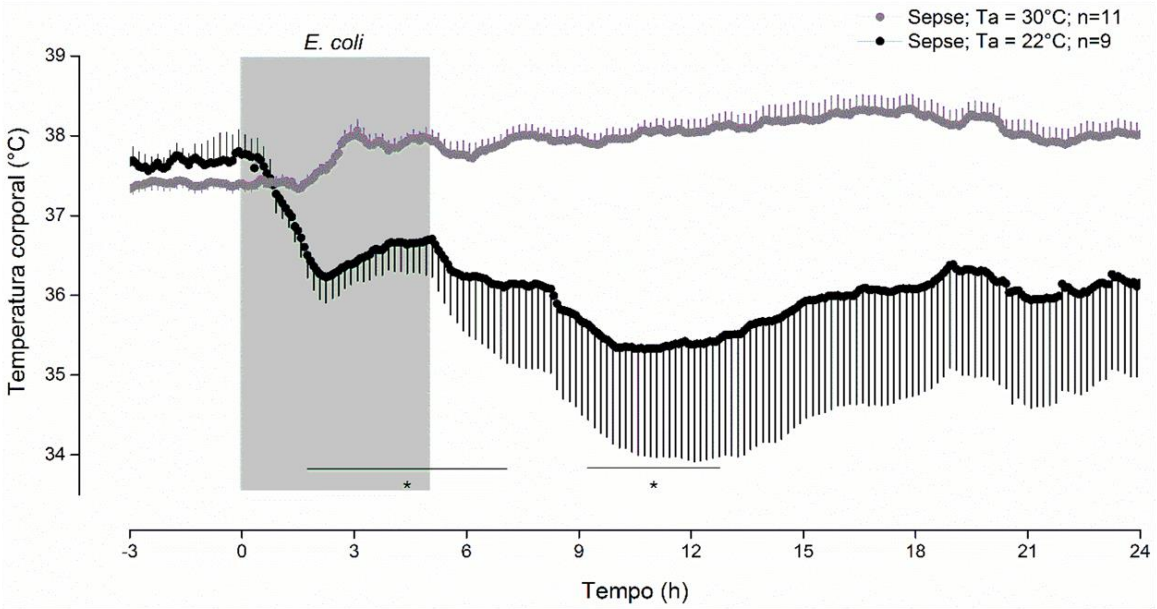

Figura 16 - Curso temporal de hipotermia e febre em ratos com sepse. Ratos *Wistar* foram sensibilizados com *Poly I:C* (0,5mg/animal/dia; administrado por dois dias anteriores ao experimento) e desafiados com *E. coli* via i.p. na dose de 5 x 10^8 CFU/h durante 5 h; o tempo de infusão está indicado em cinza. Os ratos foram mantidos em T_A de 30 °C (previne hipotermia) ou 22 °C (permite hipotermia). Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.3 OBJETIVO 3: IMPACTO DA HIPOTERMIA SOBRE O RECRUTAMENTO, A VIABILIDADE E A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

4.3.1 Função pulmonar dos ratos com sepse

O principal órgão afetado pela sepse é o pulmão, e um estudo prévio do nosso grupo [142] demonstrou que este é um dos principais órgãos preservados pela virada de febre para hipotermia. Neste estudo ratos inoculados com *E. coli* apresentaram menor edema pulmonar e diminuição do infiltrado neutrofílico, porém nenhum estudo funcional foi realizado. Logo, fomos investigar se o desenvolvimento de hipotermia ao invés de febre seria importante para preservar a função pulmonar na sepse grave. Para isso, ratos *Wistar* foram previamente implantados com (1) cateter arterial, para coleta de sangue; (2) cateter i.p., para administração de *Poly I:C* e *E. coli*; e (3) probe de telemetria i.p., para medida de T_{CORP} em tempo real. Os ratos foram colocados em câmaras climáticas em T_A de 22 °C e a coleta de sangue arterial foi realizada 5 h e 20 h após a indução de sepse. Imediatamente após ser coletado, o sangue arterial foi posicionado em cartucho e acoplado ao aparelho *iSTAT* que realizou as medidas de gasometria, mostradas na **Tabela 5**. Para todos esses parâmetros medidos não observamos diferenças estatísticas nos animais sépticos em comparação com animais saudáveis, indicando que a função pulmonar estava preservada no animal séptico que teve hipotermia.

Tabela 5 - Dados de gasometria arterial 5 h e 20 h após a indução de sepse.

Parâmetro	Salina		*E. coli*	
	5h	20h	5h	20h
PaO_2 (mmHg)	78 ± 3	79 ± 2	83 ± 4	83 ± 5
SaO_2 (%)	96 ± 1	96 ± 0	97 ± 0	97 ± 0
$PaCO_2$ (mmHg)	36 ± 1	34 ± 2	30 ± 2	29 ± 2
HCO_3^- (mM)	24,9 ± 0,9	23,8 ± 1,8	21,2 ± 1,1	21,7 ± 1,1
pH	7,45 ± 0,01	7,45 ± 0,02	7,45 ± 0,01	7,49 ± 0,02
Hematócrito (%)	41 ± 3	42 ± 3	37 ± 4	42 ± 4
Hemoglobina (g/dL)	14,1 ± 1,1	14,4 ± 1	12,5 ± 1,5	14,4 ± 1,4

Os ratos foram mantidos em T_A de 22 °C e inoculados via i.p. com *Poly I:C* + *E. coli;* os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo é igual a 7.

Ainda, fomos avaliar se existiam diferenças no comprometimento pulmonar dos animais que desenvolveram hipotermia (T_A = 22°C) em comparação com aqueles os quais essa resposta foi impedida de ocorrer (T_A = 30°C). A PaO_2 e a SaO_2 foram medidas no sangue arterial, 5 h e 20 h após a indução de sepse, e reduções nesses parâmetros em relação aos respectivos controles (animais saudáveis) foram tomadas como indício de disfunção pulmonar. Os resultados obtidos foram marcantes e claros ao mostrar que houve reduções tanto na PaO_2 quanto na SaO_2 do grupo de ratos que não tiveram hipotermia, 20 h após o início da sepse. Esta mesma redução não acontece no grupo de ratos hipotérmicos, reforçando a ideia de que este fenômeno térmico protege a função pulmonar de ratos com sepse grave (**Fig. 17**).

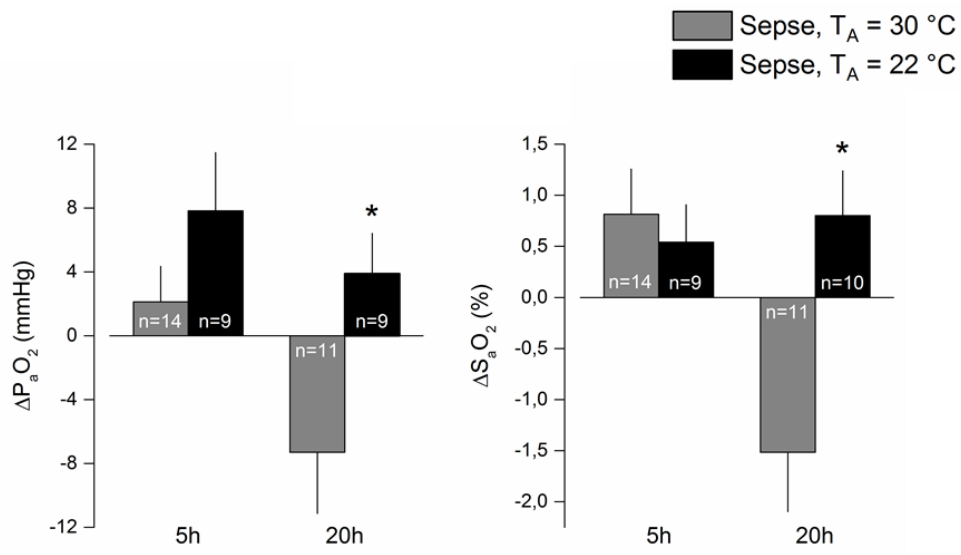

Figura 17 – Função pulmonar. Ratos *Wistar* sépticos foram mantidos em T_A de 30 °C ou 22 °C. O sangue arterial foi coletado 5 h e 20 h após o inícios da sepse e a P_aO_2 e a S_aO_2 foram dosadas. Os resultados representam a diferença entre o grupo experimental e seus respectivos controles (animais saudáveis). Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.3.2 Recrutamento e viabilidade de neutrófilos no sangue e nos sítios de infecção

Os neutrófilos são as células responsáveis por desencadear danos no pulmão, que culminam na perda de função deste órgão [177]. Logo, o passo seguinte foi investigar se a função pulmonar estava preservada nos ratos sépticos hipotérmicos devido a alterações no infiltrado neutrofílico para este órgão. Inicialmente foi avaliado o infiltrado neutrofílico nos pulmões, no peritônio e no sangue dos ratos sépticos, 5 h e 20 h após a indução de sepse. A marcação de neutrófilos foi feita via anticorpo RP-1, que é específico para neutrófilos de ratos. Ainda, a morte celular dessas células foi avaliada também por citometria de fluxo via marcação com Anexina V e incorporação de 7AAD. As estratégias de *gate* utilizadas para avaliar essas características estão mostradas na **Fig. 18**.

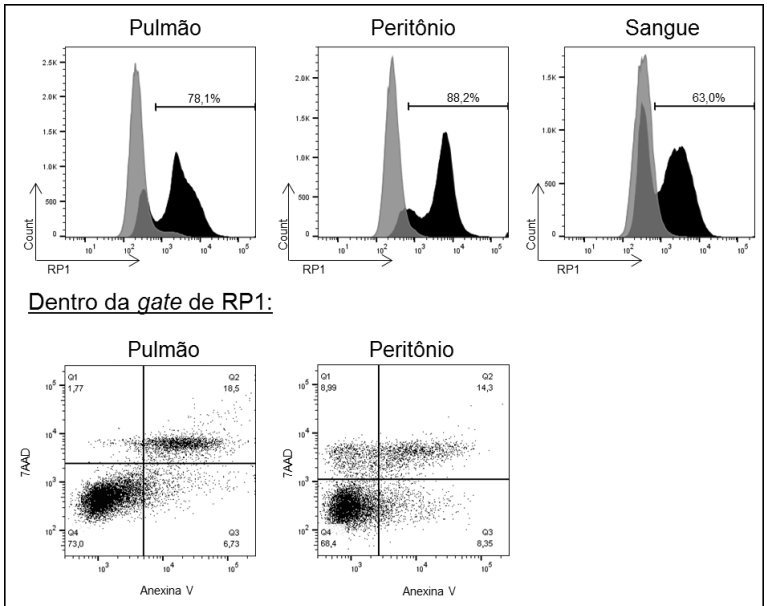

Figura 18 - Estratégia para estudo dos neutrófilos por citometria de fluxo.

Primeiramente foi avaliado o infiltrado e a viabilidade dos neutrófilos 5 h após a indução de sepse, e não foram observadas diferenças entre o grupo de animais com hipotermia daqueles onde a hipotermia foi impedida de ocorrer **(Fig. 19)**.

Entretanto, 20 h após a administração de *Poly I:C* e *E. coli*, os resultados mostraram que a presença de hipotermia reteve os neutrófilos na circulação sanguínea, e por consequência, reduziu significativamente o infiltrado neutrofílico no peritônio e nos pulmões dos ratos. (**Fig. 19A**). Ainda, observamos que neste período a hipotermia promoveu redução na porcentagem de morte dos neutrófilos sem alterar a taxa de apoptose (**Fig. 19C**). Portanto, esses dados sugeriram que uma queda regulada na T_{CORP}, durante a sepse, preservou a função pulmonar, pois impediu a migração transendotelial dos neutrófilos da circulação para os pulmões e peritônio. Além disso, é importante levantar a hipótese de que além de estarem com dificuldade para migrar da circulação para os sítios infecciosos, os neutrófilos dos animais sépticos com hipotermia estão morrendo menos, logo eles podem estar também com as atividades microbicidas comprometidas.

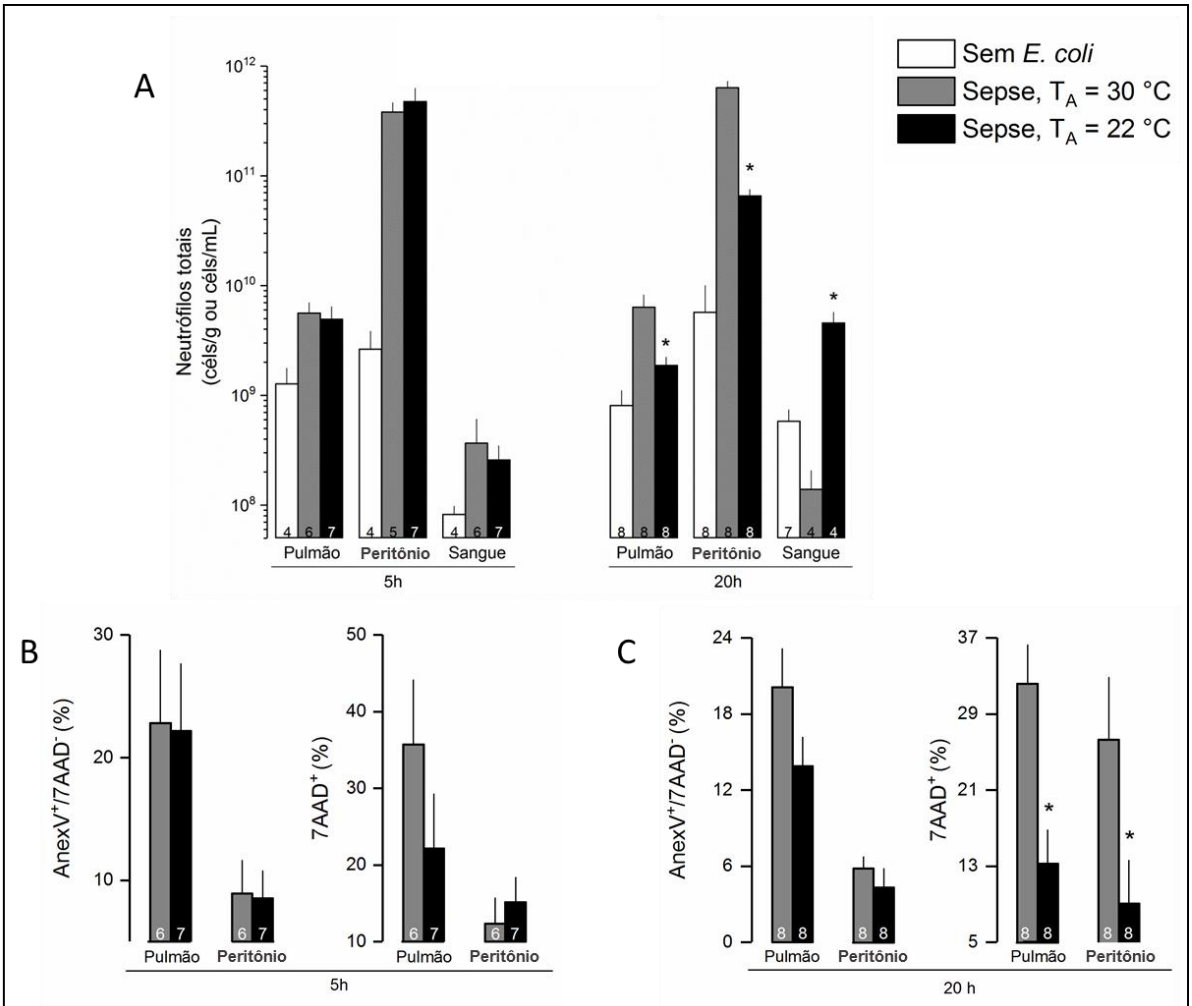

Figura 19 - Recrutamento e viabilidade de neutrófilos. Ratos *Wistar* sépticos foram mantidos em T_A de 30 °C ou 22 °C. Foram coletados sangue, pulmão e lavado peritoneal dos ratos 5 h e 20 h após início da sepse. Infiltrado neutrofílico (A), estágio inicial de apoptose e morte celular (B e C) foram analisados por citometria de fluxo. Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado.

Antes de responder a questão levantada acima, foi realizado um experimento com neutrófilos isolados da circulação sanguínea de ratos e incubados em placas de cultura em diferentes temperaturas de cultivo (T_{CULT}), com o intuito de elucidar se a redução na taxa de morte celular nos neutrófilos foi devido a ação direta ou indireta da temperatura sobre essas células. Para tal experimento, neutrófilos oriundos do sangue periférico foram isolados e colocados em cultura com *E. coli* por 5 h, com MOI igual a 1. Essas culturas foram colocadas em T_{CULT} correspondentes a T_{CORP} do rato na situação de febre ou hipotermia. Utilizando os dados da curva de T_{CORP} da **Fig. 16,** definimos que 38,5 °C e 36,0 °C seriam as T_{CULT} utilizadas para mimetizaria as situações de febre e hipotermia, respectivamente. Após a incubação de 5 h, os neutrófilos foram marcados com Anexina V e 7AAD (**Fig. 20A**), e foi observado, de forma semelhante ao observado *in vivo*, que a morte celular dos neutrófilos estava reduzida (**Fig. 20C**), embora a taxa de apoptose estivesse aumentada (**Fig. 20B**). Estes resultados sugeriram que as alterações na morte celular dos neutrófilos foi um efeito direto da temperatura sobre as células. Além disso, a permanência dos neutrófilos em uma temperatura correspondente a hipotermia desencadeou um aumento na taxa de apoptose dessas células, que é uma morte

celular fisiológica onde não há extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular, corroborando com o fato de que animais sépticos com hipotermia têm a função pulmonar preservada, pois a inflamação neste órgão estava diminuída.

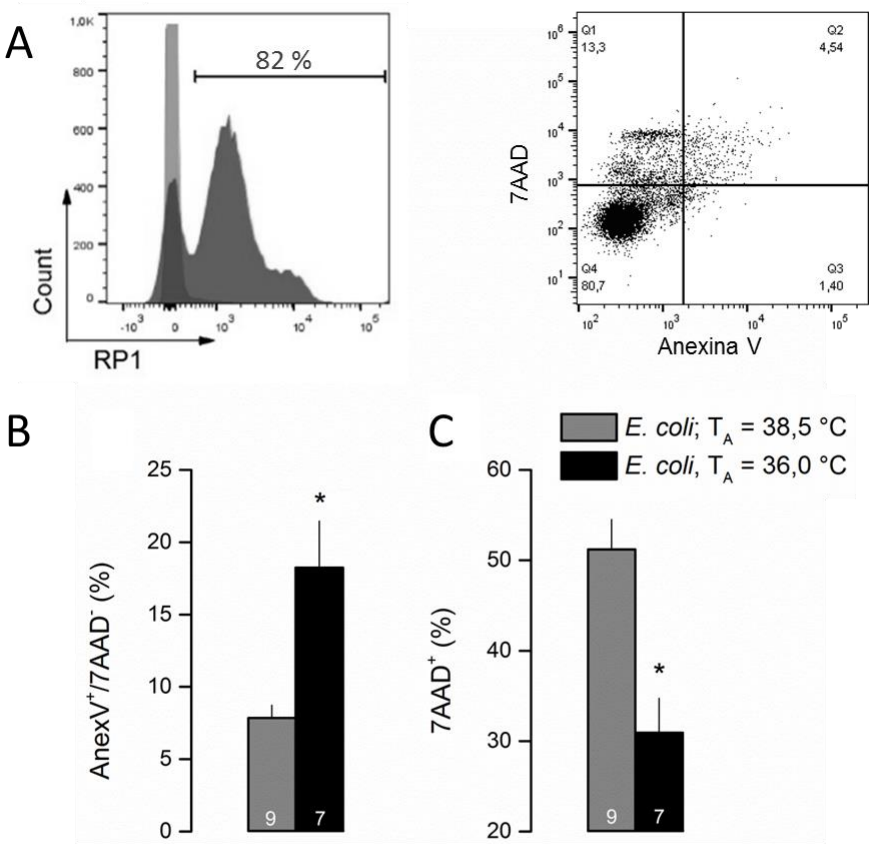

Figura 20 – Viabilidade celular *in vitro*. Neutrófilos isolados do sangue de ratos *naive* foram colocados em cultura com *E. coli* por 5 h, em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. Estágio inicial de apoptose (B) e morte celular (C) foram analisados por citometria de fluxo, sendo estratégia utilizada mostrada em (A). Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.3.3 Migração dos neutrófilos

A migração dos neutrófilos para o sítio de infecção é mediada por uma combinação de processos distintos e ligados em sequência temporal [178]. Logo, foi decidido avaliar se a diminuição do infiltrado neutrofílico nos pulmões e no peritônio dos ratos com sepse e hipotérmicos era devido a alterações na expressão de moléculas envolvidas na migração dos neutrófilos. Para isso, células totais provenientes do sangue periférico de ratos sépticos e neutrófilos isolados, colocados em cultura e estimulados com *E. coli* foram marcados com anticorpos. As células marcadas com anti-CCR2, anti-CXCR2, anti-CD62L (L-selectina) e anti-CD18 (integrinas LFA-1 e Mac-1) foram analisadas dentro da gate de RP-1 (específico de neutrófilos), e lidas em citômetro de fluxo como representado na **Fig. 21**.

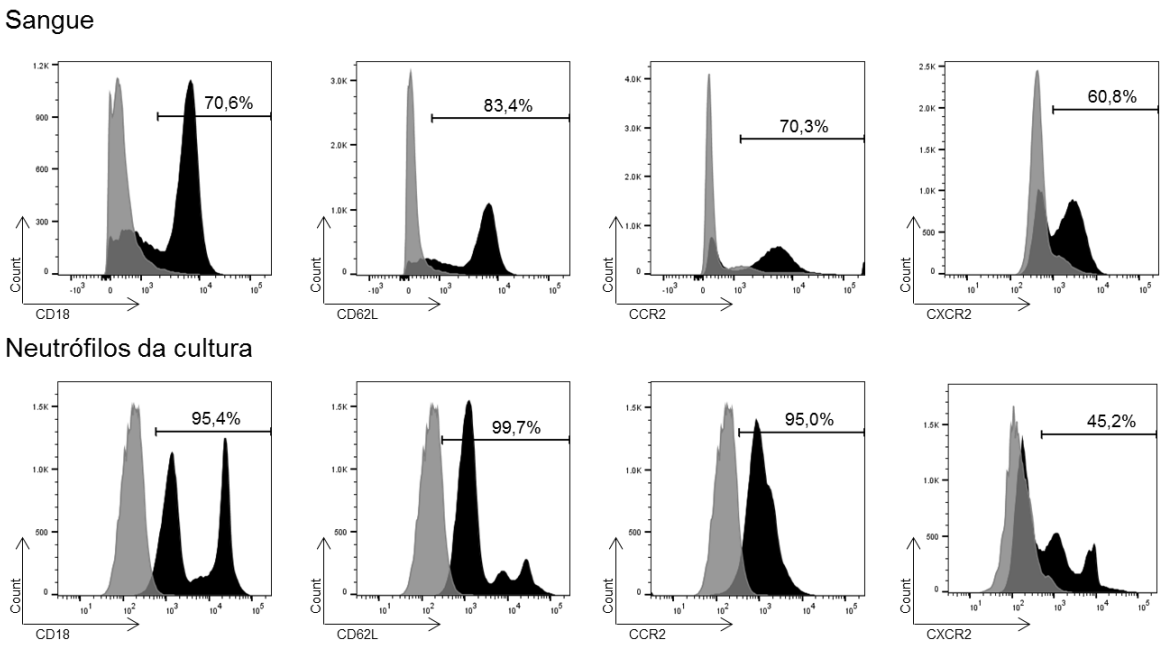

Figura 21 - Estratégia para estudo dos neutrófilos por citometria de fluxo.

Os resultados revelaram que na hipotermia o receptor CCR2 diminuiu nos neutrófilos circulantes 5 h após a sepse e essa diminuição permaneceu por 20 h. Além disso, a diminuição desse receptor pode ser um efeito intrínsico da temperatura sobre os neutrófilos, pois neutrófilos em cultura e submetidos à hipotermia também tiveram diminuição de CCR2 após 5 h de estímulo. Porém, é necessário ressaltar que os parâmetros alterados são diferentes entre as células provenientes do animal e aquelas que vieram da cultura. Enquanto a hipotermia levou a diminuição no número de receptores CCR2 por célula (identificado pela relação entre MFI e quantidade de células marcadas com o anticorpo específico) *in vivo*, a porcentagem de células expressando CCR2 foi o parâmetro que diminuiu *in vitro* (**Fig. 22**).

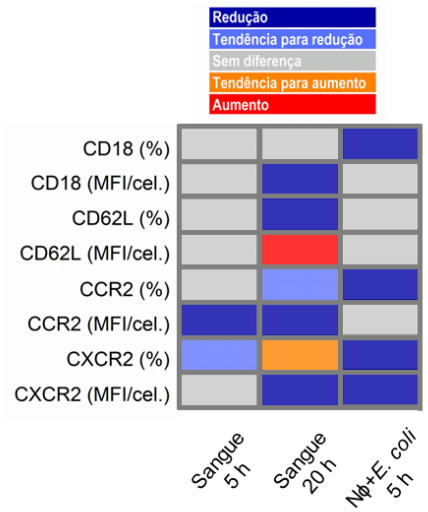

Figura 22 – Moléculas envolvidas na migração de neutrófilos. Foi coletado sangue de ratos *Wistar* sépticos mantidos em T_A de 30 °C ou 22 °C por 5 h ou 20 h. Leucócitos totais do sangue foram marcados, assim como neutrófilos isolados do sangue de ratos naïve e estimulados com *E. coli* por 5 h. Os resultados dos efeitos encontrados para CD18, CD62L, CCR2 e CXCR2 estão representados por comparação em pares pelo teste *t*, sendo que redução ou aumento refere-se a $p < 0,05$ e tendência refere-se a p entre 0,05 e 0,10.

Às 20 h após a inoculação de *E. coli* no animal mantido em condições de hipotermia foi observado que o receptor CXCR2 também diminuiu e esse efeito foi novamente consistente em células provenientes da cultura. Porém, foi observada uma inconsistência nos dados dependendo do parâmetro analisado às 20 h, uma vez que o número de neutrófilos expressando CXCR2 pareceu aumentar na hipotermia, enquanto no número de receptores CXCR2 por célula diminuiu nas mesmas condições. Essa mesma inconsistência foi observada no receptor CD62L após 20 h de sepse, pois a quantidade de neutrófilos expressando essa molécula reduziu enquanto o número de CD62L expresso por célula aumentou na hipotermia (**Fig. 22**).

O CD18 parece contribuir para a menor migração de neutrófilos na hipotermia, pois ele diminuiu às 20 h após a sepse e também nos neutrófilos em cultura por 5 h com *E. coli*. Este também pode ser um efeito intrínsico da temperatura sobre o neutrófilo, porém novamente os parâmetros afetados foram diferentes nas duas condições descritas acima (**Fig. 22**). Os valores utilizados para confeccionar a **Fig. 22** estão mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Expressão de moléculas envolvidas na migração de neutrófilos.

		In vivo 5 h após sepse							*In vivo* 20 h após sepse							*In vitro* 5 h após *E. coli*						
		FEBRE (T_A = 30 °C)			HIPOTERMIA (T_A = 22 °C)				FEBRE (T_A = 30 °C)			HIPOTERMIA (T_A = 22 °C)				FEBRE (T_{CULT} = 36,0 °C)			HIPOTERMIA (T_{CULT} = 38,5 °C)			
		Média	SE	n	Média	SE	n	Valor de p	Média	SE	n	Média	SE	n	Valor de p	Média	SE	n	Média	SE	n	Valor de p
CD18	%	99,80	0,09	6	98,49	0,78	7	0,1220	94,20	3,30	4	99,20	0,30	4	0,1333	100,0	0,00	9	76,90	2,70	7	0,0026*
	MFI/cél.	0,59	0,22	6	0,43	0,16	7	0,5279	0,43	0,07	4	0,07	0,02	4	0,0035*	2,25	0,27	9	3,14	1,06	7	0,1568
CD62L	%	29,95	8,59	6	11,51	3,33	6	0,4884	12,84	2,77	4	1,61	0,28	4	0,0108*	22,27	2,08	9	26,59	4,99	7	0,0968
	MFI/cél.	0,43	0,11	6	0,66	0,12	7	0,1533	0,83	0,17	4	2,56	0,77	4	0,0270*	2,61	0,38	9	1,85	0,29	7	0,1359
CCR2	%	31,78	8,74	6	42,86	16,1	7	0,5462	23,61	6,30	4	8,00	1,80	4	0,0635†	96,48	1,12	9	30,52	2,42	7	0,0046*
	MFI/cél.	0,76	0,29	6	0,36	0,11	7	0,0271*	1,01	0,21	4	0,28	0,04	4	0,0193*	0,84	0,15	9	1,09	0,17	7	0,0869
CXCR2	%	93,36	2,23	5	71,66	19,3	5	0,0774†	48,20	4,20	4	63,21	6,10	4	0,0533†	45,58	3,19	9	35,48	2,58	7	0,0037*
	MFI/cél.	0,14	0,06	6	1,32	0,80	7	0,1701	0,16	0,02	4	0,05	0,01	4	0,0037*	1,14	0,21	9	0,42	0,06	7	0,0012*

Dados utilizados na confecção dos plots integrados da **Fig. 22**. * indica $p < 0,05$ e † indica p entre 0,05 e 0,10.

A migração dos neutrófilos pode ser totalmente independente de alterações nos receptores de quimiocinas e integrina, pois pode estar simplesmente refletindo diminuição na motilidade celular, ou seja, na capacidade do neutrófilo de andar de um local para outro. Logo, foi aplicado um teste de quimiotaxia nessas células para observar seu comportamento frente a um quimioatrator potente, o LTB4, que não é ligante de nenhuma das moléculas avaliadas na análise anterior. Para este teste foi usada a técnica de *transwel* em duas temperaturas diferentes (T_{CULTs} = 36,0 °C ou T_{CULTs} = 38,5 °C), e os resultados mostraram que os neutrófilos tiveram dificuldades de migrar em direção ao LTB4 na hipotermia (**Fig. 23**).

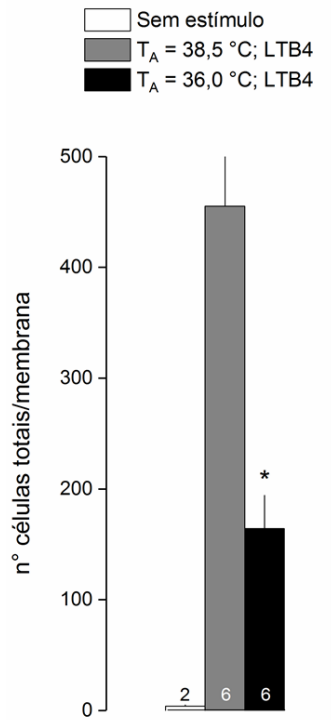

Figura 23 - Teste de quimiotaxia. A técnica de *transwell* foi aplicada em neutrófilos isolados do sangue de ratos *naive*. O leucotrieno B4 (LTB4) foi o quimioatrator utilizado na dose de 50nM. A migração celular foi determinada por contagem de neutrófilos que permaneceram na membrana de nitrocelulose após 2h à T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.4 OBJETIVO 4: IMPACTO DA HIPOTERMIA SOBRE O CONTROLE DA INFECÇÃO

4.4.1 Carga bacteriana nos pulmões e peritônio

A sobrevida na sepse depende de um rápido recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso bem como da atividade microbicida destes fagócitos [179]. A falência na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal na sepse Gram-positiva e Gram-negativa resulta em permanência da infecção, bacteremia e morte [180, 181]. Logo, foi verificado se o menor infiltrado inflamatório observado nos pulmões e no peritônio dos ratos sépticos com hipotermia estaria tendo dificuldades em controlar a quantidade de bactérias nestes órgãos. Para isso, tanto o lavado peritoneal quanto o homogenato pulmonar, após 5 h e 20 h de infecção, foram plaqueados em ágar McConkey para quantificação de *E. coli*. O resultado obtido foi inesperado, e mostrou que embora a quantidade de bactérias, após 5 h de sepse, estivesse muito aumentada nos pulmões dos animais com hipotermia, este fenômeno térmico de alguma forma controlou a quantidade de *E. coli* após 20 h de infecção (**Fig. 24**).

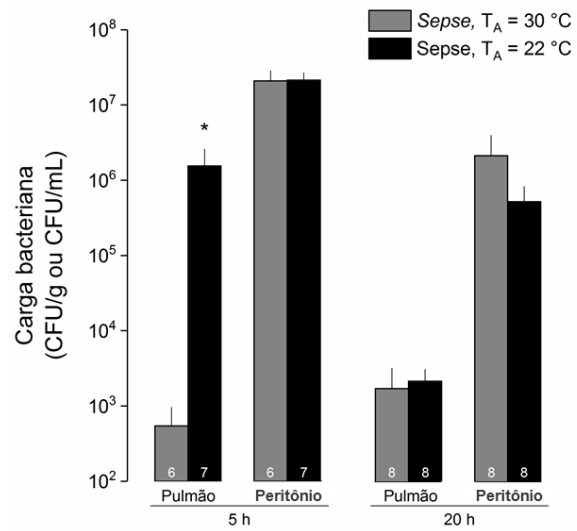

Figura 24 - Carga bacteriana. A quantidade total de bactéria foi avaliada no pulmão e no lavado peritoneal, 5 h e 20 h após a indução de sepse, via contagem de colônias presentes em ágar McConkey. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.4.2 Presença de macrófagos nos sítios infecciosos

O controle da carga bacteriana associado ao reduzido infiltrado neutrofílico nos pulmões e no peritônio dos animais hipotérmicos levantou a hipótese de que poderia estar havendo outra célula compensando o papel inflamatório dos neutrófilos. Logo, foi investigado se a hipotermia estava alterando o infiltrado dos macrófagos nos pulmões e no peritônio. Para isso, as células totais do peritônio e dos pulmões de ratos sépticos mantidos a T_A de 22 °C ou 30 °C foram coletadas, marcadas com CD68 (marcador de proteínas lisossomais específicas de macrófagos) e lidas em citômetro de fluxo, 20 h após a inoculação da bactéria (**Fig. 25A**). Esperou-se uma quantidade aumentada de macrófagos nos sítios infecciosos dos animais hipotérmicos para suprir a falta dos neutrófilos, porém a quantidade dessas células não estava alterada no peritônio, e, interessantemente, ainda estavam reduzidas nos pulmões (**Fig. 25B**), assim como estavam os neutrófilos (**Fig. 19A**). Ou seja, mesmo em menor número os neutrófilos e macrófagos conseguiram controlar a infecção.

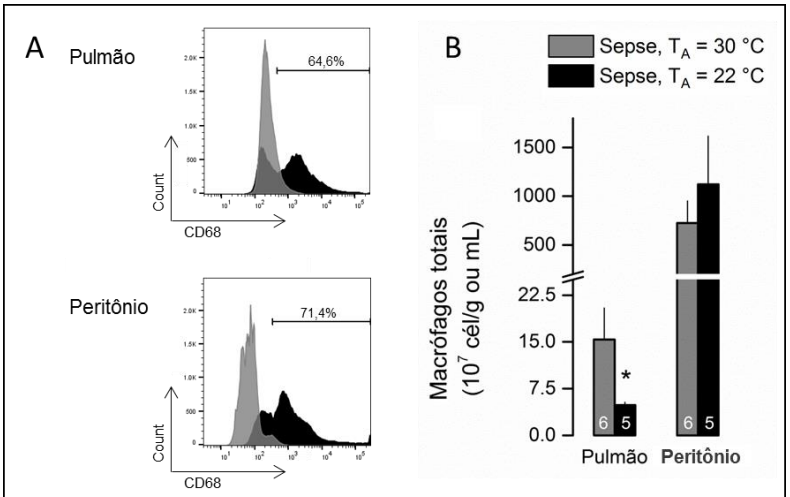

Figura 25 – Infiltrado de macrófagos. Ratos *Wistar* sépticos foram mantidos em T_A de 30°C ou 22°C. Foram coletados pulmão e lavado peritoneal dos ratos 20 h após início da sepse e a quantidade de macrófagos nestes sítios foi analisada por citometria de fluxo em (B), sendo histograma representado em (A). Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.4.3 *E. coli* na febre *versus* hipotermia

O controle da quantidade de bactéria nos pulmões e no lavado peritoneal dos ratos por um menos número de fagócitos ainda poderia ser explicado pelo fato da hipotermia estar atrapalhando o crescimento da bactéria. Logo, a *E. coli* foi colocada em meio de cultura durante 5 h e esse experimento revelou que em T_{CULT} de 36,0 °C essa bactéria cresce significativamente mais do que quando está submetida a uma T_{CULT} de 38,5 °C (**Fig. 26**). Logo, a hipótese de que a infecção estava sendo controlada, pois a multiplicação da bactéria estaria comprometida frete a T_A mais baixa, foi rejeitada.

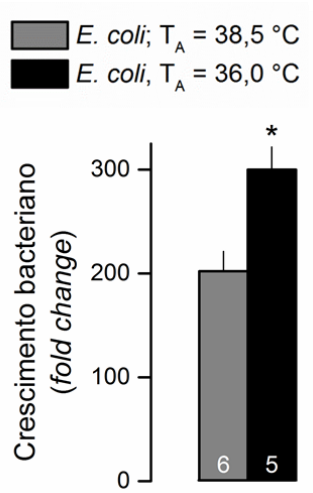

Figura 26 - Crescimento bacteriano. A taxa de crescimento da *E. coli* foi avaliada colocando a mesma em meio de cultura por 5 h, em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

4.4.4 Atividade microbicida dos neutrófilos e macrófagos

Na hipotermia, neutrófilos e macrófagos, mesmo estando presentes em menor quantidade, controlaram a infecção causada por uma bactéria que apresentava um crescimento mais pronunciado. Esses dados fizeram com que a atividade microbicida desses fagócitos fosse investigada. Surpreendentemente, após 5 h de cultura com *E. coli*, os neutrófilos mataram menos bactérias enquanto os macrófagos, tanto oriundos dos pulmões quanto do peritônio, mataram mais bactérias a uma T_{CULT} que corresponde a hipotermia (**Fig. 27**). Esse dado totalmente inesperado sugeriu que os macrófagos compensaram a falta dos neutrófilos potencializando sua capacidade microbicida na hipotermia.

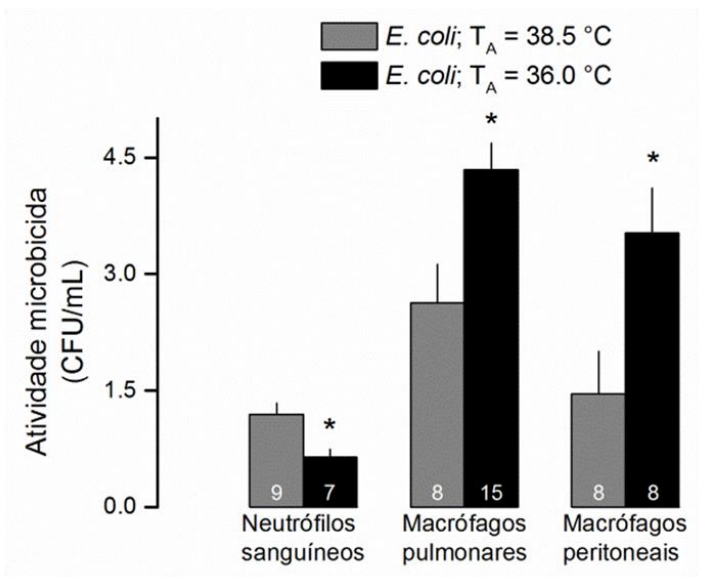

Figura 27 - Atividade microbicida. Neutrófilos e macrófagos foram colocados em cultura com *E. coli* por 5 h, em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. A quantidade de bactérias mortas por mL de sobrenadante está representada. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Com base na observação inesperada de que na hipotermia os macrófagos apresentaram aumento da capacidade microbicida, foi feita uma investigação para elucidar qual foi o mecanismo alterado nessa condição. Levando em consideração que os macrófagos usualmente têm uma taxa de fagocitose maior que os neutrófilos e que dependem exclusivamente de mecanismos microbicidas intracelulares [182], a taxa de fagocitose, a produção de ROS e a expressão de iNOS foram os mecanismos avaliados.

Inicialmente, os macrófagos e os neutrófilos foram cultivados com uma *E. coli* fluorescente durante 60 min em diferentes T_{CULTs} (36,0 °C e 38,5°C). Os resultados indicaram que não havia alteração na quantidade de bactérias fagocitadas pelos neutrófilos nas duas temperaturas avaliadas, enquanto que os macrófagos fagocitaram menos na hipotermia (**Fig. 28**).

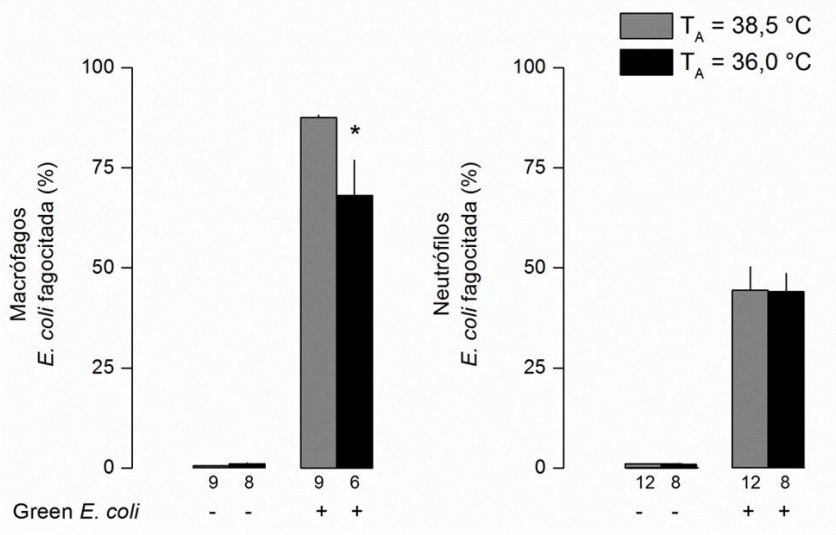

Figura 28 – Ensaio de fagocitose. Neutrófilos e macrófagos foram incubados na presença de *E. coli* fluorescente durante 60 minutos, em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. Ao final as células foram adquiridas em citômetro de fluxo. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Para avaliar a produção de ROS em macrófagos, essas células foram estimuladas por 60 min com LPS e PMA. Os resultados mostraram que a produção de ROS foi aumentada na hipotermia por macrófagos ativados com LPS e também com PMA (**Fig. 29**). Esses estímulos foram escolhidos, pois ativam as células de formas diferentes: LPS ativa via ligação ao receptor TLR4 presente na superfície do fagócito, enquanto PMA ativa diretamente a proteína quinase C (PKC). Logo, esses resultados sugeriram que o efeito da temperatura sobre os macrófagos ocorre *downstream* a ativação de TLR4 e da PKC. A hipotermia levou ao aumento da produção de ROS também nos neutrófilos, porém de forma menos pronunciada que nos macrófagos (**Fig. 29**). Este resultado foi indispensável, pois indicou que a hipotermia alterou a produção de ROS de forma consistente em macrófagos e neutrófilos, porém como este mecanismo microbicida é mais importante para os macrófagos, esses conseguiram potencializar a sua capacidade de matar as bactérias.

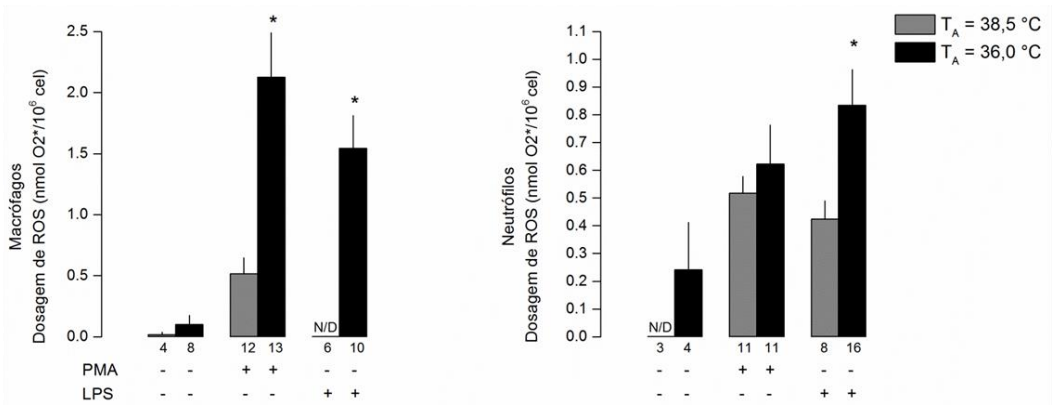

Figura 29 – Produção de ROS. Neutrófilos e macrófagos foram incubados na presença de ferricitocromo c (80 mM) e estimulados com LPS (500 ng/mL) ou PMA (100 nM) durante 60 minutos, em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. Ao final o ferrocitocromo c foi medido no sobrenadante. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Foi também avaliada a expressão de iNOS, que é a enzima responsável pela produção de NO e consequente liberação do agente microbicida peroxinitrito. Foi observado que após 4 h de cultura, os macrófagos estimulados com LPS não foram capazes expressar quantidades significativas dessa enzima, o que sugeriu que este não foi o mecanismo microbicida responsável pelo aumento da capacidade microbicida dos macrófagos (**Fig. 30**).

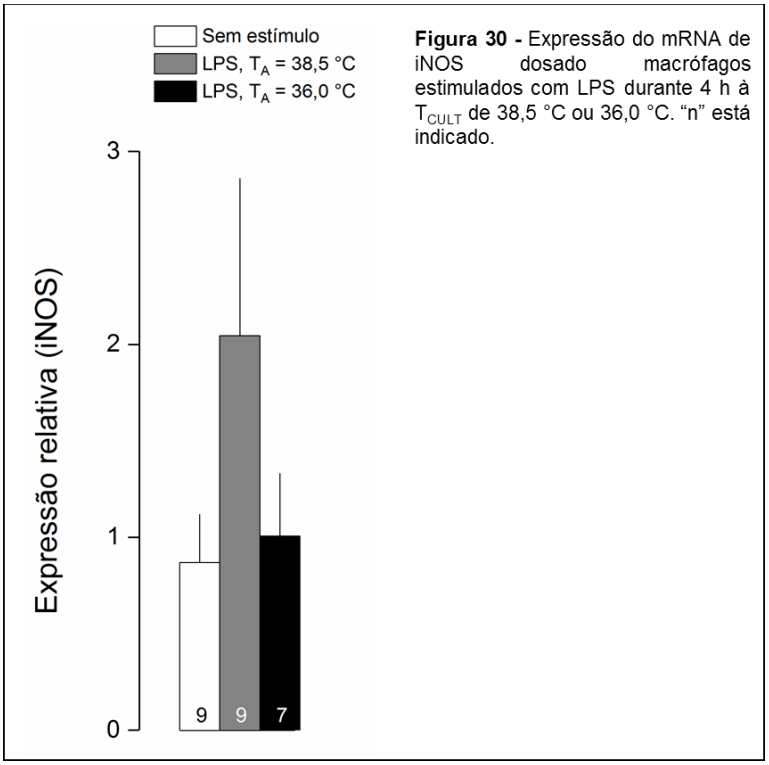

Figura 30 - Expressão do mRNA de iNOS dosado macrófagos estimulados com LPS durante 4 h à T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C. "n" está indicado.

4.4.5 Perfil de citocinas produzidas por macrófagos

Os macrófagos são importantes produtores de citocinas, que por sua vez são proteínas que desempenham importante papel na inflamação [183]. Além disso, estudos prévios mostraram que a produção de ROS pode inibir a cascata de sinalização responsável por induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias [184]. Dessa forma, foi feita a dosagem de TNF-α, IL-1β e IL-10 no lavado peritoneal, no homogenato dos pulmões e também no sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com *E.coli*, para entender se o efeito da temperatura sobre o macrófago é seletivo para produção de ROS ou é uma característica mais geral dessa célula. Os resultados mostraram que a produção dessas citocinas no peritônio após 20 h de sepse, não foi diferente nos animais com hipotermia e naqueles onde a hipotermia foi impedida de ocorrer. Porém, nos pulmões foi visto diminuição na quantidade de IL-1β, aumento de IL-10, e a razão de IL-1β e TNF-α por IL-10 indicou que os pulmões se tornaram um ambiente mais anti-inflamatório quando a hipotermia aconteceu, corroborando com o fato de que o aumento na produção de ROS inibe citocinas pró-inflamatórias (**Fig. 31**).

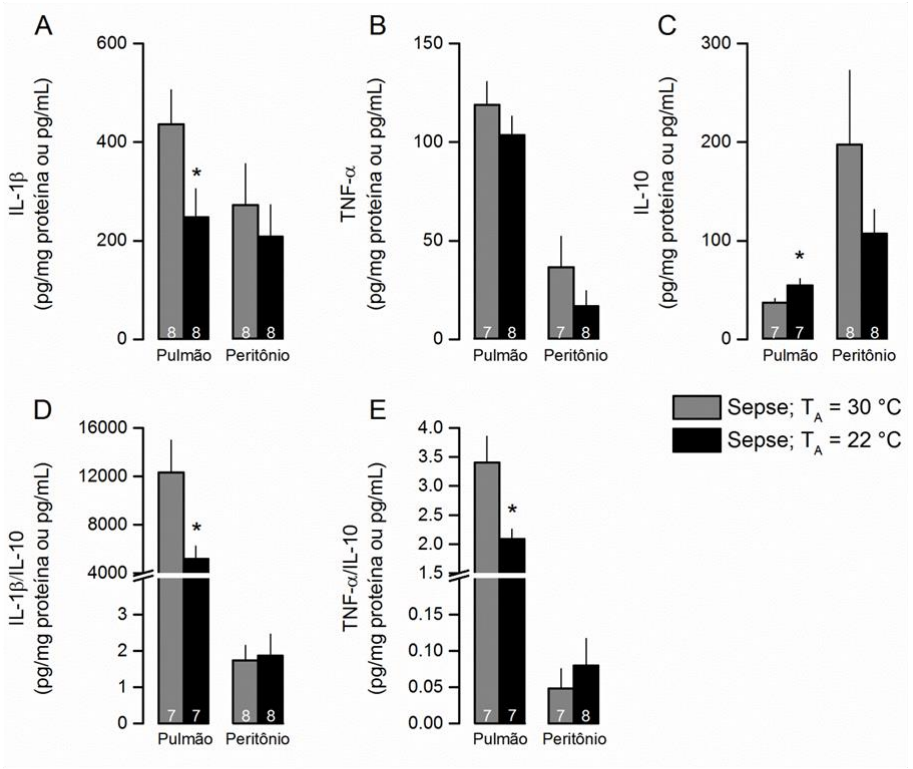

Figura 31 – Citocinas produzidas *in vivo*. Ratos *Wistar* sépticos foram mantidos em T_A de 30 °C ou 22 °C. Foram coletados pulmão e lavado peritoneal dos ratos 20 h após início da sepse e o homogenato foi extraído para dosagem de citocinas por ELISA. IL-1β (A), TNF-α (B), IL-10 (C) e a relação IL-1β/IL-10 (D) e TNF-α/IL-10 (E) estão mostrados. Não houve detecção de citocinas nos animais saudáveis. Os dados estão representados como média ± EP. O número de animais por grupo (n) está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Em seguida, macrófagos isolados dos pulmões e do lavado peritoneal de ratos *naïve* foram estimulados com *E. coli* nas diferentes T_{CULTs} (36,0 °C e 38,5 °C) e após 5 h as citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10 foram dosadas no sobrenadante destas culturas. Os resultados mostraram que os macrófagos pulmonares diminuíram a produção de todas as citocinas avaliadas (**Fig. 32 A, B e C**), enquanto os macrófagos peritoneais reduziram apenas IL-1β (**Fig. 32A**). Após analisar a razão entre as citocinas pró-inflamatórias com IL-10, foi observado um predomínio em manter o ambiente anti-inflamatório na hipotermia frente ao estímulo por *E.coli* (**Fig. 32D e E**), assim como visto nos resultados *in vivo* (**Fig. 31D e E**). *Logo, os resultados deste estudo deixaram a seguinte mensagem: macrófagos matam mais ao mesmo tempo em que favorecem um perfil menos inflamatório na hipotermia, mostrando um refinamento mecanístico seletivo dessas células.*

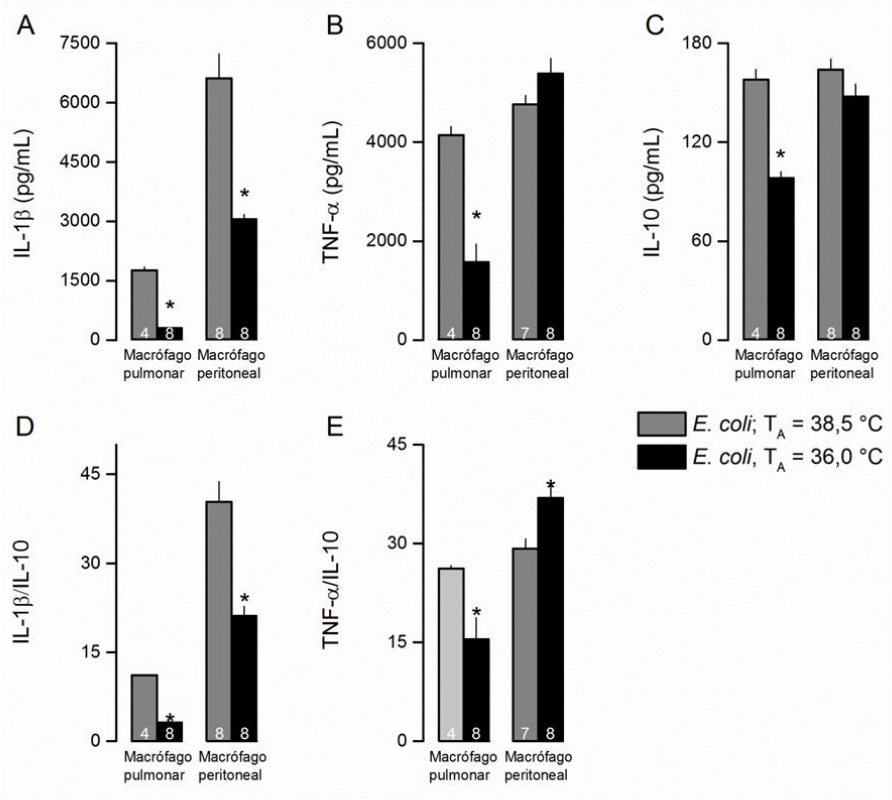

Figura 32 - Citocinas produzidas *iv vitro*. Macrófagos isolados do pulmão e do lavado peritoneal foram colocados em cultura com *E. coli* em T_{CULT} de 38,5 °C ou 36,0 °C e após 5 h o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas por ELISA. IL-β (A), TNF-α (B), IL-10 (C) e a relação IL-1β/IL-10 (D) e TNF-α/IL-10 (E) estão mostrados. Não houve detecção de citocinas nas culturas sem estímulo. Os dados estão representados como média ± EP. "n" está indicado. * $p < 0,05$ entre os grupos.1

5 DISCUSSÃO

Ao avaliar a dinâmica e outras características da hipotermia em um grupo raro de pacientes sépticos que não foram submetidos ao reaquecimento ativo, o presente estudo demonstrou que a hipotermia na sepse humana é uma resposta predominantemente transitória, auto limitante e não terminal. Ainda, é possível observar a presença de flutuações bidirecionais na T_{CORP} dos pacientes. Juntos, os resultados foram compatíveis com a ideia de que pacientes sépticos com hipotermia mantem a capacidade de defender a T_{CORP} do resfriamento, porém fazem isso em um limiar de temperatura mais baixo. Outra grande novidade deste estudo foi o fato de não haver qualquer evidência de que a hipotermia seja um subproduto de disfunções fisiológicas comuns (choque circulatório ou disfunção respiratória) ou de intervenções farmacológicas.

É notável que as características da hipotermia em pacientes sépticos, aqui relatadas, se assemelham aquela hipotermia observada em ratos submetidos a protocolos de endotoxemia, um modelo experimental onde as manifestações termorregulatórias da inflamação sistémica foram mais bem caracterizadas. Neste modelo experimental, a hipotermia parece ser um componente próprio da resposta inflamatória sistêmica, prevalecendo sobre a febre quando essa inflamação se torna mais grave [185]. A hipotermia acontece precocemente e é geralmente transitória, além de não ser uma consequência do choque circulatório ou da disfunção respiratória [186]. A natureza regulada da hipotermia neste modelo experimental é reforçada por estudos que mostram que a hipotermia é precedida por um deslocamento abaixo do limiar da T_{CORP} para a ativação de produção de calor aeróbico [123] em um momento em que a capacidade do metabolismo aeróbico não é comprometida [186]. Esta alteração termo efetora é particularmente eficaz quando associada à preferência por ambientes frios pelos animais com inflamação sistêmica [123, 187]. Ainda em modelos experimentais, foi visto que a hipotermia inicial pode ser seguida por uma hipotermia progressiva e terminal quando a endotoxemia é letal [123]. A forma progressiva pode ainda prevalecer sobre a forma transitória em outras espécies de roedores, como camundongos [188, 189]. No entanto, com base nos resultados do presente estudo clínico, a hipotermia precoce e regulada parece ser mais relevante que a hipotermia tardia e progressiva na sepse humana.

Em estudos clínicos prévios, a prevalência de hipotermia em pacientes sépticos no momento da admissão foi de 9 - 21% [78, 93-97]. Um número semelhante (22,6%) foi obtido no presente estudo para o momento em que a sepse foi diagnosticada, porém o presente estudo também revelou um número substancial de pacientes (31,2%) que não estavam hipotérmicos na admissão, mas se tornaram hipotérmicos no decorrer da internação. Dessa forma, a hipotermia parece ser mais comum em pacientes sépticos do que geralmente se pensa. Outro ponto a ser considerado é que a hipotermia vista no início do diagnóstico de sepse e aquela que é desenvolvida em outro período durante a internação possam ser fenômenos distintos, porém esta possibilidade é enfraquecida pelo fato de que a dinâmica da hipotermia em seres humanos é uma resposta muito similar, independente do estágio em que ocorre.

Embora o presente estudo não tenha sido delineado para avaliar o quão impactante são os efeitos da hipotermia espontânea, alguns dos achados devem ser discutidos em relação à associação entre hipotermia e mau prognóstico na sepse. Inicialmente, Clemmer et al. [78] e Kushimoto et al. [95] relataram maior incidência de choque em pacientes que desenvolvem hipotermia, enquanto que o presente estudo mostrou que hipotermia e choque raramente acontecem simultaneamente. Uma explicação razoável para esta aparente contradição é que hipotermia e choque são eventos independentes, mas ocorrem em um subconjunto comum de pacientes. Hipotermia e choque são fenômenos observados em pacientes com sepse mais grave, como é evidenciado pelo maior escore tanto no APACHE II quanto no SOFA [97, 167]. Do mesmo modo, como já descrito acima, o escore APACHE II no presente estudo foi correlacionado positivamente com o número de episódios de hipotermia quando o período de internação na UTI foi levado em conta. O presente estudo ainda mostrou que a chance de desenvolver hipotermia durante o choque não está somente inalterada, e sim reduzida em relação aos períodos em que a T_{CORP} do paciente está acima de 36,0 °C. O motivo para esta redução não está claro, mas pode ser devido ao fato de que pacientes em choque circulatório frequentemente recebem norepinefrina, uma droga com ação termogênica [169]. Outro ponto conflitante é que estudos clínicos prévios reportam consistentemente uma associação positiva entre hipotermia e mortalidade [78, 94-96], ao passo que o presente estudo demonstrou que a hipotermia é usualmente um evento não terminal. O ponto em comum parece ser o fato de que os estudos prévios não avaliaram a hipotermia na hora da morte, mas sim dentro de 24 h após o diagnóstico de sepse ou admissão no estudo. Portanto, assim como no caso de choque, a hipotermia pode estar positivamente associada com a mortalidade simplesmente porque ambas ocorrem em pacientes mais graves. A definição da hipotermia natural como um mecanismo adaptativo ou não, no decorrer da sepse, só poderá ser resolvida por um estudo prospectivo, intervencionista em que o subconjunto hipotérmico de pacientes sépticos seja dividido ao acaso em dois grupos: um grupo submetido a reaquecimento assim que a hipotermia é detectada (o padrão de cuidados em muitos hospitais); e o outro grupo com hipotermia correndo o seu curso natural (talvez dentro de certos limites). Curiosamente, quando um delineamento experimental semelhante foi aplicado em ratos com choque séptico induzido por *E. coli*, o resultado, que incluía avaliação de mortalidade, foi mais benéfico no grupo que foi permitido desenvolver hipotermia em comparação com o grupo em que a hipotermia foi prevenida [142].

No que diz respeito às questões metodológicas, é importante pontuar que o tipo de medição utilizada em estudos clínicos, que relataram casos de hipotermia na sepse, é um problema. Muitos deles simplesmente não descreveram como e onde a T_{CORP} foi medida [78, 93, 96, 167] ou, quando descreveram [95, 97], não foram medidas padronizadas, e incluíram no mesmo estudo temperaturas axilares, retais, arteriais e na bexiga. No presente estudo, a termometria axilar foi o único método de medição de T_{CORP} utilizado, pois estava disponível nos prontuários revisados da UTI. A utilização de uma metodologia padronizada é uma vantagem, porém deve-se reconhecer que a termometria axilar tem sua limitação, uma vez que é menos precisa do que outros métodos mais invasivos, como a termometria via artéria pulmonar,

bexiga e esôfago [162]. Essa limitação, no entanto, não deve ser vista como evidência de que a temperatura axilar não tem qualquer valor, principalmente quando é levado em consideração a natureza rara da amostra de pacientes investigadas no presente estudo (na grande maioria dos hospitais o paciente séptico é imediatamente submetido ao reaquecimento quando a hipotermia é detectada, logo a dinâmica desta resposta é impossível de ser descrita). Além disso, o erro da termometria axilar não excede 0,5 °C [162], e, mais importante ainda, o deslocamento permanece relativamente constante ao longo de uma ampla variedade de medidas de T_{CORP}, de modo que esta medida e medidas de temperaturas em locais mais profundos do corpo sejam satisfatoriamente relatadas e aceitas [190-192]. Sabendo disso, foram definidas medidas conservadoras para evitar a inclusão de valores não confiáveis nos grupos hipotérmicos. Mais especificamente, foram considerados hipotérmicos somente pacientes que tiveram uma ou mais medidas de 35,5 °C ou menores, um valor que é, pelo menos, 0,5 °C abaixo do limiar atualmente estabelecido para o diagnóstico de hipotermia na sepse [2].

Outro ponto metodológico que merece ser comentado é que a T_A, a qual os pacientes sépticos estavam submetidos, não foi avaliada nem no presente estudo (dados não disponíveis nos prontuários) e nem nos estudos clínicos anteriores sobre hipotermia em pacientes sépticos, embora isso seja essencial para o desenvolvimento de hipotermia em modelos murinos de inflamação sistêmica e sepse [185]. Além disso, um estudo observacional realizado durante a onda de calor europeia de 2003 mostrou que pacientes com infecção grave são mais sensíveis a mudanças na T_{CORP} quando há mudanças na T_A, do que pacientes não infectados [193]. Esta dependência da T_A (poiquilotermia) é frequentemente vista como evidência de disfunção na termorregulação [194], porém essa interpretação reflete um modelo ultrapassado de termorregulação, segundo o qual todo termo efetor está supostamente ligado a uma única e integrada T_{CORP} de referência. Este modelo foi recentemente revisado devido à constatação de que as funções termo efetoras são independentes entre si, e podem defender diferentes níveis de T_{CORP} em uma resposta termorreguladora controlada [109, 120, 172, 195]. No caso da inflamação sistêmica experimental, doses de endotoxina que causam diminuição no limiar da T_{CORP}, para ativação da termogênese, produzem um efeito oposto ou pouca mudança no limiar da T_{CORP} para ativação dos efetores de perda de calor [123, 196]. Como consequência desta dissociação do limiar, a preferência térmica se torna imprescindível para determinar qual tipo de alteração na T_{CORP} irá ocorrer, sendo que formas mais graves de endotoxemia estejam associadas à preferência por ambientes frios e o desenvolvimento de hipotermia, e formas menos graves esteja associadas à preferência por ambientes quentes e aparecimento de febre, pelo menos em ratos [136].

Em conclusão, o presente estudo foi o primeiro a caracterizar a dinâmica da hipotermia espontânea na sepse humana. Os resultados podem ser uma mudança de paradigma para retratar a hipotermia como uma resposta transitória, auto limitante e não terminal, em oposição a um fenômeno desregulado e progressivo. Como discutido acima, a dinâmica da hipotermia séptica aqui relatada se assemelha aquela hipotermia regulada que é descrita em modelos animais, onde a hipotermia substitui naturalmente a febre quando a

inflamação sistêmica se agrava. Juntas, essas observações levam ao questionamento sobre quando e se o reaquecimento é realmente necessário no subgrupo de pacientes sépticos que desenvolvem hipotermia. Embora esta questão somente possa ser respondida com um estudo prospectivo e intervencional, o presente estudo promoveu dados essenciais e relevantes para futuros estudos clínicos.

6 CONCLUSÃO

6.1 ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO:

a) A hipotermia é um fenômeno regulado, transitório e não terminal em humanos.

b) Choque circulatório, disfunção respiratória e farmacoterapia não desencadeiam o início da hipotermia.

6.2 ESTUDO EXPERIMENTAL:

a) O modelo experimental de sepse grave monobacteriana desenvolvido permite ao rato apresentar uma hipotermia regulada quando este, além se ser submetido ao protocolo de sepse, também é exposto a baixas temperaturas.

b) A hipotermia protege a função pulmonar na sepse e afeta a migração e a motilidade dos neutrófilos levando a diminuição da infiltração dessas células nos pulmões e no peritônio.

c) Macrófagos de ratos apresentam maior atividade microbicida quando incubados a uma temperatura que corresponde à forma regulada de hipotermia (36,0°C) do que aqueles expostos a uma temperatura que corresponde à febre (38,5°C). Por outro lado, os neutrófilos respondem à temperatura de forma oposta: têm maior atividade microbicida a 38,5°C.

REFERÊNCIAS

1. Schmid A, Pugin J, Chevrolet JC, Marsch S, Ludwig S, Stocker R, Finnern H. Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. Swiss Med Wkly. 2004;134(7-8):97-102
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R, Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric S. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. Intensive Care Med. 2013;39(2):165-228
3. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 2013;369(21):2063
4. 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. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101(6):1644-55
5. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-10
6. Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, Pinsky MR. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(6):1389-94
7. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(1):77-84
8. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest. 1997;112(1):235-43
9. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol. 2007;170(5):1435-44
10. Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173(3):256-63
11. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assuncao M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Correa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care. 2004;8(4):R251-60
12. Vincent JL. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. Acta Clin Belg. 2000;55(2):79-87
13. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest. 2003;112(4):460-7
14. Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. Mediators Inflamm. 2010;2010:781235
15. Lin Q, Li M, Fang D, Fang J, Su SB. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. Int Immunopharmacol. 2011;11(10):1422-32
16. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 2002;420(6917):885-91
17. Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 2001;297(3):1051-8
18. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. J Immunol. 1986;136(5):1680-7
19. Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of Papio anubis. Am J Pathol. 1989;135(1):121-33
20. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. J Pathol. 2008;214(2):211-23
21. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(12):4533-7
22. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. Scand J Infect Dis. 2003;35(9):535-44

23. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. Chest. 1997;112(6 Suppl):321S-329S

24. Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. Int J Biochem Cell Biol. 1998;30(10):1075-9

25. Chaitanya GV, Franks SE, Cromer W, Wells SR, Bienkowska M, Jennings MH, Ruddell A, Ando T, Wang Y, Gu Y, Sapp M, Mathis JM, Jordan PA, Minagar A, Alexander JS. Differential cytokine responses in human and mouse lymphatic endothelial cells to cytokines in vitro. Lymphat Res Biol. 2010;8(3):155-64

26. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. Eur J Immunol. 2011;41(5):1203-17

27. Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. Crit Care Med. 2005;33(12 Suppl):S468-71

28. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. Crit Care Med. 2002;30(1 Suppl):S58-63

29. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. Eur J Immunol. 1995;25(4):1129-32

30. Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. Surgery. 1996;120(2):284-8; discussion 289

31. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. Lancet. 2006;368(9530):157-69

32. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. Am J Pathol. 2008;172(1):1-7

33. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010;33(5):657-70

34. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):3

35. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J Immunol. 2004;172(5):2731-8

36. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. Shock. 2010;34 Suppl 1:15-21

37. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. Clinics (Sao Paulo). 2006;61(1):71-6

38. Janetopoulos C, Firtel RA. Directional sensing during chemotaxis. FEBS Lett. 2008;582(14):2075-85

39. Alves-Filho JC, Sonego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Jr., Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. Nat Med. 2010;16(6):708-12

40. Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, Czaikoski PG, Souto FO, Alves-Filho JC, Freitas A, Carlos D, Montenegro MF, Neto AF, Ferreira SH, Rossi MA, Hothersall JS, Assreuy J, Cunha FQ. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K+ATP channel activation. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(3):360-8

41. Solomkin JS, Bass RC, Bjornson HS, Tindal CJ, Babcock GF. Alterations of neutrophil responses to tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 following human endotoxemia. Infect Immun. 1994;62(3):943-7

42. Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. J Clin Invest. 1999;103(9):1269-76

43. Warner RL, Bless NM, Lewis CS, Younkin E, Beltran L, Guo R, Johnson KJ, Varani J. Time-dependent inhibition of immune complex-induced lung injury by catalase: relationship to alterations in macrophage and neutrophil matrix metalloproteinase elaboration. Free Radic Biol Med. 2000;29(1):8-16

44. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(2):234-42

45. Babior BM. NADPH oxidase. Curr Opin Immunol. 2004;16(1):42-7

46. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J Leukoc Biol. 2005;78(5):1025-42

47. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. Intensive Care Med. 2003;29(10):1782-9

48. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. Br J Anaesth. 2003;90(2):221-32

49. Novelli GP. Role of free radicals in septic shock. J Physiol Pharmacol. 1997;48(4):517-27

50. Tsukahara Y, Morisaki T, Kojima M, Uchiyama A, Tanaka M. iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. ANZ J Surg. 2001;71(1):15-20

51. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. Nat Immunol. 2011;12(11):1035-44

52. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. J Intern Med. 2010;268(1):25-34

53. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303(5663):1532-5

54. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. Nat Med. 2011;17(11):1381-90

55. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. Trends Immunol. 2009;30(11):513-21

56. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. Growth Factors. 2004;22(4):225-31

57. Johnston RB, Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. N Engl J Med. 1988;318(12):747-52

58. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. 2013;496(7446):445-55

59. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003;3(1):23-35

60. Metcalf D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. J Cell Physiol. 1971;77(2):277-80

61. Van Furth R, Diesselhoff-den Dulk MC, Mattie H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. J Exp Med. 1973;138(6):1314-30

62. Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. Annu Rev Immunol. 1984;2:283-318

63. Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest. 1987;79(2):319-26

64. Rappolee DA, Werb Z. Secretory products of phagocytes. Curr Opin Immunol. 1988;1(1):47-55

65. Takemura R, Werb Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. Am J Physiol. 1984;246(1 Pt 1):C1-9

66. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005;4(3):281-6

67. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209-12

68. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med. 1992;176(1):287-92

69. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010;32(5):593-604

70. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005;5(12):953-64

71. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? Trends Mol Med.20(4):195-203

72. Bernard AM, Bernard GR. The immune response: targets for the treatment of severe sepsis. Int J Inflam.2012:697592

73. Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL. Effects of size and temperature on metabolic rate. Science. 2001;293(5538):2248-51

74. Malvin GM, Wood SC. Behavioral hypothermia and survival of hypoxic protozoans Paramecium caudatum. Science. 1992;255(5050):1423-5

75. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev. 2004;84(1):277-359

76. Grigg GC, Beard LA, Augee ML. The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds. Physiol Biochem Zool. 2004;77(6):982-97

77. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. Physiol Rev. 2006;86(2):435-64

78. Clemmer TP, Fisher CJ, Jr., Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. Crit Care Med. 1992;20(10):1395-401

79. Hasday JD, Fairchild KD, Shanholtz C. The role of fever in the infected host. Microbes Infect. 2000;2(15):1891-904

80. Hasday JD, Garrison A. Antipyretic therapy in patients with sepsis. Clin Infect Dis. 2000;31 Suppl 5:S234-41

81. Harmon DR, Zarafonetis C, Clark PF. Temperature relations in phagocytosis. J Bacteriol. 1946;52:337-47

82. Yoshioka H, Koga S, Maeta M, Shimizu N, Hamazoe R, Murakami A. The influence of hyperthermia in vitro on the functions of peritoneal macrophages in mice. Jpn J Surg. 1990;20(1):119-22

83. Tulapurkar ME, Almutairy EA, Shah NG, He JR, Puche AC, Shapiro P, Singh IS, Hasday JD. Febrile-range hyperthermia modifies endothelial and neutrophilic functions to promote extravasation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012;46(6):807-14

84. Wang WC, Goldman LM, Schleider DM, Appenheimer MM, Subjeck JR, Repasky EA, Evans SS. Fever-range hyperthermia enhances L-selectin-dependent adhesion of lymphocytes to vascular endothelium. J Immunol. 1998;160(2):961-9

85. Ostberg JR, Kabingu E, Repasky EA. Thermal regulation of dendritic cell activation and migration from skin explants. Int J Hyperthermia. 2003;19(5):520-33

86. Tournier JN, Hellmann AQ, Lesca G, Jouan A, Drouet E, Mathieu J. Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. J Leukoc Biol. 2003;73(4):493-501

87. Mace TA, Zhong L, Kilpatrick C, Zynda E, Lee CT, Capitano M, Minderman H, Repasky EA. Differentiation of CD8+ T cells into effector cells is enhanced by physiological range hyperthermia. J Leukoc Biol. 2011;90(5):951-62

88. Jampel HD, Duff GW, Gershon RK, Atkins E, Durum SK. Fever and immunoregulation. III. Hyperthermia augments the primary in vitro humoral immune response. J Exp Med. 1983;157(4):1229-38

89. Kluger MJ, Ringler DH, Anver MR. Fever and survival. Science. 1975;188(4184):166-8

90. Small PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Sande MA. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. Infect Immun. 1986;52(2):484-7

91. Freitas Lione VO, Bittencourt Dos Santos MH, Ulisses Carvalho TM, Hirata R, Jr., Mattos-Guaraldi AL, Arruda Mortara R, Nagao PE. Fever temperature enhances mechanisms of survival of Streptococcus agalactiae within human endothelial cells. Int J Mol Med. 2010;26(4):511-6

92. Loh E, Kugelberg E, Tracy A, Zhang Q, Gollan B, Ewles H, Chalmers R, Pelicic V, Tang CM. Temperature triggers immune evasion by Neisseria meningitidis. Nature. 2013;502(7470):237-40

93. Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson W, Wright P, Dupont WD, Swindell BB. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. Crit Care Med. 1999;27(4):699-707

94. Drewry AM, Fuller BM, Skrupky LP, Hotchkiss RS. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia. Crit Care Med. 2015;43(6):1165-9

95. Kushimoto S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Ogura H, Fujishima S, Araki T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi S, Suzuki K, Suzuki Y, Takeyama N, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N, Group JSRS. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. Crit Care. 2013;17(6):R271

96. Marik PE, Zaloga GP. Hypothermia and cytokines in septic shock. Norasept II Study Investigators. North American study of the safety and efficacy of murine monoclonal antibody to tumor necrosis factor for the treatment of septic shock. Intensive Care Med. 2000;26(6):716-21

97. Peres Bota D, Lopes Ferreira F, Melot C, Vincent JL. Body temperature alterations in the critically ill. Intensive Care Med. 2004;30(5):811-6

98. Epstein E, Anna K. Accidental hypothermia. BMJ. 2006;332(7543):706-9

99. Corrigan JJ, Fonseca MT, Flatow EA, Lewis K, Steiner AA. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. J Physiol. 2014;592(17):3901-16

100. Cunha BA, Gran A, Munoz-Gomez S. Typhoid fever vs. malaria in a febrile returning traveler: typhomalaria revisited--an Oslerian perspective. Travel Med Infect Dis. 2013;11(1):66-9

101. Cunha BA. With sepsis: If fever is good, then hypothermia is bad! Crit Care Med. 2012;40(10):2926; author reply 2926-7

102. Li XS, Liu L, Jin YL, Luo FF, Li L, Zhu J, Xie Q. Accompanying mild hypothermia significantly improved the prognosis of septic mice than artificial mild hypothermia. Am J Emerg Med. 2015;33(11):1651-8

103. Romanovsky AA, Shido O, Sakurada S, Sugimoto N, Nagasaka T. Endotoxin shock-associated hypothermia. How and why does it occur? Ann N Y Acad Sci. 1997;813:733-7

104. Romanovsky AA, Szekely M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. Med Hypotheses. 1998;50(3):219-26

105. Roberts WW. Differential thermosensor control of thermoregulatory grooming, locomotion, and relaxed postural extension. Ann N Y Acad Sci. 1988;525:363-74

106. Crawshaw LI. Temperature regulation in vertebrates. Annu Rev Physiol. 1980;42:473-91

107. Fuller A, Dawson T, Helmuth B, Hetem RS, Mitchell D, Maloney SK. Physiological mechanisms in coping with climate change. Physiol Biochem Zool.83(5):713-20

108. Florez-Duquet M, Peloso E, Satinoff E. Fever and behavioral thermoregulation in young and old rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001;280(5):R1457-61

109. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. Front Biosci (Landmark Ed).16:74-104

110. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;293(2):E444-52

111. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360(15):1509-17

112. Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. Proc Natl Acad Sci U S A.107(19):8848-53

113. Tanaka M, Ootsuka Y, McKinley MJ, McAllen RM. Independent vasomotor control of rat tail and proximal hairy skin. J Physiol. 2007;582(Pt 1):421-33

114. Shibasaki M, Crandall CG. Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans. Front Biosci (Schol Ed).2:685-96

115. Geor RJ, McCutcheon LJ. Thermoregulatory adaptations associated with training and heat acclimation. Vet Clin North Am Equine Pract. 1998;14(1):97-120

116. Robertshaw D. Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals. J Appl Physiol (1985). 2006;101(2):664-8

117. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Akulich NV, Koulchitsky SV, Simons CT, Sessler DI, Gourine VN. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? Am J Physiol. 1996;271(1 Pt 2):R244-53

118. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Simons CT, Sugimoto N. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? Am J Physiol. 1998;275(1 Pt 2):R332-8

119. Steiner AA, Chakravarty S, Robbins JR, Dragic AS, Pan J, Herkenham M, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses of rats to conventional preparations of lipopolysaccharide are caused by lipopolysaccharide per se-- not by lipoprotein contaminants. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(2):R348-R352

120. Romanovsky AA. Do fever and anapyrexia exist? Analysis of set point-based definitions. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287(4):R992-5

121. Blanque R, Meakin C, Millet S, Gardner CR. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. Gen Pharmacol. 1996;27(6):973-7

122. Martin SM, Malkinson TJ, Veale WL, Pittman QJ. Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. Am J Physiol. 1995;268(4 Pt 2):R919-23

123. Romanovsky AA, Shido O, Sakurada S, Sugimoto N, Nagasaka T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. Am J Physiol. 1996;270(4 Pt 2):R693-703

124. Krall CM, Yao X, Hass MA, Feleder C, Steiner AA. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010;298(6):R1512-21

125. Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, Corrigan JJ, Simons CT, Petersen SR, Musteata FM, Bakshi CS, Romanovsky AA, Sellati TJ, Steiner AA. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2012;302(12):R1372-83

126. Steiner AA, Hunter JC, Phipps SM, Nucci TB, Oliveira DL, Roberts JL, Scheck AC, Simmons DL, Romanovsky AA. Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009;297(2):R485-94

127. Al-Saffar H, Lewis K, Liu E, Schober A, Corrigan JJ, Shibata K, Steiner AA. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. Brain Behav Immun. 2013;28:188-95

128. Steiner AA, Molchanova AY, Dogan MD, Patel S, Petervari E, Balasko M, Wanner SP, Eales J, Oliveira DL, Gavva NR, Almeida MC, Szekely M, Romanovsky AA. The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. J Physiol. 2011;589(Pt 9):2415-31

129. Ootsuka Y, Blessing WW, Steiner AA, Romanovsky AA. Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;294(4):R1294-303

130. Steiner AA, Krall CM, Liu E. A reappraisal on the ability of leptin to induce fever. Physiol Behav. 2009;97(3-4):430-6

131. Romanovsky AA, Simons CT, Kulchitsky VA. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. Am J Physiol. 1998;275(1 Pt 2):R323-31

132. Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, Roberts JL, Kobayashi S, Matsumura K, Sawchenko PE, Romanovsky AA. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. PLoS Biol. 2006;4(9):e284

133. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. Nat Rev Immunol.15(6):335-49

134. Li S, Wang Y, Matsumura K, Ballou LR, Morham SG, Blatteis CM. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. Brain Res. 1999;825(1-2):86-94

135. Scammell TE, Griffin JD, Elmquist JK, Saper CB. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. Am J Physiol. 1998;274(3 Pt 2):R783-9

136. Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. Eur J Neurosci. 2006;23(12):3359-67

137. Bibby DC, Grimble RF. Temperature and metabolic changes in rats after various doses of tumour necrosis factor alpha. J Physiol. 1989;410:367-80

138. Leon LR, White AA, Kluger MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. Am J Physiol. 1998;275(1 Pt 2):R269-77

139. Chajek-Shaul T, Barash V, Weidenfeld J, Friedman G, Ziv E, Shohami E, Shiloni E. Lethal hypoglycemia and hypothermia induced by administration of low doses of tumor necrosis factor to adrenalectomized rats. Metabolism. 1990;39(3):242-50

140. Ferran C, Dy M, Merite S, Sheehan K, Schreiber R, Leboulenger F, Landais P, Bluestone J, Bach JF, Chatenoud L. Reduction of morbidity and cytokine release in anti-CD3 MoAb-treated mice by corticosteroids. Transplantation. 1990;50(4):642-8

141. Ueno R, Narumiya S, Ogorochi T, Nakayama T, Ishikawa Y, Hayaishi O. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(19):6093-7

142. Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, Corrigan JJ, Simons CT, Petersen SR, Musteata FM, Bakshi CS, Romanovsky AA, Sellati TJ, Steiner AA. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.302(12):R1372-83

143. Ellis GS, Carlson DE, Hester L, He JR, Bagby GJ, Singh IS, Hasday JD. G-CSF, but not corticosterone, mediates circulating neutrophilia induced by febrile-range hyperthermia. J Appl Physiol (1985). 2005;98(5):1799-804

144. Hasday JD, Garrison A, Singh IS, Standiford T, Ellis GS, Rao S, He JR, Rice P, Frank M, Goldblum SE, Viscardi RM. Febrile-range hyperthermia augments pulmonary neutrophil recruitment and amplifies pulmonary oxygen toxicity. Am J Pathol. 2003;162(6):2005-17

145. Capitano ML, Nemeth MJ, Mace TA, Salisbury-Ruf C, Segal BH, McCarthy PL, Repasky EA. Elevating body temperature enhances hematopoiesis and neutrophil recovery after total body irradiation in an IL-1-, IL-17-, and G-CSF-dependent manner. Blood. 2012;120(13):2600-9

146. Singh IS, Gupta A, Nagarsekar A, Cooper Z, Manka C, Hester L, Benjamin IJ, He JR, Hasday JD. Heat shock co-activates interleukin-8 transcription. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;39(2):235-42

147. Launey Y, Nesseler N, Malledant Y, Seguin P. Clinical review: fever in septic ICU patients--friend or foe? Crit Care. 2011;15(3):222

148. Blanford S, Thomas MB. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust Schistocerca gregaria infected with the fungus Metarhizium anisopliae var acridum. J Invertebr Pathol. 2001;78(1):1-8

149. Bachleitner-Hofmann T, Strohschneider M, Krieger P, Sachet M, Dubsky P, Hayden H, Schoppmann SF, Pfragner R, Gnant M, Friedl J, Stift A. Heat shock treatment of tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances their capacity to elicit antitumor T cell responses against medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(11):4571-7

150. Yan X, Xiu F, An H, Wang X, Wang J, Cao X. Fever range temperature promotes TLR4 expression and signaling in dendritic cells. Life Sci. 2007;80(4):307-13

151. Hatzfeld-Charbonnier AS, Lasek A, Castera L, Gosset P, Velu T, Formstecher P, Mortier L, Marchetti P. Influence of heat stress on human monocyte-derived dendritic cell functions with immunotherapeutic potential for antitumor vaccines. J Leukoc Biol. 2007;81(5):1179-87

152. Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA. Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. Int J Hyperthermia. 2002;18(6):552-62

153. Peng JC, Hyde C, Pai S, O'Sullivan BJ, Nielsen LK, Thomas R. Monocyte-derived DC primed with TLR agonists secrete IL-12p70 in a CD40-dependent manner under hyperthermic conditions. J Immunother. 2006;29(6):606-15

154. Ostberg JR, Gellin C, Patel R, Repasky EA. Regulatory potential of fever-range whole body hyperthermia on Langerhans cells and lymphocytes in an antigen-dependent cellular immune response. J Immunol. 2001;167(5):2666-70

155. Cooper ZA, Ghosh A, Gupta A, Maity T, Benjamin IJ, Vogel SN, Hasday JD, Singh IS. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS-stimulated macrophages by differentially modifying NF-{kappa}B recruitment to cytokine gene promoters. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298(1):C171-81

156. Hasday JD, Thompson C, Singh IS. Fever, immunity, and molecular adaptations. Compr Physiol. 2014;4(1):109-48

157. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. Nat Rev Immunol. 2015;15(6):335-49

158. Tang D, Wang C, Gao Y, Pu J, Long J, Xu W. Deep hypothermia-enhanced autophagy protects PC12 cells against oxygen glucose deprivation via a mitochondrial pathway. Neurosci Lett. 2016;632:79-85

159. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med. 2004;32(3):858-73

160. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, International Surviving Sepsis Campaign Guidelines C, American Association of Critical-Care N, American College of Chest P, American College of Emergency P, Canadian Critical Care S, European Society of Clinical M, Infectious D, European Society of Intensive Care M, European Respiratory S, International Sepsis F, Japanese Association for Acute M, Japanese Society of Intensive Care M, Society of Critical Care M, Society of Hospital M, Surgical Infection S, World Federation of Societies of I, Critical Care M. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med. 2008;36(1):296-327

161. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. Intensive Care Med.39(2):165-228

162. Barnason S, Williams J, Proehl J, Brim C, Crowley M, Leviner S, Lindauer C, Naccarato M, Storer A. Emergency nursing resource: non-invasive temperature measurement in the emergency department. J Emerg Nurs.38(6):523-30

163. Glynn SA, O'Sullivan D, Eustace AJ, Clynes M, O'Donovan N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. BMC Cancer. 2008;8:9

164. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969;244(22):6049-55

165. Condino-Neto A, Muscara MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MM, De Nucci G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. Br J Clin Pharmacol. 1993;35(5):485-90

166. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8

167. Drewry AM, Fuller BM, Skrupky LP, Hotchkiss RS. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia. Crit Care Med.43(6):1165-9

168. Kushimoto S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Ogura H, Fujishima S, Araki T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi S, Suzuki K, Suzuki Y, Takeyama N, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. Crit Care.17(6):R271

169. Ensinger H, Weichel T, Lindner KH, Grunert A, Ahnefeld FW. Effects of norepinephrine, epinephrine, and dopamine infusions on oxygen consumption in volunteers. Crit Care Med. 1993;21(10):1502-8

170. Edwards JE, Meseguer F, Faura CC, Moore RA, McQuay HJ. Single-dose dipyrone for acute postoperative pain. Cochrane Database Syst Rev. 2001(3):CD003227

171. Zylber-Katz E, Granit L, Stessman J, Levy M. Effect of age on the pharmacokinetics of dipyrone. Eur J Clin Pharmacol. 1989;36(5):513-6

172. Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007;292(1):R37-46

173. Gordon CJ. Thermal biology of the laboratory rat. Physiol Behav. 1990;47(5):963-91

174. Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. J Appl Physiol (1985). 2002;92(6):2667-79

175. Metzger DW, Sun K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. J Immunol. 2013;191(5):2047-52

176. Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. PLoS One. 2006;1:e1

177. Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Gonzalez A. Depletion of Neutrophils Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice Infected with Paracoccidioides brasiliensis. PLoS One. 2016;11(9):e0163985

178. Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. Crit Care. 2003;7(4):291-307

179. Feterowski C, Weighardt H, Emmanuilidis K, Hartung T, Holzmann B. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. Eur J Immunol. 2001;31(4):1268-77

180. Crosara-Alberto DP, Darini AL, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. Br J Pharmacol. 2002;136(5):645-58

181. Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. Crit Care Med. 2006;34(2):461-70

182. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. Nat Rev Immunol. 2015;15(12):731-44

183. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. Nat Immunol. 2015;16(1):36-44

184. Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology (Oxford). 2008;47(5):584-90

185. Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. Front Biosci. 2005;10:2193-216

186. Corrigan JJ, Fonseca MT, Flatow EA, Lewis K, Steiner AA. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. J Physiol.592(17):3901-16

187. Abreu PR, Almeida MC, Bernardo RM, Bernardo LC, Brito LC, Garcia EA, Fonseca AS, Bernardo-Filho M. Guava extract (Psidium guajava) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. J Zhejiang Univ Sci B. 2006;7(6):429-35

188. Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(5):R1244-52

189. Zolfaghari PS, Pinto BB, Dyson A, Singer M. The metabolic phenotype of rodent sepsis: cause for concern? Intensive Care Med Exp.1(1):25

190. Langham GE, Maheshwari A, Contrera K, You J, Mascha E, Sessler DI. Noninvasive temperature monitoring in postanesthesia care units. Anesthesiology. 2009;111(1):90-6

191. Lefrant JY, Muller L, de La Coussaye JE, Benbabaali M, Lebris C, Zeitoun N, Mari C, Saissi G, Ripart J, Eledjam JJ. Temperature measurement in intensive care patients: comparison of urinary bladder, oesophageal, rectal, axillary, and inguinal methods versus pulmonary artery core method. Intensive Care Med. 2003;29(3):414-8

192. Moran JL, Peter JV, Solomon PJ, Grealy B, Smith T, Ashforth W, Wake M, Peake SL, Peisach AR. Tympanic temperature measurements: are they reliable in the critically ill? A clinical study of measures of agreement. Crit Care Med. 2007;35(1):155-64

193. Stephan F, Ghiglione S, Decailliot F, Yakhou L, Duvaldestin P, Legrand P. Effect of excessive environmental heat on core temperature in critically ill patients. An observational study during the 2003 European heat wave. Br J Anaesth. 2005;94(1):39-45

194. MacKenzie MA. Pathophysiology and clinical implications of human poikilothermia. Ann N Y Acad Sci. 1997;813:738-40

195. McAllen RM, Tanaka M, Ootsuka Y, McKinley MJ. Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. Eur J Appl Physiol.109(1):27-33

196. Iriki M, Hashimoto M, Saigusa T. Threshold dissociation of thermoregulatory effector responses in febrile rabbits. Can J Physiol Pharmacol. 1987;65(6):1304-11