UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

ANDRÉ LUIZ THOMAZ DE SOUZA

Efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos em ratos

RIBEIRÃO PRETO
2019

ANDRÉ LUIZ THOMAZ DE SOUZA

Efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos em ratos

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de Pesquisa: Doenças Infecciosas: problemática e estratégias de enfrentamento.

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

RIBEIRÃO PRETO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

SOUZA, ANDRÉ LUIZ THOMAZ DE
Efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos em ratos. Ribeirão Preto, 2019.
81 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.
Orientadora: Evelin Capellari Cárnio

1. Sepse. 2. Temperatura corporal. 3.Pressão arterial. 4.Lactato. 5.Óxido nítrico.

SOUZA, ANDRÉ LUIZ THOMAZ DE

Efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos em ratos.

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovado em _____ / _____ / _____.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____

DEDICATÓRIA

Á minha mãe **Lúcia**, pelo apoio incondicional e pelos ensinamentos em todas as fases da vida. Tudo o que sou hoje tem um pedaço de você.

Á minha família, em especial os meus tios, **Luciana**, **José Carlos** e **Lucilei**, e primos, **Thaiany**, **Jamile** e **Antônio**, obrigado por acompanharem minha trajetória de vida, e por estarem comigo em cada momento vivido até aqui.

Á **Juliane Novaes**, pela dedicação, companheirismo e por possibilitar a geração de uma nova vida que está por vir, a qual carinhosamente terá o nome de **Maria Eduarda**.

AGRADECIMENTOS

Á ***Deus***, por conhecer cada detalhe da minha vida e proporcionar condições para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Obrigado por colocar tantas pessoas boas no meu caminho e permitir com que eu possa seguir em frente.

Á todos os amigos e colegas que proporcionaram momentos inesquecíveis no decorrer da vida e que de alguma forma contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ás minhas orientadoras acadêmicas que me mostraram o caminho para chegar até aqui, obrigado pelo acolhimento, pelo incentivo e pela oportunidade em aprender com vocês, Dra. Evelise Aline Soares, Dra. Denise Holanda Iunes e Dra. Evelin Capellari Cárnio.

Á Dra. Evelin Capellari Cárnio pelo exemplo de pessoa, pesquisadora e principalmente pelo Ser Humano que é. Obrigado por tornar essa trajetória leve e repleta de aprendizados.

Ao Marcelo Eduardo Batalhão, pelo apoio em todas as etapas deste trabalho, pelas horas de conversa e boas risadas.

Aos meus colegas de laboratório Angelita, Felipe, Patrícia e Aline pelos momentos de descontração e aprendizado.

Aos meus amigos Juliano Caliari e Bárbara Sousa, obrigado por cada momento vivido até aqui.

Ás Faculdades Integradas do Vale do Ribeira, em especial a Deise Aparecida Carminatte por acreditar no meu trabalho e proporcionar condições para a realização desta etapa.

Aos meus amigos de Registro-SP Patrícia Santiago e José Simas por estarem presentes nos momentos tristes e felizes.

A todos os meus amigos de Alfenas-MG, que mesmo distantes, se fazem presentes na memória e nas oportunidades de encontro.

Á Escola de Enfermagem de Ribeirão pela oportunidade de crescimento profissional e possibilidade em cursar o doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

Pense: Pode ser Sepse?

Instituto Latino Americano de Sepse

RESUMO

SOUZA, A. L. T. **Efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos em ratos**. 2019. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Na endotoxemia e na sepse alterações nos sinais vitais e em biomarcadores estão presentes e sinalizam o grau de comprometimento fisiológico. Embora a interpretação sobre as concentrações do óxido nítrico (NO) e do lactato plasmáticos na pressão arterial sejam bem estabelecidas na literatura, elucidações sobre suas participações na temperatura corporal ainda são incipientes. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da endotoxemia na temperatura corporal, pressão arterial média e correlacionar esses valores com os biomarcadores NO e lactato plasmáticos. Foram utilizados 40 ratos divididos igualmente em cinco grupos experimentais. A indução da endotoxemia foi realizada por meio da administração endovenosa de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, respectivamente 0,5 mg/Kg, 1,5 mg/Kg, 3,0 mg/Kg e 10 mg/Kg. O grupo controle recebeu 0,5 mL de solução salina. O experimento teve duração de seis horas. Na 0h (medida basal) foram coletadas amostras de sangue (0,4 mL) para dosagem do NO e lactato plasmáticos e obtidos os valores de temperatura corporal e pressão arterial média, na sequência os modelos experimentais foram induzidos de acordo com o grupo e a dose de LPS. O mesmo procedimento para as análises das variáveis investigadas foi realizado na 2ª, na 4ª e na 6ª hora. A temperatura corporal e a pressão arterial foram registradas em intervalos de 15 minutos. Nossos resultados mostram que os animais que receberam LPS nas doses de até 3,0 mg/Kg apresentaram aumento significativo na temperatura corporal em relação ao grupo com 10 mg/Kg, que apresentou diminuição nesses valores. O aumento nas concentrações de NO e lactato plasmáticos nos grupos com LPS foram significativamente superiores ao grupo que recebeu solução salina e estiveram correlacionados com o aumento na temperatura corporal. O grupo com 10 mg/Kg também apresentou correlação inversa com os níveis da pressão arterial média. Em conclusão, as variações na temperatura corporal observadas neste estudo mostram efeito dose-dependente de LPS, além disso, em sua maioria os parâmetros vitais analisados estiveram correlacionados com o aumento nas concentrações dos biomarcadores NO e lactato plasmáticos.

Palavras-chave: Sepse. Temperatura corporal. Pressão arterial. Lactato. Óxido nítrico.

ABSTRACT

SOUZA, A. L. T. **Effect of endotoxemia on body temperature, mean arterial pressure, and nitrate and lactate plasma concentrations in rats**. 2019. 81f. Thesis (Doctoral) – College of Nursing at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

During endotoxemia and sepsis changes in vital signs and biomarkers are present, which may indicate a degree of physiological impairment. Although the interpretation on plasma nitric oxide (NO) and plasma lactate concentrations in blood pressure are well established in the literature, elucidations about their participation in body temperature are still incipient. Thus, this study aimed to evaluate the effect of endotoxemia on body temperature, mean arterial pressure correlating these changes with NO and plasma lactate concentrations. In our study we used 40 rats equally divided in five experimental groups. Induction of endotoxemia was performed by intravenous administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS), being 0.5 mg / kg, 1.5 mg / kg, 3.0 mg / kg and 10 mg / kg and control group received 0.5 mL of saline. The experiment lasted six hours. At baseline, blood samples (0.4 mL) were collected for plasma NO and plasma lactate measurements and body temperature and mean arterial blood pressure values were obtained. The same procedure was performed for the analysis of all the variables at 2 nd, 4 th and 6 th hours. Body temperature and blood pressure were recorded at each 15 minute intervals. Our results show that animals receiving LPS at doses up to 3.0 mg / kg showed a significant increase in body temperature in relation to the 10 mg / kg group, which presented a decrease in these values. The increase in NO concentrations and plasma lactate in the LPS groups were significantly higher than the saline group and correlated with the increase in body temperature. The 10 mg / kg group also showed a negative correlation with mean arterial pressure levels. In conclusion, the changes in body temperature observed in this study show a dose-dependent effect of LPS, in addition, most of the vital parameters analysed were correlated with the increase in the concentrations of NO biomarkers and plasma lactate.

Keywords: Sepsis. Body temperature. Arterial pressure. Lactic acid. Nitric oxide.

RESUMEN

SOUZA, A. L. T. **Efecto de la endotoxemia en la temperatura corporal, presión media arterial y concentración de nitrato y lactato plasmático en las ratas**. 2019. 81f. Tesis (Doctorado) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

En la endotoxemia y la sepsis alteraciones en las señales vitales y en biomarcadores están presentes y señaliza el grado del comprometimiento fisiológico. Aunque la interpretación sobre las alteraciones del óxido nítrico (NO) y del lactato plasmático en la presión arterial sean bien establecidas en la literatura, elucidaciones sobre sus participaciones en la temperatura corporal todavía son incipientes. Así, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la endotoxemia en la temperatura corporal, presión arterial media y correlacionar esos valores con los biomarcadores NO y lactato plasmáticos. Fueron utilizados 40 ratas divididas en cinco grupos experimentales. La inducción de la endotoxemia fue realizada por medio de la administración endovenosa del lipopolisacárido (LPS) bacteriana, respectivamente 0,5 mg / Kg, 1,5 mg / Kg, 3,0 mg / Kg y 10 mg / Kg. El grupo control recibió 0,5 ml de solución salina. El experimento tuvo una duración de seis horas. En la 0h (medida basal) se tomaron muestras de sangre (0,4 mL) para dosificación del NO y lactato plasmáticos y obtenidos los valores de temperatura corporal y presión arterial media, en consecuencia los modelos experimentales fueron inducidos de acuerdo con el grupo y la dosis de LPS. El mismo procedimiento para los análisis de las variables investigadas fue realizado en la 2ª, en la 4ª y en la 6ª hora. La temperatura corporal y la presión arterial se registraron en intervalos de 15 minutos. Nuestros resultados muestran que los animales que recibieron LPS en las dosis de hasta 3,0 mg / Kg presentaron un aumento significativo en la temperatura corporal en relación al grupo con 10 mg / Kg, que presentó disminución en esos valores. El aumento en las concentraciones de NO y lactato plasmático en los grupos con LPS fueron significativamente superiores al grupo que recibió salina y estuvieron correlacionados con el aumento en la temperatura corporal. El grupo con 10 mg / Kg también presentó correlación inversa con los niveles de la presión arterial media. En conclusión, las variaciones en la temperatura corporal observadas en este estudio muestran efecto dosis-dependiente de LPS, además, en su mayoría los parámetros vitales analizados estuvieron correlacionados con el aumento en las concentraciones de los biomarcadores NO y lactato plasmáticos.

Palabras clave: Sepsis. Temperatura corporal. Presión arterial. Ácido Láctico. Óxido nítrico.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal..... 46

Gráfico 2 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal..... 47

Gráfico 3 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS na concentração de nitrato plasmático..... 48

Gráfico 4 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre as concentrações de nitrato plasmático..... 49

Gráfico 5 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS nas concentrações de lactato plasmático..... 50

Gráfico 6 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre as concentrações de lactato plasmático..... 51

Gráfico 7 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS na pressão arterial média..... 52

Gráfico 8 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre a pressão arterial média..... 53

Gráfico 9 - Correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a temperatura corporal..... 54

Gráfico 10 - Correlação entre as concentrações de lactato plasmático e a temperatura corporal..... 55

Gráfico 11 - Correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a pressão arterial média..... 56

Gráfico 12 - Correlação entre as concentrações de lactato plasmático e a pressão arterial média..... 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 13

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17

2.1 SEPSE, SEPSE GRAVE E CHOQUE SÉPTICO..... 18

2.2 TEMPERATURA CORPORAL..... 24

2.3 PRESSÃO ARTERIAL..... 26

2.4 ÓXIDO NÍTRICO..... 28

2.5 LACTATO PLASMÁTICO..... 29

2.6 MODELOS DE ENDOTOXEMIA..... 31

3 OBJETIVOS..... 34

3.1 OBJETIVO GERAL..... 35

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 35

4 MATERIAL E MÉTODO..... 36

4.1 ANIMAIS..... 37

4.2 DROGAS..... 37

4.3 CIRURGIAS..... 38

4.3.1 Inserção do dispositivo para mensuração da temperatura corporal..... 38

4.3.2 Canulação da veia jugular externa direita..... 38

4.3.3 Canulação da artéria femoral direita..... 39

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... 40

4.4.1 Modelos experimentais..... 41

4.5 COLETA DE DADOS..... 41

4.5.1 Temperatura corporal..... 41

4.5.2 Determinação da pressão arterial média..... 42

4.5.3 Coleta de sangue..... 42

4.5.3.1 Determinação do lactato plasmático..... 43

4.5.3.1 Dosagem do nitrato plasmático..... 43

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 44

5 RESULTADOS..... 45

5.1 VARIAÇÕES NA TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS..... 46

5.2 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO PLASMÁTICO NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS..... 48

5.3 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO PLASMÁTICO NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS..... 50

5.4 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS..... 52

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO PLASMÁTICO E A TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS..... 54

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTATO PLASMÁTICO E A TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS..... 55

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO PLASMÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS..... 56

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTATO PLASMÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS..... 57

6 DISCUSSÃO..... 58

7 CONCLUSÃO..... 67

REFERÊNCIAS..... 69

ANEXO..... 80

1 INTRODUÇÃO

Apesar do amplo número de estudos disponíveis na literatura, ainda são encontradas limitações sobre a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que resultam nas elevadas taxas de morbimortalidades relacionadas à sepse nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (ZHANG; CHEN; NI, 2015). O percurso clínico da doença pode levar a piora do prognóstico quando ocorre a evolução para o choque séptico (DELLINGER et al., 2013). Essa mudança representa um índice de mortalidade que varia de 10% a 40% (SERPA-NETO et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

Dentre as manifestações clínicas apresentadas na sepse e no choque séptico, a temperatura corporal é um importante sinal cardinal sobre as condições de saúde, cujo controle rigoroso da termorregulação pode aumentar as chances de sobrevida dos pacientes (LÉON et al., 2015). No entanto, os mecanismos que resultam nas alterações da temperatura corporal durante a doença, principalmente relacionados à hipotermia, permanecem incompreendidos (LÉON et al., 2015; ZHANG; CHEN; NI, 2015).

A presença de distúrbios na termorregulação é uma característica comum nos quadros clínicos da sepse e do choque séptico, em que, nas fases iniciais pode ser observado o aumento da temperatura e nos estágios mais avançados quadros de hipotermia, os quais são mais frequentes e estão associados ao mau prognóstico clínico e ao aumento nos índices de mortalidade (KUSHIMOTO et al., 2014; SAIA; ANSELMO-FRANCI; CÁRNIO, 2008; PERES-BOTA et al., 2004).

Alterações nas concentrações de óxido nítrico (NO) e lactato plasmáticos também são frequentes na sepse, no entanto, somente o lactato é usado como variável preditora de gravidade na doença. A hiperlactatemia está associada à diminuição na oferta de oxigênio e ao comprometimento orgânico (KIYATKIN; BAKKER, 2017), sendo também classificado como um preditivo na alta taxa de mortalidade (MIKKELSEN et al., 2009).

Durante a resposta inflamatória desencadeada pelo organismo no combate a sepse, os neutrófilos e macrófagos tornam-se as principais células de defesa primária contra a doença (SANTOS et al., 2012), sendo que, na resposta imune o organismo amplifica e direciona as atividades dessas células por meio da produção de quimiocinas, de citocinas e de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o NO (HOEBE; JANSSEN; BEUTLER, 2004).

O NO é um mensageiro molecular que desempenha diversas ações (HOLLENBERG; CINEL, 2009), o que inclui tanto a participação em mecanismos que envolvem a homeostasia, quanto em situações que levam ao dano celular (PARRATT, 1998). Desde sua descoberta na década de 1980, seus efeitos têm sido amplamente investigados em estudos experimentais e

clínicos, sendo o controle do tônus vascular a variável mais pesquisada (TEIXEIRA et al., 2014).

Os efeitos do NO no sistema cardiovascular são discutidos na literatura e levam a interpretação de que o aumento em suas concentrações resulta na menor resistência vascular periférica (SHIC et al., 2017; VINCENT; DE BACKER, 2013), sendo este comportamento identificado durante o choque séptico (GAMCRLIDZE et al., 2015; PARRILLO, 1993), logo são observadas manifestações clínicas como diminuição dos níveis pressóricos (DELLINGER et al., 2013), menor oferta de oxigênio e hiperlactatemia (CHO; CHOI, 2014).

Um fator importante durante o combate do organismo a sepse refere-se à própria produção do NO, devido a sua capacidade microbicida, entretanto nos quadros de choque séptico, sua produção excessiva tem sido associada à toxicidade ao organismo (SANTOS et al., 2012) e à elevação nas taxas de mortalidade (HUET et al., 2007). Além do tônus vascular, a participação do NO no controle da temperatura corporal também representa uma importante variável pesquisada em estudos envolvendo quadros de sepse e choque séptico.

Diferente dos efeitos do NO como molécula vasodilatadora no controle da pressão arterial relatado na literatura, seus efeitos na temperatura corporal caminham para comportamentos distintos, quer seja em situações onde são administrados doadores ou inibidores da sua produção (SCAMMELL; ELMQUIST; SAPER, 1996; GOURINE, 1995). A relação entre a produção de NO e a temperatura corporal durante a sepse e o choque séptico é complexa, além disso, sua influência sobre a termorregulação não é clara e necessita de respostas (HAKIM et al., 2014).

No que se refere ao lactato, assim como o NO, a relação entre as concentrações deste marcador fisiopatológico e a temperatura corporal na sepse é pouco discutida na literatura. Sendo aceito que a hiperlactatemia é comum na sepse e no choque séptico e está associada ao mau prognóstico (RYOO; KIM, 2018). No contexto clínico o lactato serve como parâmetro global para avaliar estados de hipoperfusão tecidual em pacientes críticos (JANSEN et al., 2010), já que, o aumento em suas concentrações durante o choque ocorre em função da menor oferta de oxigênio, resultando na hipóxia tecidual e na produção de glicose por via anaeróbia (RYOO; KIM, 2018).

Durante a atuação da enfermagem a temperatura corporal representa um sinal que possibilita a tomada de decisões com foco em preservar as condições fisiológicas do paciente. Além disso, o monitoramento de outros sinais e sintomas permite à equipe de enfermagem a identificação precoce de alterações orgânicas (KELLY et al., 2014). Neste cenário, o gerenciamento na assistência em saúde realizado pelo enfermeiro exige conhecimento sobre

as modificações morfofuncionais evidenciadas pelo organismo. Para tanto, a educação permanente em conjunto com a pesquisa, refletem na eficácia da assistência clínica oferecida por este profissional. Por se tratar de uma doença de evolução clínica rápida e potencialmente prejudicial, é necessário que o enfermeiro saiba reconhecer e intervir precocemente nos casos suspeitos e/ou confirmados de sepse e choque séptico (SOUZA et al., 2018).

Neste contexto, o "Processo de Enfermagem" é uma importante estratégia para direcionar os cuidados realizados pela equipe de enfermagem. Sua realização ocorre por meio de cinco etapas: coleta de dados, diagnósticos de enfermagem, planejamento, implementação e avaliação. O monitoramento dos sinais vitais em conjuntos com a avaliação de biomarcadores representa um importante indicador na coleta de dados que pode refletir na identificação precoce da sepse e/ou do choque séptico.

Por se tratar de uma doença onerosa ao sistema de saúde e que ainda apresenta elevadas taxas de morbimortalidade, torna-se fundamental a contribuição da enfermagem em estudos que reflitam na qualidade de sua assistência em saúde. Ressalta-se, que estudos clínicos e experimentais têm sido conduzidos pela enfermagem, com o objetivo de investigar o processo saúde-doença em diversas condições patológicas (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014). No entanto, a participação desse profissional no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à temática "sepse / modelo experimental" ainda é discreta.

O uso de modelos animais submetidos à sepse e ao choque séptico experimental é necessário na busca pela compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos durante a doença, pois permite a reprodução de muitas situações que seriam difíceis de serem alcançadas no contexto clínico. Consequentemente, tais evidências fornecem subsídios para o desenvolvimento de estudos clínicos e a eficácia nos cuidados direcionados ao paciente séptico. Aliado a isso, é fundamental que o enfermeiro seja capaz de buscar e investigar a melhor evidência disponível para a sua atuação no contexto profissional e acadêmico.

Portanto, é importante que no âmbito acadêmico e clínico os enfermeiros desenvolvam estudos nas ciências básicas com foco em investigar as variáveis que estejam atreladas as manifestações clínicas da sepse e do choque séptico em humanos. Logo, frente à problemática que envolve os estágios da sepse e suas manifestações clínicas, este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros vitais como a temperatura corporal e a pressão arterial e sua relação com biomarcadores endógenos diretamente relacionados à fisiopatologia da sepse, como o lactato e o NO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SEPSE, SEPSE GRAVE E CHOQUE SÉPTICO

Durante a assistência oferecida a pacientes críticos, o enfermeiro detém um papel importante na vigilância da evolução clínica de quem recebe sua assistência em saúde (KUTNEY-LEE; LAKE; AIKEN, 2009), cuja presença contínua deste profissional, principalmente nas UTIs reflete na identificação precoce de sinais e sintomas que estejam associados à desregulação fisiológica (KELLY et al., 2014).

O percurso clínico da sepse, da sepse grave e do choque séptico envolve uma complexidade de mecanismos fisiopatológicos resultantes da interação entre o hospedeiro e os microrganismos invasores (ou seus componentes), levando a exacerbação na resposta inflamatória, também denominada como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (SANTOS et al., 2012; ULLOA; TRACEY, 2005) e consequentemente a manifestação de uma variedade de sinais e sintomas. Dentre os microrganismos que desencadeiam a sepse, as bactérias são consideradas como as principais causadoras da doença, em especial a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas spp* (HODGIN; MOSS, 2008).

A SIRS está presente em diversas condições clínicas, por exemplo, em queimaduras, no pós-operatório, na pancreatite e é diagnosticada por pelo menos duas da seguintes manifestações: temperatura corporal > 38,0 ou < 36,0 °C; frequência respiratória > 20 mov/resp/min ou $PaCO_2$ < 32 mmHg; frequência cardíaca > 90 bat/min; contagem de leucócitos > 12.000 células/mm^3 ou < 4.000 células células/mm^3 ou, ainda, a presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos (MILITÃO; CARROLA; PRESA, 2013; KNOBEL 2006).

No que diz respeito ao diagnóstico e ao tratamento para a sepse e os seus diferentes estágios, é fundamental que sejam realizados precocemente, por possibilitarem um aumento nas chances de sobrevida (RIVERS et al., 2001). Entretanto, a ausência de especificidade nos sinais e sintomas torna o diagnóstico um desafio, impondo barreiras para intervenções imediatas (MCREE et al., 2014; KWEON et al., 2014; BONE et al., 1992).

Assim, o rápido diagnóstico para sepse e seus estágios fica dependente da perspicácia clínica do médico em realizar uma anamnese e um exame físico detalhado, da capacidade do enfermeiro em investigar e reconhecer os sinais e sintomas da doença, bem como, da realização de exames laboratoriais. No entanto, o diagnóstico por meio dos resultados da hemocultura é demorado, além disso, o sangue apresenta susceptibilidade aumentada às contaminações (KWEON et al., 2014).

Neste cenário, estudos epidemiológicos sobre a sepse e seus estágios são importantes para melhorar o conhecimento em relação à incidência da doença em diferentes países, e

consequentemente aprimorar os cuidados oferecidos aos pacientes e minimizar as chances de óbito (LAGU et al., 2012). No Brasil a partir de um panorama realizado pela Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) identificou-se que 17% dos leitos nas UTIs são preenchidos por pacientes diagnosticados com sepse grave ou choque séptico (BIROLINI; ATALLAH, 2013).

Entretanto, dados sobre a incidência da sepse são difíceis de serem estimados em decorrência das subnotificações envolvendo a doença (SANTOS; ALVES; STABILE, 2012; AHRENS; TUGGLE, 2004). Por exemplo, se um paciente morre por choque séptico devido a uma pneumonia, ele pode ter sua causa mortis registrada como pneumonia e não por falência múltipla de órgãos causada pelo choque séptico (AHRENS; TUGGLE, 2004).

Para que ocorra eficácia na redução das taxas de mortalidade é essencial que os profissionais da saúde saibam identificar os sinais e sintomas da sepse e implementar precocemente medidas terapêuticas (DELLINGER et al., 2013). Tais intervenções minimizam as chances de evolução da doença para os estágios de sepse grave e choque séptico (RIVERS et al., 2001).

Em um estudo recente que avaliou o conhecimento do enfermeiro sobre o choque séptico fundamentado no consenso de 2012 (SOUZA et al., 2018) os autores identificaram fragilidades nesse conhecimento, chama atenção no estudo a percepção sobre a temperatura corporal, onde grande parte dos enfermeiros reconhecem a febre como critério para o choque séptico, ou seja, é provável que em muitas situações ocorra demora na identificação da doença, visto que a hipotermia é mais presente nessas condições.

O déficit no conhecimento sobre a sepse também foi identificado em estudantes de graduação do curso de enfermagem, no qual os autores apontam que provavelmente o ensino sobre o tema durante o curso tem sido deficitário (SANTOS; ALVES; STABILE, 2012). É importante que o enfermeiro tenha conhecimento sobre os aspectos fisiopatológicos da sepse em seus diferentes estágios, já que, na maior parte do tempo é o primeiro a perceber alterações funcionais no paciente.

Na fisiopatologia da doença, a SIRS e a infecção representam importantes fatores para determinação da evolução clínica da sepse (FAN et al., 2015). Quando ocorre uma infecção as respostas pró e anti-inflamatórias dão início a atividade do sistema imunológico (FAN et al., 2015), em que inicialmente o reconhecimento dos patógenos invasores e/ou substâncias estranhas é realizado pelas células do sistema imune inato, principalmente macrófagos e células dendríticas (LUAN et al., 2014). A partir daí, estas células podem definir qual será a tendência da atividade inflamatória, o que leva a produção de citocinas pró-

inflamatórias (interleucina – (IL-) 1β, fator de necrose tumoral – (TNF-) α, e interferon – (IFN-) γ) ou citocinas antinflamatórias (interleucina – (IL-) 10, fator de transformação de crescimento – (TGF-) β (NOVOTNY et al., 2012; GAUTAM et al., 2012).

Durante a resposta ao patógeno é que ocorreram as manifestações clínicas da sepse, incialmente com acentuada inflamação seguida por disfunção orgânica no decorrer da doença (ANGUS; VANDER POLL, 2013). As alterações fisiopatológicas evidenciadas pelos sinais vitais e por marcadores biológicos é que permitem avaliar o prognóstico do paciente e estabelecer medidas terapêuticas durante a sepse e seus estágios (DELLINGER et al., 2013). Muitos biomarcadores são sugeridos como úteis para o diagnóstico precoce da sepse, dentre estes, o lactato (CHO; CHOI, 2014). Logo, a queda nos níveis pressóricos, a termorregulação ineficaz e a hiperlactatemia associada com outras manifestações da doença são parâmetros importantes durante a avaliação clínica.

No decorrer das últimas décadas os critérios de diagnóstico para a sepse sofreram modificações com foco em melhorar o rastreamento da doença. Desde a primeira definição publicada em 1992 em uma conferência realizada pelo *American College of Chest Physicians* em conjunto com a *Critical Care Medicine* (BONE et al., 1992), ocorreram quatro conferências para redefinir o consenso sobre a doença, em 2001 (LEVY et al., 2003), em 2008 (DELLINGER et al., 2008), em 2012 (DELLINGER et al., 2013) e em 2016 (SINGER et al., 2016).

Conforme consenso de 2012 (DELLINGER et al., 2013), a sepse é definida como a presença (provável ou documentada) de infecção associada a manifestações clínicas de infecção. A sepse grave é definida como a sepse atrelada à disfunção de órgãos ou hipoperfusão tecidual. O choque séptico é definido a partir da falência do sistema circulatório, evidenciado por meio da hipotensão refratária persistente apesar da administração de fluídos intravasculares e do uso de fármacos vasopressores e do aumento de lactato. O Quadro 1 apresenta as variáveis clínicas investigadas para estabelecer o diagnóstico de sepse, sepse grave e choque séptico (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Quadro 1 - Critérios para o diagnóstico de sepse, sepse grave e choque séptico. (ANGUS; VANDER POLL, 2013).

Sepse (infecção documentada ou suspeita com ≥ 1 das seguintes manifestações clínicas)†:

VARIÁVEIS GERAIS

- Febre (temperatura corporal > 38,3°C)
- Hipotermia (temperatura corporal < 36°C)
- Elevação da frequência cardíaca (> 90 bpm ou 2 DP acima do limite normal para idade)
- Taquipneia
- Alterações no nível de consciência / estado mental
- Edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20 mL/Kg do peso corporal ao longo de 24 horas)
- Hiperglicemia na ausência de diabetes (glicose plasmática > 120 mg/dL [6,7 mmol/L])

VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS

- Leucocitose (quantidade de células brancas, > 12,000/mm^3)
- Leucopenia (quantidade de células brancas, < 4000 /mm^3)
- Contagem de células brancas normais (> 10% nas formas imaturas)
- Elevação plasmática de proteína C – reativa (> 2 DP acima do limite superior do intervalo normal)
- Elevação plasmática de procalcitonina (> 2 DP acima do limite superior do intervalo normal)

VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS

- Hipotensão arterial (pressão sistólica, < 90 mmHg; pressão arterial média, < 70 mmHg; ou diminuição da pressão sistólica > 40 mm Hg em adultos ou > 2 DP abaixo do limite normal para a idade
- Saturação de oxigênio no sangue venoso misto elevada (>70%)‡
- Índice cardíaco elevado (> 3,5 litros/min/m^2 de área da superfície corporal)§

VARIÁVEIS DE DISFUNÇÃO ORGÂNICA

- Hipoxemia arterial (razão entre a pressão parcial de oxigênio arterial para fração de oxigênio inspirada, < 300)
- Oligúria aguda (produção de urina, < 0,5 mL/Kg/hora ou 45 mL/hora durante pelo menos 2 horas
- Aumento no nível de creatinina (0,5 mg/dL [>44 μmol/L])
- Anormalidades na coagulação (razão normalizada internacional, > 1,5; ou ativado tempo parcial em tromboplastina, > 60 segundos)
- Íleo paralítico (ausência de ruídos em áreas intestinais)
- Trombocitopenia (contagem de plaquetas, < 100,000/mm^3)
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total no plasma, > 4 mg/dL)

VARIÁVEIS DE PERFUSÃO TISSULAR

- Hiperlactatemia (lactato, > 1 mmol/litro)
- Diminuição do enchimento capilar ou manchas

Sepse grave (sepse com disfunção orgânica)

Choque séptico (sepse com hipotensão "refratária mediante a administração de fluídos" ou presença de hiperlactatemia) ¶

Nota: *Dados adaptados de Levy et al. (2003). †Em crianças, os critérios de diagnóstico para a sepse são sinais e sintomas de inflamação mais infecção com hipertermia ou hipotermia (temperatura retal >38,5°C ou < 35,0°C, respectivamente), taquicardia (pode estar ausente com hipotermia) e pelo menos uma das seguintes indicações de alteração da função orgânica: alteração do estado mental, hipoxemia, aumento no nível do lactato sérico, ou pulsos de delimitação. ‡Um nível de saturação venosa mista de oxigênio de mais de 70% é normal em recém-nascidos e crianças (faixa pediátrica, 75 a 80%). §Um índice cardíaco variando de 3,5 a 5,5 litros por minute por metro quadrado é normal em crianças. ¶A hipotensão refratária é definida como hipotensão persistente ou requerendo vasopressores após administração de bolos de fluído intravenoso.

Embora tenham ocorrido pequenas mudanças nos critérios para o diagnóstico de sepse, sepse grave e choque séptico entre 1992 e 2012, a mudança mais significativa se deu em 2016. Fundamentado no consenso de 2016 (SINGER et al., 2016), sepse passa a ser definida como uma disfunção orgânica, ameaçadora à vida causada por resposta desregulada do organismo à infecção, sendo a disfunção orgânica identificada pelo aumento de ≥ 2 pontos no

Sequential Organ Failure Assesment (SOFA), Tabela 1. Valores elevados no score SOFA estão associados com o aumento na probabilidade de morte (VINCENT et al., 1998).

Tabela 1 - *Sequential Organ Failure Assesment* (SOFA).

Sequential Organ Failure Assesment Escore[a]					
Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO_2 / FIO_2, mm Hg (kPa)	≥ 400 (53.3)	< 400 (53.3)	< 300 (40)	< 200 (26.7) com suporte respiratório	< 100 (13.3) com suporte respiratório
Coagualação					
Plaquetas 10^3 / mm^3	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado					
Bilirrubina mg / dL (µmol / L)	< 1.2 (20)	1.2 – 1.9 (20-23)	2.0 – 5.9 (33-101)	6.0 – 11.9 (102-204)	> 12.0 (204)
Cardiovascular					
Pressão Arterial	PAM ≥ 70 mm Hg	PAM < 70 mm Hg	Dopamina < 5 ou Dobutamina (qualquer dose)[b]	Dopamina 5.1 – 15 ou Epinefrina ≤ 0.1 ou Norepinefrina ≤ 0.1[b]	Dopamina > 15 ou Epinefrina > 0.1 ou Norepinefrina > 0.1[b]
Sistema Nervoso Central					
Escala de Coma de Glasgow[c]	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Renal					
Creatinina mg / dL (µmol / L)	< 1.2 (110)	1.2 – 1.9 (110-170)	2.0 – 3.4 (171 – 299)	3.5 – 4.9 (300 – 440)	> 5.0 (440)
Débito urinário mL / d				< 500	< 200

Nota: PaO_2, pressão parcial de oxigênio; FIO_2, fração inspirada de oxigênio; PAM, pressão arterial média. [b]As dose de catecolaminas são dadas como µg/kg/min durante pelo menos uma hora. [c]Na Escala de Coma de Glasgow os escores variam de 3 a 15 pontos, onde a maior pontuação indica melhor função neurológica.
Fonte: [a]Singer et al. (2016) *apud* Vincent et al. (1996).

Por entender que a sepse é suficientemente grave, o critério de diagnóstico para sepse grave deixa de ser utilizado (SINGER et al., 2016). Já o choque séptico pelas novas definições é caracterizado como um subconjunto de anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, identificado clinicamente pela presença de hipotensão persistente, requerendo o uso de fármacos vasopressores para manter a pressão arterial média acima de 65 mmHg e pela presença de lactato sérico maior que 2 mmol/L (>18 mg/dL), na ausência de hipovolemia (SINGER et al., 2016).

Com o uso das novas definições para a sepse e para o choque séptico pretende-se facilitar o rastreamento clínico da doença e permitir com que o tratamento seja iniciado rapidamente (SINGER et al., 2016). Embora a temperatura corporal não esteja incluída como um indicador clínico a ser avaliado como critério de diagnóstico para a doença, conforme

definições de 2016 (SINGER et al., 2016), ela representa um importante sinal sobre as condições de saúde da pessoa doente e possibilita a equipe de saúde a tomada de decisão clínica com foco em prevenir complicações e a evolução para o óbito (LÉON et al., 2015).

Ressalta-se que a implementação das novas definições tem ocorrido de forma distinta, sendo que, em alguns países permanece o consenso de 2012. O Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) emitiu nota informando a opção pelo alinhamento da triagem dos pacientes de acordo com a *Surving Sepsis Campaign* – SSC (RHODES et al., 2015). O ILAS retrata que embora a SIRS não seja utilizada para nova definição de sepse, ela continua sendo fundamental no rastreamento de pacientes com suspeita de sepse (ILAS, 2018). Dessa forma, o ILAS não modificou os critérios utilizados na definição de disfunção orgânica, permanecendo a hiperlactatemia como um deles (ILAS, 2018). Os critérios de definição do choque séptico também permanecem inalterados. Além disso, a variação do escore SOFA também não foi adotada, sendo mantidos os mesmos critérios utilizados na SSC (ILAS, 2018). A Figura 1 mostra os conceitos que passam a ser adotados pelo ILAS.

Figura 1 - Conceitos adotados pelo Instituto Latino Americano de Sepse na implementação de protocolos gerenciados de sepse.

Classificação antiga	**Classificação atual (a ser usada)**	**Característica**
Sepse	**Infecção sem disfunção**	Infecção suspeita ou confirmada, sem disfunção orgânica, de forma independente da presença de sinais de SRIS.
Sepse grave	**Sepse**	Infecção suspeita ou confirmada associada a disfunção orgânica, de forma independente da presença de sinais de SRIS.
Choque séptico	**Choque séptico**	Sepse que evoluiu com hipotensão não corrigida com reposição volêmica (PAM ≤65 mmHg), de forma independente de alterações de lactato.

Fonte - https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/protocolo-de-tratamento.pdf

2.2 TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal, também denominada como temperatura do "centro do corpo" quase sempre permanece constante, exceto na presença de doença febril. Em contrapartida a temperatura da pele, aumenta ou diminui conforme a temperatura ambiente, sendo um importante mecanismo relacionado à capacidade da pessoa perder calor para o ambiente (HALL, 2011). A temperatura corporal é resultado da seguinte equação: Produção de calor – Perda de calor = Temperatura corporal.

A temperatura do corpo é regulada quase que totalmente por meio de *feedbacks* neurais, que operam através de centros regulatórios da temperatura, localizados no hipotálamo. Para tanto, são necessários receptores capazes de detectar quando a temperatura está elevada ou baixa (HALL, 2011). Quando os centros hipotalâmicos de temperatura identificam que a temperatura está fora do ponto de ajuste (muito alta ou muito baixa), são instituídos mecanismos para diminuir ou aumentar a temperatura, especificamente (HALL, 2011):

- ***Mecanismos para diminuição da temperatura:*** quando o corpo está muito quente três mecanismos podem ser ativados para reduzir a temperatura corpórea, a) vasodilatação dos vasos sanguíneos cutâneos, levando ao aumento na transferência de calor para a pele; b) sudorese, que pode resultar na remoção de 10 vezes na intensidade basal da produção de calor pelo corpo; c) diminuição da produção de calor, resultando na inibição de calafrios e na inibição da termogênese química.

- ***Mecanismos de elevação da temperatura:*** quando o corpo está muito frio ocorrem mecanismos opostos a situações de elevação na temperatura, a) vasoconstrição da pele por todo o corpo, resultando na diminuição na transferência de calor para a pele; b) piloereção, permitindo com que ocorra maior retenção de ar próximo a pele e consequentemente ocorra diminuição na transferência de calor para o ambiente; c) aumento na termogênese (produção de calor), que ocorre por meio da promoção de calafrios, excitação simpática e secreção de tiroxina, resultando na produção de calor pelos sistemas metabólicos.

A regulação da temperatura corporal apresenta mudanças significativas em pacientes críticos. Na sepse e no choque séptico frequentemente o organismo sinaliza quadros de febre

ou de hipotermia, que estão associados à gravidade da doença (LÉON et al., 2015). A febre é uma reposta comum à infecção e ao processo inflamatório, sendo amplamente aceito que ela pode facilitar a sobrevida do hospedeiro na fase inicial da sepse, por meio de estímulo na resposta imunológica (KUGLER et al., 1998).

Assim como a febre, a hipotermia em determinadas condições pode ser benéfica ao organismo, acredita-se que a diminuição da temperatura corporal seja uma resposta adaptativa com o objetivo de diminuir o gasto energético e consequentemente conservar energia (ROMANOVSKY et al., 1996). Contudo, a regulação da temperatura corpórea depende da gravidade da doença, das condições do hospedeiro e da temperatura do ambiente (ROMANOVSKY et al., 1996). Sendo amplamente aceito que a hipotermia é uma manifestação clínica relacionada à evolução do quadro de sepse para o choque séptico (KUSHIMOTO et al., 2014).

Existem controversas em relação ao controle da temperatura corporal em pacientes críticos, principalmente quando se investiga se hipotermia representa uma resposta adaptativa ou uma falência orgânica. O controle da febre em pacientes com sepse por meio do resfriamento resulta em diminuição nas taxas de mortalidade associadas à doença (SCHORTGEN et al., 2012). Além disso, a hipotermia induzida pode preservar as funções teciduais em situações que levam à isquemia cerebral (STERZ et al., 2003). No entanto, quando se trata do choque séptico, a presença de hipotermia pode representar um sinal de agravamento clínico, e não um fator protetor, o que resulta no aumento nas chances de óbito (KUSHIMOTO et al., 2014; PERES-BOTA et al., 2004).

Uma das principais situações clínicas que levam anormalidades na regulação da temperatura corporal é a febre, que significa temperatura corporal acima dos níveis normais de variação (KUSHIMOTO et al., 2014). A febre pode ocorrer em consequência de lesões cerebrais ou por substâncias tóxicas que afetem o centro regulador da temperatura no hipotálamo, que incluem: doenças infecciosas, principalmente bacterianas; tumores cerebrais e até mesmo condições ambientais (ZHANG; CHEN; NI, 2015; HALL, 2011).

O reajuste do centro de regulação hipotalâmico da temperatura em situações de doença febril pode ser desencadeado por toxinas que são denominadas como *pirogênios*, dentre elas, se destaca principalmente o LPS oriundo da parede celular de bactérias Gram-negativas (HALL, 2011). Quando o ponto de ajuste da temperatura corporal no hipotálamo se eleva acima dos níveis normais, são ativados os mecanismos para elevação da temperatura, o que inclui a conservação e o aumento na produção de calor (HALL, 2011).

Durante a inflamação desencadeada pela invasão de patógenos, bactérias ou seus produtos de degradação presentes nos tecidos e/ou na corrente sanguínea são fagocitadas pelos leucócitos do sangue, pelos macrófagos teciduais e por linfócitos. Após a digestão realizada por essas células, ocorre liberação de citocinas, que são moléculas peptídicas de sinalização que participam da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Uma das citocinas mais importantes na causa da febre é a *interleucina-1 (IL-1)* (HALL, 2011; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Ao chegar no hipotálamo, a *IL-1* imediatamente ativa os mecanismos de febre (HALL, 2011; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Experimentos com modelos animais sugerem que a *IL-1* desencadeia a febre por meio da indução da formação de prostaglandinas, em especial a prostaglandina E2 (PGE2) (HALL, 2011). No decorrer da febre, a PGE2 sintetizada dentro da barreira hematoencefálica sustenta a febre (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). Desse modo, o uso de medicamentos que bloqueiam a formação de prostaglandinas representa a principal via de tratamento antipirético.

O controle da temperatura corporal em quadros de sepse e choque séptico é amplamente investigado em modelos animais (SAIA et al., 2013; ROMANOVSKY et al., 2005). Sendo observado que o mesmo agente inflamatório pode induzir tanto a febre quanto a hipotermia (ROMANOVSKY et al., 2005). No entanto, cabe destacar que os mediadores que participam da hipotermia não estão bem compreendidos (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018), conforme mencionado anteriormente, sugere-se que o NO possa participar desse controle.

2.3 PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial representa um sinal de grande importância no contexto clínico (ALESSI et al., 2014). A precisão em sua mensuração é vital, pois é uma medida elementar relacionada ao quadro hemodinâmico e a perfusão tissular (THOMAS; DUFFIN-JONES, 2015). O controle da pressão arterial é influenciado por três parâmetros cardiovasculares: frequência cardíaca, volume sistólico e resistência vascular periférica (ACKERMANN, 2004; HALL, 2011).

A frequência cardíaca é determinada pelos potenciais de ação gerados no marcapasso cardíaco (nó sinusal), podendo sofrer efeito cronotrópico positivo ou negativo, respectivamente, influenciados pela atividade simpática e parassimpática. Já o volume sistólico é determinado pela pré-carga (pressão exercida na parede dos ventrículos ao final da

diástole), pela pós-carga (resistência encontrada pelos ventrículos durante a sístole), pela frequência cardíaca e pela contratilidade (associada ao inotropismo cardíaco). Por fim, a resistência vascular periférica, que é determinada pelo diâmetro das arteríolas, ou seja, o músculo liso ao seu redor pode sofrer efeito vasoconstritor ou vasodilatador (ACKERMANN, 2004; HALL, 2011).

Dentre os parâmetros pressóricos utilizados para estabelecer diagnóstico nos estágios da sepse, são utilizados a frequência cardíaca, a pressão sistólica (PAS), a pressão diastólica (PAD) e/ou a pressão arterial média (PAM) (ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Este último pode ser calculado pela equação: PAM = PAD + 1/3 PRESSÃO DE PULSO (HALL, 2011; ACKERMANN, 2004). Durante os estágios da sepse o funcionamento do sistema vascular é fortemente influenciado pelas concentrações de NO, sendo considerado um potente vasodilatador (TITHERADGE, 1999).

Tanto em estudos com modelos animais quanto em estudos clínicos as altas concentrações de NO observadas principalmente no choque séptico estiveram associadas à diminuição na pressão arterial (GAMCRLIDZE et al., 2015; PARRILLO, 1993) e a menor chance de sobrevida. Por esse motivo, um dos objetivos no tratamento da doença é manter os níveis pressóricos, por meio do uso de medicamentos vasoconstrição e/ou reposição volêmica (DELLINGER et al., 2013).

Os efeitos fisiopatológicos do NO durante o choque séptico estão atrelados à alta capacidade de gerar vasoplegia e consequentemente diminuir a resistência vascular periférica (GAMCRLIDZE et al., 2015). Com a queda da pressão arterial ocorre uma cascata de eventos desfavoráveis ao paciente, o que envolve: menor oferta de oxigênio, hipoxemia e uso de via anaeróbia para produção de trifosfato de adenosina - ATP (FOUCHER; TUBBEN, 2018).

Assim como na avaliação de outros sinais vitais e marcadores biológicos, o enfermeiro detém um papel essencial na avaliação cardiovascular. Neste caso, a complexidade que envolve a sepse nos seus diferentes estágios, requer o monitoramento da pressão arterial em conjunto com a avaliação da temperatura corporal, pois são elementos fundamentais durante o acompanhamento clínico do paciente (GIULIANO, 2006). Além disso, são avaliações simples e que não demandam grandes recursos, contudo, isso não dispensa a necessidade de uma adequada interpretação dos dados coletados.

2.4 ÓXIDO NÍTRICO

A descoberta sobre o papel do NO como fator relaxante derivado do endotélio na década de 1980 por Furchgott e Zawadzki, deu origem a investigação sobre os seus efeitos como “sinalizador molecular” em diversos sistemas biológicos (STEINER; BRANCO, 2001; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), o que inclui sua participação no controle da pressão sanguínea, na neurotransmissão e na defesa antimicrobiana (HOLLENBERG; CINEL, 2009). Dessa forma, muitas doenças podem resultar em alterações nas concentrações de NO, como por exemplo, doenças inflamatórias e infecciosas, cardiovasculares e cerebrais (GRANIK; RYABOVA; GRIGORIEV, 1997).

O NO é um radical livre, gasoso, incolor à temperatura ambiente, de baixa solubilidade em água, com meia vida ≤ 6 segundos, sendo extremante solúvel em solventes apolares (QUEIROZ; BATISTA, 1999). Ao contrário de outras moléculas sinalizadoras, por não possuir um receptor específico, o NO é capaz de difundir-se livremente por meio das membranas celulares e agir onde e quando se fizer necessário (CHOI, 1993).

A formação do NO ocorre endogenamente a partir do catabolismo da L-arginina, resultando na formação de L-citrulina e NO por meio de reação enzimática da enzima NO sintase (NOS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Existem três isoformas de NOS identificadas, entre elas: a endotelial (eNOS) que está envolvida no controle vasomotor; a neural (nNOS) que exerce papel na neurotransmissão; e o NO induzível (iNOS) que participa da resposta imune e pode ser induzida por estímulos externos, como por exemplo, o LPS e as citocinas pró-inflamatórias (NATHAN; XIE, 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Durante a resposta inflamatória, a grande quantidade de NO produzida pela iNOS com a participação de macrófagos e neutrófilos pode ser benéfica ao organismo devido ao seu efeito antimicrobiano (SANTOS et al., 2012). Contudo, sua produção excessiva pode resultar em efeitos desfavoráveis e frequentemente está vinculada a fisiopatologia de várias doenças em humanos, como por exemplo, o choque séptico (PAUTZ et al., 2010).

Na sepse e/ou no choque séptico a síntese de NO se intensifica, principalmente a partir da ativação da isoforma iNOS (SANTOS et al., 2012). Os componentes presentes nas bactérias, por exemplo, o LPS, ativam vias intracelulares que induzem a expressão de iNOS, sendo possível detectar sua presença em poucas horas nos macrófagos e nos tecidos animais (LIN et al., 2006). Devido a sua ação microbicida, quando animais são tratados com inibidores de iNOS, ocorre agravamento no processo infeccioso, o que leva ao aumento na chances de óbito (ZHOU et al., 2002).

Em contrapartida, a produção excessiva de NO a partir da iNOS resultante de células não-inflamatórias, está envolvida na origem de várias complicações orgânicas, em especial no sistema cardiovascular (AFULUKWE et al., 2000). Além disso, estudos com diferentes delineamentos sugerem que essa produção excessiva também esteja relacionada com distúrbios na termorregulação (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014; SAIA; ANSELMO-FRANCI; CÁRNIO, 2008; SOSZYNSKI; CHELMINIAK, 2007). Em condições homeostáticas, acredita-se que o NO desencadeia seu papel na temperatura por meio da vasodilatação na pele (TAYLOR; BISHOP, 1993).

Estudos com modelo animal submetido à endotoxemia (quadro análogo a sepse) revelam que o NO atua como mediador pirético da febre, cuja administração farmacológica de inibidores da sua síntese resultaram na diminuição da temperatura corporal durante a resposta febril (SCAMMELL; ELMQUIST; SAPER, 1996). Em contrapartida, a redução de estados febris também foi observada quando administrado doadores de NO no ventrículo cerebral lateral de coelhos, revelando estímulo na atividade antipirética no sistema nervoso central (GOURINE, 1995).

A investigação relacionada ao binômio NO e temperatura corporal, também revelou correlação negativa entre os níveis plasmáticos de nitrato (molécula gerada a partir do NO) e os valores da temperatura corporal em pessoas com choque séptico, evidenciando que quanto menor os valores da temperatura, maiores são as concentrações de NO (PEREIRA, BATALHÃO, CÁRNIO, 2014). Estudos envolvendo a mensuração da produção de NO durante a sepse em humanos são raros, porém, em geral evidenciam um pequeno aumento nessa produção (HAKIM et al., 2014).

Embora a literatura retrate esses contextos sobre a participação do NO na temperatura, ainda são escassos estudos relacionados ao tema, o que impõe limitações na busca por compreender os mecanismos fisiopatológicos sobre a influência que o NO exerce na temperatura corporal nos quadros clínicos de sepse e choque séptico.

2.5. LACTATO PLASMÁTICO

Diariamente pode ocorrer o excesso na produção de ácido láctico em concentrações de aproximadamente 20 mmol / Kg / dia, sendo levado para a corrente sanguínea e metabolizado especificamente no fígado e nos rins, essa produção em excesso é frequentemente encontrada nos seguintes tecidos: pele, glóbulos vermelhos, tecido cerebral, músculos e trato gastrointestinal (FOUCHER; TUBBEN, 2018). A intensa atividade dos

músculos esqueléticos também pode contribuir com a maior produção do ácido láctico durante o dia. Porém, em condições patológicas, onde a oferta de oxigênio é restrita, a produção aumentada de lactato pode ocorrer em outros locais (SUETRONG; WALLEY, 2016).

Além de ser produzido em processos fisiológicos normais, o ácido láctico também é encontrado em estados patológicos, nestas situações em concentrações mais elevadas. (FOUCHER; TUBBEN, 2018). O efeito de concentrações elevadas do lactato é acompanhado por alterações hemodinâmicas significativas podendo levar ao óbito (KIYATKIN; BAKKER, 2017). Neste contexto, o lactato pode ser avaliado tanto como um biomarcador de risco quanto como alvo terapêutico, já que, a demora no tempo de normalização nos seus valores indica maior complicação clínica (FOUCHER; TUBBEN, 2018; DELLINGER et al., 2013).

A produção de energia celular (glicólise) pode acontecer através de duas vias: aeróbia e anaeróbia, sinteticamente descritas a seguir (FOUCHER; TUBBEN, 2018). Em situações fisiológicas (aeróbia) a transformação de glucose em piruvato leva a produção inicial de duas moléculas de ATP, na sequência o piruvato entra no ciclo de Krebs após ter sido convertido em acetil-CoA e por meio de uma série de reações bioquímicas leva ao metabolismo oxidativo com produção final de 38 ATP. Entretanto, em situações onde ocorra a diminuição na oferta de oxigênio (anaeróbia), o piruvato é transformado em lactato e leva ao metabolismo glicolítico com produção final de 2 ATP.

A produção de lactato durante a sepse e/ou choque séptico acontece por meio da via glicolítica anaeróbia (RYOO; KIM, 2014). A *Surviving Sepsis Campaign* aponta que a hiperlactatemia (> 1,0 mmol/L) é um marcador de hipoperfusão tecidual (DELLINGER et al., 2013). Neste contexto, o tratamento imediato na hiperlactatemia é direcionado em melhorar a oferta de oxigênio aos tecidos. Isto pode ser alcançado por meio da melhora no fluxo sanguíneo que consequentemente resulta em maior perfusão na microcirculação (BAKKER, 2017; DELLINGER et al., 2013).

O papel do lactato como biomarcador também foi confirmado em estudo envolvendo ratos submetidos à sepse através de ligadura e punção cecal (CLP). Neste experimento os animais que apresentam concentrações de lactato ≥ 1,64 mmol / L quando comparado as concentrações <1,64 mmol / L, não sobreviveram após 5 dias do CLP, além disso, esses animais apresentaram valores superiores nas taxas de procalcitonina sérica, alanina aminotransaminase, nitrogênio uréico no sangue e piora na PaO_2 / FiO_2, microcirulação e pressão arterial média (ZHAI et al., 2018). Os autores destacam que até o momento na medicina veteriária não existem critérios bem estabelecidos sobre a sepse em modelos

animais e por esse motivo adotaram como limiares de avaliação os parâmetros observados em humanos, descritos no estudo de Angus; Van Der Poll (2013).

Em outro modelo experimental conduzido por meio da administração de diferentes doses de LPS, por veia intraperitoneal, sendo incluidos 42 ratos, distribuidos respectivamente em quatro grupos: controle (n=6), 3 mg/Kg (n=12), 5 mg/Kg (n=12) e 10 mg/Kg (n=12), os pesquisadores encontram aumento expressivo nas concentrações de lactato (principalmente nos dois grupos com maior dose) após seis horas da administração do LPS com uma tendência a diminuição próximo das 24 horas de experimento. Além disso, esses animais desenvolvorem trombocitopenia, lesão hepática e renal. O estudo ainda aponta que com doses mais elevadas de LPS ocorre intensificação na hipoxemia e que quanto maior o tempo de exposição ao LPS mais grave se tornam as lesões (FODOR et al., 2015).

A dosagem do lactato é uma medida simples, mais rápida e detém um custo muito inferior em relação ao uso de outros biomarcadores (ZHAI et al., 2018). Conforme demonstrado anteriormente, a hiperlactatemia está relacionada ao aumento no espectro de gravidade (BAKKER, 2017; DELLINGER et al., 2013), logo seu uso como marcador em modelos experimentais é de grande importância, pois remete a uma prática clínica comum durante o tratamento da sepse.

2.6 MODELOS DE ENDOTOXEMIA

Dado a complexidade que envolve o desenvolvimento de estudos clínicos em pacientes com sepse e choque séptico, estudos com modelos animais têm sido desenvolvidos com o objetivo de tentar reproduzir as condições clínicas da doença e consequentemente investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos e testar o uso de agentes farmacológicos (SAIA et al., 2013; BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

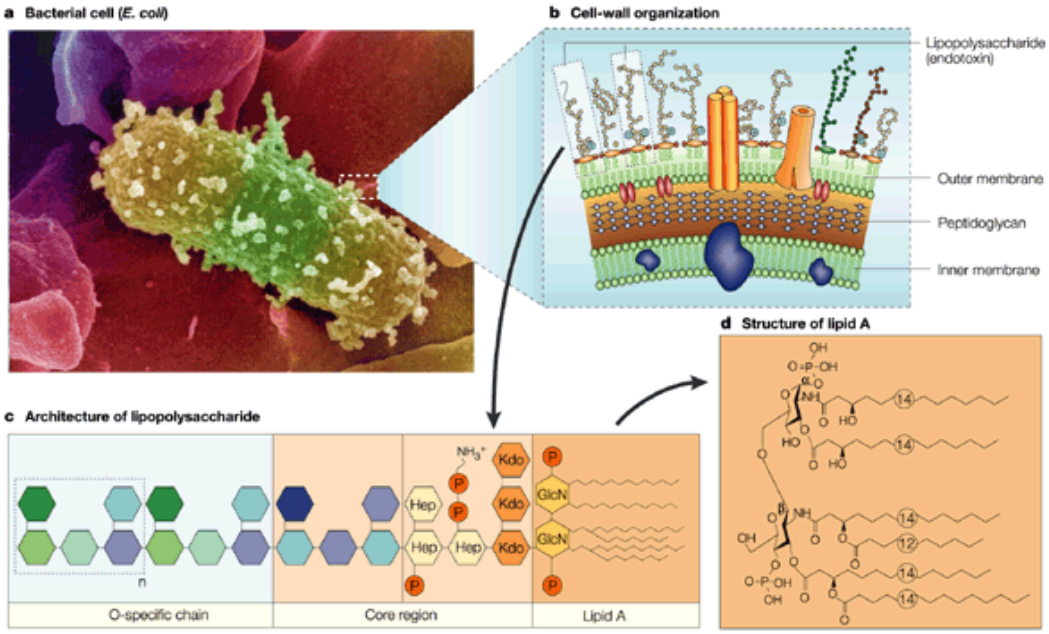
Existem vários modelos animais para tentar replicar a sepse e o choque séptico, com destaque para: modelo de infusão intravascular de endotoxina ou bactérias vivas, modelo de peritonite bacteriana, modelo de ligação e perfuração cecal e modelo de infecção de tecidos moles (GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004; FINK; HEARD, 1990).

Dentre estes modelos, o de administração de endotoxina com o uso do LPS é uma excelente alternativa por ser de fácil utilização e induzir resposta similar a sepse em humanos (FINK; HEARD, 1990). Contudo, devido à resistência ao LPS que pode ser apresentada por muitos animais de laboratório, a administração de diferentes concentrações de LPS são

necessárias para se obter condições análogas a sepse e ao choque séptico (FINK; HEARD, 1990).

As manifestações clínicas apresentadas na sepse e no choque séptico são desencadeadas pela à presença do LPS, considerado uma endotoxina, que é liberada após a degradação da parede celular das bactérias durante a doença (SAIA et al., 2013; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). O LPS é um complexo glicolipídico, encontrado na membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas (SPERANDEO; DEHO; POLISSI, 2009). Sua estrutura é formada por três porções: A) Lipídeo A, porção hidrofóbica da molécula que possibilita o seu ancoramento à membrana externa; B) Corpo de Oligossacarídeos; C) Antígeno O, porção que representa uma cadeia de polissacarídeos (Figura 2).

Figura 2 - Bactéria Gram-negativa. (A) Imagem microscopia eletrônica de uma *Escherichia coli*, com representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina) na parede bacteriana, (B) e sua estrutura química (C). (D) Estrutura do lipídeo A, componente imunogênico do LPS.



Fonte - Saia (2012) *apud* Beutler; Rietschel (2003).

A liberação de LPS pelas bactérias não ocorre de modo intencional, e sim em situações específicas, como por exemplo, na multiplicação ou na divisão celular (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Grandes concentrações de LPS são liberadas principalmente em situações que levam a morte das bactérias, a mais comum envolve o uso de antibióticos durante o tratamento para quadros clínicos de infecção (CAROFF, KARIBIAN, 2003).

Em experimentos com ratos envolvendo o modelo de infusão intravascular de endotoxina, identificou-se que a administração endovenosa de altas doses de LPS, 40 mg/Kg

(BRACKETT et al., 1985) e 10 mg/Kg (LAW; FERGUSON, 1988), resultaram no hipodinamismo circulatório, ao passo que, o uso de doses menores desencadeou hiperdinamismo circulatório (JOHNSTON; HAMPTON; FRY, 1989). Doses de LPS de *E. coli* (1,5 mg/Kg) administradas por via intravascular, também foram suficientes para promover queda progressiva da pressão arterial média e aumento na frequência cardíaca em modelo animal (SAIA et al., 2013).

A administração de LPS em ratos também é capaz de induzir a febre por meio da produção de citocinas e da síntese de PGE2, que por sua vez interferem no controle neural da temperatura corporal central no hipotálamo (SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012; NAKAMURA; MORRISON, 2011). Nos casos mais graves de indução de modelos de sepse, pode-se observar uma redução na temperatura corporal em vez de febre (AKARSU; MAMUK, 2007; ROMANOVSKY; SZÉKELY, 1998).

Embora existam muitos modelos para reproduzir a sepse e o choque séptico em animais, nem um deles é perfeito. Assim, a importância dos experimentos com animais está na busca por caracterizar situações clínicas que ocorrem na doença em humanos, como por exemplo: a diminuição na resistência vascular; o aumento na taxa metabólica; a falência de órgãos, dentre outras (FINK; HEARD, 1990). Este contexto representa um desafio à comunidade científica na busca por estratégias que fortaleçam o desenvolvimento de modelos de sepse e choque séptico reproduzível e consequentemente com indicadores aplicáveis em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal e pressão arterial média em ratos submetidos à endotoxemia, e correlacionar esses valores com marcadores que participam do quadro fisiopatológico da sepse, como o lactato e o nitrato plasmáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar variações na temperatura corporal;
b) Avaliar variações na pressão arterial média;
c) Avaliar variações nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos;
d) Avaliar a correlação entre a temperatura corporal e as concentrações de nitrato plasmático;
e) Avaliar a correlação entre a temperatura corporal e as concentrações lactato plasmático;
f) Avaliar a correlação entre a pressão arterial média e as concentrações do nitrato plasmático;
g) Avaliar a correlação entre a pressão arterial média e as concentrações do lactato plasmático;
h) Caracterizar um modelo experimental de investigação envolvendo os efeitos de diferentes doses de LPS sobre os sinais vitais e marcadores fisiológicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus novergicus*) da linhagem *Wistar*, com idade de 8 a 12 semanas e massa corporal média entre 200-300g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - USP, campus de Ribeirão Preto, SP. Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção do Laboratório de Fisiologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - EERP-USP, em estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), com temperatura controlada em 25±2°C e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, sendo permitido o acesso livre a água e a dieta sólida comercial balanceada (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil).

Inicialmente, os animais foram alocados em caixas plásticas conjuntas (18 cm de altura x 41 cm de comprimento x 33 cm de largura), quatro animais por caixa, e no dia anterior ao início das cirurgias foram transferidos para caixas individuais, permanecendo nestas até a eutanásia. Durante o estudo, para evitar variações circadianas, todos os experimentos foram iniciados entre 8:00 e 10:00 horas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil, protocolo n° 15.737.22.0 (ANEXO) e conduzido em conformidade com os princípios éticos para pesquisa com animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 DROGAS

Neste estudo foram utilizadas as seguintes drogas nas etapas experimentais - anestésico: cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health), cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®, Agribrands Brasil Ltda.); modelo de endotoxemia: lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* Sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA); analgésico: flunixinameglumina (Bayer®); antibióticos: benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico, Zoetis Fort Dodge®); anticoagulante: heparina sódica (Sigma-Aldrich®).

4.3 CIRURGIAS

4.3.1 Inserção do dispositivo para mensuração da temperatura corporal

Para mensurar a temperatura corporal, seis dias antes ao início da coleta de dados, na sala de cirurgia do laboratório de Fisiologia da EERP-USP, foi inserida na cavidade peritoneal dos animais uma cápsula de *datalogger* (SubCue, Calgary, AB, Canadá). Essa cápsula permitiu a coleta e o armazenamento de dados sobre os valores da temperatura corporal no decorrer o experimento.

Sob anestesia geral induzida com solução anestésica de cloridrato de xilazina 2% e clodridrato de ketamina 10% respectivamente a 2 mg/mL e a 10 mg/mL, sendo administrada dose única por via intraperitoneal (IP) de 0,10 mL para cada 100 g de peso animal, foi realizada uma incisão longitudinal na parede abdominal que permitiu inserção da cápsula *datalogger*. Na sequência o local da incisão cirúrgica foi suturado em blocos com pontos simples com fios reabsorvíveis. Ao término, os animais receberam profilaxia com benzilpenicilina (120,000 UI) e estreptomicina (50 mg) e, analgesia com flunixinameglumina (2,5 mg / Kg) por via intramuscular (IM) em dose única.

Os animais permaneceram em recuperação por um período cinco dias. Após este período, com a cápsula de *datalogger* implementada, 24 horas antes da cirurgia para canulação da veia jugular externa direita e da artéria femoral direita, os animais foram alojados em caixas individuais.

4.3.2 Canulação da veia jugular externa direita

Sob anestesia geral com solução anestésica de cloridrato de xilazina 2% e clodridrato de ketamina 10% diluídos respectivamente a 2 mg/mL e a 10 mg/mL, sendo administrada dose única por via IP de 0,10 mL para cada 100 g de peso animal, os animais tiveram a veia jugular externa direita canulada conforme técnica descrita por Harms e Ojeda (1974), adotada em métodos para a indução de endotoxemia.

Para canulação foram utilizadas cânulas de silástico (Sigma-Aldrich®), com comprimento total de 10 cm, confeccionadas com suporte para a fixação no músculo peitoral, permitindo que apenas 1,7 cm de cânula fossem introduzidos no lúmen vascular. Após a fixação do animal em mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia na região supra-clavicular

direita, na qual foi possível identificar o trajeto da veia jugular externa, por transparência, aplicando-se uma leve pressão acima da clavícula, de modo a obstruir o retorno venoso.

Identificado o trajeto, com auxílio de uma lâmina de bisturi foi realizada uma pequena incisão longitudinal de 1 cm na superfície ventral do pescoço para, na sequência, realizar-se a dissecção venosa. Com a veia exposta, após uma breve cessação do fluxo sanguíneo, foi realizada uma pequena incisão na parede da mesma para a introdução da cânula.

A cânula foi introduzida no lúmen vascular da veia cava em direção ao átrio direito com o auxílio de um instrumento cirúrgico especialmente confeccionado para tal finalidade. Após a verificação do retorno venoso, a cânula foi fixada no local com fios de sutura reabsorvíveis. Com o auxílio de um trocater, a extremidade distal da cânula foi exteriorizada na região interescapular por meio de um trajeto subcutâneo. Em seguida, para evitar obstrução com sangue coagulado, a cânula foi lavada com soro fisiológico heparinizado (125 UI / mL), dose 0,15 mL.

Antes de desconectar a extremidade distal da cânula da seringa contendo solução heparinizada, a mesma foi ocluída por meio de um laço, realizado com o auxílio de uma pinça cirúrgica. Essa manobra visou dificultar o refluxo de sangue dentro da cânula, em que na maioria dos animais ocorre apenas um discreto sangramento com o uso dessa técnica cirúrgica. No local da incisão cirúrgica, com fios de sutura reabsorvíveis, os planos foram suturados em blocos com pontos simples.

4.3.3 Canulação da artéria femoral direita

Para obter os registros da pressão arterial média, os animais tiveram a artéria femoral direita canulada. Este procedimento foi realizado imediatamente após a canulação da veia jugular externa direita. Ainda sob o efeito da anestesia geral com solução anestésica de cloridrato de xilazina 2% e clodridrato de ketamina 10% administrada antes da canulação da veia jugular externa direita, foi realizado uma incisão de 1 cm na região inguinal direita para exposição da artéria femoral.

Após a localização da artéria, a mesma foi cuidadosamente separada do nervo e da veia femoral. Na sequência, o fluxo sanguíneo foi momentaneamente interrompido por meio da oclusão das porções distais do vaso exposto. Uma pequena incisão na parede superior do vaso foi realizada, permitindo assim a introdução da cânula de polietileno (PE), constituída por um seguimento de PE-10 de 4,5 cm de comprimento, conectado a um cateter de PE-50 de 15 cm (Intramedic, BD, Sparks, MD, EUA) inserida na artéria femoral em direção a aorta

abdominal. Após posicionamento da cânula, a mesma foi fixada no local com fios de sutura reabsorvíveis.

A extremidade livre da cânula foi exteriorizada e fixada na área interescapular do animal por meio de um trajeto subcutâneo com o auxílio de um trocater. Após esse procedimento, a cânula foi lavada com soro fisiológico heparinizado (125 UI / mL) 0,15 mL para evitar obstrução da mesma com sangue coagulado. Ao final, a cânula foi ocluída no intuito de evitar refluxo sanguíneo, além disso, no local da incisão cirúrgica, com fios de sutura reabsorvíveis, os planos foram suturados em blocos com pontos simples.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos de canulação, foi administrado antibiótico profilático com benzilpenicilina (120,000 UI) e estreptomicina (50 mg) e, analgesia com flunixinameglumina (2,5 mg / Kg) por via IM, em dose única, e os animais foram alojados novamente na estante ventilada, com acesso livre à água e à ração, até o início da indução dos modelos de experimentais que ocorreram após 24 horas.

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental adotado neste estudo envolveu a administração de diferentes concentrações de LPS de *Escherichia coli* Sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich®), os registros da temperatura corporal (°C), dos valores pressóricos (mm/Hg) e a coleta de sangue (plasma) para análise do lactato (mmol/L) e do nitrato plasmáticos (µM), em intervalos pré-determinados. A Figura 3 mostra as etapas experimentais realizadas no estudo.

Figura 3 - Etapas do cronograma experimental.

Fonte: Do autor.

4.4.1 Modelos experimentais

Os modelos experimentais desenvolvidos no estudo envolveram:

a) ***Grupo Salina (n=8):*** recebeu por via endovenosa em veia jugular externa direita 0,5 mL de solução salina 0,9%;

b) ***Grupo* 0,5 mg/Kg de LPS *(n=8):*** recebeu por via endovenosa em veia jugular externa direita 0,5 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, diluído em um volume final de 0,5 mL de solução salina 0,9%;

c) ***Grupo* 1,5 mg/Kg de LPS *(n=8):*** recebeu por via endovenosa em veia jugular externa direita 1,5 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, diluído em um volume final de 0,5 mL de solução salina 0,9%;

d) ***Grupo* 3,0 mg/Kg de LPS *(n=8):*** recebeu por via endovenosa em veia jugular externa direita 3,0 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, diluído em um volume final de 0,5 mL de solução salina 0,9%;

e) ***Grupo* 10,0 mg/Kg de LPS *(n=8):*** recebeu por via endovenosa em veia jugular externa direita 10,0 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, diluído em um volume final de 0,5 mL de solução salina 0,9%.

4.5 COLETA DE DADOS

4.5.1 Temperatura corporal

Na mensuração da temperatura corporal as cápsulas de *dataloggers* foram previamente programadas para efetuar os registros em intervalos de 15 minutos por períodos de 24 horas. Desse modo, os valores basais foram determinados por meio dos registros obtidos na primeira hora antecedente a indução dos modelos experimentais. Após a indução dos modelos experimentais os registros da temperatura corporal foram obtidos até o término do experimento.

No local onde foram obtidos os registros da temperatura corporal, a temperatura ambiente foi controlada e mantida em 25±2°C com o auxílio de um ar condicionado SPRINGER®, modelo Split 9.000 BTUs que permite manter a temperatura de 17 – 30°C. Além disso, foi utilizado um termômetro de superfície INFRARED THERMOMETER®, modelo GM300, como forma de monitoramento. Incialmente os animais foram submetidos à

adaptação neste local para que ocorresse o equilíbrio térmico do corpo com a temperatura ambiente.

Dentro da sala foi permitida somente a presença de uma pessoa, sendo limitado o contato manual com os animais. Os animais foram distribuídos em locais pré-determinados e com a distância padronizada entre as caixas. Ao final do experimento (após seis horas) os animais foram sacrificados e a cápsula de *datalogger* retirada da cavidade peritoneal. Tanto a programação quanto a obtenção dos registros da temperatura corporal foram realizadas por meio do *software SubCue Analyzer*, sendo os valores corrigidos em tabela de conversão específica para cada *datalogger*. Foi considerada no estudo como valor de referência de cada animal, a temperatura basal coletada uma hora antes da indução dos modelos experimentais.

4.5.2 Determinação da pressão arterial média

Na manhã do dia do experimento, aproximadamente 24 horas após a canulação dos vasos sanguíneos e antecedendo o início da indução dos modelos experimentais os animais tiveram as cânulas lavadas com solução fisiológica heparinizada e na sequência a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão (TSD104A) e ao dispositivo de aquisição de dados (MP150 System, BIOPAC Systems Inc., Goleta, CA, EUA), acoplado a um microcomputador. Os animais foram mantidos em caixas individuais, não-anestesiados e com livre circulação.

Os registros da pressão arterial média (PAM) foram realizados a cada 15 minutos com início uma hora antes (dados basais) da indução dos modelos experimentais e permanecendo até a sexta hora de experimento. A conversão e análises dos dados realizadas por meio do *software AcqKnowledge*® v.3.9.0 (BIOPAC Systems Inc., EUA).

4.5.3 Coleta de sangue

Para avaliar as concentrações do lactato e do nitrato plasmáticos foram realizadas coletadas de sangue (0,4 mL) na 0h (dados basais), na 2h, na 4h e na 6h após a indução dos modelos experimentais. O sangue foi coletado por meio da cânula femoral, procedimento já descrito na literatura em estudo anterior a este (ZHAI et al., 2018). Ressalta-se, que parte do sangue coletado foi utilizada na dosagem do lactato plasmático. Todas as coletas de sangue foram realizadas com uma seringa de 1 mL (100 UI) e na sequência as amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno contendo heparina sódica (1500UI/tubo), sendo

imediatamente colocadas no gelo. A reposição volêmica referente às alíquotas de sangue retiradas dos animais nos horários descritos foi realizada na mesma proporção (0,4 mL) com solução fisiológica 0,9%.

4.5.3.1 Determinação do lactato plasmático

A determinação do lactato plasmático foi realizada antes da administração dos veículos na 0 hora (dados basais), na 2ª, na 4ª e na 6ª hora após a indução dos modelos experimentais por meio de alíquotas de sangue obtidas a partir da cânula femoral. Os valores foram determinados através do aparelho ACCUTREND PLUS (Roche®), com o uso de fitas reagentes específicas (Accusport BM – Lactate).

Imediatamente após a coleta do sangue da artéria femoral uma pequena alíquota era colocada sobre a fita reagente e as demais partes armazenadas para dosagem do nitrato plasmático. Com a fita preenchida por sangue, o aparelho permitia identificar uma faixa de valores de 0,8 a 22 mmol/L, com um tempo de medição de 60 segundos.

4.5.3.1 Dosagem do nitrato plasmático

A dosagem do nitrato plasmático (µM), usada como medida indireta da produção de NO, foi realizada a partir das alíquotas obtidas na 0 hora (dados basais), na 2ª, na 4ª e na 6ª hora após a indução dos modelos experimentais. O NO possui meia vida curta e é degradado rapidamente a nitrato e nitrito, por isso as dosagens de NO são feitas na forma de nitrato. O sangue coletado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e o plasma obtido foi armazenado a uma temperatura de -20°C até a realização as dosagens de nitrato.

Para a dosagem de nitrato, alíquotas de 50 µL das amostras de plasma foram desproteinizadas por incubação com etanol a 95%, mantido a uma temperatura de 4°C por 30 minutos, sendo na sequência centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Para medir o NO plasmático, foi utilizado à técnica de quimioluminescência NO / ozônio descrita por Hampl; Walters; Archer (1996), no qual foi utilizado o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyer 280 (GE Analytical Instrumentes Boulder, CO. USA).

Amostras de 5 µL desproteinizadas foram injetadas na câmara de reação do analisador, a qual contém um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCL a 95%) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. Por sucção na câmara de

quimioluminescência do analisador, o NO é absorvido e reage com o ozônio (O_3), resultando na formação de dióxido de nitrogênio (NO_2).

As reações entre o NO e o O_3 emitem fótons vermelhos, sendo esses fótons detectados e convertidos em sinais elétricos, em que as correntes de elétrons geradas por esses sinais elétricos são captadas e processadas por um transdutor analógico-digital acoplado a um microcomputador, que resulta em um gráfico de curvas sobre corrente elétrica, o qual corresponde às concentrações de nitrato na amostra.

Neste estudo, as concentrações de nitrato foram calculadas em comparação com uma curva padrão, utilizando-se de concentrações distintas (0; 7,5; 15; 30; 60; 120; 240 µmol) de nitrato de sódio, sendo os valores de nitrato definidos em micro mol por litro (µM).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realizar as análises estatísticas inicialmente os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro–Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal a Analise de Variância Unidirecional (One-Way ANOVA) foi usada para estimar diferenças entres os grupos experimentais, sendo também aplicado o pós-teste de Tukey para identificar essas diferenças. Em contrapartida, na ausência de distribuição normal foi utilizado o Teste Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn’s para calcular as diferenças entre os grupos. O valor médio da temperatura e da pressão arterial mensurado uma hora antes a administração das drogas nos grupos experimentais foi considerado como valor basal (valor que antecede a indução dos modelos experimentais), bem como os valores obtidos na 0 hora.

A evolução temporal dos valores de temperatura corporal e pressão arterial média foram analisadas considerando todos os registros obtidos no intervalo de 15 minutos durante o experimento. Para as análises dos índices: térmico, pressórico, de nitrato e lactato plasmáticos, a área sob a curva ocupada por animal foi determinada e na sequência foram realizadas as comparações intergrupos dos tempos, 0h, 2h, 4h, e 6h.

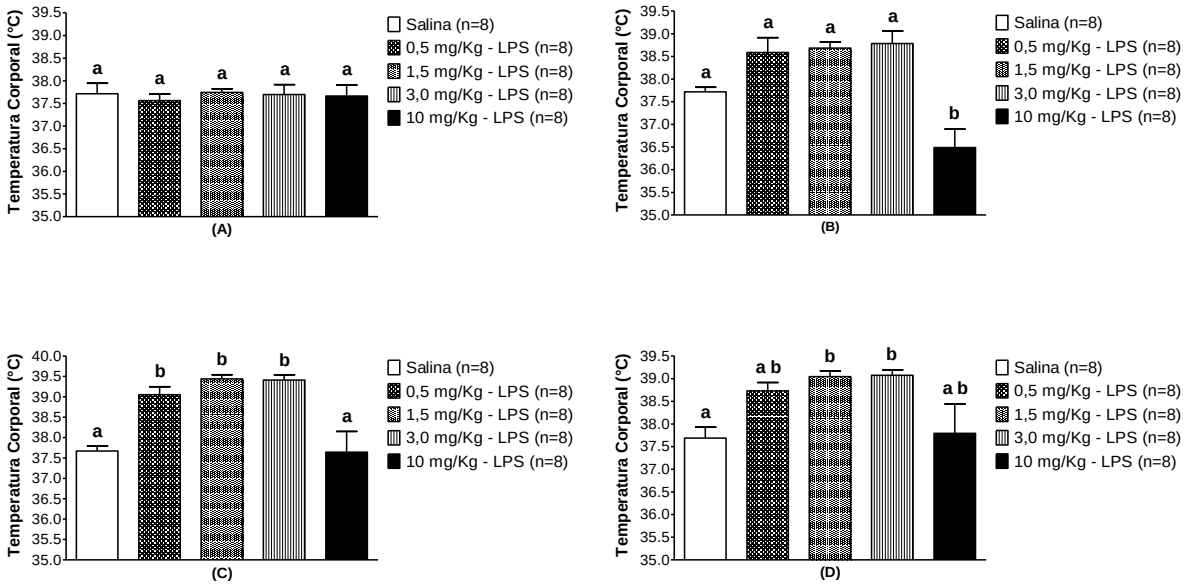
Para identificar possíveis associações entre as variáveis investigadas foram implementados testes de correlação conforme a normalidade da distribuição amostral, ou seja, foram utilizados o Teste de Correlação de Pearson e/ou o Teste de Correlação de Spearman. Em todas as análises o intervalo de confiança de 95% foi determinado. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM), sendo os valores considerados significativos quando $p<0,05$. Todas as análises e gráficos foram realizadas por meio do *Graph Pad Prism version* 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 VARIAÇÕES NA TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS

A administração de LPS na concentração de 10 mg/Kg diminuiu significativamente a temperatura corporal dos animais quando comparado aos demais grupos após duas de experimento (Gráfico 1 (B)). Na quarta hora a temperatura dos animais com 0,5, 1,5 e 3,0 mg/Kg de LPS foi maior quando comparado ao grupo salina e 10 mg/Kg, sendo os valores estatisticamente significativos (Gráfico 2 (C)). Na sexta hora, nos grupos com LPS não houve diferenças estatísticas. Contudo, a temperatura corporal dos grupos 1,5 e 3,0 mg/Kg de LPS permanece estatisticamente superior ao grupo salina (Gráfico 3 (D)).

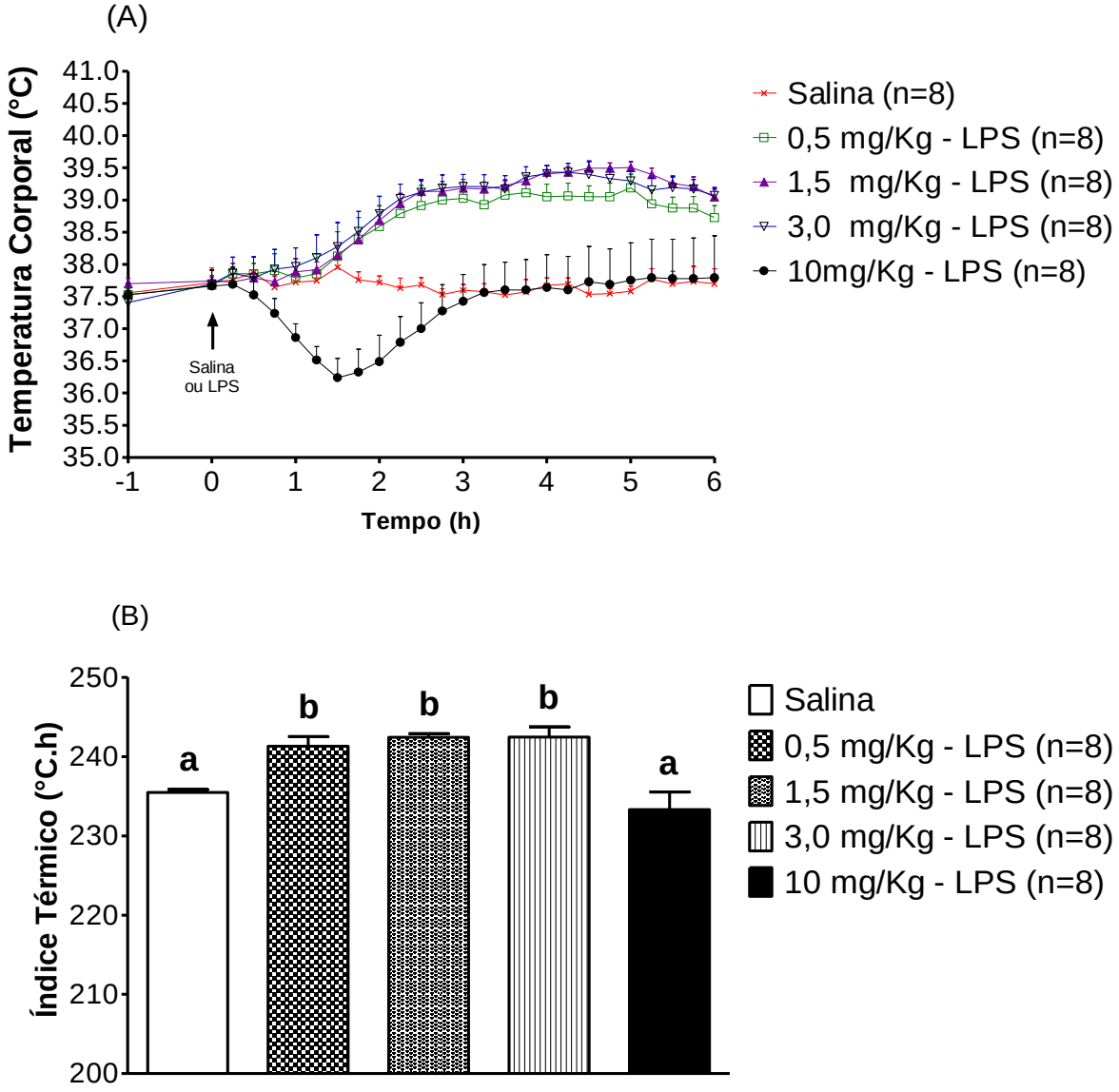
Gráfico 1 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal. **(A)** 0 hora – mensurado antes da administração do LPS ou salina; **(B)** 2 horas após; **(C)** 4 horas após; **(D)** 6 horas após. Os resultados dos gráficos são expressos como média ± EPM. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte – Do autor.

O Gráfico 2 (A) mostra a evolução temporal da variação da temperatura corporal dos animais que receberam as diferentes doses de LPS. Na avaliação da área sob a curva (temperatura corporal vezes tempo) apresentada no Gráfico 2 (B), os animais que receberam doses de 0,5, 1,5 e 3,0 mg/Kg de LPS ocuparam maior área no gráfico quando comparado ao grupo salina e 10 mg/Kg, sendo as diferenças estatisticamente significativas.

Gráfico 2 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal. (A) Variação da temperatura corporal durante o experimento. **(B)** Média ± EPM do cálculo da área sob a curva do gráfico de variação temporal de cada grupo experimental. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey (p< 0,05).

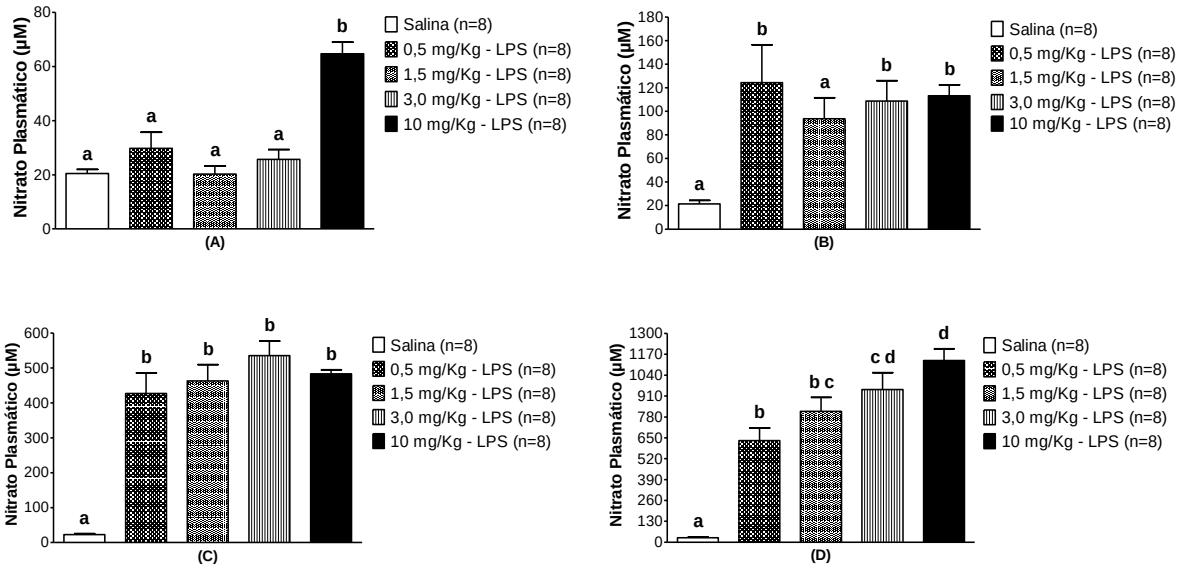


Fonte – Do autor.

5.2 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO PLASMÁTICO NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS

As concentrações de nitrato plasmático foram estatisticamente diferentes nos animais com LPS quando comparados ao grupo salina (Gráfico 3). Na zero hora (Gráfico 3 (A)) os animais com 10 mg/Kg de LPS apresentam médias superiores aos demais grupos, contudo, as concentrações de nitrato plasmático não ultrapassam 100 µM, diferente dos níveis observados nas demais horas. Após duas horas da administração do LPS observa-se diferenças significativas entre os grupos 0,5, 3,0 e 10 mg/Kg – LPS quando comparado ao grupo salina (Gráfico 3 (B)). Na quarta hora os grupos com LPS diferem estatisticamente do grupo salina apresentando um aumento expressivo nas concentrações de nitrato chegando a ultrapassar 500 µM (Gráfico 3 (C)). Com seis horas após a administração do LPS a diferença significativa com o grupo salina permanece, além disso, os grupos com maiores doses de LPS apresentam concentrações estatisticamente superiores de nitrato plasmático chegando a ultrapassar 900 µM (Gráfico3 (D)).

Gráfico 3 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS na concentração de nitrato plasmático. (A) 0 hora – mensurado antes da administração do LPS ou salina; (B) 2 horas após; (C) 4 horas após; (D) 6 horas após. Os resultados dos gráficos são expressos como média ± EPM. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).

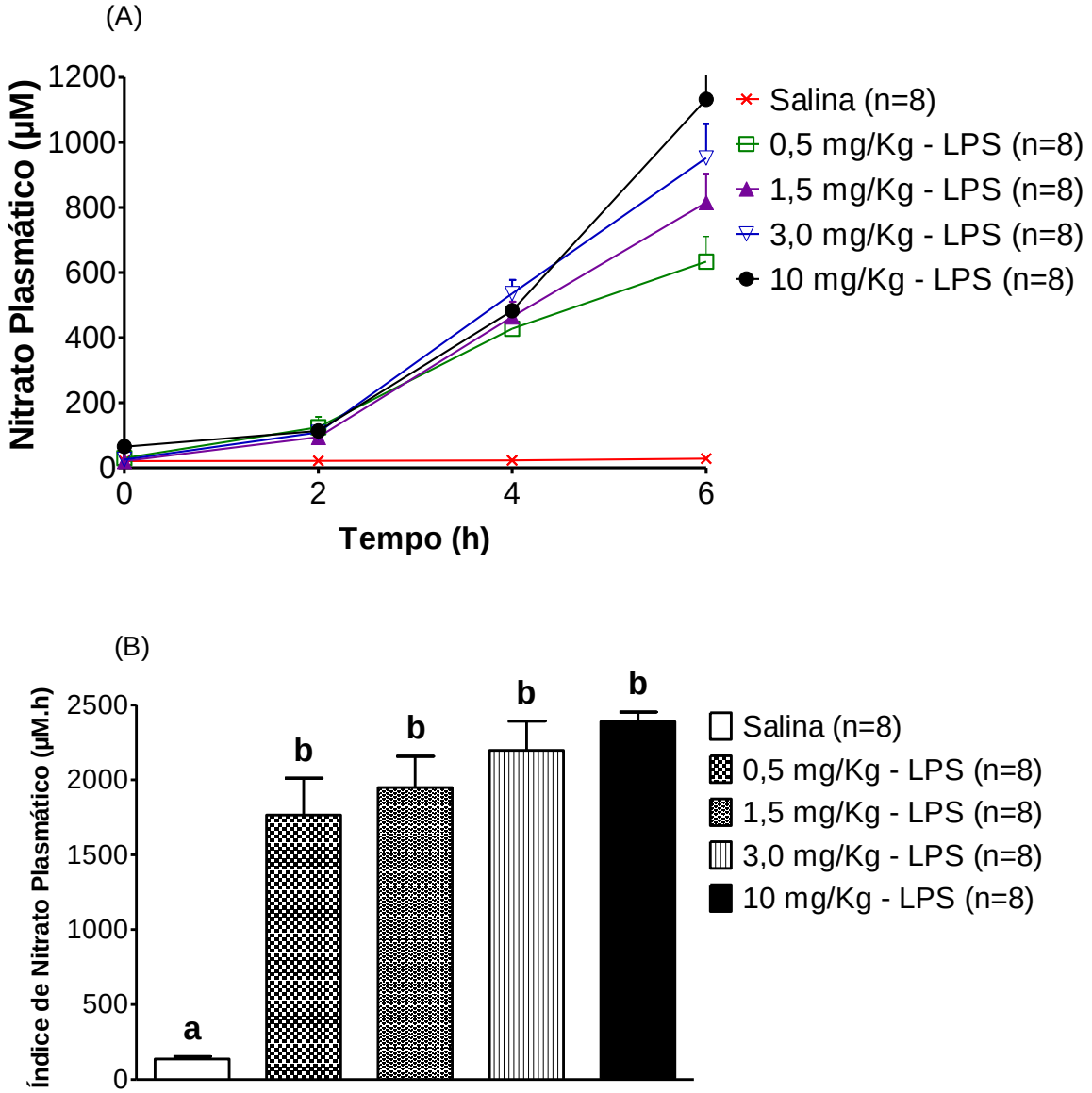


Fonte – Do autor.

Evolução temporal das concentrações de nitrato plasmático no decorrer do experimento está mostrada no Gráfico 4 (A). A área sob a curva referente a essa evolução

temporal (nitrato plasmático vezes tempo) está mostrada no Gráfico 4 (B). Os grupos com LPS ocuparam maior área no gráfico quando comparados com o grupo salina, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 4 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre as concentrações de nitrato plasmático. **(A)** Variação nas concentrações de nitrato plasmático durante o experimento. **(B)** Média ± EPM do cálculo da área sob a curva do gráfico de variação temporal de cada grupo experimental. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).

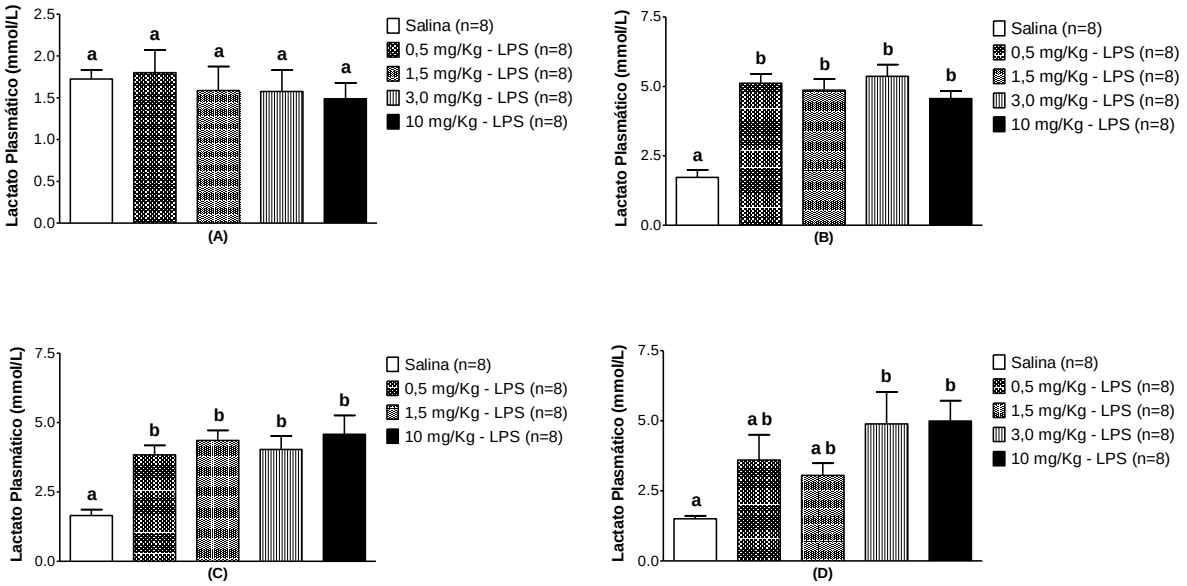


Fonte – Do autor.

5.3 VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO PLASMÁTICO NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS

As concentrações de lactato plasmático na zero hora não diferem entre os grupos experimentais, no entanto, na segunda e na quarta hora ocorre aumento expressivo nessas concentrações levando a uma elevação estatisticamente significativa quando comparado LPS *versus* salina (Gráfico 5 (B) e (C)). Após seis horas diferenças significativas são observadas somente na comparação dos grupos com maiores doses de LPS, respectivamente 3,0 e 10 mg/Kg, quando comparado ao grupo salina (Gráfico 5 (D)).

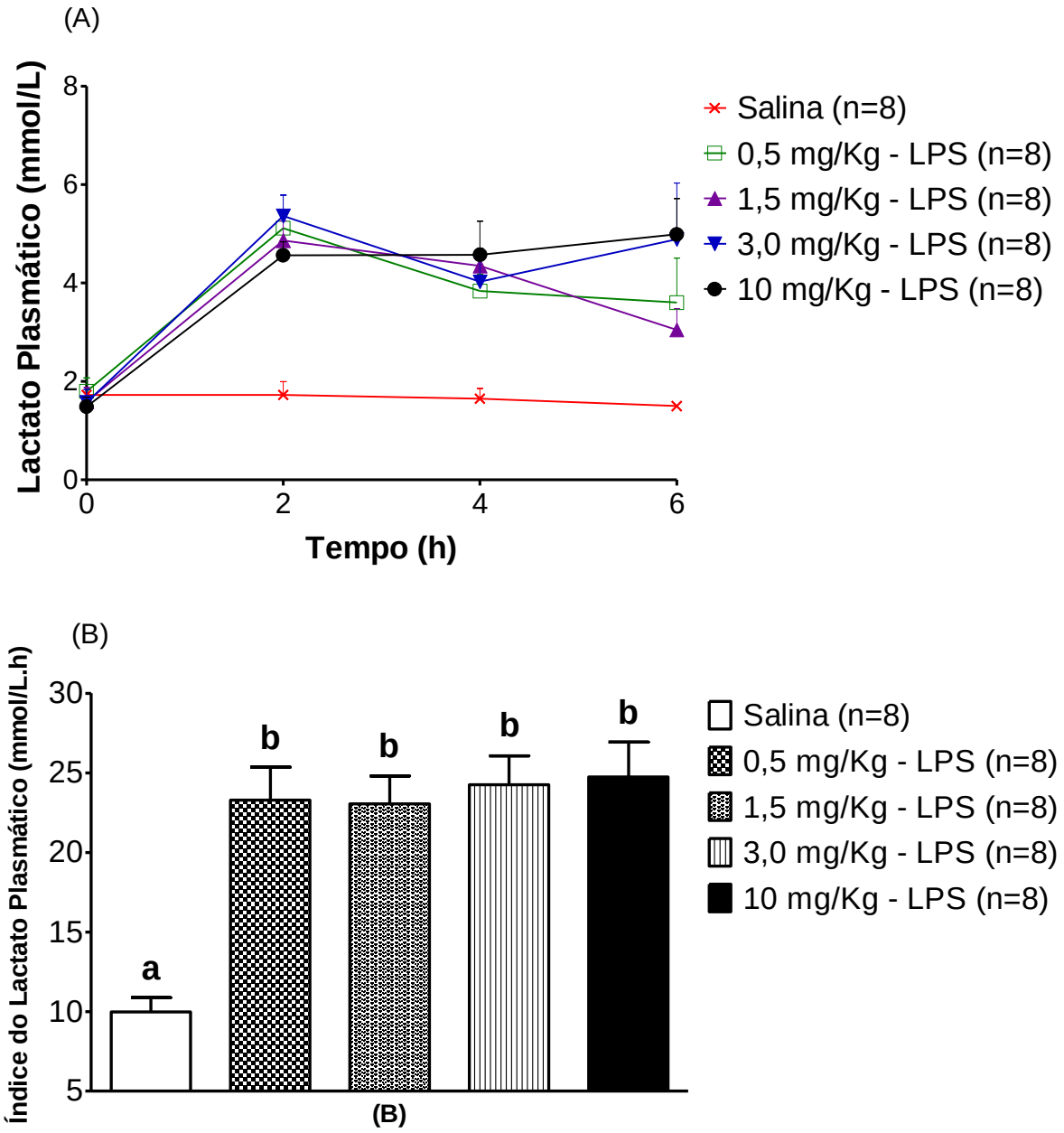
Gráfico 5 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS nas concentrações de lactato plasmático. (A) 0 hora – mensurado antes da administração do LPS ou salina; (B) 2 horas após; (C) 4 horas após; (D) 6 horas após. Os resultados dos gráficos são expressos como média ± EPM. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte – Do autor.

Evolução temporal da variação nas concentrações de lactato plasmático no decorrer do experimento (Gráfico 6 (A). Na análise da área sob a curva (lactato plasmático vezes tempo) apresentada no Gráfico 6 (B) os grupos com LPS são estatisticamente diferentes do grupo salina, pois ocupam uma maior área do gráfico.

Gráfico 6 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre as concentrações de lactato plasmático. **(A)** Variação nas concentrações de lactato plasmático durante o experimento. **(B)** Média ± EPM do cálculo da área sob a curva do gráfico de variação temporal de cada grupo experimental. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).

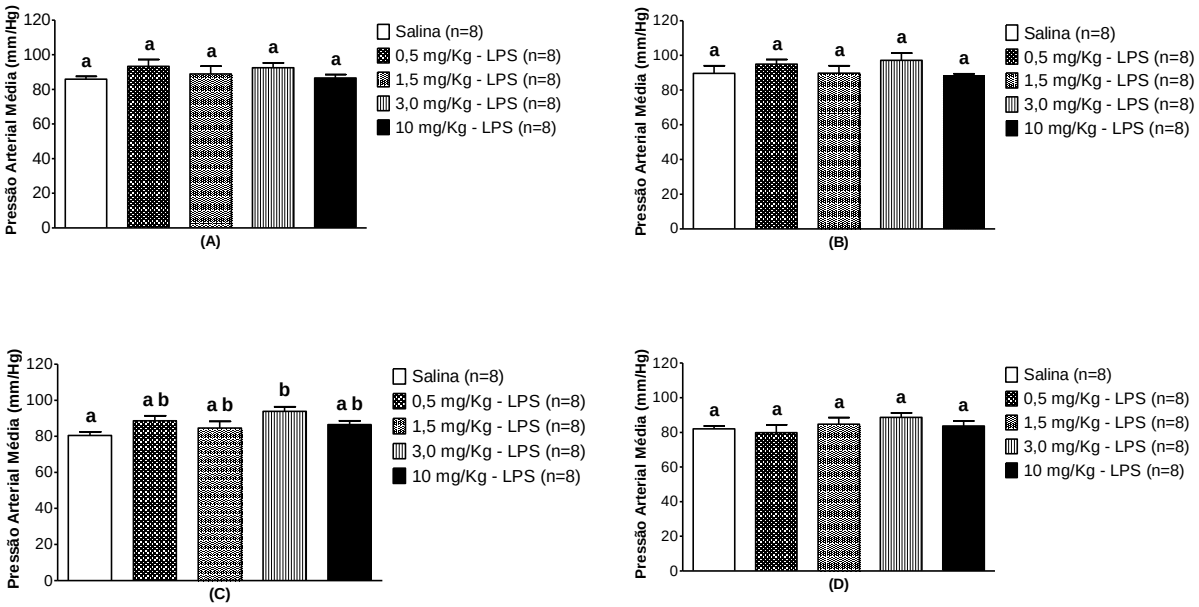


Fonte – Do autor.

5.4 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA COM DIFERENTES DOSES DE LPS

As análises da pressão arterial média mostram que os grupos experimentais não se diferem no decorrer do tempo de experimento, exceto com quatro horas, onde o grupo 3,0 mg/Kg apresenta elevação estatisticamente significativa na pressão arterial média quando comparado ao grupo salina (Gráfico 7).

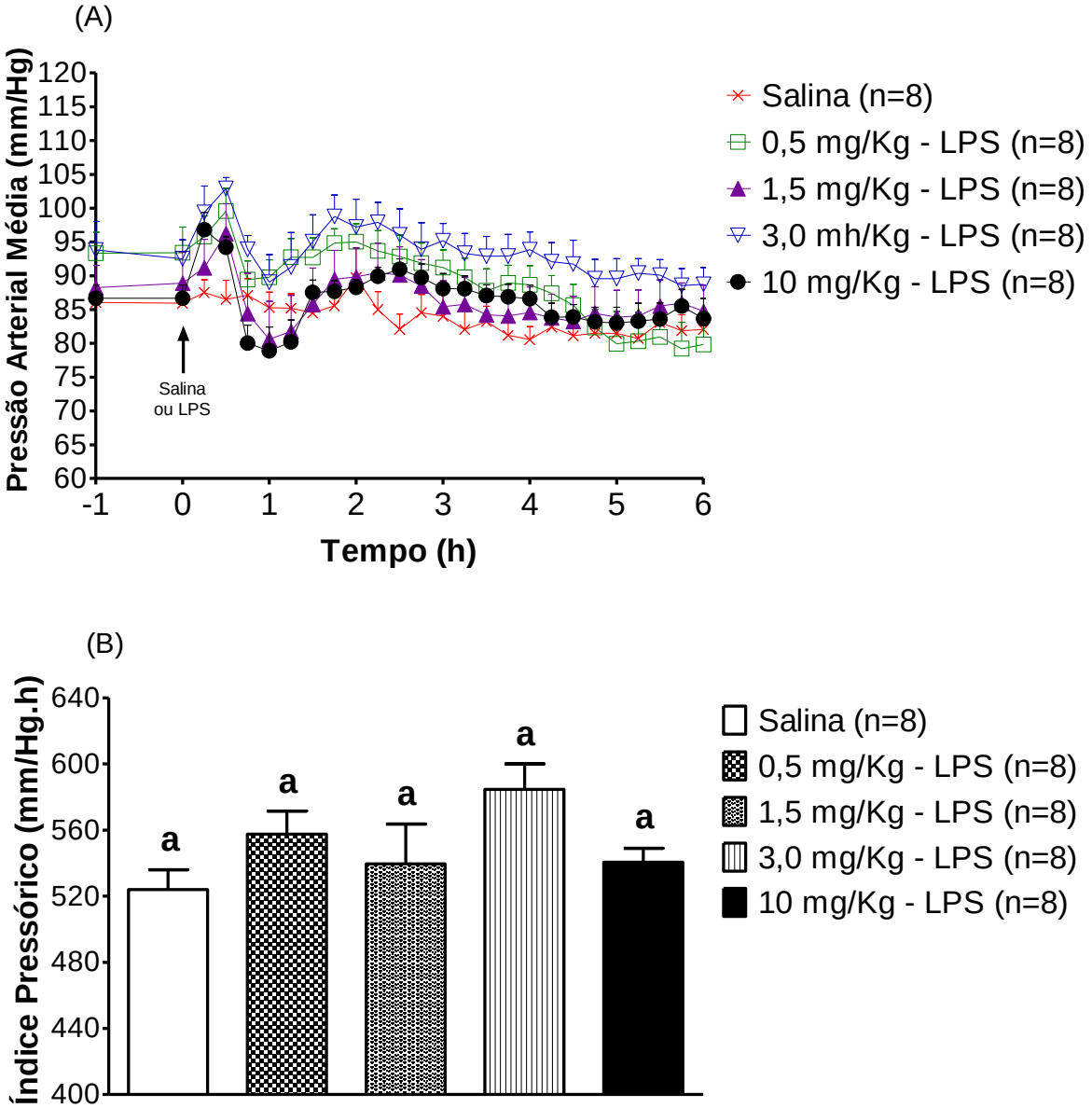
Gráfico 7 - Efeito da administração de diferentes doses de LPS na pressão arterial média. (A) 0 hora – mensurado antes da administração do LPS ou salina; (B) 2 horas após; (C) 4 horas após; (D) 6 horas após. Os resultados dos gráficos são expressos como média ± EPM. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte – Do autor.

Evolução temporal da variação na pressão arterial média no decorrer do experimento (Gráfico 8 (A)). Quando comparado à área sob a curva os resultados mostram que não há diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 8 (B)).

Gráfico 8 - Evolução temporal da administração de diferentes doses de LPS sobre a pressão arterial média. (A) Variação na pressão arterial média durante o experimento. **(B)** Média ± EPM do cálculo da área sob a curva do gráfico de variação temporal de cada grupo experimental. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pela ANOVA One-Way seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).



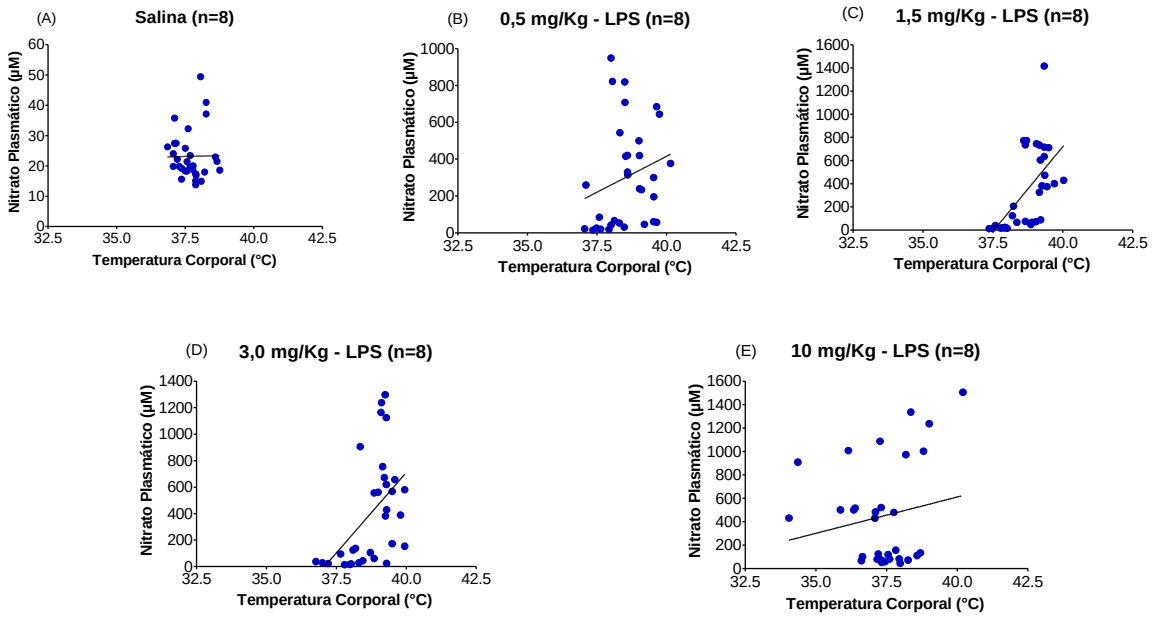
Fonte – Do autor.

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO PLASMÁTICO E A TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS

Na correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a temperatura corporal dos modelos experimentais (Gráfico 9), não foram encontradas diferenças significativas nos grupos salina (coeficiente de Spearman – 0,2136, p = 0,2406 e r^2 = 0,0001883) e 10 mg/Kg – LPS (coeficiente de Spearman 0,03960, p = 0,8296 e r^2 = 0,02935).

Entretanto, houve correlação significativa no grupo 0,5 mg/Kg – LPS (coeficiente de Spearman 0,3603, **p = 0,0428** e r^2 = 0.05177); 1,5 mg/Kg – LPS (coeficiente de Spearman 0,6742, **p = 0,0001** e r^2 = 0,3483); 3,0 mg/Kg – LPS (coeficiente de Spearman 0,5679, **p = 0,0007** e r^2 = 0,2535). A correlação significativa apresentada no Gráfico 9 sugere que quanto maior as concentrações de nitrato plasmático maior a temperatura corporal.

Gráfico 9 - Correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a temperatura corporal. (A) Salina, (B) 0,5 mg/Kg – LPS, (C) 1,5 mg/Kg – LPS, (D) 3,0 mg/Kg – LPS, (E) 10 mg/Kg – LPS.

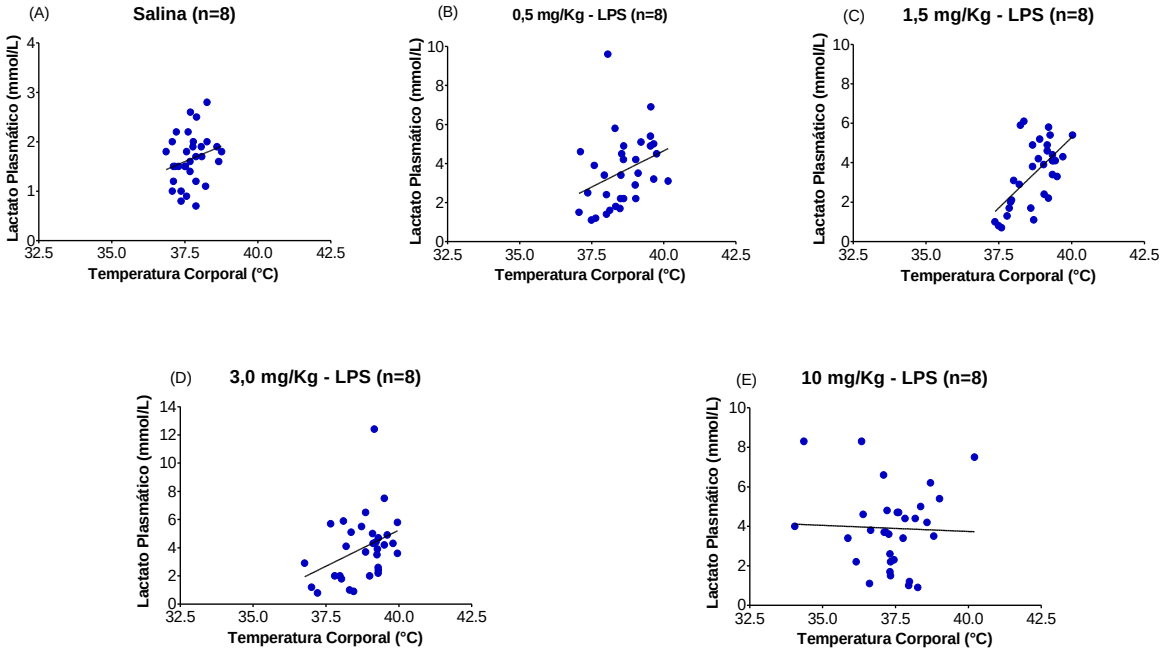


Fonte – Do autor.

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTATO PLASMÁTICO E A TEMPERATURA CORPORAL NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS

A correlação entre as concentrações de lactato plasmático e a temperatura corporal dos modelos experimentais (Gráfico 10), não apresenta diferenças estatísticas nos grupos salina (coeficiente de Pearson 0,2397, p = 0,1864 e r^2 = 0,05745); 0,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson 0,3266, p = 0,0681, r^2 = 0,1067); 10 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson – 0,03789, p = 0,8369 e r^2 = 0,001436). Porém, os animais com 1,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson 0,6182, **p = 0,0002** e r^2 = 0,3822) e 3,0 mg/Kg - LPS (coeficiente de Spearman 0,3552, **p = 0,0461** e r^2 = 0,1370) apresentam correlação significativa, sendo que, quanto maior a concentração de lactato plasmático maior o valor da temperatura corporal.

Gráfico 10 - Correlação entre as concentrações de lactato plasmático e a temperatura corporal. (A) Salina, (B) 0,5 mg/Kg – LPS, (C) 1,5 mg/Kg – LPS, (D) 3,0 mg/Kg – LPS, (E) 10 mg/Kg – LPS.

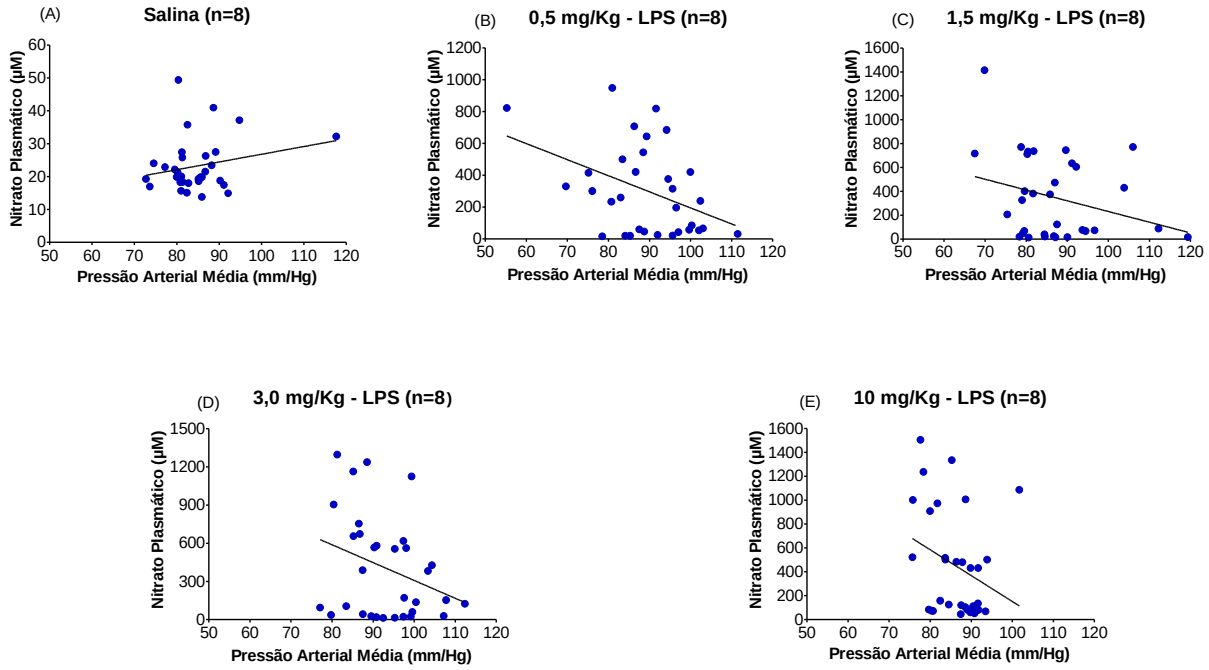


Fonte – Do autor.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO PLASMÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS

Na verificação da correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a pressão arterial média o grupo com maior dose de LPS apresentou correlação significativa (Gráfico 11), 10 mg/Kg (coeficiente de Spearman - 0,3585, **p = 0,0439** e r^2 = 0,08483), mostrando que quanto maior as concentrações de nitrato plasmático, menor a pressão arterial média. Nos demais grupos não foram encontrados diferenças significativas - salina (coeficiente de Spearman 0,09567, p = 0,6024 e r^2 = 0,5343); 0,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Spearman - 0,2834, p = 0,1161 e r^2 = 0,1647); 1,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Spearman -0,1725, p = 0,3452 e r^2 = 0,08467); 3,0 mg/Kg - LPS (coeficiente de Spearman – 0,2724, p = 0,1315 e r^2 = 0,09360).

Gráfico 11 - Correlação entre as concentrações de nitrato plasmático e a pressão arterial média. (A) Salina, (B) 0,5 mg/Kg – LPS, (C) 1,5 mg/Kg – LPS, (D) 3,0 mg/Kg – LPS, (E) 10 mg/Kg – LPS.

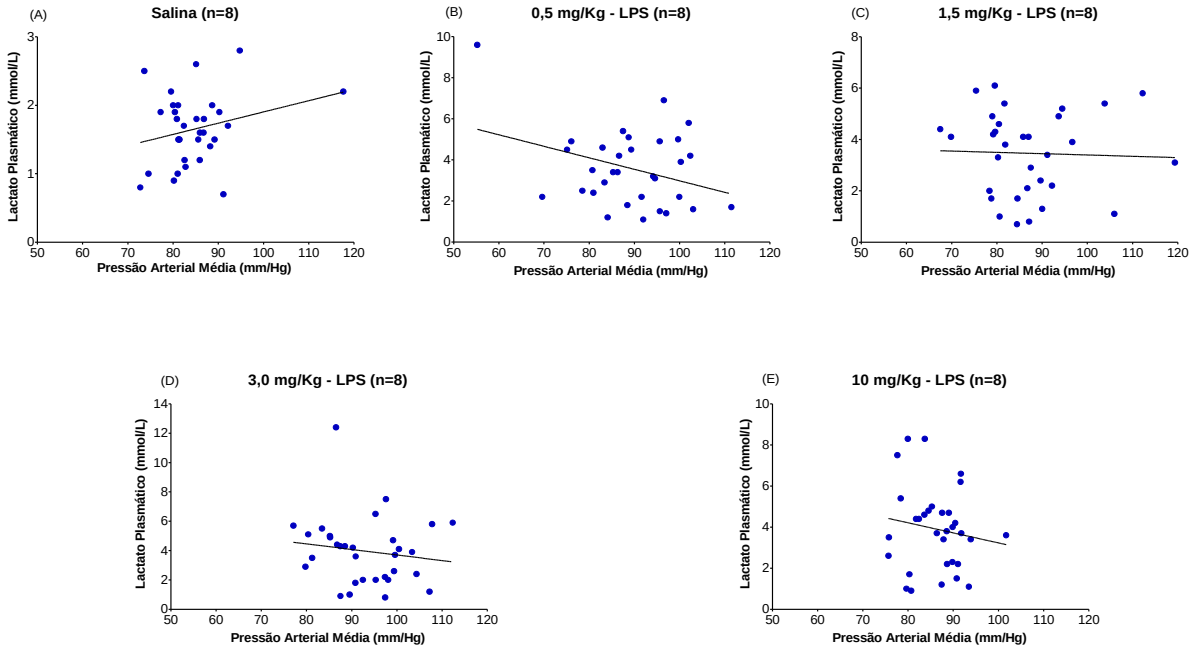


Fonte – Do autor.

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTATO PLASMÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS

Nas análises de correlação entre a concentração de lactato plasmático e a pressão arterial média não foram encontradas correlações significativas nos grupos experimentais (Gráfico 12) - salina (coeficiente de Pearson 0,2562, p = 0,1569 e r^2 = 0,06566); 0,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson – 0,3383, p = 0,0583, r^2 = 0,1144); 1,5 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson 0,03535, p = 0,8477 e r^2 = 0,001250); e 3,0 mg/Kg - LPS (coeficiente de Spearman – 0,1727, p = 0,3445 e r^2 = 0,02071); 10 mg/Kg - LPS (coeficiente de Pearson – 0,1459, p = 0,4256 e r^2 = 0,02128).

Gráfico 12 - Correlação entre as concentrações de lactato plasmático e a pressão arterial média. (A) Salina, (B) 0,5 mg/Kg – LPS, (C) 1,5 mg/Kg – LPS, (D) 3,0 mg/Kg – LPS, (E) 10 mg/Kg – LPS.



Fonte – Do autor.

6 DISCUSSÃO

Esse estudo mostra pela primeira vez a correlação entre a temperatura corporal e mediadores que participam da fisiopatologia da sepse e do choque séptico (lactato e óxido nítrico) em animais submetidos ao modelo de endotoxemia com diferentes doses de LPS. Durante os experimentos observou-se que as doses de LPS infundidas nos grupos experimentais resultaram em alterações na termorregulação, bem como, no aumento nas concentrações plasmáticas dos marcadores fisiológicos analisados.

Após a indução da endotoxemia, os animais utilizados em nosso estudo apresentaram sinais típicos do quadro inicial de sepse, como diarreia, piloereção, inação e secreção periorbital, também observado em estudos anteriores (SAIA et al., 20013). Nos animais que receberam solução salina não foram identificadas mudanças significativas nos parâmetros fisiológicos e/ou comportamentais. Um detalhe importante deste estudo envolve a utilização do mesmo animal durante todas as etapas do experimento, o que permitiu avaliar a evolução dos efeitos desencadeados pelas diferentes doses de LPS utilizadas no mesmo animal.

O aumento na temperatura corporal observado nos grupos que receberam 0,5, 1,5 3,0 mg/Kg – LPS (Gráfico 1 (B), (C) e (D)) bem como, a resposta bifásica com queda de temperatura seguida por aumento da temperatura identificada no grupo que recebeu 10 mg/Kg – LPS (Gráfico 2 (A)) estão associados à alterações na resposta termorregulatória, característica do quadro de endotoxemia. Além disso, o índice térmico do grupo com 10 mg/Kg é significativamente inferior aos demais grupos que receberam LPS. Assim, acreditamos que os valores menores de temperatura corporal observados no grupo com maior dose, se devem ao efeito mais acentuado do LPS podendo acarretar em piora no quadro observado neste grupo de animais.

Em humanos, as mudanças na temperatura corporal identificadas na sepse também estão relacionadas à febre e/ou hipotermia, sendo estes sinais característicos para o rastreamento e diagnóstico da doença (DELLINGER et al., 2013). Sugere-se que a febre seja uma manifestação frequente na sepse e a hipotermia nos casos de sepse grave e/ou choque séptico, sendo interpretado como uma piora clínica no prognóstico do paciente, aumentando chances de óbito (KUSHIMOTO et al., 2013; LÉON et al., 2015; REMICK; XIOA, 2006).

Embora existam diferentes tentativas de reproduzir a sepse e o choque séptico em modelos animais, é importante interpretar os resultados com cautela, visto que, os ratos apresentam respostas distintas a dos humanos (REMICK; XIOA, 2006). Nos quadros de infecção normalmente o homem apresentará febre e em alguns casos pode haver diminuição na temperatura, ao passo que, os roedores normalmente apresentam diminuição da

temperatura corporal frente a uma infecção significativa (REMICK; XIOA, 2006; SAITO et al., 2003).

Nos estudos com animais, a endotoxemia é frequentemente induzida pela administração endovenosa de LPS, que leva a respostas distintas na temperatura corporal (febre ou hipotermia), de acordo com a dose e a temperatura ambiente (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). Após a administração do LPS o sistema imunológico reconhece o agente infeccioso e produz mediadores que interferem na termorregulação, também conhecidos como pirogênios endógenos e criogênicos (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018; VOLTARELLI, 1994).

Nas espécies de pequenos roedores a termorregulação sob efeito do LPS é influenciada fortemente pela temperatura ambiente, uma vez que, pequenas diferenças na temperatura ambiente são suficientes para mudar a resposta entre febre e hipotermia (ROMANOVSKY et al., 1998). Além disso, a injeção abdominal do LPS adotada em muitos estudos pode influenciar na resposta termorreguladora levando a hipertermia inicial por estresse decorrente do procedimento doloroso, o que leva a falsas interpretações de que na fase inicial possa ocorrer rápida hipertermia ou declínio na temperatura chegando ao quadro de hipotermia (RUDAYA et al., 2005).

Em nosso estudo a temperatura ambiente foi controlada a 25±2°C, e as diferentes doses de LPS administradas pela via endovenosa (livre do estresse doloroso), possibilitou encontrar resultados distintos na temperatura corporal quando comparado o grupo que recebeu a maior dose (10 mg/Kg) com os demais. Os mecanismos que levam ao aumento na temperatura corporal nos quadros de endotoxemia são amplamente discutidos na literatura e envolve basicamente a atuação da PGE2 na regulação hipotalâmica. No entanto, a compreensão sobre os quadros de hipotermia e os mediadores envolvidos nela, não é bem compreendida (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018).

Ao analisar as concentrações do nitrato plasmático nosso estudo mostra aumento significativo no decorrer do experimento nos grupos que receberam LPS, especificamente na sexta hora o grupo com maior dose manteve maior concentração quando comparado ao grupo salina, 0,5 e 1,5 mg/Kg – LPS (Gráfico 3). Contudo, não foram encontradas diferenças significativas no índice de nitrato plasmático entre os grupos que receberam LPS (Gráfico 4).

As análises de correlação mostram resultados significativos envolvendo o nitrato plasmático e temperatura corporal nos animais com 0,5, 1,5 e 3,0 mg/Kg – LPS, demonstrando que quanto maior a temperatura corporal maior a concentração de nitrato plasmático (Gráfico 9). A participação do NO na regulação de diversos processos fisiológicos

tem sido investigada nas últimas décadas (DANTONIO et al., 2016; STEINER; BRANCO, 2001). Estudos demonstram que o NO além de ser um importante modulador do sistema cardiovascular, também participa da fisiopatologia da termorregulação (DANTONIO et al., 2016; ROMANOVSKY et al., 2005; STEINER; BRANCO, 2001).

Até o momento a compreensão sobre a participação do NO na regulação da temperatura corporal leva a interpretações distintas – alguns estudos apontam que a inibição da síntese do NO com o uso de L-NAME (inibidor da síntese de NO) injetado no peritônio preveniu a febre em animais submetidos à administração de LPS (SOSZYNSKI, 2001), sugerindo que o NO possa atuar como mediador pirético da febre. Por outro lado, também é demonstrado que o aumento nas concentrações de NO em animais submetidos à endotoxemia resultou em hipotermia (SAIA; ANSELMO-FRANCI; CARNIO, 2008). Além disso, a administração de doadores de NO na região intracerebroventricular reduziu a febre em coelhos (GOURINE, 1995), sugerindo um efeito antipirético central.

Em estudo com humanos, realizado em nosso laboratório, observou-se uma correlação entre queda da temperatura corporal e elevação das concentrações plasmáticas de NO em situações de choque séptico, que não foi observada durante a sepse. (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014). No presente estudo, no entanto, observamos correlação positiva nos grupos de animais que receberam doses menores de LPS, sendo os valores de temperatura corporal diretamente relacionado ao NO plasmático. Essa diferença entre os grupos de animais que receberam doses diferentes pode ser atribuída a uma maior resistência dos animais experimentais ao LPS.

A correlação observada entre as doses de NO e a temperatura corporal na endotoxemia, com doses menores de LPS, pode sugerir a ação do NO, com sua propriedade bactericida (ZHOU et al., 2002), associado ao aumento da temperatura corporal, como forma de defesa do organismo. Assim, o aumento na temperatura pode estar vinculado a maior atividade do sistema imunológico, com a produção de PGE2 e consequentemente elevação da temperatura corporal. Por outro lado, sabendo-se do efeito deletério do NO em altas concentrações, a correlação inversa observada em estudo com humanos (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014), em situações de choque séptico, pode sugerir que tenhamos uma situação de falência na capacidade de resposta do organismo, associada à situação do aumento do estresse oxidativo e consequentemente hipotermia.

Dentre as alterações presentes na sepse e no choque séptico em humanos, a temperatura corporal é destacada como sinalizador de gravidade na evolução clínica da doença, sendo que, no quadro de sepse é observado principalmente aumento na temperatura

corpórea resultando em maior atividade do sistema imunológico, em contrapartida, o choque séptico é marcado pela hipotermia e pela intensa produção de NO (PEREIRA; BATALHÃO, CÁRNIO, 2014; CAUWELS, 2007) acompanhado por alterações significativas no sistema vascular (CAUWELS, 2007). Quando comparado a sepse, a taxa de mortalidade do choque séptico apresenta incidência superior, também resultando em maior comprometimento orgânico (KUSHIMOTO et al., 2014).

A produção de NO na doença ocorre principalmente sob a forma induzível (iNOS), podendo ser estimulada pela presença do LPS em modelos animais (DANTONIO et al., 2016; SAIA et al., 2013) e ou bactérias, principalmente a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas spp* (HODGIN; MOSS, 2008) em humanos. Considerando as respostas distintas entre humanos e animais, os resultados do nosso estudo sugerem que provavelmente a maior concentração de NO em humanos resulta na diminuição da temperatura corporal, visto que, nos animais ocorre efeito oposto. Essa hipótese tem sido investigada em estudos com humanos, sendo confirmada a correlação entre o aumento nas concentrações de nitrato com a diminuição da temperatura corporal no choque séptico (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014).

Ressalta-se que a diminuição intensa da temperatura corporal observada no grupo que recebeu maior dose de LPS (10 mg/Kg) acompanhada pelo aumento expressivo nas concentrações de nitrato mostra que quanto maior a dose administrada menor será a temperatura corporal, confirmando os apontamentos encontrados na literatura (RUDAYA et al., 2005). Assim, é fundamental considerar a influência da dose de LPS e a resposta do animal.

Além do aumento nas concentrações do nitrato plasmático os resultados do nosso estudo mostram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de lactato (Gráfico 5) nos grupos com LPS comparado ao grupo salina. Esse aumento é acompanhado pelo maior índice do lactato plasmático quando analisado a área sob a curva (Gráfico 6). Nas análises de correlação foram encontrados valores significativos nos grupos com 1,5 e 3,0 mg/Kg – LPS (Gráfico 10) demonstrando que quanto maior a concentração do lactato maior a temperatura corporal.

Ambos os marcadores da sepse (nitrato e lactato) em conjunto com a avaliação dos sinais vitais, em especial a temperatura corporal são importantes indicadores sobre a gravidade clínica da sepse em humanos, sendo o lactato utilizado como parâmetro para o diagnóstico do choque séptico (SINGER et al., 2016). Por se tratar de um mediador difícil de

ser dosado no ambiente clínico, frequentemente a avaliação do nitrato plasmático se restringe a pesquisa científica.

Na detecção da sepse, os marcadores biológicos (biomarcadores) auxiliam no rastreamento precoce da doença, na classificação de risco, na resposta ao tratamento e no prognóstico clínico (FAIX, 2013). Mais de 170 biomarcadores foram sugeridos como úteis na investigação da sepse (CHO; CHOI, 2014), dentre estes se encontra o lactato. A escolha pela avaliação do lactato plasmático adotada em nosso estudo se deve a proximidade com a realidade do contexto clínico. Além disso, optou-se por um instrumento portátil de avaliação do lactato como forma hipotética para seu uso junto aos pacientes. Ressalta-se que não há conflitos de interesses envolvendo o instrumento utilizado.

A atividade imunológica nos quadros de sepse é caracterizada por resposta hiperinflamatória na etapa inicial seguida por uma fase de imunossupressão (FAN et al., 2015). A grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios produzidos na etapa inicial da doença, torna-se um dos focos principais adotados nos métodos terapêuticos para tratar a sepse (FAN et al., 2015) em conjunto com o tratamento antimicrobiano (DELLINGER et al., 2013). Contudo, acredita-se que a resposta desregulada do sistema imunológico seja o principal fator associado à alta taxa de mortalidade na doença, cuja sobrevivência depende da participação das células defesa do sistema imune (FAN et al., 2015).

Estudos recentes mostram que a diminuição na produção de lactato resultou na melhora da sobrevida de animais (ZHENG et al., 2017; XIE et al., 2016; YANG et al., 2014). A literatura atual aponta que a sepse e a endotoxemia podem aumentar o metabolismo anaeróbio e a produção de lactato que por sua vez altera o funcionamento das células imunes (NOLT et al., 2018). O efeito imunomodulador do lactato nas células imunes inatas (principalmente macrófagos e células dendríticas) tem sido investigado em pesquisas recentes. Essas células desempenham um importante papel no controle da inflamação e na apresentação de antígenos para a ativação do sistema de defesa adaptativo, com participação dos linfócitos T e células B (NOLT et al., 2018).

Na sepse e/ou endotoxemia a desregulação no funcionamento do sistema imunológico não apenas limita a resposta nas infecções primárias, como também prejudica as barreiras de defesa nas infecções nasocomias secundárias (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013). Uma característica marcante da sepse duradoura é o desenvolvimento desajustado de tolerância imunológica contra patógenos (PENA et al., 2014; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013).

As altas concentrações de lactato observadas na sepse podem resultar na regulação negativa de enzimas glicolíticas, especificamente a hexoquinase e a fosfofrutoquinase, nas células imunes (HAAS et al., 2015) e em uma variedade de tecidos (LEITE et al., 2011). Assim, considerando a importância da glicólise aeróbia para o funcionamento das células do sistema imunológico em atividade, a regulação negativa dessas enzimas sob influência do lactato implica no comprometimento funcional dessas células (FAN et al., 2015).

Os efeitos da alta concentração de lactato no sistema imunológico observado em modelos experimentais apontam que a presença de lactato em soluções de diálise peritoneal inibe a maturação de células dendríticas induzida por LPS (10 ng/mL) (PUIG-KROGER et al., 2003); o tratamento com lactato também aumentou a produção de genes associados ao M2 (VEGF e Arg1) e marcadores (Fizz1, Mgl1 e Mgl2) (COLEGIO et al., 2014). O M2 é um fenótipo imunossupressor derivado dos macrófagos encontrado nos estágios tardios da sepse, seu aumento pode resultar em disfunção crítica no sistema imunológico (ARTS et al., 2017).

No sistema imune adaptativo, a presença de altas concentrações de lactato no líquido sinovial e nas articulações de pacientes com artrite reumatoide, desempenhou um papel de sinalizador para localização de células T no local da inflamação (HAAS et al., 2015). Ao realizar experimentos *in vitro* os autores deste estudo apontam que o lactato de sódio extracelular e o ácido lático bloqueiam respectivamente a motilidade das células T CD4+ e CD8+ (HAAS et al., 2015).

Assim como nos modelos animais, o aumento nas concentrações de lactato na sepse e no choque séptico em humanos é interpretado como um prognóstico ruim que reduz as chances de sobrevida (MARTY et al., 2013) e sinaliza disfunções no sistema imunológico (HAAS et al., 2015; NOLT et al., 2018). Neste contexto, nossos resultados reforçam a importância no monitoramento do lactato em pesquisas experimentais e clínica, visto que, é uma variável fácil de ser mensurada e possibilita compreender seu comportamento na endotoxemia e/ou sepse.

Os dados obtidos em nosso estudo, mostrando a elevação das concentrações de lactato após a administração de LPS estão de acordo com as evidências da literatura (FODOR et al., 2015; SAIA et al., 2013). Contextualizando a literatura com os resultados encontrados neste estudo, reforçamos a importância na análise do lactato plasmático como medida para determinação da evolução do quadro de sepse, quando associado a outros parâmetros. Acreditamos que existe potencial para se considerar as avaliações da temperatura corporal e de pressão arterial, associadas às concentrações de lactato e NO plasmático, como forma de se avaliar uma mudança no prognóstico do paciente séptico.

Os resultados da pressão arterial média (Gráfico 7) deste estudo mostram que não há diferenças significativas entre os grupos experimentais, exceto na comparação das médias entre o grupo com 3,0 mg/Kg-LPS e o grupo salina. Também não foram encontradas diferenças na análise do índice pressórico (Gráfico 8). No entanto, observa-se correlação significativa entre nitrato plasmático e pressão arterial média no grupo com 10 mg/Kg-LPS (Gráfico 11 (E)), sendo que, o aumento nas concentrações de nitrato plasmático é inversamente proporcional a pressão arterial média. As análises de correlação entre lactato plasmático *versus* pressão arterial média não sugerem qualquer tipo de relação entre essas variáveis.

Possivelmente as doses de LPS utilizadas no nosso estudo não foram suficientes para levar a queda expressiva na pressão arterial. No entanto, a diminuição na pressão arterial acompanhada pelo aumento nas concentrações de nitrato plasmático mostradas no grupo que recebeu 10 mg/Kg – LPS pode ser explicada pelo efeito vasodilatador da iNOS (SAIA et al., 2013; BROCCARD et al., 2000; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). O excesso na síntese e na indução da iNOS durante a endotoxemia e nos pacientes com choque séptico, implica no comprometimento cardiovascular (SAIA et al., 2013; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), resultando na vasoplegia e na diminuição da resistência vascular periférica (SHIC et al., 2017; VINCENT; DE BACKER, 2013).

Diversos estudos na literatura encontraram diminuição da pressão arterial média em modelos de endotoxemia usando vias e doses distintas para administração na LPS, por exemplo, 50 mg/Kg por via intraperitoneal (SHIC et al., 2017) e 1,5 mg/Kg por via endovenosa (SAIA et al., 2013). Embora o NO possua uma importância significativa para o equilíbrio homeostático, sua produção em excesso é prejudicial ao organismo. Cabe destacar, que a avaliação do lactato plasmático em modelos animais de sepse e choque séptico ainda é incipiente, onde em sua maioria os estudos concentram-se em avaliar o papel do NO na doença.

A hiperlactatemia e a hipotensão arterial são sinais tipicamente presentes no choque séptico, indicando metabolismo celular anormal com diminuição na oferta de oxigênio (VINCENT; DE BACKER, 2013). Na busca por melhorar o rastreamento da doença, o último consenso sobre a sepse, retrata que o choque séptico apresenta como características clínicas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, sendo diagnosticado pela presença de hipotensão persistente requerendo o uso de fármacos vasopressores para manter a pressão arterial média acima de 65 mmHg e pelas concentrações de lactato sérico maior que 2 mmol/L (>18 mg/dL), na ausência de hipovolemia (SINGER et al., 2016).

O aumento nas concentrações de lactato e nitrato plasmático na presença de LPS observado em nosso estudo vão ao encontro dos sinais clínicos observados em humanos, indicando que possivelmente os animais tiveram comprometimento no oferta de oxigênio e/ou outras funções orgânicas. Em síntese, é necessário compreender que altas concentrações destes biomarcadores são prejudiciais ao organismo e interferem na temperatura corporal e no funcionamento cardiovascular.

Embora os resultados deste estudo não tenham apresentados valores estatisticamente significativos para algumas variáveis, é importante destacar que valores de *p* acima de 0,05 não permitem afirmar a ausência de efeitos (HENTSCHKE; STÜTTGEN, 2011; FERGUSON, 2009). Ainda que o valor do *p* forneça a probabilidade para obtenção de uma estatística significativa, isso não é suficiente para evidenciar a implicação clínica dos resultados (BERBEN; SEREIKA; ENGBERG, 2012; DURLAK, 2009).

No cenário clínico a temperatura corporal é um sinal frequentemente coletado pela equipe de enfermagem. Em muitas situações a enfermagem é a primeira a identificar alterações clínicas no paciente. Por este motivo, ressaltamos a importância na detecção precoce da doença com uso de diferentes ferramentas, que possam permitir uma coleta de dados rápida e eficaz, por exemplo, o uso do dosador de lactato e do termômetro. Considerando que a equipe de enfermagem muitas vezes é a primeira a perceber modificações no quadro clínico do paciente, é importante o monitoramento constante de variáveis preditoras da sepse e do choque séptico.

Por fim, ressalta-se que os protocolos experimentais adotados na pesquisa *in vivo* permitem reproduzir situações que dificilmente seriam possíveis na pesquisa clínica. Além disso, suas evidências são subsídios para o desenvolvimento da pesquisa clínica. Portanto, os resultados do nosso estudo fornecem informações importantes sobre o comportamento das variáveis investigadas e leva a reflexões sobre a necessidade no uso de instrumentos distintos para estimar a produção de NO, avaliar as concentrações de lacto e consequentemente promover uma avaliação mais rápida sobre a evolução clínica da sepse.

7 CONCLUSÃO

O modelo experimental adotado neste estudo por meio da utilização do mesmo animal em todas as etapas experimentais e da coleta de sangue por via arterial mostrou-se adequado para avaliar os efeitos da endotoxemia sobre a temperatura corporal, pressão arterial média e as concentrações de nitrato e lactato plasmáticos, o que permite ser reproduzido e/ou replicado em outros estudos.

Variações significativas na temperatura corporal foram observadas nos modelos de endotoxemia adotados em nosso estudo, mostrando aumento ou diminuição na temperatura conforme a dose de LPS administrada. Estas alterações estiveram correlacionadas com os aumentos nas concentrações de nitrato e lactato plasmáticos, que são importantes mediadores fisiopatológicos observados durante a endotoxemia. Além disso, o grupo que recebeu maior dose de LPS apresentou correlação entre o aumento nas concentrações de nitrato e a diminuição da pressão arterial média.

Por fim, o estudo traz como implicações para enfermagem a importância no monitoramento da temperatura corporal, em conjunto com a avaliação destes marcadores fisiopatológicos, os quais sugerem um agravamento do prognóstico durante a sepse.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, U. Regulation of arterial blood pressure. **Surgery (Oxford)**, v. 22, n. 5, p. 120a – 120f, 2004.

AFULUKWE, I. F. et al. Selective NOS inhibition restores myocardial contractility in endotoxemic rats; howver, myocardial NO content does not correlate with myocardial dysfunction. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**, v. 162, n. 1, p. 21-26, 2000.

AHRENS, T.; TUGGLE, D. Surviving severe sepsis: early recognition and treatment. **Crit Care Nurse**, p. 14-15, 2004. Supplement 2-13.

AKARSU, E.; MAMUK, S. *Escherichia coli* lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292: R1846–R1850, 2007.

ALESSI, A. et al. I posicionamento brasileiro sobre pré-hipertensão, hipertensão do avental branco e hipertensão mascarada: diagnóstico e conduta. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 102, n. 2, p. 110-119, 2014.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, v. 369, n. 9, p. 840-851, 2013.

ARTS, R. J. et al. Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 101, n. 101, p. 151–164, 2017.

BAKKER, J. Lactato é O alvo para ressuscitação precoce na sepse. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.**, v. 29, n. 2, p. 124-127, 2017 .

BERBEN, L.; SEREIKA, S. M.; ENGBERG, S. Effect size estimation: methods and examples. **International Journal of Nursing Studies**, v. 49, n. 8, p. 1039–1047, 2012.

BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 2, p. 168-176, 2003.

BIROLINI, D.; ATALLAH, A. N. **Atualização terapêutica de Prado, Ramos e Valle:** urgências e emergências. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

BONE, R. C. et al. 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**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BRACKETT, D. J. et al. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circ. Shock**, v. 17, n. 4, p. 273-284, 1985.

BROCCARD, A. et al. Tissue oxygenation and hemodynamic response to NO synthase inhibition in septic shock. **Shock**, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2000.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 854 – 865, 2005.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydr Res**, v. 338, n. 23, p. 2431- 2447, 2003.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney Int**, v. 72, n. 5, p. 557-565, 2007.

CHO, S. Y.; CHOI, J. H. Biomarkers of sepsis. **Infect Chemother**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2014.

CHOI, D. W. Nitric oxide: foe or friend to the injured brain? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 21, p. 9741-9743, 1993.

COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014.

DANTONIO, V. Nitric oxide and fever: imune-tobrain signaling vs. Thermogenesis in chicks. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 310: R896-R905, 2016.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Crit Care Med**, v. 36, n. 1, p. 17-60, 2008.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. **Crit Care Med**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.

DURLAK, J. A. How to select, calculate, and interpret effect sizes. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 34, n. 9, p. 917–928, 2009.

FAIX, J. Biomarkers of sepsis. **Crit Ver Clin Lab Sci**, v. 50, n. 1, p. 23-36, 2013.

FAN, X. et al. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis. **Biomed Res Int**, 2015: 903720, 2015.

FERGUSON, C. J. An effect size primer: A guide for clinicians and researchers. **Professional Psychology: Research and Practice**, v. 40, n. 5, p. 532-538, 2009.

FINK, M. P.; HEARD, S. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **J Surg Res**, v. 49, n. 2, p. 186-196, 1990.

FODOR, R. S. et al. Time- and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 4, p. 1329-1337, 2015.

FOUCHER, C. D., TUBBEN, R. E. Lactic Acidosis. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470202/ >. Acesso em: 15 dez. 2018.

GAMCRLIDZE, M. M. et al. Vasoplegia in septic shock (review). **Georgian Med News**, v. 239, p. 56-62, 2015.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Chapter 34 - Fever and hypothermia in systemic inflammation. **Handbook of Clinical Neurology**, Elsevier, v. 157, p. 565-597, 2018.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F.; SILVA, M. R. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cir. Bras**, v. 19, n. 2, p. 82-88, 2004.

GAUTAM, A. et al. Different patterns of expressionando fIL-10 modulation of inflammatory mediators from macrophages of Lyme disease-resistant and -susceptible mice. **PLoSONE**, v. 1.7, n. 9, Article IDe43860, 2012.

GIULIANO, K. K. Continuous physiologic monitoring and the indentification of sepsis: what is the evidence supporting current clinical practice? **AACN Adv Crit Care**, v. 17, n. 2, p. 215-223, 2006.

GOURINE, A. V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever rabbits. **Gen Pharmacol**, v. 26, n. 4, p. 835-841, 1995.

GRANIK, V. G.; RYABOVA, S. Y.; GRIGORIEV, N. B. Exogenous nitric oxide donos and inhibitors of its formation (the chemical aspects). **Russ. Chem. Rev**, v. 66, n. 8, p. 717, 1997.

HAAS, R. et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. **PLoS Biol**, v. 13, n. 7, e1002202, 2015.

HAKIM, T. S. et al. Hypothermia attenuates NO production in anesthetized rats with endotoxemia. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 659-665, 2014**.**

HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAMPL, V.; WALTERS, C. L.; ARCHER, S. L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescense reaction with ozone, in: M. feelisch and J. S. Stamler (Ed), **Methods in Nitric Oixide Research**, JS Wiley & Sons ltd, 1996.

HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**, v. 36, n. 3, p. 391-392, 1974.

HENTSCHKE, H.; STÜTTGEN, M. C. Computation of measures of effect size for neuroscience data sets. **Eur J Neurosci**, v. 34, n. 12, p. 1887-1894, 2011.

HODGIN, K. E.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 19, p. 1833-1839, 2008.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 971-974, 2004.

HOLLENBERG, S. M.; CINEL, I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness – update 2008. **Crit Care**, v. 13, n. 4, p. 218, 2009.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D: Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 3, p. 260–268, 2013.

HUET, O. et al. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. **Crit Care Med**, v. 35, n. 3, p. 821-826, 2007.

ILAS (Instituo Latino Americano de Sepse). Disponível em: <https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/protocolo-de-tratamento.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2018.

JANSEN, T. C. et al. Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 6, p. 752-7561, 2010.

JOHNSTON, T. D.; HAMPTON, W. H.; FRY, D. E. *E. coli* endotoxin produces hyperdynamic hemodynamics in the rats. **Circ. Shock**, v. 27, p. 320, 1989.

KELLY, D. M. et al. Impact of critical care nursing on 30-day mortality of mechanically ventilated older adults. **Crit Care Med**, v. 42, n. 5, p.1089-1095, 2014.

KIYATKIN, M. E.; BAKKER, J. Lactate and microcirculation as suitable targets for hemodynamic optimization in resuscitation of circulatory shock. **Curr Opin Crit Care**, v. 23, n. 4, p. 348-354, 2017.

KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

KUGLER, M. J. et al. Role of fever in disease. **Ann NY Acad Sci**, v. 856, p. 224-233, 1998.

KUSHIMOTO, S. et al. Body temperature abnormalities in non-neurological critically ill patients: a review of the literature. **J Intensive Care**, v. 2, n. 1, p. 14, 2014**.**

KUSHIMOTO, S. et al. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis form a multicenter, prospective survey of severe sepsis. **Crit Care**, v. 17, n. 6, R271, 2013.

KUTNEY-LEE, A.; LAKE E. T.; AIKEN, L. H. Development of the Hospital Nurse Surveillance Capacity Profile. **Res Nurs Health**, v. 32, n. 2, p. 217-228, 2009.

KWEON, O. J. et al. Usefulness of presepsin (sCD14 subtype) measurements as a new marker for the diagnosis and prediction of disease severity of sepsis in the Korean population. **J Crit Care**, v. 29, n. 6, p. 965-970, 2014.

LAGU, T. et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Crit Care Med**, v. 40, n. 3, p. 754-761, 2012.

LAW, W. R.; FERGUSON, J. L. Nalaxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats. **Amer. J. Physiol**, v. 255: H1106, 1988.

LEITE, T. C. et al. Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. **FEBS Lett**, v. 585, p. 1, p. 92–98, 2011.

LÉON, K. et al. Does induction time of mild hypothermia influence the survival duration of septic rats? **Ther Hypothermia Temp Manag**, v. 5, n. 2, p. 85-88, 2015.

LEVY, M. M. et al. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 4, p. 530-538, 2003.

LIN, N. T. et al. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. **Life sciences**, v. 78, n. 10, p. 1038-1043, 2006.

LUAN, Y. Y. et al. The significance and regulatory mechanisms of innate immune cells in the development of sepsis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**,v. 34, n. 1, p. 2–15, 2014.

MARTY, P. et al. Lactate clearance for death prediction in severe sepsis or septic shock patients during the first 24 hours in Intensive Care Unit: na observational study. **Ann Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 3, 2013.

MCREE, L. et al. The impact of an electronic medical record surveillance program on outcomes for patients with sepsis. **Heart Lung**, v. 43, n. 6, p. 546-549, 2014.

MIKKELSEN, M. E. et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. **Crit Care Med**, v. 37, n. 5, p. 1670-1677, 2009.

MILITÃO, I.; CARROLA, P.; PRESA, J. Sepsis and multiorgan dysfunction in liver cirrhosis. **GE J Port Gastrenterol**, v. 20, n. 3, p. 103-111, 2013.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. **J Physiol**, v. 589, p. 3641–3658, 2011.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

NOLT, B. et al. Lactate and immunosuppression in sepsis. **Shock**, v. 49, n. 2, p. 120-125, 2018.

NOVOTNY, A. R. et al., “Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of proand anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. **Immunobiology**, v. 217, n. 6, p. 616–621, 2012.

PARRATT, J. R. Nitric oxide in sepsis and endotoxemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 31-39, 1998. Supplement A.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 2, p. 75-93, 2010.

PENA, O. M. et al. An endotoxin tolerance signature predicts sepsis and organ dysfunction at initial clinical presentation. **EBioMedicine**, v. 1, n. 1, 64–71, 2014.

PEREIRA, F. H.; BATALHÃO, M. E.; CÁRNIO, E. C. Correlação entre a temperatura corporal, pressão arterial e concentração plasmática de óxido nítrico em pacientes com sepse. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 123-128, 2014.

PERES-BOTA, D. et al. Body temperature alterations in the critically ill. **Intensive Care Med**, v. 30, n. 5, p. 811-816, 2004.

PUIG-KROGER, A et al. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 4, p. 482–492, 2003.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

REMICK, D. G.; XIOA, H. Hypothermia and sepsis. **Front Biosci**, v. 11, p. 1006-1013, 2006.

RHODES, A. et al. The Surviving Sepsis Campaign bundles and outcome: results from the International Multicentre Prevalence Study on Sepsis (the IMPreSS study). **Intensive Care Med**, v. 41, n. 9, p. 1620-1628, 2015.

RIVERS, E. et al. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. **N Engl J Med**, v. 35, p. 1368-1377, 2001.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. **Am. J. Physiol**, v. 270, n. 4Pt 2, p. R693 - R703, 1996.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci**, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

ROMANOVSKY, A. A. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 275, p. R332-R338, 1998.

ROMANOVSKY, A. A.; SZÉKELY, M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Med Hypotheses**, v. 50, p. 219–226, 1998.

RUDAYA, A. Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependesse on the dose and ambiente temperature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, p. R1244-R1252, 2005.

RYOO, S. M.; KIM, W. Y. Clinical applications of lactate testting in patients with sepsis and septic shock. **J Emerg Crit Care Med**, v. 2, p. 1-10, 2018.

SAIA, R. S. **Efeito *in vitro* e *in vivo* da colecistocinina sobre mediadores inflamatórios estimulados por lipopolissacarídeo**. 2012. 182f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP, Ribeirão Preto, SP, 2012.

SAIA, R. S. et al. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 104-112, 2013.

SAIA, S. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CÁRNIO, E. C. Hypothermia during endotoxemic shock in female mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Shock**, v. 29, n. 1, p. 119-126, 2008.

SAITO, H. et al. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. **Mech Ageing Dev**, v. 124, n. 10, p. 1047-1058, 2003.

SANTOS, J. F.; ALVES, A. P.; STABILE, A. M. Evaluation of the knowledge of nursing students regarding sepsis. **Rev. Eletr. Enf. [Internet]**, v. 14, n. 4, p. 850-856, 2012.

SANTOS, S. S. et al. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 18-23, 2012.

SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL TE. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat Neurosci**, v. 15, p. 1088–1095, 2012.

SCAMMELL, T. E.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. **Am J Physiol**, v. 271, n. 2, p. 333-338, 1996.

SCHORTGEN, F. et al. Fever control using external cooling in septic shock: a randomized controlled trial. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 10, p. 1088–1095, 2012.

SERPA-NETO, A. et al. The use of the pulse oximetric saturation/fraction of inspired oxygen ratio for risk stratification of patients with severe sepsis and septic shock. **J Crit Care**, v. 28, n. 5, 681-686, 2013.

SHIC, C. C. et al. Effects of SPAK on vascular reactivity and nitric oxide production in endotoxemic mice. **Eur J Pharmacol**, v. 814, p. 248-254, 2017.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R. Sepse: atualidades e perspectivas. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SOSZYNSKI, D. The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS – and psychological-stress-induced fever in rats. **Physiol Behav**, v. 72, n. 1-2, p. 65-72, 2001.

SOSZYNSKI, D.; CHELMINIAK, M. Intracerebroventricular injection of neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitors attenuates fever due to LPS in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 3, p. 551-561, 2007.

SOUZA, A. L. T. et al. Nurses' knowledge on septic shock. **Cienc Cuid Saude**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2018.

SPERANDEO, P.; DEHO, G.; POLISSI, A. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bactéria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 7, p. 594-602, 2009.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, n. 4-5, p. 325-330, 2001.

STERZ, F. et al. Hypothermia after cardiac arrest: a treatment that works. **Curr Opin Crit Care**, v. 9, n. 3, p. 205–210, 2003.

SUETRONG, B.; WALLEY, K. R. Lactic acidosis in sepsis: it's not all anaerobic: implications for diagnosis and management. **Chest**, v. 149, n. 1, p. 252-261, 2016.

TAYLOR, W. F.; BISHOP, V. S.A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. **Am J Physiol**, v. 264, n. 5, p. 1355-1359, 1993.

TEIXEIRA, B. C. et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **J. Vasc. Bras**, v. 13, n. 2, p. 108-115, 2014.

THOMAS, G.; DUFFIN-JONES, V. Monitoring arterial blood pressure. **Anesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 3, n. 3, p. 124-127, 2015.

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 437-55, 1999.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends Mol Med**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.

VINCENT J. L. et al. Working Group on "Sepsis-Related Problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med**, v. 26, n. 11, p. 1793-1800, 1998.

VINCENT, J. L. et al. Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Med**, v. 22, n. 7, p. 707-710, 1996.

VINCENT, J. L.; DE BACKER, D. Circulatory shocy. **N Engl Med**, v. 369, n.18, p. 1726-1734, 2013.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n. ½, p. 7-48, 1994.

XIE, M. et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nat Commum**, v. 7, p. 13280, 2016.

YANG, L. et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. **Nat Commum**, v. 5, p. 4436, 2014.

ZHAI, X. et al. Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. ID 8352727, 2018.

ZHANG, Z. et al. Prognostic value of B-type natriuretic peptide (BNP) and its potential role in guiding fluid therapy in critically ill septic patients. **Scand J Trauma Resusc Emerg Med**, v. 20, n. 86, p. 1-7, 2012.

ZHANG, Z.; CHEN, L.; NI, H. Antipyretic therapy in critically ill patients with sepsis: an interaction with body temperature. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121919, 2015.

ZHENG, Z. et al. Enhanced glycolytic metabolism contributes to cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis. **J Infect Dis**, v. 215, n. 9, p. 1396-1406, 2017.

ZHOU, X. et al. Aminoguanidine renders inducible nitric oxide synthase knockout mice more susceptible to Salmonella typhimurium infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 93-97, 2002.

ANEXO

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Influência do óxido nítrico sobre a temperatura corporal em ratos com sepse, sepse grave e choque séptico", protocolo nº 15.1.737.22.0, sob a responsabilidade de André Luiz Thomaz de Souza e Evelin Capellari Cárnio, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-EERP/USP) em reunião de 02/06/2016.

Vigência do Projeto	09/06/2016 a 01/06/2018
Espécie / Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	40
Peso / Idade	250g / 2 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 09 de junho de 2016.

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
Presidente da CEUA-EERP/USP

Avenida Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo
Fone: (16) 3315 4811 – Fax: (16) 3315 9197