UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

GUILHERME JUNIO PINHEIRO

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO DURANTE A FEBRE EM RATOS

BRASÍLIA, DF
2015

GUILHERME JUNIO PINHEIRO

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO DURANTE A FEBRE EM RATOS

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza

BRASÍLIA, DF
2015

GUILHERME JUNIO PINHEIRO

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO DURANTE A FEBRE EM RATOS

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
(FCE/ Universidade de Brasília)

_____

Profa. Dra. Djane Braz Duarte
(FS/ Universidade de Brasília)

_____

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASILIA, DF
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me acompanhar e guiar sempre meus passos. À minha família, principalmente a minha mãe Raimunda e meu padrasto Filho, por toda a ajuda, compreensão e esforços que fizeram ao longo desses anos para que eu conseguisse chegar onde estou, muito obrigado e espero um dia poder recompensa-los. Aos meus irmãos Rayssa, Gustavo, Maria Luisa e Rodrigo, por me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço imensamente a Fabiane, pelas oportunidades que me foram dadas, por todo o aprendizado, a confiança que depositou em mim nesses anos de iniciação cientifica.

À Marina pela companhia em laboratório, por sempre me ajudar seja em experimentos ou no que eu precisasse, serei sempre grato. À Marcela, pela ajuda nos experimentos, nas idas ao Biotério, e pelas historias engraçadas contadas na volta pra casa, meu muito obrigado.

Agradeço imensamente a Bruna, companheira de pesquisa durante anos, muito obrigado por tudo, por compartilhar e dividir comigo alegrias, desesperos, indecisões, nessa vida complicada de pesquisa, mas que meu deu de presente uma amizade sincera pra vida inteira.

Aos professores da Faculdade de Ceilândia, por sempre repassarem com prazer os seus conhecimentos, que me fizeram ser quem sou hoje.

Aos amigos que fiz durante esse tempo na Universidade de Brasília, obrigado, com vocês foi muito mais fácil chegar até aqui. Aos companheiros de republica, Alemão, Felipe, Guto, Kaio e o agregado Victor que também são os companheiros de copo e de assuntos sérios quando preciso, meu muito Obrigado. Aos amigos de intercâmbio, que se tornaram minha família durante uma das melhores experiências da minha vida, *merci beaucoup.*

RESUMO

A febre é o aumento da temperatura corporal decorrente de uma reação inflamatória de fase aguda. Estudos mostram que em reações inflamatórias ocorre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Dentre as várias espécies reativas nosso estudo analisou a produção de oxigênio singleto ($^1O_2$) durante a febre produzida pela administração de LPS. Neste trabalho foram utilizados Ratos Wistar fêmeas que foram submetidas à cirurgia de implante de transmissores de temperatura na cavidade intraperitoneal. Os animais receberam injeção endovenosa de LPS (5 µg/kg) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/Kg) e tiveram a temperatura corporal aferida a cada 10 minutos, durante 1h, 2,5h ou 6h após a injeção. Em seguida, os animais foram eutanasiados para a dissecação do hipotálamo e tecido adiposo marrom. A concentração de $^1O_2$ foi investigada por ressonância paramagnética eletrônica nesses tecidos utilizando-se o marcador de TEMP. Os resultados mostraram que há um aumento significativo na detecção de $^1O_2$ tanto no hipotálamo quanto no tecido adiposo marrom em animais do grupo LPS comparado com o grupo controle 2,5 h após a administração. Nos grupos de 1 h e 6 h apesar de haver uma tendência de aumento desta espécie reativa, não foram encontradas diferenças significativas. A avaliação temporal da concentração de $^1O_2$ revelou que o pico de aumento dessa espécie reativa no hipotálamo e tecido adiposo marrom coincidiu com o pico de elevação da temperatura corporal, o que sugere que as vias de produção de $^1O_2$ são ativadas e que podem ter papel relevante na patogênese da febre.

Palavras chaves: Febre. Lipopolissacarídeo. LPS. Radicais Livres. Oxigênio singleto. EPR.

ABSTRACT

Fever is the increasing of the body temperature for an acute phase inflammatory reaction. Studies have shown that in inflammatory reactions there is an increasing of the production of oxygen reactive species. Among the various reactive species, our study has assessed the production of singlet oxygen ($^1O_2$) during fever induced by the administration of LPS. This work was carried out with female Wistar rats that underwent a temperature transmitter's implant surgery in the intraperitoneal cavity. The animals received an intravenous injection of LPS (5 µg/kg) or its control (saline 0,9%, 2 mL/Kg), and had its body temperature measured every 10 minutes, during 1h, 2.5h, or 6h after the injection. After that, the animals were euthanized for the dissection of the hypothalamus and the brown adipose tissue. The $^1O_2$ concentration was assessed by electron paramagnetic resonance in these tissues, using the TEMP's marker. Results showed a significant increasing in the detection of $^1O_2$ both on hypothalamus and brown adipose tissue in animals of the LPS group, compared to the control group 2.5h after the administration. In groups 1h and 6h, despite the rising trend of this reactive specie, there was no significant differences found. The time-based evaluation of the $^1O_2$ concentration revealed that the peak increasing of this reactive specie in the hypothalamus and brown adipose tissue coincided with the peak elevation of the body temperature, therefore suggesting that the $^1O_2$ production pathways are activated, and may play a relevant role in the fever pathogenesis.

Keywords: Fever. Lipopolysaccharide. LPS. Free Radicals. Singlet oxygen. EPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos 10

Figura 2: Estrutura esquemática do lipopolissacarideo bacteriano.....12

Figura 3: Estados do O_2 segundo a teoria do Orbital Molecular.....15

Figura 4: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 1 h.....26

Figura 5: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 2,5 h.....27

Figura 6: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 6h.....28

Figura 7: Espectro típico do radical TEMPO no hipotálamo de animais 3 h após a administração de LPS ou Salina.....29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Caracterização das principais ERO's formadas *in vivo.*.....16

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AINE- antiinflamatório não esteroidal

AP-1 – *activatorprotein1*

ATP – adenina trifosfato

APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior

°C – graus Celsius

ERO's – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

EPR – ressonância paramagnética eletrônica

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

i.p – intraperitoneal

i.v – intravenoso

Kg – kilogramas

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

µg – micrograma

n – número de animais

LPS – lipopolissacarídeo bacteriano

MDP – muramil – dipeptideo

PAMP – padrão molecular associado a patógenos

SOD – peróxido dismutase

NO – oxido nítrico

NMDA – n-metil d-aspartato

O_2 – oxigênio diatômico

$^1O_2$ – oxigênio singleto

O_2^{*-} - radical superóxido

^{-}OH – radical hidroxil

SNC – sistema nervoso central

v – volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
1.1 Resposta febril 9
1.2 Pirógenos 10
1.3 Tecido adiposo marrom 12
1.4 Radicais livres 13
1.5 Espécies reativas de oxigênio – ERO's 14
1.6 Oxigênio singleto ($^1O_2$) 16
1.7 Espécies reativas de oxigênio e febre 17
2 JUSTIFICATIVA 19
3 OBJETIVOS 20
3.1 Objetivos gerais 20
3.2 Objetivos específicos 20
4 MATERIAS E MÉTODOS 21
4.1 Animais 21
4.2 Cirurgia para implante de transmissores de temperatura na cavidade peritoneal 21
4.3 Mensuração da temperatura corporal dos ratos 21
4.4 Procedimentos experimentais 22
4.5 Ressonância paramagnética eletrônica 22
4.6 Drogas 24
5 RESULTADOS 25
5.1 Efeito da administração intravenosa de LPS sobre a temperatura corporal e produção de oxigênio singleto em ratos 25
6 DISCUSSÃO 31
ANEXOS 38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta febril

A resposta febril é um dos componentes da resposta de fase aguda (REIS et al., 2011). Quando se tem um aumento da temperatura corporal, mecanismos de defesa são estimulados, tornando a resposta febril relevante para a proteção da integridade do corpo contra microrganismos invasores ou qualquer outra substância reconhecida como estranha pelas células imunes (BLATTEIS; SEHIC, 1998).

Não há uma resposta definitiva sobre a febre ser considerada benéfica ou prejudicial ao organismo (BARTFAI; CONTI, 2010). Dentre as funções da febre na resposta imune, pode ser enumerada a aceleração da quimiotaxia de neutrófilos e da secreção de substâncias antibacterianas, o aumento da produção dos interferons, a estimulação das fases de reconhecimento e sensibilização da resposta imunológica resultando em uma interação mais eficiente entre macrófago e linfócito T e a diminuição da disponibilidade de ferro, a qual limita a proliferação bacteriana e de alguns tumores (VOLTARELI, 1994). Apesar disso, em algumas situações, quando a temperatura atinge níveis muito elevados, como acima de 41ºC, pode ocorrer sequelas neuronais, delírios, malformações fetais e mesmo coma, sendo que nessas situações é indicada a terapia antipirética (HASDAY; FAIRCHILD; SHANHOLTZ, 2000; BRITO, 2011).

De acordo com BOULAN (2000), o aumento da temperatura corporal é decorrente da elevação do ponto de regulagem, chamado *set point*, localizado na área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA). Portanto é considerada a região mais importante para a homeostase da temperatura, já que a região pode identificar mudanças de temperatura local pela temperatura do fluxo sanguíneo e então ativar as respostas termorreguladoras para que se tenha a manutenção da temperatura corporal constante (BARTFAI; CONTI, 2010).

Algumas evidências mostram que os neurônios da APOHA fazem sinapses com os neurônios do trato espinotalâmico lateral, que é uma importante via ascendente responsável por transmitir informações a partir de termorreceptores na pele e medula espinhal para vários núcleos na formação reticular do tronco cerebral (BOULANT, 2000).

1.2 Pirógenos

De acordo com BARTFAI E CONTI (2010) pirógenos são substâncias que podem induzir febre e são classificados como endógenos ou exógenos. Para DINARELLO (2004), os pirógenos exógenos são os estímulos que induzem a resposta febril, incluindo os microorganismos e seus subprodutos.

A Figura 1 mostra a relação entre 3 diferentes tipos de neurônios localizados a APOHA. De acordo com esse modelo, os pirógenos e seus mediadores produzem febre por meio da inibição da taxa de disparos dos neurônios sensíveis ao calor, resultando em menor ativação de mecanismos de perda de calor. Eles também são responsáveis por modularem a taxa de disparos dos neurônios insensíveis à temperatura, que ativam neurônios sensíveis ao frio e, consequentemente, mecanismos de retenção e produção de calor. A alteração na taxa de disparos neuronais eleva o ponto de regulagem da temperatura no hipotálamo, e consequentemente promove aumento na temperatura corporal, por ativar mecanismos de retenção e produção de calor e inibir mecanismos de perda de calor (BOULANT, 2000).

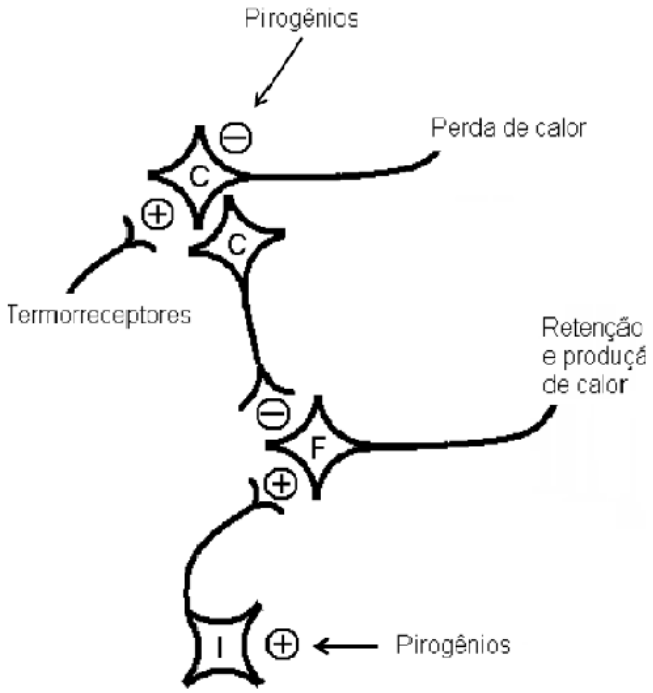

Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos na APOHA. C – neurônios sensíveis ao calor; F – neurônios sensíveis ao frio; I – neurônios insensíveis às variações de temperatura. (+) estimulação; (-) inibição. Fonte: adaptado de BOULANT et al (2000).

Vários componentes, provenientes tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas podem causar febre, tais como**,** peptideoglicanos, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), muramil-dipeptídeo (MDP), além de parasitas, micoplasmas, vírus e fungos.

Um dos modelos experimentais mais utilizados para a indução de febre em ratos é a injeção intravenosa de LPS, que produz aumento de temperatura com latência de aproximadamente 1,5h, permanecendo por cerca de 6 horas e reproduzindo o que ocorre nos processos infecciosos (FABRÍCIO *et al.*, 2005; REIS *et al.,* 2011). Bactérias gram-negativas possuem em sua membrana externa o lipopolissacarídeo, sendo um componente exclusivo deste grupo de bactérias e essencial para a estabilidade da membrana. O LPS confere maior patogenicidade às bactérias e dificulta a ação de neutralização pelos anticorpos, a ação dos antibióticos e outros estresses ambientais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O lipopolissacarídeo é composto por três domínios distintos, a cadeia de O-polissacarídeo, uma porção central de oligossacarídeo e o lipídeo A (Figura 2) (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002, LEON *et al*, 2008). A região mais externa é a região de O- polissacarídeo que consiste de um a oito resíduos de glicosídeo, sendo uma estrutura altamente variável. É o principal alvo antigênico das respostas imunes, sendo a porção mais distal da molécula. A porção de oligossacarídeo, diferentemente da anterior, é altamente conservada entre as diferentes estirpes e espécies (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002). O LPS é uma substância que estimula a imunidade natural, por isso pode ser considerado um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Existe uma porção altamente hidrofóbica da molécula, chamada de Lipídeo A ou endotoxina que se ancora na bicamada lipídica, e é ela a o responsável pela pirogenicidade da substância (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

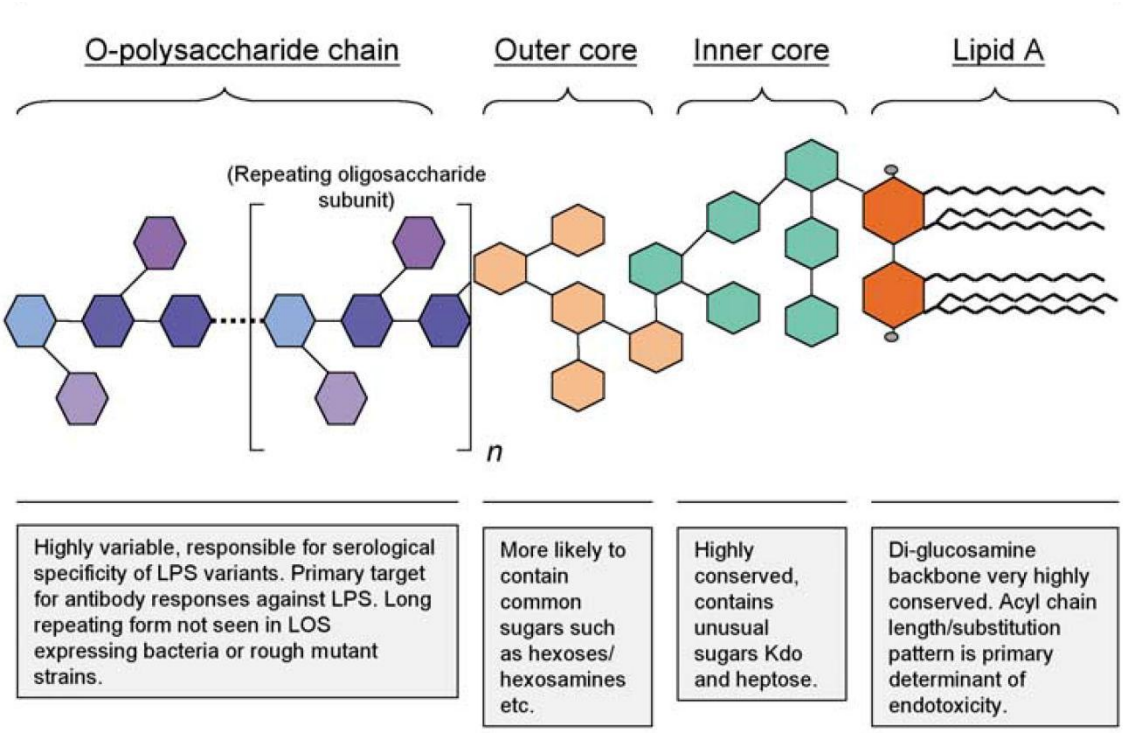

Figura 2: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

Fonte: ERRIDGE et al (2002).

1.3 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo marrom tem papel essencial na regulação da termogênese em mamíferos como roedores e crianças. Devido a sua localização interescapular e também nos gânglios simpáticos e ao redor da glândula adrenal e do rim, esse tecido pode ser responsável pela produção basal de calor para a manutenção da temperatura corporal em baixas temperaturas (MORRISON, et al., 2008).

Segundo GUYTON e colaboradores (2011), a epinefrina e a norepinefrina liberada pelo sistema nervoso simpático durante a febre atuam sobre o tecido adiposo marrom. Na adaptação crônica ao frio, grandes quantidades de epinefrina e norepinefrina podem ser liberadas induzindo a diferenciação do tecido adiposo branco (normalmente encontrado) para o tecido adiposo marrom. Neste tipo específico de adipócito, a estimulação simpática induz a biossíntese da termogenina, uma proteína desacopladora presente nas cristas mitocondriais. Seu papel é fornecer uma via alternativa para os prótons (H^+) passarem do espaço intermembranar da mitocôndria para a matriz mitocondrial sem passarem pela enzima ATP sintase.

Quando a termogenina está presente ela oferece um caminho bioenergeticamente mais favorável para os prótons voltarem à matriz mitocondrial, uma vez que não há a conservação da energia em ATP. Por outro lado, a energia química que foi gerada pela concentração do próton no espaço intermembranar é transformada em calor (GUYTON et al; 2011).

1.4 Radicais livres

Quando ocorre uma resposta inflamatória, são produzidos, dentre diversos outros produtos, os radicais livres, que são moléculas que desempenham um papel crucial no aparecimento e progressão da inflamação (CLOSA; FLOCH-PUY, 2004.). Nas primeiras fases do processo, os radicais livres exercem suas ações por meio da ativação de fatores nucleares, como NFkB ou AP-1 que induzem a síntese de citocinas. (CLOSA; FLOCH-PUY, 2004.).

Radical livre se refere a um átomo ou uma molécula altamente reativa, pois contém um número impar de elétrons na sua camada eletrônica. O não emparelhamento de elétrons em sua ultima camada é o que confere a alta reatividade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA et al., 1997). A existência de espécies químicas na forma de radical livre foi descrita pela primeira vez no ano de 1900 com a demonstração da decomposição do hexa-feniletano em dois radicais tri - fenilmetil (RIBEIRO et al., 2005). Mais de 30 anos depois Leonor Michaelis propôs que todas as reações de oxidação envolvendo moléculas orgânicas seriam mediadas por radicais livres, esta informação, no entanto estava errada, porém Michaelis estimulou o interesse para o papel dos radicais livres em processos biológicos (VOLODYMIR 2014). A partir disso, os estudos e as descobertas a cerca dos radicais livres tem aumentado gradativamente, cada vez mais reforçando o seu papel deletério no sistema biológico. Quando McCORD e FRIDOVICH (1969) descreveram pela primeira vez uma enzima que tinha capacidade de proteção contra os radicais livres, a peróxido dismutase, esse papel deletério dos radicais livres ficou evidenciado.

Embora os radicais livres possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Quando existe um equilíbrio entre a produção e a eliminação de

radicais livres, não ocorrem efeitos nocivos. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA; 1997).

Nutrientes e seus metabólitos, juntamente com antioxidantes essenciais desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase dos radicais livres, por exemplo, a glutationa que é um antioxidante produzido pelo organismo se inter-relaciona de forma sinérgica com a homeostase de radicais livres. A proporção entre radical livre e antioxidante deve ser mantida em humanos de diferentes idades e sob várias condições de vida, a fim de que o estresse oxidativo e seus danos sejam evitados ou amenizados antes do envelhecimento (FANG et al., 2004).

1.5 Espécies reativas de oxigênio – ERO’s

Na maioria das vezes os termos “Radicais livres’’ e ‘’Espécies Reativas e Oxigênio’’ são utilizadas sinonimamente por diversos autores podendo haver alguns equívocos**,** pois podem possuir diferentes significados. A Terminologia Espécies Reativas de Oxigênios (ERO’s) inclui as espécies Radicais livres e outras, que embora não possuam elétrons desemparelhados são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (RIBEIRO et al., 2005).

Segundo a teoria do Orbital molecular, a molécula de Oxigênio diatômico (O_2 = oxigênio molecular ou tripleto), em seu estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante π* como pode ser observado no esquema da Figura 3.

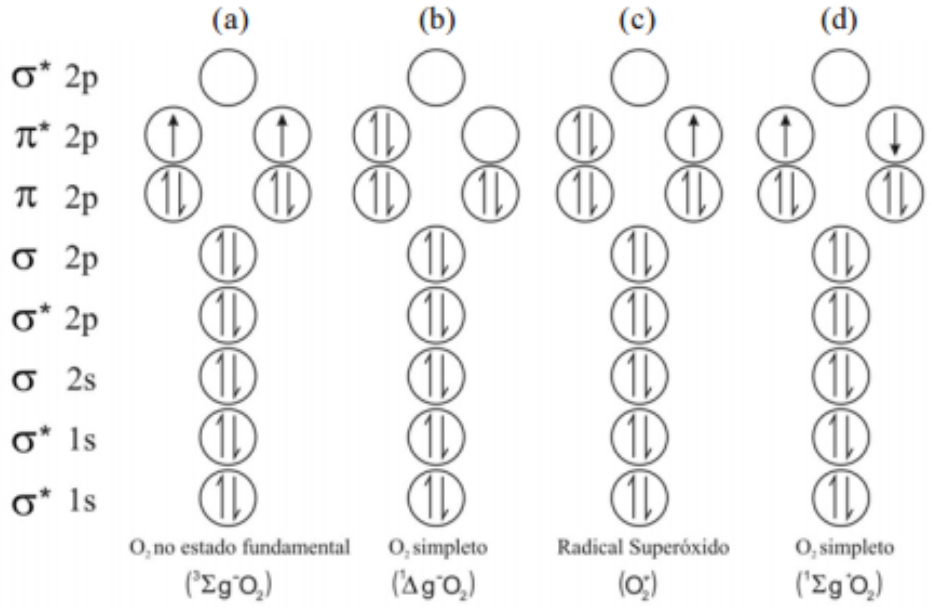

Figura 3: Estados do O_2 segundo a Teoria do Orbital molecular. Fonte: Adaptado de HALLIWEL; GUTTERIDGE (1990).

É possível perceber que os dois elétrons possuem spins paralelos, promovendo um estado tripleto, este fato restringe a reatividade da molécula, pois quando esta tenta oxidar outro átomo ou molécula, os elétrons que serão aceitos pelo oxigênio devem também possuir spins paralelos, ou seja, tripletos, para conservarem o número quântico de spins e continuarem nos orbitais vazios. Porém, tal condição é difícil de ser encontrada, pois a maioria das moléculas são não-radicais ligados covalentemente e os dois elétrons que formam uma ligação covalente têm spins opostos ocupando o mesmo orbital molecular, fazendo com que a reatividade do oxigênio com biomoléculas se restrinja pelo spin (HALLIWELL; GUTTERIDGE. 1990).

Existem duas formas de Oxigênio singleto ($^1O_2$), uma com dois elétrons em orbitais diferentes, (Figura 2d) que é uma forma muito instável e por isso antes de reagir com outras moléculas se converte em Δg, e outra na qual os elétrons ocupam o mesmo orbital (Figura 2b). Ainda de acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (1990) outras formas reativas do oxigênio de importância biológica podem ser formadas por reduções parciais do oxigênio originando as espécies reativas: radical superoxido (O_2^{*-}), peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (^{-}OH).

O Quadro 1 mostra algumas das espécies reativas de Oxigênio que são formadas *in vivo,* apresentando diferenças nos potenciais de reatividade e tempo de meia-vida.

Quadro 1: Caracterização das principais ERO's Formadas *in vivo*. Adaptado de RIBEIRO et al; (2005).

Intermediário	Comentário	Meia – Vida	Sítios de Formação
Radical superoxido	Formado a partir da redução parcial do Oxigênio molecular por 1 elétron.	Decomposição enzimática na velocidade de $5x10^5$ $M^{-1}seg^{-1}$ em pH 7,0	Reações de autoxidação envolvendo flavoproteinas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do Oxigênio molecular por 2 elétrons.	Decomposição enzimática.	Vias catalisadas por oxidades e pela peróxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do Oxigênio molecular por 3 elétrons na reações de Fenton e Haber-Weis, catalisada por metais.	10^{-9} seg	Locais adjacentes a formação de anion superoxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente Ferro
Radical alcoxil	Radical orgânico centrado no Oxigênio.	10^{-6} seg	Intermediário da peroxidação de lipídios de membrana.
Radical peroxil	Formados a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 seg	Intermediário da peroxidação de lipídios de membrana.
Oxigenio molecular simpleto	Primeiro estado excitado do Oxigênio molecular com nível de energia de 22kcal/mol, acima do estado fundamental ou do oxigênio tripleto	10^{-5} seg	Sem sítios metabólicos definidos.

1.6 Oxigênio singleto ($^1O_2$)

O $^1O_2$ pode interagir com outras moléculas de duas maneiras: por meio de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para estas moléculas e retornando ao estado fundamental. O último processo é conhecido como supressão física do $^1O_2$ e pode ser realizados por carotenóides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis dentre outros (RONSEIN et al. 2006.).

O $^1O_2$ é produzido por meio de diferentes reações desencadeadas no processo inflamatório.

Logo após a chegada dos neutrófilos nos sítios inflamatórios e subsequente ativação da NADPH oxidase, ocorre a formação dos radicais superóxidos que são convertidos em H_2O_2 espontaneamente ou por meio de catálise por meio da superóxido dismutase (SOD) (COSTA et al. 2005).

Metais de transição podem levar a formação de radical hidroxila, podendo reagir com acido hipocloroso, oxido nítrico ou peróxido nitrito para produzir $^1O_2$.

A produção de $^1O_2$ também tem sido evidenciada em meios biológicos por reações que envolvem enzimas como as peroxidases, tais como, lactoperoxidase, mieloperoxidase, cloroperoxidase e peroxidase de raiz forte. Também foram relatadas evidências da geração de $^1O_2$ na fagocitose, na reação de ozônio (O_3) com biomoléculas e no processo de lipoperoxidação (RONSEIN et al. 2006).

A mieloperoxidade é uma oxiredutase de H_2O_2 encontrada especificamente nos leucócitos da linhagem dos granulócitos de mamíferos incluindo neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos e produz HOCl, hidroperóxidos de lipídeos e íons cloreto para a obtenção de $^1O_2$. (COSTA et al 2006)

Estudos demonstram que ERO's e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) possuem um importante papel no processo inflamatório. COSTA e colaboradores (2008) demonstraram em seus experimentos *in vitro* que diversas classes de AINE's são potentes sequestradores de $^1O_2$.

1.7 Espécies reativas de oxigênio e febre

Estudos recentes mostram que a interação do LPS com o sistema imune pode ser detectada pelos grupamentos tiol contidos nas estruturas neuronais do cérebro. (RIEDEL et al, 2002). Grupos de tiol vicinal juntamente com o sitio modulador redox, n-metil d-aspartato (NMDA) possuem um ato receptor como um sensor redox no cérebro. Esta estrutura da membrana pós-sináptica responde ao oxido nítrico (NO) liberado pelo glutamato durante a excitação neuronal (RIEDEL et al, 2002).

Estudos sugerem um crescimento rápido de hidroperoxidos no plasma após a injeção de LPS em uma latência similar ao da febre. De acordo com RIEDEL (2002) a elevação de temperatura do corpo por pirógenos é induzida por uma alteração no

equilíbrio entre a produção de espécies derivadas de Oxigênio e defesas antioxidantes celulares. O estresse oxidativo pode ser detectado pelo cérebro como uma diminuição de grupos tiol, oxidados no local do sítio modulador redox de NMDA nos subtipos de receptores de glutamato. Isto implica que a constante de temperatura do corpo depende em grande parte de uma relação homeostasicamente regulada entre a quantidade de glutationa reduzida e a glutatinona oxidase no cérebro (RIEDEL et al 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A resposta febril é um processo multifatorial e seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente elucidados. Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a forma como os pirogênios exercem seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) (BANKS *et al*, 1991).

A investigação da produção de ERO's durante a febre induzida pela administração de LPS pode revelar vias de sinalização importantes para este processo e que poderão ser úteis para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos. Como algumas febres são resistentes aos tratamentos com antitérmicos convencionais, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de terapias farmacológicas mais específicas baseadas em mecanismos de ação distintos dos existentes atualmente e que sejam capazes de controlar a resposta febril com menor incidência de efeitos indesejáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar a produção temporal de Oxigênio singleto $^1O_2$ durante a febre em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a produção temporal de $^1O_2$ no hipotálamo de ratos controles e febris;
- Analisar a produção temporal de $^1O_2$ no tecido adiposo marrom de ratos controles e febris.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos (*Rattus novergicus*), variedade Wistar, fêmeas, pesando entre 180 e 200g. Os animais foram provenientes e alojados no Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em ambiente de temperatura de 24º±1ºC, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentos fornecidos *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos e os experimentos farmacológicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do IB/UnB, sempre no período das 08 às 18 h. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnBDoc n.33998/2015) (Anexo 1).

4.2 Cirurgia para implante de transmissores de temperatura na cavidade peritoneal

Para a mensuração da temperatura dos animais foram implantados transmissores de temperatura (Data LoggersSubcue, Calgary Canadá) na cavidade peritoneal dos ratos. Antes das cirurgias, os transmissores foram desinfectados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min). Os animais foram anestesiados com uso de uma mistura de ketamina e xilazina (60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após tricotomia e antissepsia da pele, foi feita uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos peritoniais. O transmissor foi lavado com solução salina estéril e então inserido na cavidade peritoneal e, em seguida, o músculo e a pele foram suturados separadamente. Esse procedimento foi realizado uma semana antes dos experimentos.

4.3 Mensuração da temperatura corporal dos ratos

A mensuração da temperatura corporal dos ratos durante os experimentos foi realizada por transmissores implantados na cavidade abdominal, descritos anteriormente. Os animais permaneceram na sala de experimentação por pelo menos 24 horas antes do início dos experimentos, para a ambientação dos mesmos.

Para o processo de leitura da temperatura corporal por telemetria, os transmissores implantados na cavidade peritoneal foram programados para serem acionados no dia anterior ao experimento. Para o cálculo da temperatura basal a temperatura corporal abdominal foi determinada pela média das 4 medições anteriores a qualquer tratamento. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, com a sala experimental tendo sua temperatura controlada a 27 ± 1°C (GORDON, 1990).

4.4 Procedimentos experimentais

A cada experimento foi utilizado um grupo diferente de animais, ou seja, cada animal foi utilizado apenas uma vez. Após o transporte dos animais para a sala de experimentação, os mesmos permaneceram em repouso por uma hora e só então suas temperaturas basais foram determinadas por 4 medidas, a intervalos de 10 minutos.

Os animais receberam injeção endovenosa de LPS (5 µg/kg) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/Kg). A dose de LPS usada foi padronizada para os experimentos em nosso laboratório (DA SILVA, 2013). A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 10 minutos, durante a duração do experimento. Após 1 h, 2,5 h ou 6 h os animais foram eutanasiados e então decapitados para a dissecação do hipotálamo e tecido adiposo marrom para análise de $^1O_2$.

Foram utilizados 3 animais por grupo experimental para a análise de $^1O_2$.

4.5 Ressonância paramagnética eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é uma técnica espectroscópica baseada na inversão de spin eletrônico. Assim, para que um material tenha sinal de EPR é necessário que, conforme a regra de Hund para preenchimento de orbitais eletrônicos, tenha um ou mais elétrons desemparelhados. A RPE diferente de outras técnicas de espectroscopia mantém os fótons de excitação da amostra com frequência fixa e varia o nível de energia entre os estados up-down de spin eletrônico por meio da aplicação de um campo magnético contínuo com magnitude variável. Quando, por efeito Zeeman induzido pelo campo magnético, a diferença de energia entre o estado down e up dos elétrons

desemparelhados do material, se igualam à energia das micro-ondas a amostra passa a absorvê-las e então o detector do espectrômetro acusa a ressonância paramagnética eletrônica. Mas, por uma questão da eletrônica utilizada, o que se registra nos equipamentos comerciais é a derivada da absorção das micro-ondas e não a absorção em si. Assim, um gráfico de EPR, no eixo das abscissas registra o valor do campo magnético aplicado e no eixo das ordenadas o valor da derivada da absorção das micro-ondas.

Por apresentarem elétrons desemparelhados, a detecção de radicais livres por EPR a princípio se apresenta como muito atraente. Porém na prática, por dois fatores, os mesmos são difíceis de serem detectados, o primeiro fator diz respeito à sua meia-vida extremamente curta em meio biológico e o segundo fator se deve ao tempo muito curto para decaimento dos spins excitados no estado up para o estado down implicando em uma largura de transição extremamente longa, impossibilitando o seu registro pelos equipamentos convencionais.

Os problemas citados são superados pela utilização de marcadores de spin que se ligam aos radicais livres eliminando a sua reatividade e excreção pelos sistemas biológicos. Por sua vez os marcadores de spin somente apresentam sinal de EPR quando ligados a um radical livre. Desse modo a intensidade do sinal de EPR de uma amostra com marcadores de spin é uma medida direta da quantidade de radicais livres que havia na amostra quando da aplicação dos marcadores.

Neste estudo foi utilizado o marcador TEMP (Sigma), seletivo para a detecção de $^{1}O_{2}$. Os hipotálamos e tecido adiposo marrom foram imersos em microtubos contendo 20 µL de TEMP em tampão PBS, na concentração de 20 mM em seguida foram pesados e foi adicionado mais uma quantidade de solução TEMP de acordo com a massa dos tecidos, para que assim ambos possuíssem a mesma relação entre quantidade de massa de tecido e de marcador. Os microtubos foram incubados a temperatura ambiente durante 30 min e, em seguida foram centrifugadas e retiradas alíquotas de 20 µL das amostras e foram aplicadas em capilares de vidro de para a determinação da produção de $^{1}O_{2}$ em EPR.

As medidas de EPR foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX500, utilizando a banda X (9,35 GHz), potência 20mW e campo de modulação de 1 Gauss. Os parâmetros e a análise dos dados foram baseados em metodologia padronizada e adaptados de acordo com as necessidades do nosso estudo.

4.6 Drogas

As seguintes drogas foram usadas nos experimentos:

Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina®, Pfizer, São Paulo, Brasil);

Dexametasona (Azium®, Mantecorp Ind. Quím. e Farm. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil);

Cloridrato de S (+) cetamina (Ketamin®, Cristália, São Paulo, Brasil);

Xilazina 2% (Calmiun®,Agener União, São Paulo, Brasil);

LPS (endotoxina de E. coli0111:B4, Sigma ChemCo., St. Louis, EUA).

5 RESULTADOS

Foi realizado um estudo piloto para otimização das condições do experimento em hipotálamos, utilizando diversas concentrações e tempos em solução TEMP afim de se padronizar os melhores parâmetros e melhor leitura do espectro em aparelho de EPR para realização deste estudo. Hipotálamos foram imersos em solução TEMP durante 15 ou 30 min, na concentração de 10 ou 20 mM e macerando ou não os tecidos.

Tempo	15 min	30 min
Concentração	10mM	20mM
Maceração	Não	Sim

Estudo piloto para otimização das condições do experimento em hipotálamos.

Nesta padronização foi observado que amostras não maceradas imersas durante 30 min em solução TEMP na concentração de 20mM obtiveram uma melhor leitura em EPR.

5.1 Efeito da administração intravenosa de LPS sobre a temperatura corporal e produção de oxigênio singleto em ratos

Os animais receberam LPS ou solução salina 0,9% e após 1 h, 2,5 h ou 6 h da administração foram eutanasiados e tiveram seus hipotálamos e tecido adiposo marrom dissecados para análise da concentração de $^1O_2$.

A elevação da temperatura iniciou-se logo após a injeção de LPS (Figura 4A). Entretanto este aumento inicial deve-se provavelmente ao manuseio dos animais para a injeção intravenosa visto que foi observado tanto no grupo tratado com LPS quanto no grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de $^1O_2$ no hipotálamo (Figura 4B) e no tecido adiposo marrom (Figura 4C) 1 h após a administração de LPS.

Duas horas e meia após a injeção verificou-se elevação significativa da temperatura corporal nos animais tratados com LPS (Figura 5A). Este resultado segue o padrão de resposta febril induzida por esse estímulo em ratos. Neste tempo, também houve aumento significativo na concentração de $^1O_2$ em cerca de 69% no hipotálamo (Figura 5B) e de 116% no tecido adiposo marrom (Figura 5C).

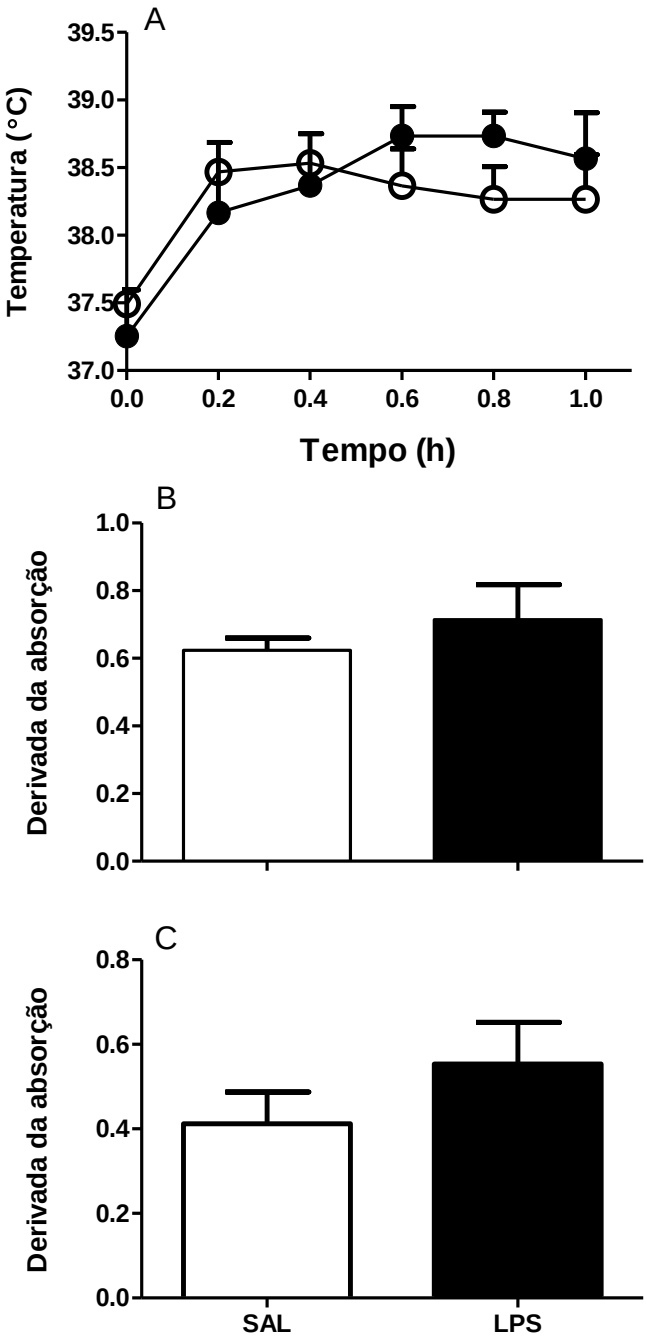

Figura 4: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 1 h. Os animais receberam LPS (símbolos cheios) por via intravenosa na dose de 5 µg/Kg/mL, ou o mesmo volume de solução salina 0,9% (símbolos vazios). No painel A os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. Nos painéis B e C as colunas representam a derivada de absorção de $^1O_2$ nos grupos tratados com solução salina (SAL) ou LPS no hipotálamo e tecido adiposo marrom, respectivamente, 1 h após a injeção. (n= 3).

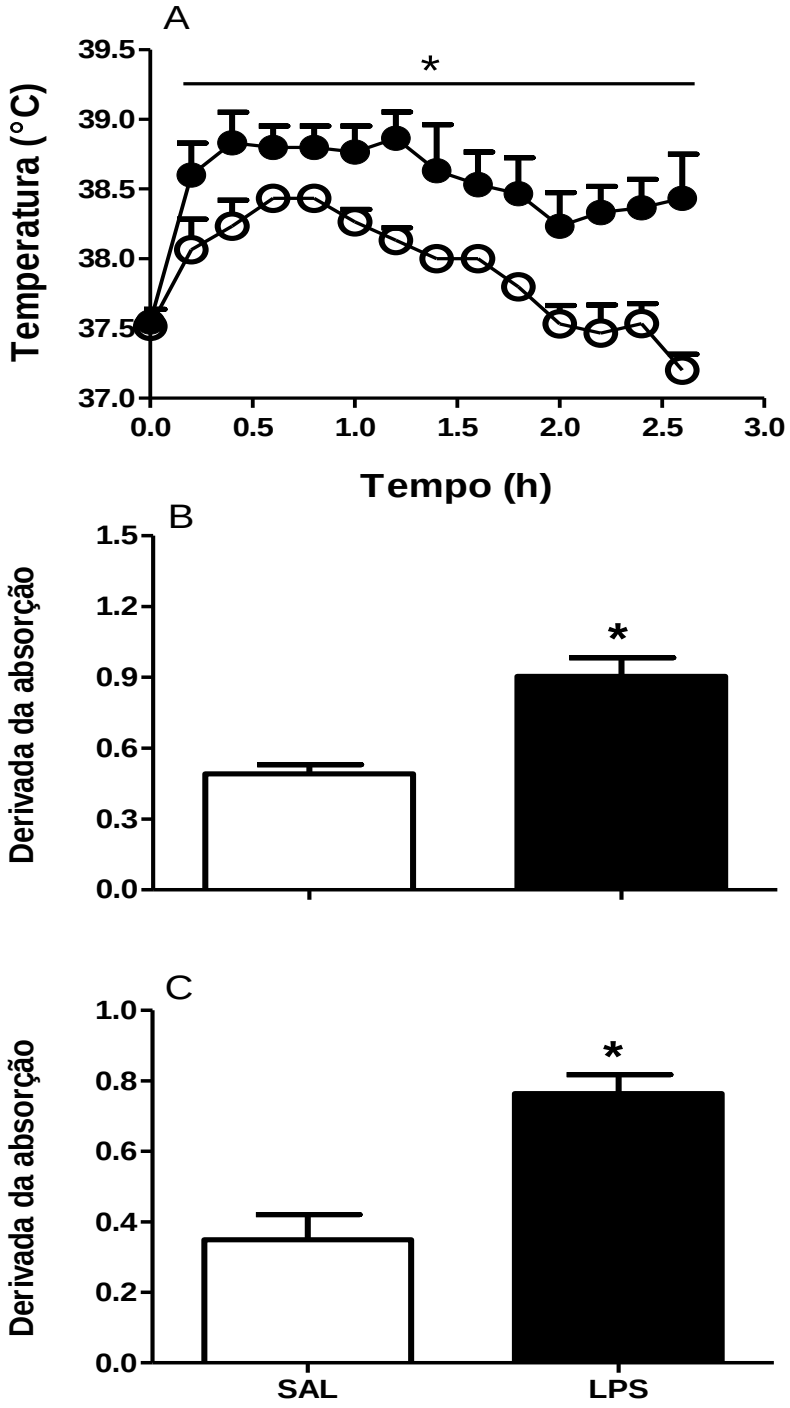

Figura 5: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 2,5h. Os animais receberam LPS (símbolos cheios) por via intravenosa na dose de 5 µg/Kg/mL, ou o mesmo volume de solução salina 0,9% (símbolos vazios). No painel A os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. Nos painéis B e C as colunas representam a derivada de absorção de $^1O_2$ nos grupos tratados com solução salina (SAL) ou LPS no hipotálamo e tecido adiposo marrom, respectivamente, 2,5 h após a injeção. (n= 4). *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

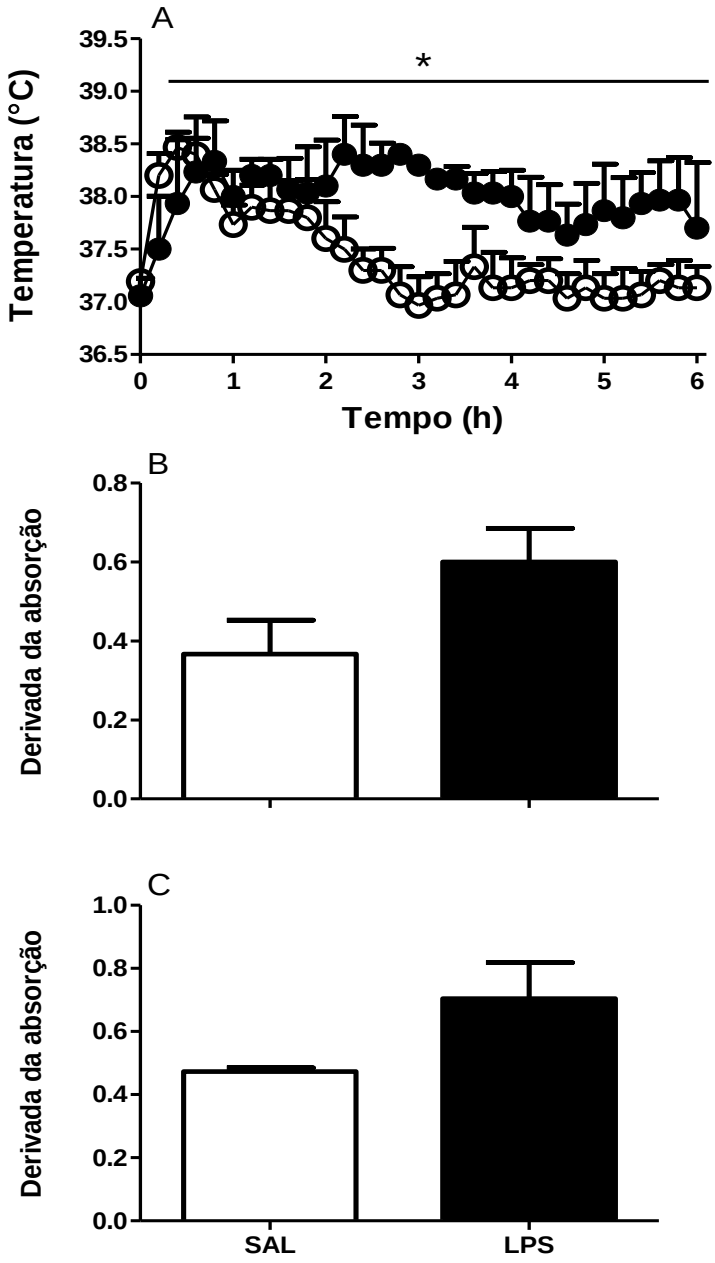

Figura 6: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal e produção de $^1O_2$ após 6h. Os animais receberam LPS (símbolos cheios) por via intravenosa na dose de 5 µg/Kg, ou o mesmo volume de solução salina 0,9% (símbolos vazios). No painel A os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. Nos painéis B e C as colunas representam a derivada de absorção de $^1O_2$ nos grupos tratados com solução salina (SAL) ou LPS no hipotálamo e tecido adiposo marrom, respectivamente, 6 h após a injeção. (n= 3). *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

No tempo de 6 h após a injeção de LPS verifica-se que a temperatura corporal dos animais já se encontra na fase de defervescência (Figura 6A). A concentração de $^1O_2$ no hipotálamo (Figura 6B) e tecido adiposo marrom (Figura 6C) também se encontram reduzidas em relação ao tempo de 2.5 h e, embora o grupo LPS apresente elevação de $^1O_2$ em ambos os tecidos, não foram verificadas diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle.

A Figura 7 apresenta o espectro típico do radical TEMPO no hipotálamo de animais 3 h após a administração de LPS ou Salina.

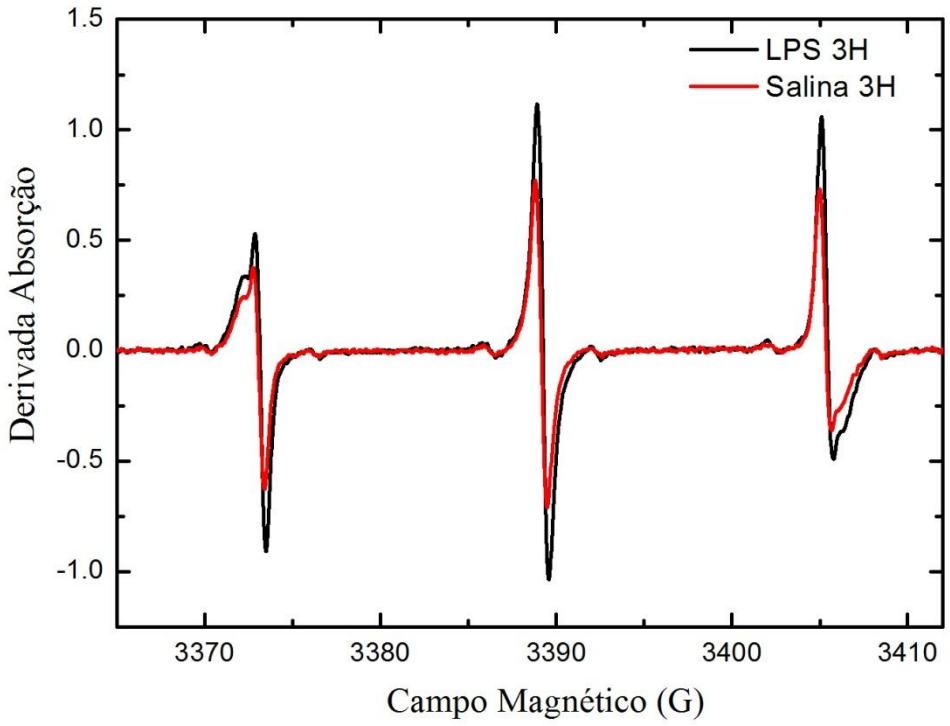

Figura 7: Espectro típico do radical TEMPO no hipotálamo de animais 3 h após a administração de LPS ou Salina.

6 DISCUSSÃO

Com o avanço das técnicas de biologia molecular nos últimos anos, a investigação dos mecanismos moleculares e bioquímicos associados à patogênese de diversas doenças tem aumentado consideravelmente. Este estudo teve como objetivo investigar a produção de EROS, especialmente $^1O_2$ durante a febre em ratos.

O LPS desencadeia uma reação inflamatória liberando grandes quantidades de mediadores que possibilitam que o hospedeiro responda ao patógeno invasor (IANARO; TERSIGNI; D'ACQUISITO, 2009). O LPS é um pirógeno exógeno usado rotineiramente nos estudos experimentais de febre, visto que sua administração provoca respostas que mimetizam as reações que acontecem durante a infecção do organismo por bactérias Gram-negativas (MICHIE *et al*.,1988; REIS *et al.,* 2011).

A dose de LPS utilizada nesse estudo (5 µg/Kg, iv) induziu resposta febril moderada e contínua. Logo após a injeção verificou-se elevação da temperatura corporal, porém não foi significativa e ocorreu provavelmente devido ao estresse que os animais sofreram durante a administração do LPS ou salina. O pico de aumento de temperatura ocorreu de 2.5 a 3 h após a administração de LPS. Cerca de 6 h após a injeção, a temperatura corporal dos animais já estava na etapa de defervescência. Desta forma, os tempos de coleta dos hipotálamos de 1, 2.5 e 6 h após a injeção de LPS foram selecionados buscando-se avaliar a produção de $^1O_2$ na fase inicial, no pico e no término da febre.

A curva temporal de elevação da temperatura verificada em nosso estudo é semelhante ao descrito na literatura para a resposta típica a doses moderadas de LPS (SOARES et al., 2011). Sabe-se que administração sistêmica de LPS pode induzir febre monofásica, multifásica ou hipertermia, dependendo da dose, via de administração e temperatura ambiente (ROMANOVSKY *et al*., 1998).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um aumento da produção de $^1O_2$ no hipotálamo e tecido adiposo marrom 2.5 h após a administração de LPS em ratos. Nos demais tempos avaliados, apesar de haver um aumento, não se observou diferença significativa em comparação ao grupo controle.

O aumento na produção de EROS no cérebro após o tratamento com LPS já foi documentado em roedores. Verificou-se elevação na produção de ânions

superóxidos 2 h (CLEMENT et al., 2010) e 3 h após a administração periférica de LPS em camundongos (MULLER; SCHARZ., 2008).

SHABALINA e colaboradores (2014) analisaram os mecanismos moleculares associados a produção de ERO's induzida por diferentes substratos no tecido adiposo marrom de camundongos e destacaram a participação de proteínas do tipo UCPs. SANCHES-AVALEZ sugeriram que a produção de EROS induzida por metanfetamina seja um componente importante para o desenvolvimento de hipertermia durante o abuso de metanfetamina.

As ERO's possuem importante papel na inflamação, como por exemplo, o NO na regulação de tônus vascular, O_2 na proliferação dos fibroblastos, H_2O_2 na ativação de fatores de transcrição de NFkB. As ERO's, também estão relacionadas com a modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade, danos no DNA, dentre outros (WINROW et al, 1993).

O aumento na produção de EROS tem sido verificado em modelos de choque séptico, inflamação, dor e doenças neurodegenerativas e associado a patogênese dessas condições (PAWATE et al., 2004; VIGGIANO et al., 2005; MIRSHAFIEY; MOHSENZADEGAN, 2008; CLEMENT et al., 2010; TREVISAN et al., 2014; JAZVINSCAK et al., 2015)

A OH é considerada a mais tóxica dos radicais à base de oxigênio e causa grandes problemas no interior das células, particularmente em macromoléculas.

Sabe-se que o LPS promove a secreção de TNF-α em diversos tipos celulares e, consequentemente, a ativação de NF-κB, que pode ter um papel importante no desenvolvimento da resposta febril (COMSTOCK *et al*. 1998). O fator de transcrição NF-kB é relatado como sendo o sensor de oxigênio na endotoxemia induzida por LPS (BHATTACHARYYA et al, 2004).

No estudo de BHATTACHARYYA e colaboradores (2004) detectou-se que a sequência de reações patogênicas mediadas pelo LPS, que conduz à produção de sepse, envolve as ERO's. Entre as ERO's, o radical OH seja isoladamente ou em combinação com o peroxinitrito, produz danos nos tecidos frequentemente observados durante uma lesão séptica. A inativação destes radicais por antioxidantes pode ser útil para a proteção contra sepse, mas a aplicação desses agentes como fármacos em seres humanos ainda não foi totalmente bem sucedido. Tendo em vista que cada ERO pode contribuir de diferentes maneiras no organismo é importante que se estude cada espécie reativa individualmente. O $^1O_2$ é uma

forma molecular de oxigênio que é capaz de reagir biologicamente com uma variedade importante de substratos. O $^1O_2$ pode estar envolvido em uma série de efeitos ambientais e de saúde, bem como nos efeitos terapêuticos de alguns medicamentos e na fotoquimioterapia.

Foi descrito um sistema que permite a avaliação dos efeitos de $^1O_2$ em amostras biológicas, na ausência de outras espécies reativas. O sistema faz uso de fotossensibilização, um meio muito eficiente de gerar $^1O_2$. Os resultados vistos com este sistema podem ser atribuídos ao $^1O_2$ e confirmada por medição do tempo de vida do intermediário reativo. Neste mesmo estudo foram analisados o fator protetor de oxigênio singleto tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas visto que o LPS funciona como uma barreira para proteção da bactéria contra invasores do meio externo. Várias espécies de bactérias gram-negativas e gram positivas foram depositadas em filtros de membranas e em sequência expostas ao $^1O_2$ e como resultado, tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas morreram rapidamente quando em contato com o $^1O_2$, neste estudo foi sugerido que o $^1O_2$ é um dos meios de proteção produzidos pelo sistema imunológico, porém este estudo por ser *in vitro* necessita de mais experimentos (DAHL et al; 1988). Nosso estudo teve como foco a análise da produção de $^1O_2$ durante a febre em ratos e os dados demonstraram aumento na concentração dessa ERO juntamente com o pico de resposta febril. Estudo realizado por COSTA e colaboradores (2008) demonstrou que fármacos como a dipirona são potentes sequestradores de $^1O_2$ *in vitro* e sugere que este efeito contribua para a antipirese exercida por este fármaco. Até o presente momento não encontramos relatos na literatura sobre a produção de $^1O_2$ durante a febre. Nossos resultados são preliminares, mas indicam que ocorre aumento da produção de $^1O_2$ durante a febre e que essa ERO possa desempenhar papel importante para a elevação da temperatura, tendo em vista seu aumento tanto no hipotálamo quanto no tecido adiposo marrom. Mais estudos precisam ser realizados para melhor caracterização da participação das EROS durante a febre.

7 CONCLUSÃO

A febre é uma condição clínica muito comum, mas os mecanismos envolvidos em sua gênese ainda não estão completamente esclarecidos. A análise da produção de EROS durante a febre pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos. Nossos dados revelaram aumento na concentração de $^{1}O_2$ no hipotálamo e tecido adiposo marrom de ratos durante a febre induzida por LPS e indicam que essa ERO possa desempenhar papel importante para que ocorra a elevação da temperatura corporal. Mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

BANKS, W.A., et al. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism.**J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 259, p. 988–996. 1991.

BARTFAI, T., CONTI, B. Fever. **ScientificWorldJournal**, v.16, n.10, p. 290-503, mar. 2010.

BLATTEIS, C.M., SEHIC, E. Cytokines and fever**. Ann. NY Acad. Sci**, v. 840, p. 608–618. 1998.

BOULAN, J.A. Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in the Thermoregulation and Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. S157-S161. 2000.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed.**Journal of Endotoxin Research**, v.10, p. 201-222. 2004.

ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., POXTON,I. R. Structure and function of lipopolysaccharides.**Microbes Infect**., v. 4, n. 8, p. 837-851, jul. 2002.

FANG YZ., YANG S., WU G., Free radical homeostasis. Sheng **Li Ke Xue Jin Zhan**, **Beijing**. v. 35 p. 199-204. 2004.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Revista Assistencia Médica Brasil**. v. 43. n. 1 p. 8-61. 1997.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** v. 12. 2011.

HASDAY, J.D., FAIRCHILD, K.D., SHANHOLTZ,C. The role of fever in the infected host. **Microbes and infection**, v.2, p.1891-1904. 2000.

HALLIWELL, B. ; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overwiew. **Methods in Enzymology**, New work, v.186 (part B), p. 1-85, 1990.

IANARO, A., TERSIGNI, M., D'ACQUISITO, F.New insight in LPS Antagonist.**Mini Rev Med Chem.**, v. 9, p. 306-317. 2009.

J.M. MCCORD, I. FRIDOVICH, Superoxide dismutase. An enzymic function Fo erythrocuprein (hemocuprein), **J. Biol. Chem**. v.244 p. 6049–6055. 1969.

JAZVINSCAK J. M., HOF P.R., SIMIC G. Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and A β Accumulation. **Oxid Med Cell Longev.** 2005.

LEON, C.G. et al. Discovery and Development of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists: A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases.**Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1751-1761, ago. 2008.

MICHIE, H. R. et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery,** v. 104, n. 2, p. 280-6. 1988.

MIRSHAFIEY, A; MOHSERNZADEGAN M. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v.7, p. 195-202, 2008.

MORRISON, S.F., NAKAMURA, K., MADDEN, C.J. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp Physiol**, v. 93, n. 7, p. 773-797, 2008.

RAETZ C. R; WHITFIELD C.Lipopolysaccharide endotoxins**. Annu Rev Biochem,** v. 71, p. 635-700. 2002.

REIS, R. C. et al. Central substance P NK_1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1β and CCL3/MIP-1α in rats. **Brain Res**., v.12, p.161-169. 2011.

RIBEIRO, S.M.R., QUEIROZ, J.H., PELUZO, M.C.G., COSTA, N.M.B., MATTA, S.L.P. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.; Uberlândia**, v. 21, n. 3, p. 133-149. 2005.

ROMANOVSKY A.A., et al. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic **Am J Physiol**.,vol. 275, p. R332-R338. 1998.

ONSEIN, G. E.; SAYURI MIYAMOTO, ETELVINO BECHARA, PAOLO DI MACSIO; GLAUCIA MARTINEZ. **Quimica Nova**, São Paulo v. 29, 2006.

SOARES DM, CRISTOFFOLETI R, MELO MC, LINDSEY CJ, VEIGA-SOUZA FH, FABRICIO AS, SOUZA GE. Cyclooxygenase-independent mechanism of ibuprofen-induced antipyresis: the role of central vasopressin V_1 receptors. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 25, p. 670-681, 2011.

SHABALINA , I.G. , VRABACKYM. PECINOVA, A. KALINOVICHAV, NEDERGAARD V. ROS production in brown adipose tissue mitochondria : the question of UCP1-dependence. **Biochim Biophys Acta**. 2014.

PAWATE, S., SHEN, Q., FAN, F., BHAT, N.R., Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. **J Neuroscience Res**, v.77, n.4, p. 540-551. 2004.

TREVISAN G, HOFFMEISTER C, ROSSATO MF, OLIVEIRA SM, SILVA MA, SILVA CR, FUSI C, TONELLO R, MINOCCI D, GUERRA GP, MATERAZZI S, NASSINI R, GEPPETI P, FERREIRA J. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. **Free Radic Biol Med,** v.72 p.200-209, 2014.

VIGGIANO A, MONDA M, CHIEFARI M, AURILIO C, LUCA B. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. **Brain Res,** v.1050, p. 72-78, 2005.

VOLTARELLI J.C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**. vol. 27, n.1/2, p. 7-48, jan./jun. 1994.

XIAO, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription.**Cellular & Molecular Immunology,** v. 1, p. 425–433. 2004.

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 5 de maio de 2015.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UnB

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES DURANTE A FEBRE EM RATOS."**, UnBDoC n.º 33998/2015, sob responsabilidade da Professora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus: 48.* A presente aprovação é válida pelo período de 05/05/2015 a 31/07/2017.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA Comitê de Ética no Uso Animal UnB

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.