



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

THAYANNE NARA DA ROCHA

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO NO HIPOTÁLAMO, DURANTE A FEBRE EM RATOS**

Brasília

2016

THAYANNE NARA DA ROCHA

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO NO HIPOTÁLAMO, 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: Prof.^a Dr.^a Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

Brasília

2016

ROCHA, Thyanne Nara.

Análise Quantitativa Da Produção De Espécies Reativas De Oxigênio No Hipotálamo, Durante A Febre Em RATOS/Thyanne Nara da Rocha. Brasília. UnB/ Faculdade de Ceilândia, Distrito Federal-Brasília, 2016.

43p.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico.

Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Distrito Federal – Brasília – DF.

THAYANNE NARA DA ROCHA

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO NO HIPOTÁLAMO, DURANTE A FEBRE EM RATOS**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
(Universidade de Brasília/ Faculdade de Ceilândia)

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
(Universidade de Brasília/ Faculdade de Ceilândia)

Profa. Dr.^a Vivian da Silva Santos
(Universidade de Brasília/ Faculdade de Ceilândia)

Brasília

2016

A Deus, por toda a força e determinação durante esta longa caminhada. Aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Acredito que qualquer que seja a trajetória, é impossível alcançar alguma coisa sem que pra isso tenhamos ajuda direta ou indireta de alguém. Nessa conquista não fui autossuficiente. Por isso, faz-se necessário demonstrar minha gratidão a todos os que fizeram parte e contribuíram de alguma forma para essa conquista. Sou imensamente grata:

A Deus, pois sem ele não seria capaz de transpor todos os desafios da jornada que me trouxe até aqui.

Sou grata aos meus pais, Corino e Maria, por terem transmitido os valores fundamentais para minha formação como indivíduo e por serem substanciais em todas as minhas conquistas. A minha Mãe agradeço por todas as orações, sacrifícios e lutas diárias que me permitiram chegar até aqui. Agradeço aos meus irmãos Bruno e Denise e a todos os meus tios que sempre me apoiaram e acreditaram que eu era capaz, principalmente ao meu tio Geraldo que me ajudou quando mais precisei.

A todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial à Professora Dra. Fabiane, que foi uma das responsáveis pela realização deste trabalho e que soube, com paciência e calma, me orientar quando nada parecia dar certo.

Aos meus amigos que compartilharam momentos de alegrias, tristezas e angústias. Esses se tornaram irmãos que pude escolher para me acompanhar nessa caminhada. A Jady, Muryel, Priscila, Letícia, Mariana, Cida e a todos que pude conhecer na UnB, mas não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém.

Agradeço também a equipe do laboratório de bioquímica e química de proteínas do IB que ajudaram no preparo e na coleta das amostras: Bruna, Marina, Jardeson, Maria Luiza, Thays e Lusiane. O meu muito obrigado, sem vocês não seria possível a realização desse trabalho.

Por fim agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) que financiou esse estudo.

Sou grata a oportunidade. Sou grata ao conhecimento que me foi apresentado. E, por fim, sou grata por essa etapa vencida.

RESUMO

A febre é uma resposta fisiológica comum a infecções, inflamações e trauma. Pode ser caracterizada como um aumento na temperatura corporal acima do intervalo normal. Quando ocorre o processo febril são liberados diversos mediadores pró e antiinflamatórios que estimulam resposta imune adaptativa. O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de parede de bactérias gram-negativas é responsável por sintomas de febre e hipotensão, além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e agravar doenças patológicas. Estudos sugerem que as EROS possuem papel importante no controle de muitos processos fisiológicos, principalmente na defesa contra infecções bacterianas. Este estudo avaliou a quantidade de EROS produzida no hipotálamo de ratos após a administração de LPS (5 µg/kg) e salina (salina 0,9%, 2 mL/Kg). Os animais tiveram sua temperatura corporal aferida a cada 15 minutos, durante 6 h. Em seguida os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação para a retirada do hipotálamo. Para a quantificação de EROS foi utilizado o marcador de spin CMH e a leitura foi feita por ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Os resultados do presente estudo demonstram que não há diferença estatística na concentração hipotalâmica de EROS entre os animais tratados com LPS e os animais tratados com salina. Esse resultado foi inesperado, visto que o sistema nervoso central apresenta pouca atividade antioxidante e elevada afinidade com o oxigênio. Novos experimentos estão sendo realizados em nosso laboratório a fim de confirmar esses resultados, visto que as EROS são de vital importância em processos celulares.

Palavras-chave: Febre. EROS. LPS. Ressonância paramagnética eletrônica. Hipotálamo.

ABSTRACT

Fever is a common physiological response to infections, inflammation, and trauma. It can be characterized as an increase in body temperature above the normal range. When the febrile process occurs several pro and anti-inflammatory mediators are released that stimulate adaptive immune response. Lipopolysaccharide (LPS) a gram-negative bacterial wall endotoxin is responsible for symptoms of fever and hypotension, aggravate pathological diseases besides stimulating a production of reactive oxygen species (ROS). Studies suggest that ROS plays an important role in the control of many physiological processes, especially in defense against bacterial infections. This study evaluated the level of ROS in rat hypothalamus after administration of LPS (5 µg / kg) or saline (0.9% saline, 2 mL / kg). The animals had their body temperature measured every 15 minutes for 6 h. The animals were then anesthetized and euthanized for dissection of the hypothalamus. For ROS detection the spin probe CMH was used and quantification was done by electronic paramagnetic resonance (EPR). The results of the present study do not present a statistical difference in the level of ROS in hypothalamus of animals treated with LPS and the animals treated with saline. These results were unexpected, since the Central nervous system has little antioxidant activity and high affinity with oxygen. New experiments are being carried out in our laboratory to confirm these results, since EROS are of vital importance in cellular processes.

Key words: Fever. ROS. LPS. Electronic paramagnetic resonance. Hypothalamus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Resposta febril induzida por pirógenos na APOHA.....16
- Figura 2:** Mecanismo clássico de indução da febre.....19
- Figura 3:** Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio.....22
- Figura 4:** Método de preparo de amostra para quantificação de EROS em RPE.....24
- Figura 5:** Perfil temporal da variação de temperatura após administração de salina e LPS em ratos.....31
- Figura 6:** Amplitude do sinal de RPE em função de [CP•] em amostras de calibração de [CP•] dissolvidas em tampão Krebs-Hepes.....32
- Figura 7:** Concentração de EROS no hipotálamo de ratos após a administração endovenosa de LPS ou salina.....33

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico

APOHA: área pré-óptica do hipotálamo anterior

APO: área pré- óptica

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

°C: graus Celsius

Ca: Cálcio

Cm: centímetros

CMH: (1-hidroxi-3-metilcarbonil-2,2,5,5 tetrametilpirrolidina)

COX: ciclooxigenase

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

DHE: dihidroetidium

DNA: ácido desoxirribonucleico

eNOS: enzima oxido nítrico sintase endotelial

ERNS: espécies reativas de nitrogênio

EROS: espécies reativas de oxigênio

ET-1: endotelina 1

g: grama

GMPc: Guanosina Monofosfato cíclico

GSH: glutationa

GPx: glutationa-peroxidase

h: hora

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

IL: interleucina

iNOS: enzima oxido nítrico sintase induzida

i.p: intraperitoneal

i.v: intravenosa

Kg: quilograma

LPS: lipopolissacarídeo

mg: miligramas

min: minutos

mL: mililitros

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato

ON: óxido nítrico

NOS: enzima oxido nítrico sintase

NOX: NADPH oxidase

O₂: oxigênio

(¹O₂): oxigênio singleto

(O₃): ozônio

(O₂^{•-}): ânion superóxido

•OH: radical hidroxila

(ONOO⁻): peroxinitrito

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PFPF: fator pirogênico pré-formado

PG: prostaglandina

PRRs: receptor de reconhecimento de patógenos

RNA: ácido ribonucleico

RPE: ressonância paramagnética eletrônica

RPM: rotação por minuto

SNC: sistema nervoso central

SRIS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SOD: superóxido dismutase

TLR: *toll-like receptor*

TNF- α: fator de necrose tumoral α

µg: micrograma

µL: microlitro

v/v: volume/ volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Termorregulação e Febre.....	15
1.2 Pirógenos.....	17
1.3 EROS – Espécies reativas de oxigênio.....	20
1.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	22
1.5 Marcadores de Spin.....	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos gerais	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Drogas e reagentes.....	27
4.3 Cirurgia para Implante de Transmissores de Temperatura na Cavidade Peritoneal.....	28
4.4 Mensuração da Temperatura Corporal dos Ratos.....	28
4.5 Procedimentos Experimentais.....	28
4.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	29
4.7 Estatística	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	34

7. CONCLUSÃO.....	37
8. PERSPECTIVA	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS	42
Anexo 1	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Termorregulação e Febre

Termorregulação é o processo de controle da temperatura corporal de alguns seres vivos. Este controle é possível graças à coordenação entre a termogênese (produção de calor) e a termodispersão (liberação do calor). Ocorre principalmente para adaptação comportamental e ainda atua sobre as respostas autonômicas e endócrinas a fim de manter a homeostase térmica, pois pequenas mudanças na temperatura central podem levar alterações metabólicas e enzimáticas (FLOURIS, 2011).

A região pré-óptica do hipotálamo (APOHA) contém neurônios sensíveis a mudanças sutis na temperatura hipotalâmica e é capaz de receber estímulos somatossensoriais da pele e termorreceptores da coluna vertebral, podendo integrar informações térmicas centrais e periféricas (BOULANT, 2000; TANSEY et al., 2015). Além disso, coordena a ação de áreas eferoras inferiores como vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e tecidos endócrinos. Desta forma, quando os impulsos ficam abaixo ou acima do limiar de temperatura, ocorrem respostas termorreguladoras autonômicas, a fim de manter a temperatura corporal adequada (BENSENÖR; ATTA; MARTINS, 2002).

Neurônios termossensíveis da área pré-óptica também são afetados por substâncias como pirógenos, que ao diminuir a atividade dos neurônios sensíveis ao calor e aumentar a atividade dos neurônios sensíveis ao frio, causam febre provocando assim um aumento da temperatura corporal (BOULANT, 2000; REINALDO; BRAZ, 2005).

Segundo Boulant (2000) é possível classificar os neurônios da APOHA em 3 tipos. Os neurônios sensíveis ao frio correspondem a menos de 5% dos neurônios da área pré-óptica, os neurônios sensíveis ao calor são aproximadamente 30% e os neurônios insensíveis a temperatura correspondem a mais de 60% dos neurônios.

A Figura 1 mostra que os pirógenos inibem a frequência de disparos dos neurônios sensíveis ao calor, diminuindo assim os mecanismos de perda de calor e atuam inibindo os neurônios sensíveis ao frio. Essas alterações provocam um

aumento no ponto de equilíbrio do hipotálamo, provocando assim um aumento na temperatura corporal (BOULANT, 2000).

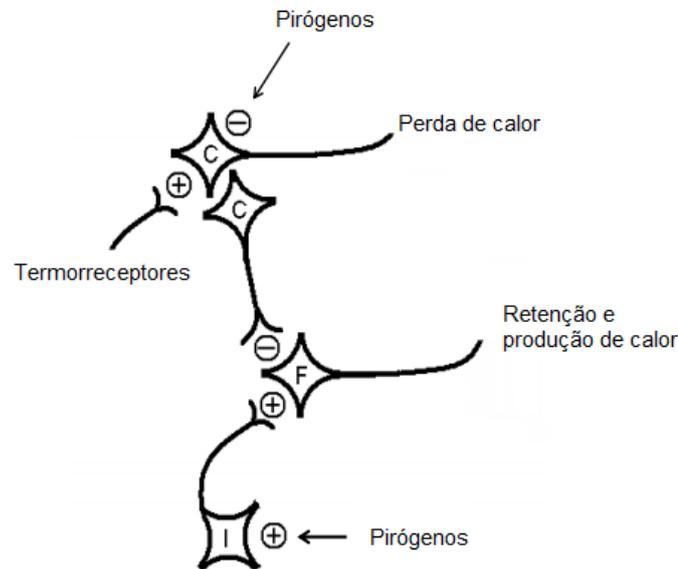


Figura 1: Resposta febril induzida por pirógenos na APOHA. C: Neurônios sensíveis ao calor; F: Neurônios sensíveis ao frio; I: neurônios insensíveis a variação de temperatura. (-) inibição; (+) estimulação. Adaptado de: BOULANT, 2000

A febre é uma resposta fisiológica comum a infecções, inflamações e trauma. Pode ser caracterizada como um aumento na temperatura corporal acima do intervalo normal, que em humanos mantém média constante de $37\text{ °C} \pm 0,6\text{ °C}$, devido oscilações habituais relacionadas a alterações hormonais, envelhecimento e ritmo circadiano. A média referida é mantida, pois ocorre um ajuste entre a produção e a perda de calor que envolve o centro termorregulador do hipotálamo (BENSENÕR; ATTA; MARTINS, 2002; LEON et al., 2002).

Quando ocorrem desvios anormais nos mecanismos de termorregulação alterando muito a faixa de temperatura, podem ocorrer diversos danos ao indivíduo e ser fatal. Por exemplo, uma temperatura corporal acima de 42 °C leva a desnaturação protéica e deficiência na síntese de DNA provocando insuficiência de órgãos e disfunção neuronal. Se a temperatura corporal se mantém abaixo de 27 °C (hipotermia grave) ocorrem alterações neuromusculares, cardiovasculares, hematológicas e respiratórias (TANSEY et al., 2015).

Durante a febre ocorre um reajuste do ponto preestabelecido de regulação do calor (“Set point”) o que a torna diferente da hipertermia. A hipertermia é quando ocorre aumento na temperatura corporal decorrente de fatores internos ou externos (exercícios físicos, calor excessivo, sauna), porém não tendo alteração no centro termorregulador do hipotálamo (BENSENÖR; ATTA; MARTINS, 2002; LEON et al., 2002).

Vários estudos demonstraram que elevações sutis na temperatura corporal, podem conferir um aspecto protetor potencializando as defesas do organismo contra agentes infecciosos e células neoplásicas (VOLTARELLI; 1994).

Respostas febris podem acelerar a quimiotaxia de neutrófilos e secreção de substâncias antibacterianas, aumentar a produção e ação antiviral e antitumoral dos interferons e aumentar a estimulação de respostas imunológica. Isso indica que a maioria dos pacientes com infecções agudas, que apresentem respostas febris moderada e com sintomas brandos, não necessitam de terapia antipirética. Porém pacientes idosos, mulheres grávidas, crianças com histórico de convulsões febris, pacientes com disfunções cardíacas, pulmonares e cerebrais devem manter controle dessas respostas, pois uma febre de curta duração pode causar maiores danos ao paciente (VOLTARELLI; 1994).

1.2 Pirógenos

Pirógeno é o termo utilizado para definir quaisquer substâncias que podem induzir febre. Eles podem ser distinguidos entre endógenos ou exógenos e esta distinção é fundamental para compreender que a resposta febril pode ser estimulada tanto por agentes bacterianos, virais ou também por fatores emocionais (BARTFAI; CONTI, 2010).

Dentre a variedade de pirógenos exógenos existentes os mais utilizados como indutores de processo inflamatório são as endotoxinas tais como os lipopolissacarídeos (LPS), que são constituintes da parede celular de bactérias gram-negativas. Essas substâncias induzem a produção e liberação de

imunocitocinas que são mediadores endógenos da febre (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; MALVAR et al., 2011; ROTH; DE SOUZA, 2001).

Os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) implicam em endotoxemia e septicemia e são identificados por um extenso grupo de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que estão presentes em células fagocíticas. A ativação de PRRs por PAMPs, como os receptores transmembrana do tipo Toll-Like (TLRs), desencadeia a produção de mediadores pro- e anti-inflamatórios, bem como o início de uma resposta imune adaptativa. PRRs residem na superfície da célula, no retículo endoplasmático, endossomas, lisossomos, endolisossomos ou no citosol (WERNERS, 2016).

Os receptores TLRs especificamente o Toll-Like4 (TLR4) são ativados por uma proteína de ligação capaz de formar um complexo com o LPS. O TLR ativa a cascata de transdução de sinal em macrófagos e outras células imunitárias competentes, incluindo a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Ao se ligar ao TLR4, O LPS pode causar síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS), sintomas de febre e hipotensão, agravar doenças patológicas, insuficiência múltipla de órgãos, lesão renal e cerebral, além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BARTFAI; CONTI, 2010; REDDY et al., 2016; WERNERS, 2016).

Os pirógenos exógenos, por meio da estimulação de células imunitárias, induzem a formação de pirógenos endógenos, tais como hormônio liberador de corticotrofina (CRH), endotelina-1 (ET-1), fator pirogênico pré-formado (PFPF), bradicinina, prostaglandinas (PG) e citocinas pró-inflamatórias que incluem o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina1 β , (IL-1 β), interleucina6 (IL-6). Esses pirógenos atuam sobre hipotálamo conduzindo à geração de febre e são responsáveis pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), pela síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, além de diversas alterações comportamentais (MALVAR et al., 2011; MORITA-TAKEMURA et al., 2016).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um componente essencial no aumento da temperatura corporal febril. Ela é sintetizada através da ciclização e oxidação do ácido araquidônico (AA) pela ciclo-oxigenase (COX), que existe sob a forma constitutiva (COX-1), e a forma induzível (COX-2) (FOSTER et al., 2015).

Na fase inicial da febre a COX-2 acelera a produção de PGE₂ a partir de macrófagos de pulmão e fígado que é então liberada para a circulação sistêmica, onde se liga à albumina e segue para a barreira hematoencefálica. Na barreira hematoencefálica a PGE₂ dissocia-se da albumina e segue em direção a área pré-óptica (APO) no hipotálamo (Figura 2). Na APO a PGE₂ se liga aos receptores de prostaglandinas EP3 onde vai exercer as respostas febris (FOSTER et al., 2015).

Estudos indicam que a ligação de PGE₂ a receptores EP3 em neurônios APO inibem as atividades dos neurônios através da redução dos seus níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular aumentando a termogênese no tecido adiposo marrom, tremores, taquicardia e induzindo vasoconstrição cutânea para reduzir a perda de calor (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; NAKAMURA et al., 2011).

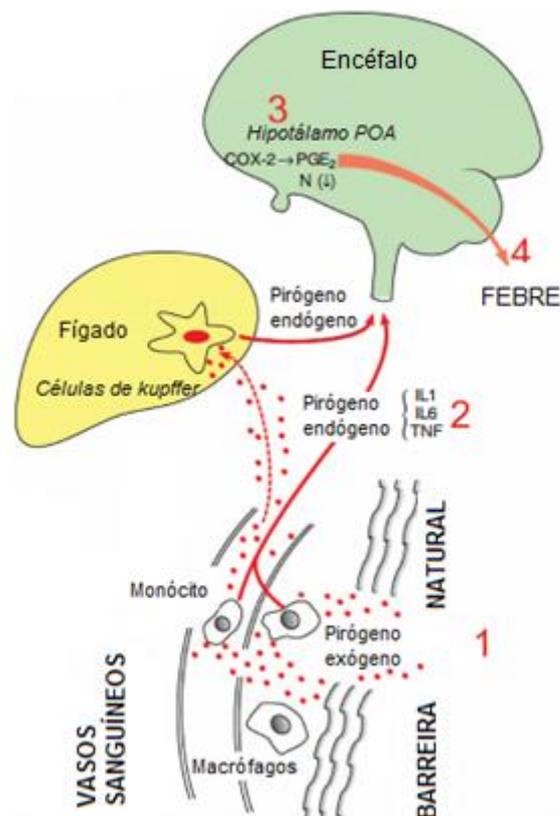


Figura 2: Mecanismo clássico de indução da febre. (1) Rompimento de barreira natural por um pirógeno exógeno. O pirógeno é transportado para o fígado onde ativa células de Kupffer e outras células fagocíticas mononucleares para produzir pirógenos endógenos; (2) Liberação de pirógenos endógenos para a corrente sanguínea; (3) entrada de pirógenos na APO induzindo a expressão de COX-2 e PGE₂. A PGE₂ inibe a atividade de neurônios (N), causando a conservação de calor e agindo assim como o mediador proximal de febre (4). Adaptado de: (ROTH; BLATTEIS, 2014)

1.3 EROS – Espécies reativas de oxigênio

Durante muito tempo vários autores utilizaram a terminologia radicais livres para denominar as espécies que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, porém esse termo foi entrando em desuso pois foram descobertos elementos que não possuem elétrons desemparelhados, mas possuem alta reatividade e instabilidade. Atualmente os termos EROS (espécies reativas de oxigênio) e ERNS (espécies reativas de nitrogênio) são os mais utilizados, pois englobam os radicais livres e elementos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), e ácido hipocloroso ($HOCl$) que mesmo não sendo radicais livres possuem efeito oxidante (RIBEIRO et al., 2005; PANTH et al., 2016).

As EROS são moléculas altamente instáveis, quimicamente reativas e com uma meia vida curta, sendo resultantes de um processo de oxido-redução. Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias e nas membranas e sua atuação vai depender de onde são formados, podendo agir em proteínas, lipídeos, carboidratos ou DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999; LOBO et al., 2010).

In vivo essa produção ocorre através da ação catalítica de enzimas, durante a aceitação ou doação de elétrons decorrentes da respiração e metabolismo celular, fagocitose, na síntese de prostaglandina, na ação do citocromo P-450, na inflamação e pela exposição a fatores exógenos como o contato com cigarro, radiação, ozônio, fatores decorrentes da dieta e medicamentos (LOBO et al., 2010).

As EROS mais conhecidas são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) radical hidroxila ($\bullet OH$), o ozônio (O_3) e outras moléculas pequenas. Elas reagem rapidamente com outras moléculas químicas podendo levar a uma nova geração de espécies reativas ativando várias vias de sinalização (DROUGARD et al., 2015; LUO et al., 2016).

O oxigênio molecular é um componente básico a todos os organismos vivos, estando envolvido na produção de energia, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias biológicas, fagocitose e sinalização intracelular, sendo essencial a vida aeróbica e do metabolismo (AIYEGORO; OKOH, 2009).

Cerca de 85% do O_2 produzido é consumido na mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons. O restante é utilizado por enzimas oxidases e oxigenases e por reações de oxidação direta (BARBOSA et al., 2010).

Em condições fisiológicas normais a cadeia de transporte mitocondrial de elétrons é a principal fonte de geração de EROS, porém elas também são produzidas pelas NADPH oxidase (NOX) que são complexos enzimáticos ligados à membrana, capazes de transferir elétrons do NADPH intracelular, acoplando-os ao oxigênio molecular. Também são produzidas pelo retículo endoplasmático e peroxissomos (SCHRADER; FAHIMI, 2006).

A enzima citocromo oxidase é responsável pela oxidação da molécula de O_2 na mitocôndria. Ela remove um elétron de quatro moléculas de citocromo C, esses elétrons são adicionados ao O_2 formando água. Ela também controla a geração excessiva de EROS, porém cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são reduzidos de forma univalente para outras vias metabólicas e acabam dando origem as EROS (BARBOSA et al., 2010).

Sendo assim as espécies reativas são produzidas naturalmente ou decorrente de alguma disfunção biológica (AIYEGORO; OKOH, 2009).

A produção excessiva de EROS pode causar danos celulares, como resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as enzimas antioxidantes. Seu excesso é conhecido como estresse oxidativo, causando a peroxidação de lipídios, proteínas e danos ao DNA e RNA (AIYEGORO; OKOH, 2009; LUO et al., 2016).

Da mesma forma em que as espécies reativas estão envolvidas em processos de danos celulares há relatos elas também possuem efeitos benéficos. Elas estimulam o processo imunológico atuando como uma barreira de defesa do organismo frente à presença de microorganismos. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio estimulam a produção do GMPc e o óxido nítrico atua no relaxamento da musculatura lisa e inibe a agregação plaquetária (MARTELLI; NUNES, 2014).

Conforme apresentado na Figura 3 existe um complexo de antioxidantes enzimáticos que controlam a produção excessiva de EROS, tais como catalase, superóxido-dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione-redutase e antioxidantes não enzimáticos como a glutathione (GSH), vitaminas C e E (REUTER et al., 2010).

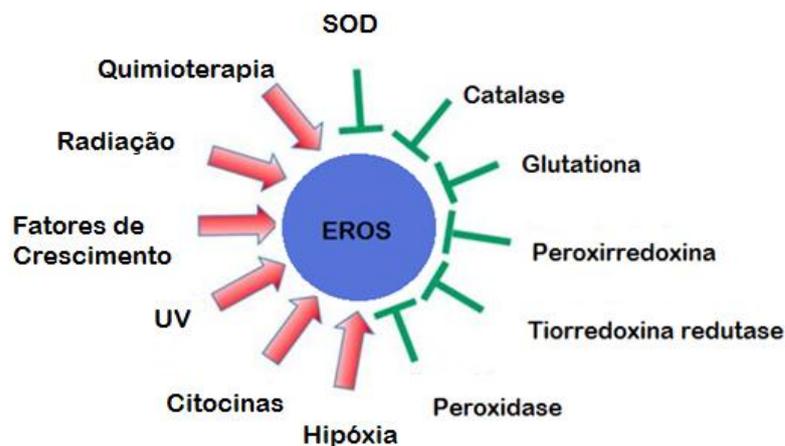


Figura 3: Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio. Vermelho - ativadores; verde - inibidores. Adaptado de: REUTER et al., 2010

1.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica baseada na inversão de spin eletrônico. Assim, para que um material tenha sinal de RPE 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 a energia das micro-ondas da amostra passa a absorvê-las e então o detector do espectrômetro acusa a ressonância paramagnética eletrônica. 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 RPE, 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 RPE a princípio se apresenta 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 pelos sistemas biológicos. Por sua vez, os marcadores de spin somente apresentam sinal de RPE quando ligados a um radical livre. Desse modo, a intensidade do sinal de RPE de uma amostra com marcadores de spin é uma medida direta da quantidade de radicais livres que havia na amostra quando ocorreu a aplicação dos marcadores¹ (SOUZA, P).

1.5 Marcadores de Spin

A quantificação e detecção de EROS em amostras biológicas podem ser realizadas por técnicas ópticas como, espectrofotometria de redução do citocromo C ou quantificação de fluorescência de Dihidroetidium (DHE), porém um dos melhores métodos para a quantificação de EROS é a ressonância paramagnética eletrônica (RPE)(BERG et al., 2014).

A nova geração de marcadores de spin (hidroxilaminas cíclicas) associadas à alta sensibilidade de espectrômetros modernos de RPE tornaram possível medir concentrações muito baixas de radicais e outras espécies paramagnéticas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Existem diversos marcadores disponíveis comercialmente, os quais diferem em termos de permeabilidade celular, tempo de meia-vida dos adutos formados e especificidade (BERG et al., 2014).

Utilizando o marcador de spin CMH (1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina) é possível detectar vários radicais e espécies reativas de oxigênio, tais como peroxinitrito e o dióxido de nitrogênio, porém a principal molécula que se liga ao CMH é o íon superóxido. O CMH não reage com óxido nítrico ou peróxido de hidrogênio (BERG et al., 2014).

¹ Souza P. (Professor – Universidade de Brasília-UnB). Comunicação pessoal, 2015

A figura 4 mostra a ligação do CMH com o ion superóxido, formando o radical livre CM• que é mais estável e detectado no RPE (MRAKIC-SPOSTA et al., 2014).

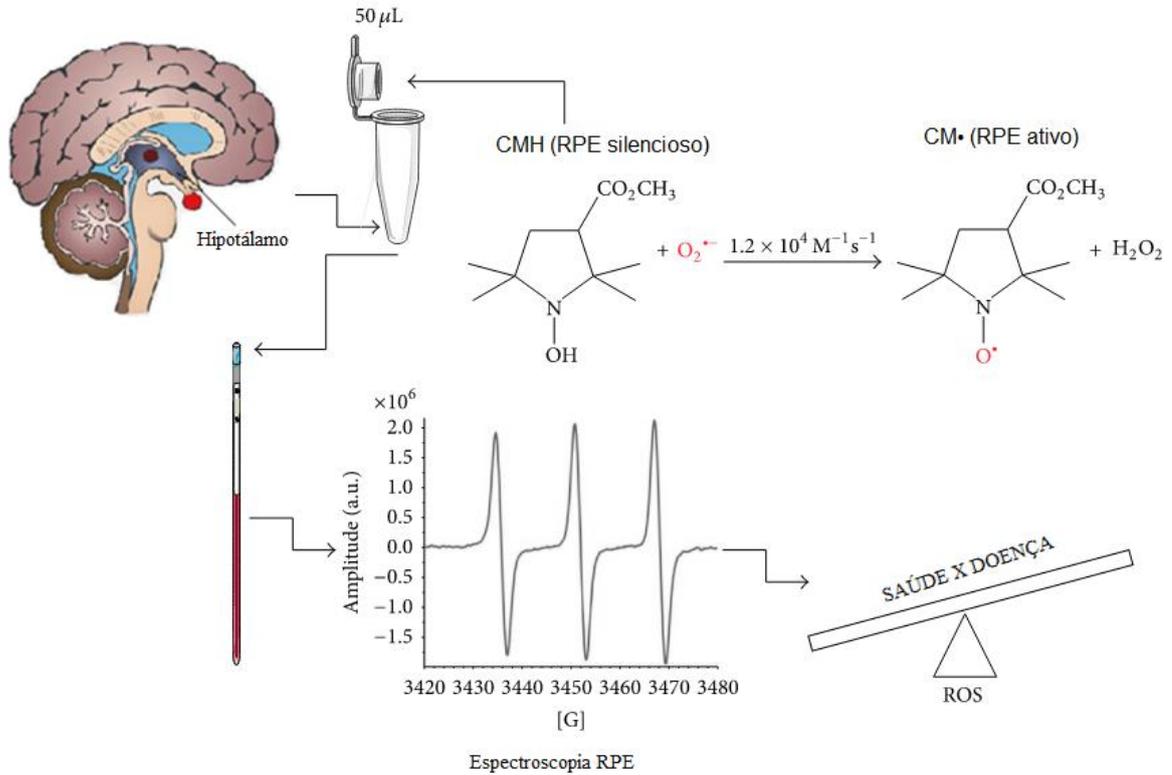


Figura 4: Método de preparo de amostra para quantificação de EROS em RPE. O marcador de spin CMH é adicionado à amostra do hipotálamo. A solução contendo CMH reage com espécies reativas da amostra formando o composto radical CM• que possui maior estabilidade e será detectado pelo RPE. A amplitude do sinal (a.u.) é proporcional ao número de rotação paramagnética formada no momento da leitura. Adaptado de: MRAKIC-SPOSTA et al., 2014.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, verificou-se um aumento no número de evidências experimentais associando as formas reduzidas de oxigênio a uma grande variedade de estados patológicos. Embora as EROS possam ser mediadores de doenças, as evidências mais recentes indicam que sua formação nem sempre é deletéria, mas apresenta influências significativas no controle de muitos processos fisiológicos, como na resposta inflamatória aguda e na defesa contra a infecção (LUO et al.,2016).

A resposta febril é um processo multifatorial e seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente elucidados. A caracterização e quantificação das EROS durante a febre pode revelar vias de sinalização importantes para este processo e que poderão ser úteis para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio no hipotálamo de ratos durante a febre.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a concentração de EROS no hipotálamo de ratos 6 h após a administração de LPS por meio de ressonância paramagnética eletrônica;
- Investigar se existe correlação entre a intensidade da febre e a concentração de EROS no hipotálamo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados 9 ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, com o peso entre 180g e 200g. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em temperatura ambiente na faixa de $24^{\circ} \pm 1$ °C, 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, 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, UnB Doc. 147474/2015 (Anexo 1).

4.2 Drogas e reagentes

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes 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. coli* 0111: B4, Sigma ChemCo., St. Louis, EUA).
- CP• (radical livre para curva de calibração)
- CMH (marcador de spin)

4.3 Cirurgia para Implante de Transmissores de Temperatura na Cavidade Peritoneal

Uma semana antes dos experimentos foram implantados na cavidade peritoneal dos ratos, transmissores do tipo Data Loggers, Subcue, (Calgary Canada) para medir a temperatura corporal. Antes das cirurgias, os transmissores foram desinfetados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min). Os animais foram anestesiados com o 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 peritoneais. 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.

4.4 Mensuração da Temperatura Corporal dos Ratos

A temperatura corporal dos ratos foi medida através de transmissores implantados cirurgicamente na cavidade abdominal como descritos anteriormente. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, a temperatura da sala experimental foi mantida a $27^{\circ}\pm 1$ °C. Os animais permaneceram nesse ambiente por pelo menos uma hora 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. As temperaturas basais foram determinadas pela média das 4 medições anteriores a qualquer tratamento.

4.5 Procedimentos Experimentais

Cada animal foi utilizado apenas uma vez. Os animais foram transportados para a sala de experimentação na noite anterior. No dia do experimento, antes da

administração dos estímulos, as temperaturas basais dos animais foram determinadas por 4 vezes, a intervalos de 15 minutos.

Os animais foram alocados em grupos experimentais de 5-4 animais e receberam injeção endovenosa de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou do seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/Kg) respectivamente. A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 minutos, durante 6 h. Ao final desse período, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue venoso, depois eutanasiados por decapitação e tiveram hipotálamo e parte do fígado e do tecido adiposo marrom dissecados para a análise da concentração de EROS.

O sangue, fígado e tecido adiposo marrom serão utilizados em outros estudos em andamento em nosso laboratório.

Após a dissecação, o hipotálamo foi cortado em 4 pedaços de cerca de 2 mm^2 . Em seguida, esse material foi lavado com tampão Krebs-Hepes (KHB) e incubado por 1 h a 37 °C com 600 μL de solução KHB contendo o marcador de spin CMH (200 μM). Após esse período, as amostras foram centrifugadas (2000 rpm) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até as análises por RPE.

4.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O marcador de spin CMH reage com as espécies reativas presente na amostra e se converte no radical livre $\text{CM}\cdot$. O $\text{CM}\cdot$ será detectado pelo aparelho de RPE.

Para a medida da concentração de EROS nesse estudo foi realizado uma curva padrão feita a partir de diferentes concentrações de $\text{CP}\cdot$, que é um radical livre, que emite sinal paramagnético detectável por RPE.

O $\text{CP}\cdot$ e o $\text{CM}\cdot$ apresentam o mesmo sinal paramagnético, porém foi utilizado o $\text{CP}\cdot$ por ele ser mais estável em relação ao $\text{CM}\cdot$.

Para leitura em RPE a amostra de tecido contendo CMH foi descongelada e aplicada em um capilar de vidro. Em seguida o capilar é inserido no RPE onde será novamente congelado por nitrogênio líquido. Essa amostra apresentará amplitude de sinal proporcional ao número de rotações paramagnéticas formadas no momento da leitura.

4.7 Estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). As comparações estatísticas entre os grupos SAL e LPS foram efetuadas por test t de Student, com a utilização do programa estatístico Prism 5.0. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

A Figura 5 demonstra que no início do experimento (tempo zero) a temperatura basal dos dois grupos de animais era similar. Logo após a administração endovenosa de salina ou LPS os animais apresentaram elevação de temperatura com duração de cerca de 1 h, decorrente da manipulação. Após esse período a temperatura dos animais do grupo controle retornou aos valores basais e do grupo LPS começou a aumentar.

A dose de LPS utilizada no presente estudo foi de 5 µg/Kg. Sabe-se que essa dose promove aumento bifásico da temperatura corporal dos ratos, com o primeiro pico de temperatura em duas horas e meia e o segundo pico em cerca de cinco horas após a administração de LPS. A elevação de temperatura começa a declinar após 6 h de observação.

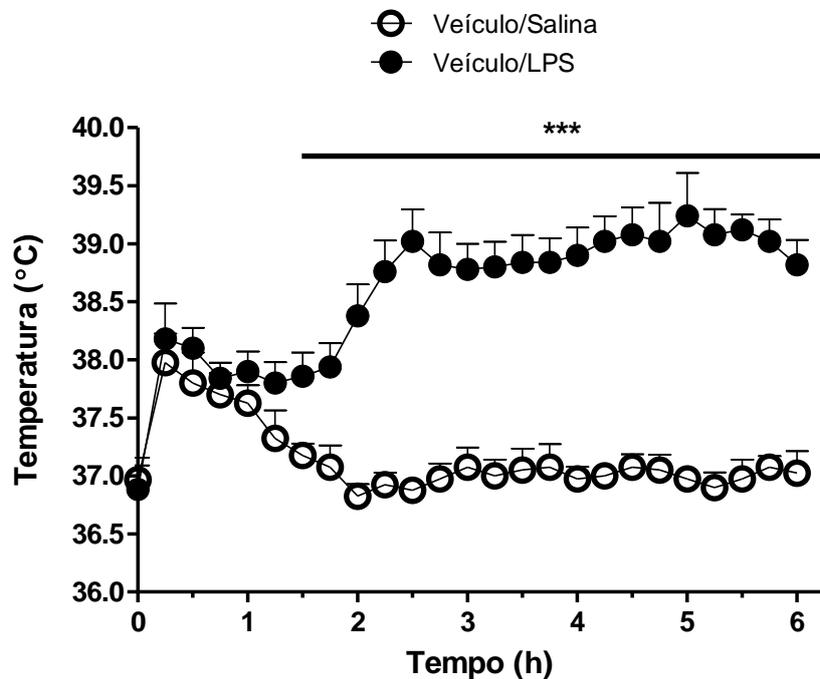


Figura 5: Perfil temporal da variação de temperatura após administração de salina e LPS em ratos. Os animais receberam injeção de veículo (água) por via oral e salina (0,2 mL/rato) ou LPS (5 µg/kg) por via endovenosa. A temperatura foi aferida durante 6 h. Os dados representam a média ± EPM em grupo de 4-5 animais. *** $p < 0,0001$ por teste T de Student.

As amostras para a quantificação de EROS por RPE foram coletadas 6h após as injeções endovenosas e preparadas conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para a medida da concentração de EROS utiliza-se uma curva padrão feita a partir de diferentes concentrações de CP. Neste estudo utilizamos as concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 μM de CP e os resultados são apresentados na Figura 6.

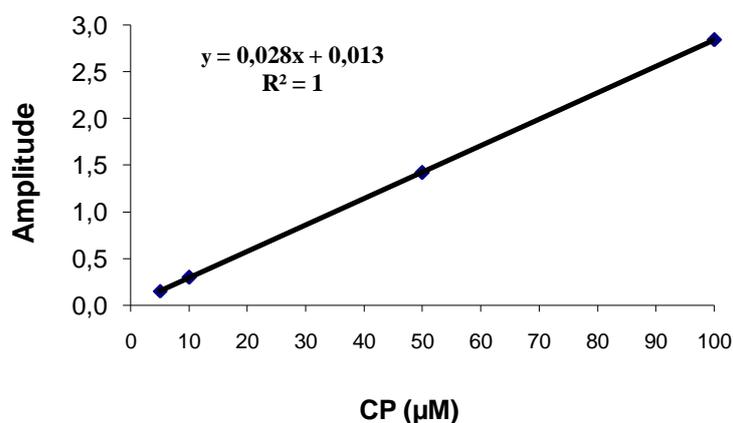


Figura 6: Amplitude do sinal de RPE em função de $[\text{CP}\cdot]$ em amostras de calibração de $[\text{CP}\cdot]$ dissolvidas em tampão Krebs-Hepes.

Os resultados da quantificação de EROS são apresentados na Figura 7. A concentração de EROS no grupo salina foi de $46,5 \pm 10,7$ e no grupo LPS foi de $28 \pm 2,7$. Após a análise estatística verificou-se que não houve diferença significativa entre os dois grupos experimentais, embora perceba-se uma tendência de redução de EROS no grupo tratado com LPS.

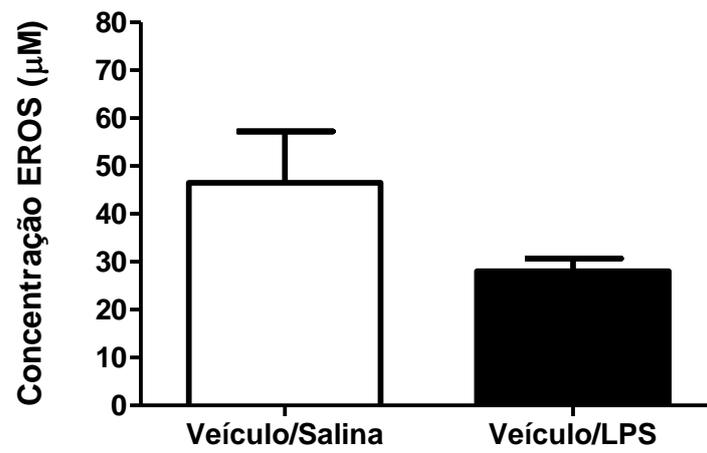


Figura 7: Concentração de EROS no hipotálamo de ratos após a administração endovenosa de LPS ou salina. As colunas representam a média \pm EPM da concentração de EROS no hipotálamo de animais tratados com solução salina 0,9% ou LPS 5 μ g/Kg.

6. DISCUSSÃO

Os pirógenos são agentes capazes de causar febre. A administração de pirógeno exógeno como os lipopolissacarídeos simula processos infecciosos e inflamatórios causados por bactérias gram-negativas, desencadeando vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios que estão localizados principalmente na membrana celular (CRUZ-MACHADO, 2010).

Durante um processo infeccioso natural ou induzido ocorre um aumento da temperatura central do corpo juntamente com outros fatores que integram um conjunto complexo de respostas de defesa. Essas respostas incluem uma série de mudanças comportamentais destinadas a conservação de energia para a restauração da saúde. Estas alterações são acompanhadas por alterações neuroendócrinas, sendo a mais significativa a ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (ROTH; BLATTEIS, 2014).

Os dados obtidos em nossos estudos relacionados a elevação da temperatura corporal dos ratos após a administração do LPS está de acordo com achados da literatura. Quando a febre é induzida por pirógenos exógenos como o LPS ela apresenta característica estereotipada e reprodutível na maioria das espécies que pode ter várias fases em um período de 6-12 h, porém depende de fatores como origem bacteriana, via de administração, dose, condições ambientais e outras características do hospedeiro (ROTH; BLATTEIS, 2014; SOARES et al., 2012).

O tipo de febre encontrado em nosso estudo foi caracterizado como bifásico com a ocorrência de um primeiro pico em 2,5 h que foi seguido por um breve e pequeno declínio. O segundo pico de febre pode ou não, ser mais alto que o primeiro, mas sempre será um platô. Essa etapa é conhecida como "fase tardia" e ocorre cerca de 5 h após a administração do LPS (SOARES et al., 2012).

Durante o processo febril ocorre aumento na expressão de células imunitárias como macrófagos, monócitos e neutrófilos. Os neutrófilos obtidos de pacientes febris mostraram um aumento de produção de EROS intracelular derivado de NADPH-oxidase se comparado com pacientes sem febre (SUNDQVIST et al., 2013).

O presente estudo buscou avaliar se a administração de LPS em ratos promoveria aumento da concentração de EROS no hipotálamo decorrida 6 h do processo febril.

Acredita-se que as EROS em baixo nível celular atuam como moléculas de

sinalização, entretanto concentrações elevadas podem estar envolvidas em diversos danos teciduais. Essas substâncias podem danificar diretamente proteínas celulares, DNA, e lipídios alterando assim todas as funções celulares (GYENGESI; PAXINOS; ANDREWS, 2012).

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, porém detecta-se possível redução de espécies reativas de oxigênio no hipotálamo de animais tratados com LPS. Esses resultados estão de acordo com os achados de Kozlov e colaboradores (2003).

Em seus estudos foi verificado aumento na concentração de EROS em apenas 3 órgãos de animais que foram submetidos ao tratamento com LPS. Os órgãos que apresentaram maiores concentrações foram o coração, fígado e pulmão. Não foi verificada nenhuma ativação da liberação de EROS no encéfalo (KOZLOV et al., 2003).

Por outro lado, há dados da literatura que mostram aumento na produção de EROS após a administração de LPS. Segundo Clemente e colaboradores (2010) ocorreu um aumento na concentração de EROS no estriado de camundongos após a administração de LPS.

Segundo Cruz et.al 2015 situações de estresse leva um aumento da concentração de EROS principalmente ions superóxidos em diferentes núcleos do tronco cerebral e no hipotálamo podendo levar a um estresse oxidativo. O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de EROS e sistemas antioxidantes.

O sistema nervoso central é extremamente sensível a danos oxidativos, por conter vários substratos oxidáveis, possuir alta ligação com oxigênio e baixa capacidade antioxidante (DE VASCONCELLOS et al., 2006). Desta forma esperava-se que a quantidade de EROS encontrada em animais tratados com LPS fosse superior aos animais tratados com salina. Esperava-se ainda que houvesse correlação entre o aumento de temperatura e a concentração de EROS. Não há, em nosso conhecimento, nenhum estudo que avalie a produção de EROS durante a febre induzida pelo LPS para fins comparativos.

Nenhum dos estudos relatados analisou a quantidade de EROS diretamente no hipotálamo. Sabe-se que a resposta do (SNC) frente a diferentes estímulos é dependente da área envolvida, desta forma a produção de EROS no encéfalo como

um todo ou no estriado podem apresentar resultados diversos em relação a análise hipotalâmica. Além disso, são poucos os estudos de quantificação de EROS feitos por meio de ressonância paramagnética eletrônica. Este método é considerado de alta acurácia e precisão, mas demanda equipamento de alto custo e cuidados detalhados na preparação de amostras.

A quantificação de EROS é altamente útil em áreas de pesquisa biológica e médica, como o câncer, doenças inflamatórias e cardiovasculares. No entanto, a produção de EROS é altamente individual e depende do estresse externo e interno do organismo, tornando difícil o controle da quantidade de EROS e dos sistemas antioxidantes no organismo.

Dados preliminares obtidos a partir de estudos de proteômica realizados por nosso grupo têm revelado a ativação de sistemas antioxidantes no hipotálamo de animais tratados com LPS. Esses dados podem sugerir que a produção de EROS esteja sendo controlada endógenamente durante a febre. Para confirmar esses dados outros estudos encontram-se em andamento no laboratório.

7. CONCLUSÃO

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em vários processos naturais associadas à vida aeróbica e o organismo possui diversos meios de manter a concentração de EROS em níveis fisiológicos. Quando estão em baixas concentrações elas podem ser responsáveis por sinalizar mecanismos de defesas. Quando ocorre um excesso de produção de EROS ou um desequilíbrio em sistemas antioxidantes podem ocorrer danos celulares levando a um estresse oxidativo, causando a peroxidação de lipídios, proteínas e danos ao DNA.

Os dados encontrados neste estudo mostraram que não houve aumento na concentração de EROS no hipotálamo durante a febre induzida pelo LPS. Esse resultado foi considerado inesperado, visto que o SNC apresenta pouca atividade antioxidante e elevada afinidade com o oxigênio.

Esses resultados são preliminares e novos experimentos com algumas alterações na metodologia estão sendo realizados em nosso laboratório a fim de confirmar essa hipótese visto que as EROS são de vital importância em processos celulares.

8. PERSPECTIVA

Confirmar a quantificação de EROS no hipotálamo aumentando o número de animais a serem analisados.

Realizar medidas de EROS em diferentes tecidos (tecidos adiposo marrom) e sangue com os animais nas mesmas condições.

Realizar as medidas em diferentes tempos, para verificar se a quantidade de EROS está relacionada ao tempo e intensidade da febre.

Realizar experimentos com a administração de marcadores de spin intracerebroventricular para se verificar a produção *in vivo* de EROS durante a febre.

Medir atividade antioxidante dos animais.

Modificar metodologia de avaliação da produção de EROS buscando diminuir manipulação e o descongelamento da amostra.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 11, p. 4990–5001, nov. 2009.
2. BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
3. BARTFAI, T.; CONTI, B. Fever. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 490–503, 2010.
4. BENSENÖR, Isabela M.; ATTA, José Antonio; MARTINS, Milton de Arruda. *Semiologia clínica*. São Paulo: Sarvier, 2002. 665 p.
5. BERG, K. et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90964, 2014.
6. BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Campinas, p. 123-130. set. 1999.
7. BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31 Suppl 5, n. Supplement 5, p. S157-61, out. 2000.
8. CLEMENT, H.-W. et al. Lipopolysaccharide-induced radical formation in the striatum is abolished in Nox2 gp91phox-deficient mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 1, p. 13–22, 29 jan. 2010.
9. CRUZ, J. C. et al. Reactive Oxygen Species in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Alter Sympathetic Activity During Metabolic Syndrome. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 384, 2015.
10. CRUZ-MACHADO, S. D. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.
11. DE VASCONCELLOS, A. P. S. et al. Chronic Lithium Treatment has Antioxidant Properties but does not Prevent Oxidative Damage Induced by Chronic Variate Stress. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 9, p. 1141–1151, 31 set. 2006.

12. DROUGARD, A. et al. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. v. 9, n. February, p. 1–12, 2015.
13. EVANS, S. S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 6, p. 335–49, jun. 2015b.
14. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.
15. FLOURIS, A. D. Functional architecture of behavioural thermoregulation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1–8, 15 jan. 2011.
16. FOSTER, J. et al. Is prostaglandin E2 (PGE2) involved in the thermogenic response to environmental cooling in healthy humans? **Medical Hypotheses**, v. 85, n. 5, p. 607–611, nov. 2015.
17. GYENGESI, E.; PAXINOS, G.; ANDREWS, Z. B. Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. **Current neuropharmacology**, v. 10, n. 4, p. 344–53, dez. 2012.
18. KOZLOV, A. V et al. Epr analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1555–1562, jun. 2003.
19. LEON, L. R. et al. Invited Review: Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2648–2655, 1 jun. 2002.
20. LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–26, jul. 2010.
21. LUO, Y. et al. Identification of MicroRNAs Involved in Growth Arrest and Apoptosis in Hydrogen Peroxide-Treated Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 7530853, 2016.
22. MALVAR, D. DO C. et al. The antipyretic effect of dipyrrone is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1401–9, mar. 2011.
23. MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, 2014.

24. MORITA-TAKEMURA, S. et al. Changes in endothelial cell proliferation and vascular permeability after systemic lipopolysaccharide administration in the subfornical organ. **Journal of Neuroimmunology**, v. 298, p. 132–137, set. 2016.
25. MRAKIC-SPOSTA, S. et al. A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 306179, 2014.
26. NAKAMURA, K. et al. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 301, n. 5, p. R1207-28, nov. 2011.
27. PANTH, N. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in Medicine**, v. 2016, p. 1–12, 2016.
28. REDDY, S. S. et al. Coagulin-L ameliorates TLR4 induced oxidative damage and immune response by regulating mitochondria and NOX-derived ROS. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 309, p. 87–100, out. 2016.
29. REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–16, 1 dez. 2010.
30. RIBEIRO, Sônia Machado Rocha et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. Uberlândia, p. 133-149. dez. 2005.
31. ROTH, J.; BLATTEIS, C. M. Mechanisms of Fever Production and Lysis: Lessons from Experimental LPS Fever. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 1563–1604.
32. ROTH, J.; DE SOUZA, G. E. P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 301–314, mar. 2001.
33. SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1755–1766, 2006.
34. SOARES, D. M. et al. A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live E. coli. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 1, p. 47–60, 5 fev. 2012.

35. SUNDQVIST, M. et al. Increased Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils During Febrile Episodes of Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Cervical Adenitis Syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2971–2983, nov. 2013.
36. TANSEY, E. A. et al. Recent advances in thermoregulation. *Advances in physiology education*, v. 39, n. 3, p. 139–48, set. 2015.
37. VOLTARELLI J. C. Febre e inflamação, **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n.1/2, p. 7-48. 1994.
38. WERNERS, A. H. Treatment of endotoxaemia and septicaemia in the equine patient. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, jul. 2016.



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

Brasília, 20 de novembro de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "MODULAÇÃO DA FEBRE E ANTIPIRESE POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO.", UnBDoC n.º 147474/2015, 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*: 140. A presente aprovação é válida pelo período de 1º/12/2015 a 31/1/2018.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA

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