



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**Análise da produção de Espécies
reativas de Oxigênio e Nitrogênio
durante a febre e a antipirese em ratos**

BRASÍLIA, DF

2017



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
durante a febre e a antipirese em ratos**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

Brasília, DF
Março de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e sustento para continuar sempre perseverante.

Meu sincero agradecimento ao professor Marcelo Valle, por me acolher como aluna e dar a oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade.

À minha co-orientadora, Fabiane, minha mãe científica, que durante todos esses anos de trabalho desde a iniciação científica me ensinou muito sobre o que é pesquisar. Agradeço pela confiança, discussões edificantes e por me ter dado a oportunidade de ingressar na pesquisa e descobrir o que realmente gosto de fazer.

Ao grupo de febre – Marina, Maria Luísa, Thays e Jardeson pela ajuda nos experimentos.

Aos colegas e professores do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço pela convivência, cafés e ajuda quando as dúvidas surgiram. Um agradecimento especial ao Samuel, Jaques e Alan por todas as conversas que fizeram do trabalho muito mais leve.

Agradeço ao Laboratório de Ressonância Eletrônica Paramagnética pelo uso do EPR, em nome do professor Paulo Souza, que foi fundamental na execução dos experimentos e me acompanhou em muitos dias, noites e finais de semana gelados. Sou muito grata por isso e por todo o ensinamento repassado.

A minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente. Aos meus pais, Zélia e Aroldo que sempre batalharam muito para que eu pudesse continuar estudando e chegasse onde eles nunca tiveram oportunidade de chegar. A eles, meu agradecimento incondicional. Aos meus irmãos, Bruno e Raphael, por todo o apoio.

Aos amigos que escutaram todos os desesperos, angústias, alegrias e me proporcionaram momentos de lazer que ajudaram a manter a calma.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu obrigado.

A UnB, esse lugar único que tanto gosto, ao CNPq pela bolsa concedida e a FAP/DF pelo financiamento do estudo e a Cristália pela doação da dipirona.

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar.”

(Chico Science)

RESUMO

A febre é o aumento da temperatura corporal que ocorre principalmente em resposta a invasão do organismo por agentes patogênicos e desempenha papel importante na resposta imune de fase aguda e na defesa contra patógenos. Entretanto, a febre também causa efeitos prejudiciais em decorrência do aumento da taxa metabólica e do consumo de oxigênio. Assim, o balanço entre os danos e benefícios deve ser considerado ao se decidir tratar ou não tratar um paciente com antipiréticos. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são geradas durante processos fisiológicos e patológicos, e podem atuar tanto como moléculas de sinalização celular, quanto como promotoras de estresse oxidativo e nitrosativo. Neste estudo, ratos Wistar machos receberam pré-tratamento oral com dipirona, ibuprofeno, celecoxibe ou n-acetilcisteína 30 min antes de injeção intravenosa de LPS ou veículo, o que levou a redução da resposta febril em todos os animais tratados. A concentração de EROs foi determinada por espectroscopia de ressonância paramagnética associada ao uso da *spin probe* CMH no sangue, fígado, tecido adiposo marrom (TAM) e hipotálamo de animais febris e tratados com os antipiréticos. Nossos resultados demonstraram aumento na produção de EROs 5 h após a indução de febre no fígado, TAM e hipotálamo e nenhum dos antipiréticos utilizados alterou o perfil dessa produção. Para a estimativa da produção de óxido nítrico, quantificou-se a concentração de HbNO no sangue. Os resultados demonstraram que a concentração de HbNO é 15 vezes maior nos animais que apresentam febre em relação aos controles. Dentre os grupos tratados, apenas a dipirona diminuiu a concentração de HbNO (- 66 %). Os dados desse trabalho sugerem que, durante a febre, há maior concentração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem causar estresse oxidativo e nitrosativo e que a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico pela dipirona pode contribuir para o mecanismo de ação desse fármaco.

Palavras chave: LPS, antitérmicos, estresse oxidativo, hemoglobina nitrosilada.

ABSTRACT

Fever is the increase in body temperature that occurs primarily in response to invasion of the body by pathogens, and plays an important role in the acute phase of immune response and in defense against pathogens. However, fever also causes harmful effects as a result of increased metabolic rate and oxygen consumption. Thus, the balance between damages and benefits should be considered when deciding whether or not to treat a patient with antipyretics. The reactive species of oxygen and nitrogen are generated during physiological and pathological processes, and can act as both signaling molecules and as promoters of oxidative and nitrosative stress. In this study, male Wistar rats received oral pre-treatment with dipyrone, ibuprofen, celecoxib or n-acetylcysteine 30 min prior to intravenous injection of LPS or vehicle, which led to a reduction in febrile response in all treated animals. The concentration of ROS was determined by paramagnetic resonance spectroscopy associated with the use of spin probe CMH in the blood, liver, brown adipose tissue (BAT) and hypothalamus of febrile animals treated with antipyretics. Our results demonstrated an increase in ROS production 5 h after induction of fever in the liver, BAT and hypothalamus, and none of the antipyretics used altered the profile of this production. For the estimation of the production of nitric oxide, the concentration of NOHb in the blood was quantified. The results demonstrated that the concentration of NOHb is 15-fold higher in the animals of LPS group compared to controls. Among the treated groups, only dipyrone decreased the concentration of NOHb (- 66 %). Data from this study suggest that during fever there is a higher concentration of reactive oxygen and nitrogen species, which may cause oxidative and nitrosative stress, and that reduction of the bioavailability of nitric oxide by dipyrone may contribute to the mechanism of action of this drug.

Key words: LPS, antipyretic, oxidative stress, nitrosylated hemoglobin.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT	19
SUMÁRIO.....	20
LISTA DE FIGURAS	22
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	24
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. TERMORREGULAÇÃO E RESPOSTA FEBRIL.....	13
1.1.1. Papel do tecido adiposo marrom na febre	18
1.2. CONTROLE FARMACOLÓGICO DA RESPOSTA FEBRIL.....	19
1.2.1. Dipirona	20
1.2.2. Paracetamol.....	21
1.2.3. Ibuprofeno	21
1.2.4. Celecoxibe	22
1.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	23
1.4. ERONS, INFLAMAÇÃO E FEBRE.....	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. ANIMAIS	33
3.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL	33
3.3. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS.....	34
3.4. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	34

3.4.1.	Produção de EROs em diferentes tempos da febre induzida por LPS ..	34
3.4.2.	Curva dose-resposta dos antipiréticos	35
3.5.	COLETA DOS TECIDOS	36
3.6.	PREPARO DE AMOSTRAS PARA MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR EPR	36
3.7.	MEDIDAS DE EPR.....	37
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.	RESULTADOS	39
4.1.	EFEITO DE DIFERENTES ANTITÉRMICOS SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS	39
4.2.	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO HIPOTÁLAMO, FÍGADO, TECIDO ADIPOSEO MARROM E SANGUE DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS.....	42
4.3.	EFEITO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES ANTITÉRMICOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS NO HIPOTÁLAMO, FÍGADO, TECIDO ADIPOSEO MARROM E SANGUE DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS	46
4.4.	EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NA FEBRE INDUZIDA POR LPS E NA PRODUÇÃO DE EROS PELO SANGUE, FÍGADO, HIPOTÁLAMO E TAM.....	50
4.5.	FORMAÇÃO DE HEMOGLOBINA NITROSILADA DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS E TRATAMENTO COM FÁRMACOS COM PROPRIEDADES ANTIPIRÉTICAS.....	52
5.	DISCUSSÃO.....	55
6.	CONCLUSÕES.....	63
7.	PERSPECTIVAS	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9.	ANEXOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hipótese humoral da indução da febre.....	15
Figura 2: Estimulação de células de Kupffer pelo LPS via TLR4 e via ativação do complemento	17
Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio.	24
Figura 4: Esquema do funcionamento de espectrômetro de EPR.	26
Figura 5: Mecanismo sugerido para a produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de ROS.....	29
Figura 6: Efeito da administração oral de dipirona sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS.....	40
Figura 7: Efeito da administração oral de ibuprofeno sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS.....	41
Figura 8: Efeito da administração oral de celecoxibe sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS.	41
Figura 9: Efeito da administração oral de paracetamol sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS.....	42
Figura 10: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal de ratos 2,5 ou 5 h após o estímulo.	43
Figura 11: Espectro típico da spin probe CMH no TAM de animais 5 h após a administração de LPS ou salina (iv).	44
Figura 12: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM 2,5 h após a administração de LPS.....	45
Figura 13: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM 5 h após a administração de LPS.....	45
Figura 14: Produção de EROs por diferentes tecidos em animais controle e estimulados com LPS.....	46
Figura 15: Temperatura corporal tratados com diferentes antitérmicos 5 h após estímulo pirogênico.	47
Figura 16: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com dipirona.....	48

Figura 17: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com ibuprofeno.....	49
Figura 18: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com celecoxibe.....	49
Figura 19: Efeito da administração oral de n-acetilcisteína sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS.....	50
Figura 20: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com NAC.	51
Figura 21: Espectro de EPR típico do sangue de animais 5h após a administração salina ou LPS (iv).	52
Figura 22: Concentração de HbNO no sangue 2,5 h 5 h após a administração de LPS.	53
Figura 23: Concentração de HbNO no sangue de animais tratados com dipirona (A), Ibuprofeno (B), Celecoxibe (C) ou n-acetilcisteína (D).....	54

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-AA – 4-amino-antipirina
4-AAA – 4-acetil-amino-antipirina
4-FAA – 4-formil-amino-antipirina
4-MAA – 4-metil-amino-antipirina
AA – ácido araquidônico
AINE- antiinflamatório não esteroidal
AMPc – 3'- 5'- *cyclic adenosine monophosphate*
ANOVA – análise de variância de uma via
AP-1 – *activator protein-1*
APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior
ASC – área sob a curva
ATP – trifosfato de adenosina
CD14 – *cluster of differentiation 14*
CMH – 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
COX – ciclooxigenases
cPGES – prostaglandina E sintasecitossólica
CSF – *cerebrospinal fluid*
CuZnSOD – superóxido dismutase cobre-zinco dependente
DETC – trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DF – deferoxamina
DMSO - dimetilsulfóxido
EC-SOD – superóxido dismutase extracelular
EP – receptor de prostaglandina
EPM – erro padrão da média
EPR – *electronic paramagnetic resonance*
ERNs – espécies reativas de nitrogênio
ERONs – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
GSH – glutationa
HbNO – hemoglobina nitrosilada
IL – interleucina

IL-1ra – antagonista do receptor de IL-1
IL-1 β – interleucina 1beta
iNOS – óxido nítrico sintetase induzida
ip – intraperitoneal
IP – receptor da prostaciclina
IRF – *interferon regulatory factor*
iv – intravenosa
JNKs – quinase jun amino-terminais
KHB – Krebs HEPES buffer
LBP – *LPS binding protein*, proteína ligadora de LPS
LPS – lipopolissacarídeo
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MD2 – proteína de diferenciação mielóide
MDA – malonaldeído
MnSOD – superóxido dismutase manganês dependente
mPGES – prostaglandina E sintase microssomal
mW – miliWatts
MyD88 – *myeloid differentiation primary response gene 88*
NAC – N-acetilcisteína
NADPH – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NF- κ B – fator nuclear kappa B
NLRP – receptores de ligação a nucleotídeo contendo domínio com seqüência repetida de resíduos do aminoácido leucina com domínio de piridina
PG – prostaglandina
PGES – prostaglandina E sintase
PGF₂ – prostaglandina F₂ alfa
PKA – proteína quinase A
PKC – proteína quinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLC – fosfolipase C
rs – receptor solúvel
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
TAM – tecido adiposo marrom

TBARS – *thiobarbituric acid reactive substances*

TLR-4 – *toll-like receptor 4*

TNF-bp – *TNF binding protein*

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TP – receptor de tromboxano

v/v – volume/volume

XO – xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERMORREGULAÇÃO E RESPOSTA FEBRIL

A termorregulação é a manutenção de uma temperatura corporal relativamente constante e sua compreensão é necessária para que se entenda melhor o conceito básico de homeostase e também para uma variedade de aplicações fisiológicas e clínicas. A temperatura corporal interna em humanos é de cerca 37 °C, com flutuações que ocorrem ao longo do dia (ritmo circadiano), do mês (ciclo menstrual) e ao longo da vida (envelhecimento). Os mamíferos são animais homeotérmicos endotérmicos que produzem calor principalmente por meio do metabolismo (TANSEY; JOHNSON, 2015).

O hipotálamo é o coordenador central da termorregulação, sendo a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA) a região mais importante para esse controle. Essa área é considerada o termostato central, pois detecta alterações da temperatura local por meio da temperatura do fluxo sanguíneo e então ativa respostas termorreguladoras para que se mantenha a temperatura corporal constante (BARTFAI; CONTI, 2010).

As propriedades termossensíveis dos neurônios da APOHA foram identificadas por estudos eletrofisiológicos, considerando a frequência de potenciais de ação durante as alterações de temperatura no local. Boulant (2000) classifica esses neurônios em três tipos básicos: sensíveis ao calor, sensíveis ao frio e insensíveis às mudanças de temperatura. Há evidências 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).

Então, a APOHA se comunica com áreas efetoras, desencadeando reações corporais apropriadas para diminuir ou aumentar a temperatura corporal. Verificou-se que o arrefecimento da APOHA inicia mecanismos de retenção de calor, incluindo vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais de conservação de calor. Em contrapartida, o aquecimento da área provoca vasodilatação cutânea,

sudorese, respiração ofegante e várias respostas comportamentais que favorecem a perda de calor (BOULANT, 2000; TANSEY; JOHNSON, 2015).

Durante uma infecção ou inflamação pode ocorrer o aumento da temperatura corporal, fenômeno fisiológico que faz parte de um complexo arranjo de respostas não específicas, mediadas pelo encéfalo, à invasão do organismo por patógenos. Esse aumento da temperatura é denominado febre (ROTH; BLATTEIS, 2014).

A resposta febril é um fenômeno relevante durante a resposta inflamatória de fase aguda, já que essa alteração da temperatura corporal faz com que mecanismos de defesa sejam estimulados, tornando-a importante para a proteção da integridade do corpo contra microrganismos invasores ou qualquer outra substância reconhecida como estranha pelo sistema imune (BLATTEIS; SEHIC, 1998).

Classicamente, a febre se desenvolve por uma sequência de eventos moleculares que se iniciam após o reconhecimento de um pirógeno exógeno e que resultam em uma alteração do ponto de regulação hipotalâmico. O ponto de regulação é a temperatura basal que o corpo mantém através dos mecanismos termorreguladores. No processo inflamatório esse ponto é elevado devido à sequência de eventos chamada de “hipótese humoral da indução da febre”, que está esquematizada resumidamente na Figura 1 (BLATTEIS; SEHIC, 1998).

Diferentes substâncias podem desencadear esses eventos de indução febril, sendo elas chamadas de pirógenos, classificados como endógenos ou exógenos. Os pirógenos endógenos são produzidos pelo organismo e liberados na corrente sanguínea em resposta a um estímulo proveniente de pirógenos exógenos (ROTH et al., 2009). Os principais pirógenos endógenos são as citocinas e os eicosanóides (DINARELLO, 2004). Já os pirógenos exógenos são os estímulos que induzem a resposta febril, incluindo microorganismos, seus subprodutos e também substâncias não infecciosas como antígenos, drogas, entre outros (ROTH; BLATTEIS, 2014).

A indução de febre em ratos por meio da injeção intravenosa (iv) de lipopolissacarídeo (LPS) é um dos modelos experimentais mais utilizados para ensaios de febre, já que produz aumento de temperatura que permanece por várias horas, reproduzindo o que ocorre nos processos infecciosos. O LPS é um pirógeno exógeno presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, fundamental para a estabilidade membranar. É o componente que confere maior patogenicidade às bactérias e que dificulta a ação de neutralização pelos anticorpos e a ação dos antibióticos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

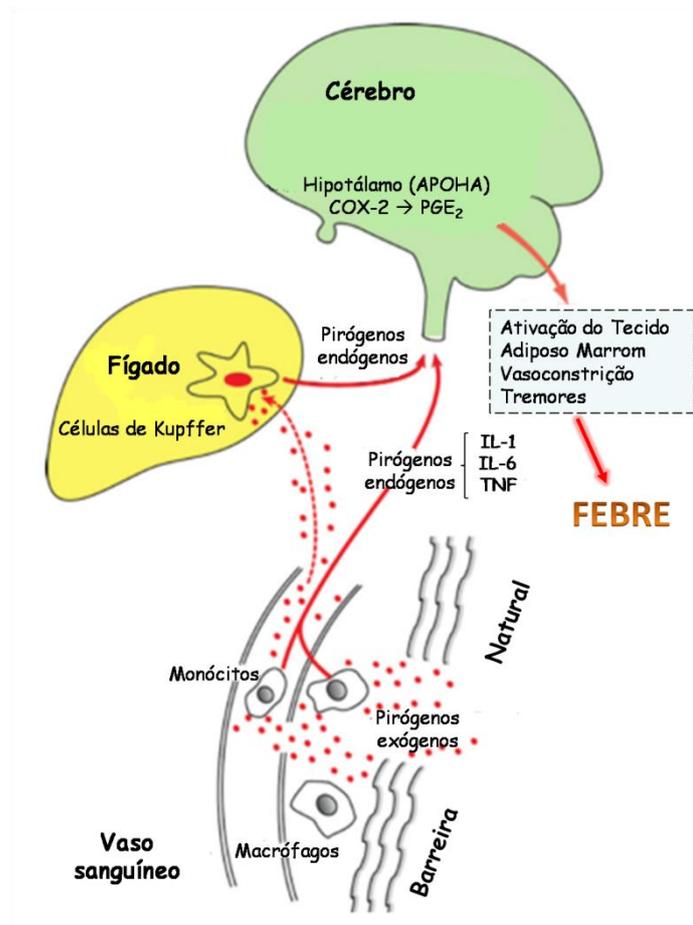


Figura 1: Hipótese humoral da indução da febre. A febre desenvolve-se em etapas sequenciais, começando pela entrada de um pirógeno exógeno, como o LPS, na corrente sanguínea através de uma ruptura nas barreiras naturais do organismo. Este agente é transportado para o fígado e ativa as células de Kupffer, que produzem pirógenos endógenos, assim como outras células fagocíticas. Os pirógenos endógenos são liberados para a corrente sanguínea e transportados até a APOHA, onde induzem a expressão de COX-2 e, conseqüentemente, de PGE₂. A PGE₂, por sua vez, inibe a atividade dos neurônios sensíveis ao calor, levando a mecanismos de conservação de calor. Adaptado de (ROTH; BLATTEIS, 2014)

Após a entrada no organismo de um pirógeno exógeno, como o LPS, os macrófagos circulantes se ligam a ele através dos receptores para vários constituintes das bactérias, entre eles o receptor de superfície CD14, que ao se ligar ao LPS, inicia o processo que culmina na liberação de mediadores que levarão ao desenvolvimento da resposta inflamatória. Outra porção de LPS é reconhecida por um receptor transmembranar, o Receptor Semelhante à *Toll* 4 (TLR4) e, quando há uma ligação física entre os dois, combinado com a presença de CD14 e da proteína acessória extracelular MD2, os receptores são ativados para desencadear diversas vias de sinalização, como a via de proteína ativada por mitógeno (MAPK), AP-1 (*activator protein 1*), IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*), via do fator de transcrição

fator nuclear κ -B (NF- κ B), dentre outras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Com essa sinalização intracelular, inicia-se a transcrição de genes que codificam proteínas solúveis, entre elas as citocinas pirogênicas, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e as interleucinas (IL)-1 β e IL-6, considerados importantes mediadores endógenos na febre induzida por LPS (BLATTEIS et al., 2005; ROTH et al., 2009).

As células de Kupffer, presentes no fígado, parecem desempenhar papel importante na febre induzida por LPS, já que animais depletados dessas células não apresentam resposta febril característica (LI et al., 2006). Vários estudos indicam que quando o LPS chega ao fígado, independentemente da sua via de administração, as células de Kupffer se ligam a ele, ativando a cascata de complemento no local. Como consequência, o fator do complemento C5a é produzido e ativa as células de Kupffer a liberar prostaglandina E₂ (PGE₂) na periferia (IVANOV; ROMANOVSKY, 2004; ROTH; BLATTEIS, 2014).

Diversas citocinas são descritas como mediadores de febre, principalmente a IL-1 β , IL-6 e o TNF α . Apesar do importante papel das citocinas, vários estudos demonstram que as respostas febris dependem da ação central de prostaglandinas (PGs), principalmente a PGE₂, considerada o mediador final da febre (ROTH et al., 2009). A PGE₂ pode ser sintetizada localmente na APOHA, ou chegar ao hipotálamo a partir do sangue. Na APOHA a PGE₂ inibe os neurônios sensíveis ao calor, e consequente ativação dos neurônios sensíveis ao frio, o que culminará em respostas de retenção e gênese de calor (BLATTEIS et al., 2005).

As citocinas pirogênicas promovem a síntese de ciclooxygenases (COXs), enzimas essenciais para a produção de PGE₂. A síntese das PGs se inicia com a ação da fosfolipase A₂ (PLA₂), que libera o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica. Então, as isoenzimas ciclooxygenases 1 e 2, convertem o ácido araquidônico (AA) em prostaglandina G₂ e, em sequência, em prostaglandina H₂. A partir de então, a depender do tecido, dos tipos celulares e das isomerases específicas, poderá haver a formação de diferentes eicosanóides, tais como PGE₂, Tromboxano A₂, PGD₂, PGI₂ e PGF_{2 α} (WOOD; FITZGERALD; PATRONO, 2001).

Na Figura 2, pode-se observar resumidamente como as células de Kupffer levam a produção de citocinas e da PGE₂ que, ao chegar ao hipotálamo, alteram a frequência de disparo dos neurônios termossensíveis, modificando o ponto de regulação para um valor de temperatura mais elevado. Isso desencadeia respostas

sistêmicas de produção e retenção de calor. A estimulação dessas células pelo LPS pode ser via TLR4 ou via ativação do sistema complemento. A via mediada pelo complemento resulta na formação local de PGE_2 em minutos. Isto ocorre através da hidrólise por fosfolipase C associada à membrana (PLC), que é ativada por C5a. A liberação de ácido araquidônico pela PLC é 10 vezes mais rápida do que a mediada pela fosfolipase A_2 , a enzima que é ativada por LPS através da via do TLR4. A conversão subsequente de AA em PGE_2 é catalisada por COX-1 e COX-2. A via mediada por TLR4 induz síntese *de novo* de citocinas pirogênicas, COX-2, de óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e outras moléculas, sendo esse, um processo mais lento. Além da formação da PGE_2 , a proteína cinase C (PKC) ativada pela via do complemento estimula a NADPH oxidase, que produz espécies reativas de oxigênio (EROs), que também ativam a via de NF- κ B (ROTH; BLATTEIS, 2014).

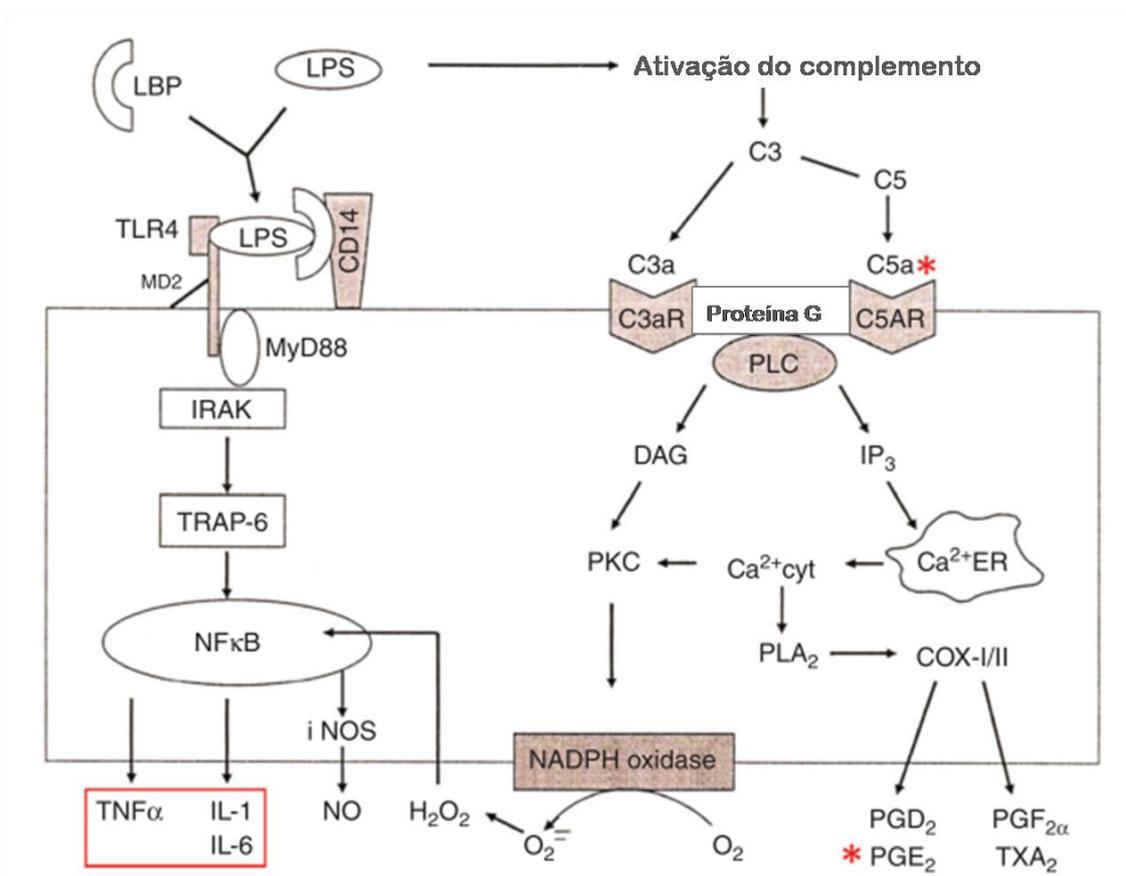


Figura 2: Estimulação de células de Kupffer pelo LPS via TLR4 (esquerda) e via ativação do complemento (direita). Adaptado de: (ROTH; BLATTEIS, 2014).

1.1.1. Papel do tecido adiposo marrom na febre

O tecido adiposo marrom (TAM) é a principal fonte de produção de calor independente de tremor, contribuindo para a taxa metabólica basal principalmente em roedores e outros pequenos mamíferos. Em humanos, o tecido adiposo marrom é encontrado em bebês e crianças, sendo importante para a manutenção da temperatura corporal no início da vida. Entretanto, era considerado inexistente ou sem importância fisiológica em indivíduos adultos. Estudos mais recentes, através da técnica de tomografia de emissão de pósitron juntamente com tomografia computadorizada (PET/CT) demonstraram que o TAM está presente em adultos e tem sua taxa metabólica aumentada em situações de frio, e também teria um papel protetor contra a obesidade (CYPESS et al., 2009; SCHEELE; NIELSEN, 2017; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009).

O tecido adiposo marrom é rico em mitocôndrias, e a geração de calor acontece principalmente pelo transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna, processo mediado pelas proteínas desacopladoras-1 (UCP-1) altamente expressas nesse tecido. A UCP-1 é específica do tecido e confere sua propriedade termogênica (MORRISON, 2016a).

A atividade do TAM é regulada pelo sistema nervoso simpático. Nos adipócitos marrons, a noradrenalina estimula diferentes vias de sinalização, sendo a mais estudada a via de estimulação β -adrenérgica da termogênese (COLLINS; YEHUDA-SHNAIDMAN; WANG, 2010).

A noradrenalina ativa o receptor β_3 -adrenérgico, muito expresso no TAM. Esse receptor se acopla a proteínas Gs para promover a termogênese. A partir dessa etapa, o sinal termogênico da noradrenalina é mediado pela adenililciclase que, ativada, converte o ATP em AMPc. Em seguida, este segundo mensageiro ativa a proteína cinase A (PKA), que fosforila proteínas citosólicas, tais como a lipase hormônio sensível (ativação) e a perilipina (desativação), a fim de estimular a via lipolítica; e proteínas nucleares, como o fator de transcrição CREB, o qual ativa a transcrição de genes, incluindo o gene da UCP-1 (COLLINS; YEHUDA-SHNAIDMAN; WANG, 2010).

O TAM é ricamente vascularizado para que se tenha uma grande oferta de oxigênio ao tecido para a produção do calor, além de permitir que o calor produzido

pelo tecido possa ser rapidamente levado ao restante do corpo. Em ratos, o TAM está localizado na região interescapular, com dois lobos simétricos que são inervados por nervos intercostais adrenérgicos (MORRISON, 2016b).

Na gênese e na manutenção da resposta febril durante a inflamação e infecção, os neurônios da APOHA, induzem respostas de produção do calor, que inclui a termogênese mediada pelo TAM pela ação da PGE₂ em receptores EP3 (MORRISON, 2016b).

1.2. CONTROLE FARMACOLÓGICO DA RESPOSTA FEBRIL

A febre desempenha papel importante na resposta imune de fase aguda, porém, em algumas situações quando a temperatura se eleva muito, ela pode se tornar deletéria, causando sequelas neuronais, delírios, malformações fetais e mesmo o coma, sendo que nestas situações é indicada a terapia antipirética (HASDAY; FAIRCHILD; SHANHOLTZ, 2000).

Desde o século XVIII, quando Edward Stone descobriu os efeitos antipiréticos da casca de salgueiro, várias outras drogas para este fim foram descobertas. Em 1971, John Vane relatou que os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), como a aspirina, exerciam seu efeito por meio da inibição da síntese de prostaglandinas através da inibição da COX (BOTTING, 2010). Entretanto, ao inibir essa enzima de forma não-seletiva, os AINEs promovem efeitos adversos diversos, dos quais se destacam os efeitos gastrintestinais e de toxicidade renal. A busca por fármacos que tivessem a mesma ação terapêutica, porém com menos efeitos adversos continuou, sendo desenvolvidos no final do século passado, fármacos com seletividade para COX-2, como o celecoxibe (PENNING et al., 1997).

Além dos AINEs, outras drogas tais como a dipirona e o paracetamol, apesar de utilizadas na clínica rotineiramente ainda não tem seu mecanismo de ação totalmente elucidado. Além da inibição da COX, outras ações podem contribuir para os efeitos antiinflamatórios de alguns AINEs. Os radicais reativos de oxigênio produzidos por neutrófilos e macrófagos estão implicados na lesão tecidual em algumas afecções, e alguns AINEs (p. ex., sulindaco) têm efeito removedor

(*scavenging*) de radicais de oxigênio, bem como atividade inibitória da COX, e assim podem diminuir a lesão tecidual (FERNANDES et al., 2003).

1.2.1. Dipirona

A dipirona é um derivado pirazolônico, sintetizado em 1920 pela empresa alemã Hoechst AG e, desde então, vem sendo utilizada no tratamento da febre e da dor em vários países (BRUNE, 1997). É uma pró-droga, sendo rapidamente hidrolizada no trato gastrointestinal em 4-metil-amino-antipirina (4-MAA), que é convertido em outros metabólitos incluindo o 4-formil-amino-antipirina (4-FAA) e o 4-amino-antipirina (4-AA), e este último transformado em 4-acetil-amino-antipirina (4-AAA) após uma acetilação. O 4-MAA e 4-AA são descritos como os metabólitos responsáveis pelo efeito antipirético na febre induzida por LPS (MALVAR et al., 2014).

É um fármaco com pouca eficácia antiinflamatória quando comparado a outros que apresentam ação antiinflamatória e antipirética, o que indica um mecanismo de ação diferente da inibição das COXs. De Souza e colaboradores (2002) demonstraram que a dipirona reduz a febre induzida por LPS, IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGF_{2 α} , mas não por ácido araquidônico, substrato da COX, além de não inibir a atividade de COX-1 ou COX-2 em células transfectadas com essas isoformas (DE SOUZA et al., 2002).

Entretanto, outros grupos demonstraram que a dipirona, por meio de seus metabólitos, pode inibir a COX-1 e COX-2 (4-MAA) ou apenas a COX-2 (4-AA) em humanos (HINZ et al., 2007). O mecanismo envolve o sequestro de radicais que desencadeiam a atividade catalítica da enzima ou a redução dos estados oxidativos da proteína COX (PIERRE et al., 2007). Esses metabólitos estão ainda associados à inibição da síntese de PGE₂ no hipotálamo e no fluido cérebro espinhal de ratos após a administração de LPS, e 4-MAA ainda mostra efeitos na febre independente de PGE₂ induzida por veneno de *Tityus serrulatus* (MALVAR et al., 2011, 2014).

Estudos recentes mostraram ainda a relação entre a dipirona e a via endocanabinoide, porém essa via não estaria envolvida com a hipotermia induzida pela dipirona (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

1.2.2. Paracetamol

O paracetamol, também chamado acetaminofeno, é um fármaco amplamente utilizado como analgésico e antipirético. Foi descrito pela primeira vez em 1877, mas sua comercialização só ocorreu a partir de 1950 sob o nome *Triagesic*, em associação com aspirina e cafeína (PRESCOTT, 2000). Quimicamente, é um fenol, que pode ser facilmente oxidado, sendo este fato associado ao mecanismo de ação como substrato e inibidor da função de peroxidase da COX (GRAHAM et al., 2013).

Assim como a dipirona, o mecanismo de ação do paracetamol não está totalmente elucidado. Apesar da sua pouca ação antiinflamatória, alguns estudos apontam uma seletividade para a COX-2 (HINZ; CHEREMINA; BRUNE, 2008; LI et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstram que a inibição da COX pelo paracetamol é dependente da concentração de peróxidos no ambiente. Lucas e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição COX em células pulmonares humanas foram completamente bloqueados pelo co-tratamento com t-butylOOH, mostrando que em altas concentrações de peróxidos, o fármaco perde sua ação, o que não ocorre com outros AINES. A dependência da concentração de peróxidos para que ocorra a inibição da COX poderia explicar por que o paracetamol não suprime a inflamação e a atividade das plaquetas, já que nesses ambientes, a concentração de peróxidos é alta (BOUTAUD et al., 2002).

É descrito também que efeito analgésico do paracetamol pode estar envolvido com o sistema endocanabinoíde, já que quando metabolizado em AM404, esse metabólito tem atividade inibindo a recaptção de anandamida pelos neurônios (HÖGESTÄTT et al., 2005). Entretanto, não há relatos do envolvimento desse mecanismo no efeito antipirético do fármaco.

1.2.3. Ibuprofeno

O ibuprofeno foi sintetizado há mais de 50 anos pelos doutores Adams e Boots no Reino Unido, com o objetivo de desenvolver uma nova forma de aspirina,

sem seus efeitos gastrointestinais e sem os sérios efeitos adversos dos corticosteróides. Atualmente, é bastante utilizado em diversos países como tratamento de primeira linha para dor, inflamação e febre (RAINSFORD, 2013).

O mecanismo de ação do ibuprofeno é o mesmo de outros antiinflamatórios não-esteroidais, ou seja, decorre da inibição competitiva com o ácido araquidônico pelo centro ativo das enzimas COX e, conseqüente, na diminuição da produção de prostaglandinas, como a PGE₂. O ibuprofeno apresenta uma baixa seletividade para a COX-1 (KATO et al., 2001; RANG et al., 2016).

Entretanto, foi demonstrado que o ibuprofeno apresenta efeitos terapêuticos independentes da inibição das COXs, como a inibição da ativação do NF-κB e a supressão da migração de leucócitos em células endoteliais ativadas por citocinas (ARONOFF; NEILSON, 2001).

1.2.4. Celecoxibe

O celecoxibe foi o primeiro antiinflamatório não esteroide seletivo para COX-2 aprovado para o tratamento de pacientes com osteoartrite e reumatismo. Os antiinflamatórios seletivos para COX-2 foram desenvolvidos após a descoberta desta isoforma, que se encontra aumentada na inflamação, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos relacionados à inibição da COX-1 constitutiva, como a irritação gastrointestinal (FLOWER, 2003).

A COX-2 está presente nos locais de inflamação, sendo expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos. A COX-2 é induzida pelas citocinas (IL-1, IL-2 e TNF) e outros mediadores da inflamação (fatores de crescimento e endotoxinas). Sua expressão no sistema nervoso central permite a mediação central da dor e da febre e contribui para a percepção da dor (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A seletividade do celecoxibe para COX-2 é explicada pela estrutura do fármaco, que contém um grupamento sulfonamida no lugar do grupamento carboxil presente nos outros ácidos antiinflamatórios. Esse grupamento contendo enxofre se liga ao bolso lateral do canal catalítico da COX-2, porém, interage fracamente com o sitio ativo da COX-1, o que lhes confere seu caráter seletivo (BOTTING, 2006).

1.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies geradas em diversos sistemas biológicos, tanto em função de eventos fisiológicos, quanto patológicos. Frequentemente, os termos “radicais livres” e “espécies reativas de oxigênio” são usados como sinônimos erroneamente. Radical livre pode ser definido como átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital, característica que lhe confere alta reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Em biologia, a produção de espécies reativas está centrada no oxigênio (VALKO et al., 2007). O oxigênio molecular (O_2) é suscetível a formação de radicais por ter dois elétrons desemparelhados presentes em sua camada de valência. As espécies reativas de oxigênio são moléculas de meia vida muito curta e altamente reativas, que inclui radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), e ainda não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 2005; KIM et al., 2015).

A formação das diferentes EROs ocorre devido a sucessivas reduções do oxigênio (O_2) até que seja formada água (Figura 3).

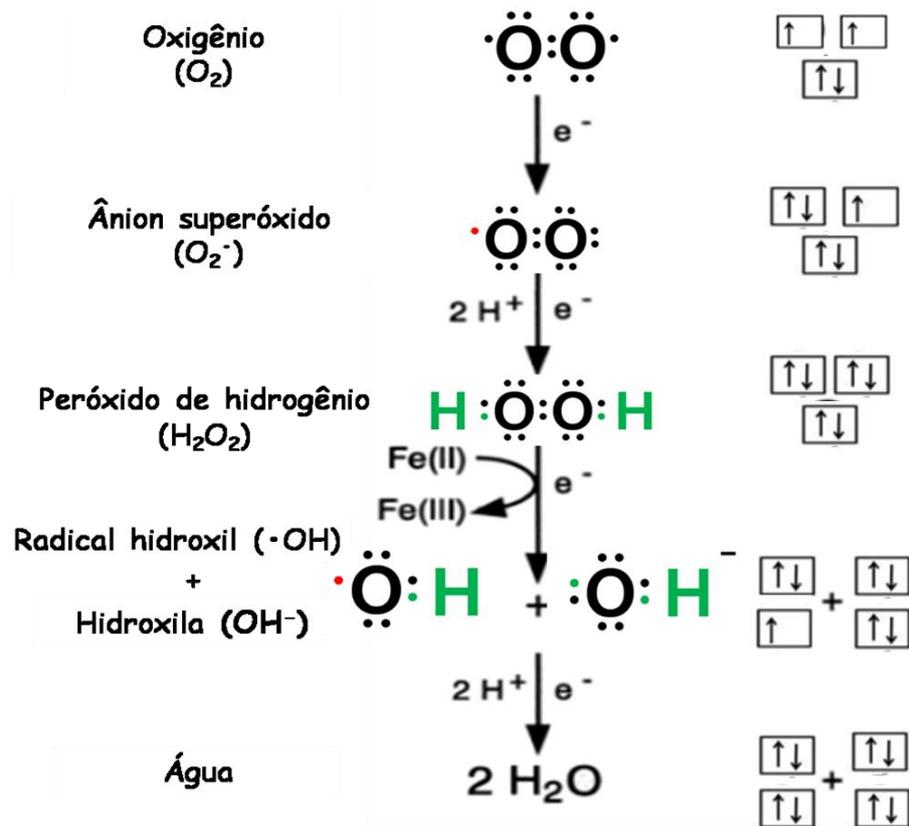


Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de (CRISTIANA; NINA; ELE, 2012)

No oxigênio molecular, existem dois elétrons desemparelhados de mesmo *spin*, o que faz com que essa molécula seja pouco reativa em meios biológicos devido à chamada impossibilidade quântica. Quando O_2 é reduzido, a adição de um elétron leva a formação do ânion superóxido, com um elétron desemparelhado. $\text{O}_2^{\cdot -}$ é um radical extremamente reativo que, através da reação de dismutação, recebe um elétron sendo reduzido a peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença do ferro, é transformado em um radical hidroxil e em uma hidroxila, a partir da Reação de Fenton descrita abaixo:



E, por fim, a incorporação de um último elétron leva a formação de água (HALLIWELL, 2005; VALKO et al., 2007).

O ânion superóxido exerce papel importante na produção das demais EROs, já que é o resultado da primeira redução do oxigênio e é uma molécula altamente reativa com meia vida de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que desencadeia a formação das demais espécies (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Ele é formado em quase todas as células aeróbicas, sendo que a sua principal fonte seria o vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 2005). Entretanto, outras vias de formação do $O_2^{\cdot-}$ foram descritas, tais como a via da xantina oxidase (XO), a formação pelo sistema NADPH oxidase e ainda pelo citocromo P-450 redutase microsomal (LEWIS, 2002). Também foi demonstrado que o ânion superóxido é produzido durante o *burst* respiratório das células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos), exercendo uma função bactericida (KIM et al., 2015). Apesar de ser relatado principalmente por seu papel deletério ao organismo decorrente da sua alta reatividade, evidências sugerem que pequenas quantidades de $O_2^{\cdot-}$ extracelular possam ser geradas como moléculas de sinalização intercelular, por outros tipos celulares, incluindo células endoteliais, linfócitos e fibroblastos, além de regular a atividade de diversos fatores de transcrição. O superóxido também pode estar envolvido na detecção dos níveis sanguíneos de O_2 pelo corpo carotídeo, o que demonstra a importância dessa molécula para os sistemas biológicos (HALLIWELL, 2005; KIM et al., 2015).

A importância biológica dessas espécies vem sendo elucidada desde a década de 1940, com a introdução de ferramentas experimentais para a detecção das EROs. Os métodos experimentais utilizados para estudar essas espécies devem superar os problemas associados à sua alta reatividade e ao tempo de meia vida bastante curto (BERGENDI et al., 1999). Em variados estudos, são utilizadas técnicas indiretas para a detecção de EROs, tais como biomarcadores de estresse oxidativo. Entre as técnicas utilizadas estão a mensuração de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, por meio do ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), e de enzimas que participam do sistema endógeno de controle do estresse oxidativo do organismo, como a glutathione peroxidase e a catalase (CRISTIANA; NINA; ELE, 2012; CZERSKA et al., 2015).

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é uma técnica espectroscópica que vem sendo utilizada para a medida quantitativa de EROs em sistemas biológicos. O funcionamento do equipamento de EPR está esquematizado na figura 4. Ela se baseia na inversão de *spin* de materiais que tenham um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, pode detectar diretamente radicais livres. Entretanto o baixíssimo tempo de meia vida dessas espécies e o tempo muito curto

de decaimento dos *spins* excitados no estado *up* para o *down*, o que implica em uma largura de transição longa que não é registrada pelo equipamento, se mostram um empecilho da técnica para a detecção direta de EROs (HAWKINS; DAVIES, 2014).

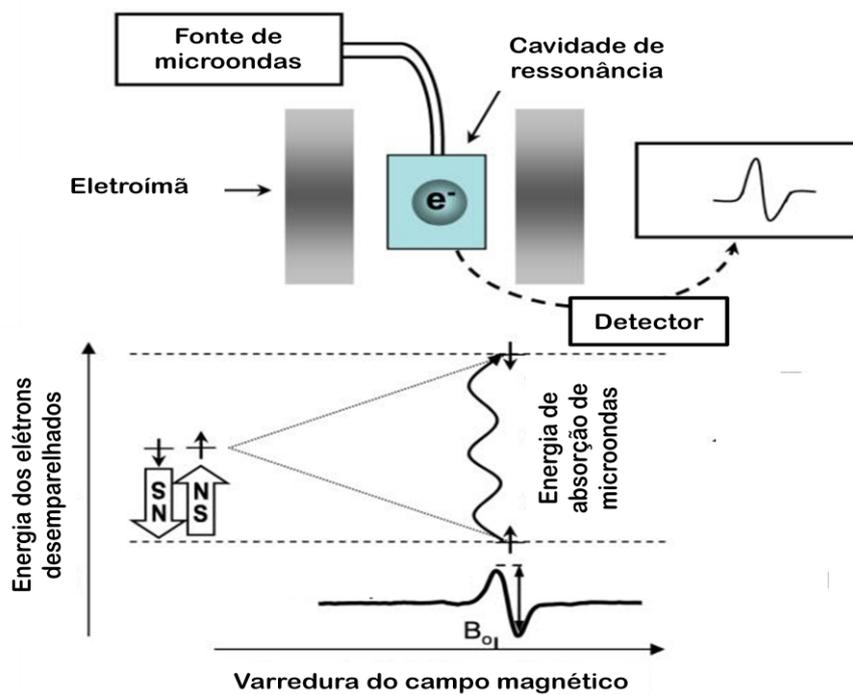


Figura 4: Esquema do funcionamento de espectrômetro de EPR. No equipamento, uma fonte da radiação eletromagnética gera microondas que incidem sobre a amostra localizada na cavidade de ressonância, que é uma estrutura metálica amplificadora de sinais fracos vindos da amostra. O eletroímã é necessário para desdobrar os níveis eletrônicos. Existe também um console contendo o detector, processador de sinais, os controles eletrônicos e o computador, usado para análise de dados e para controlar todas as unidades necessárias para adquirir os espectros.

Devido a sua alta reatividade e também por mecanismos antioxidantes presentes no próprio organismo as concentrações das EROs *in vivo* são da ordem de pico ou nanomolar. Considerando essas características e as limitações do equipamento de EPR, faz-se necessário o uso de marcadores de *spin* para a detecção de EROs em sistemas biológicos. Esses marcadores reagem com as espécies reativas e formam produtos estáveis, que emitem sinais detectáveis por EPR (DIKALOV; HARRISON, 2014).

Para as análises *in vivo* e *ex vivo* foram desenvolvidas primeiramente técnicas de *spin trapping*, usando substâncias que formam uma ligação covalente com o radical. Entretanto, o uso dessa técnica é limitado, já que a constante dessa ligação é lenta, o que dificulta a ligação ao $O_2^{\cdot -}$, que tem uma meia vida muito mais curta.

Com isso, foram então desenvolvidas as *spin probes*, moléculas que são oxidadas pelas EROs e, apenas após essa oxidação, formam adutos estáveis que emitem sinal característico de EPR, sendo então uma ferramenta bastante sensível para a mensuração de EROs em sistemas biológicos (DIKALOV; HARRISON, 2014; HAWKINS; DAVIES, 2014).

Com o avanço das técnicas de detecção e quantificação de EROs, o uso de *spin probes* detectáveis por EPR se mostra uma ferramenta importante para o estudo do papel fisiológico e patológico dessas espécies em diversos modelos seja *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

Deve ser dada atenção também as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), sendo a principal delas o óxido nítrico (NO^{\bullet}), um radical livre abundante no organismo que atua como importante molécula de sinalização em vários processos biológicos, como neurotransmissão, relaxamento de musculatura lisa e regulação da pressão arterial e de mecanismos de defesa (VALKO et al., 2007).

Entretanto, em condições patológicas, como por exemplo, em situações de isquemia e reperfusão, a produção de NO^{\bullet} pode se tornar prejudicial, já que a reação do NO^{\bullet} com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma o peroxinitrito (ONOO^-), uma molécula altamente reativa, que pode reagir com grupamentos de proteínas, lipídios ou ácido desoxidoribonucleico (DNA) (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

Assim como existem as maquinarias para o controle do estresse oxidativo, através de enzimas como a SOD e catalase, o NO^{\bullet} produzido em situações patológicas é removido pela difusão através dos tecidos para os glóbulos vermelhos, onde é rapidamente convertido em nitrato quando reage com a oxihemoglobina. Esse processo de transferência de NO^{\bullet} para eritrócitos controla a biodisponibilidade de NO^{\bullet} de plasma (DIKALOV; FINK, 2005; FAGO et al., 2013).

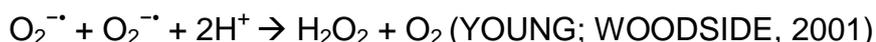
Foi sugerido que NO^{\bullet} , em condições fisiológicas, é prioritariamente consumido em vez de conservado pela reação com a oxihemoglobina, onde apenas uma parte será destinada à formação de HbNO, que pode ser detectável pela técnica de EPR. Dikalov e Fink (2005) em experimentos com sangue de ratos mostraram que apenas 10% de NO disponível forma HbNO, enquanto a outra parte é oxidada em nitrito.

1.4. EROs, INFLAMAÇÃO E FEBRE

Nos sistemas biológicos, EROs, assim como as ERNs, são produtos do metabolismo das células. É bem estabelecido que essas espécies exerçam um papel dual, sendo tanto deletérias quanto benéficas em algumas situações (VALKO et al., 2007; WALTON, 2016).

Em condições fisiológicas a produção de EROs é balanceada pela presença de diversos sistemas antioxidantes endógenos. Quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e esses mecanismos antioxidantes, temos o chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode causar danos nas membranas celulares devido à peroxidação lipídica, mudanças na estrutura e função de proteínas decorrentes a sua oxidação ou ainda danos na estrutura do DNA (KIM et al., 2015). O estresse nitrosativo é um processo que ocorre em paralelo com o estresse oxidativo, e acontece quando há um desequilíbrio entre a produção de ERNs e o consumo dessas espécies (KURUTAS, 2015).

Para manter em homeostasia esse sistema redox, o organismo desenvolveu diversos sistemas antioxidantes. Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzidos pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) envolvem mecanismos preventivos, de reparo ou mesmo antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os sistemas enzimáticos mais importantes, estão a catalase, primeira enzima antioxidante descoberta, que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; a glutathiona peroxidase, presente no citosol e que catalisa a oxidação da glutathiona (GSH) à custa de um hidroperóxido, como o H_2O_2 e a superóxido dismutase (SOD), enzima presente nos mamíferos em três formas diferentes (CuZnSOD, encontrada no citoplasma, MnSOD, localizado nas mitocôndrias e uma SOD extracelular – EC-SOD), que catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio através da reação:



A inflamação é das situações em que esse desbalanço entre produção de EROs e mecanismos antioxidantes ocorre. Durante a resposta inflamatória, são produzidas diversas substâncias, incluindo os radicais livres, que desempenham um papel crucial no aparecimento e progressão da reação. Já nas primeiras fases do processo, os radicais podem ativar fatores nucleares, como o NF- κ B que vão então

induzir a síntese de citocinas (CLOSA; FOLCH-PUY, 2004). Resumidamente, a partir de um estímulo, como por exemplo, um dano tecidual, diferentes fontes de espécies reativas de oxigênio são ativadas (mitocôndrias, xantina oxidase e neutrófilos). Subsequentemente, as EROs produzidas podem ativar algumas vias de transdução de sinal, como das MAPKs e do NF- κ B que por sua vez ativam moléculas efetoras essenciais para as respostas celulares, como as citocinas que vão desencadear a resposta inflamatória sistêmica (CLOSA; FOLCH-PUY, 2004).

Outros estudos demonstram que as EROs advindas das mitocôndrias podem ativar a produção de citocinas, como IL-6 e IL-1 β , por vias dependentes ou não de inflamassoma, como pode ser observado na Figura 5, em que o LPS ativa o TLR4 e induz a produção de O $_2^{\cdot-}$ e H $_2$ O $_2$ que vão bloquear a ação de reguladores negativos da produção de IL-6, como por exemplo, MAPK fosfatase. Já na via dependente do inflamassoma, as EROs induzem a ativação de NLRP3, responsável por clivar a pró-IL-1 β em sua forma madura (BULUA et al., 2011; NAKAHIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

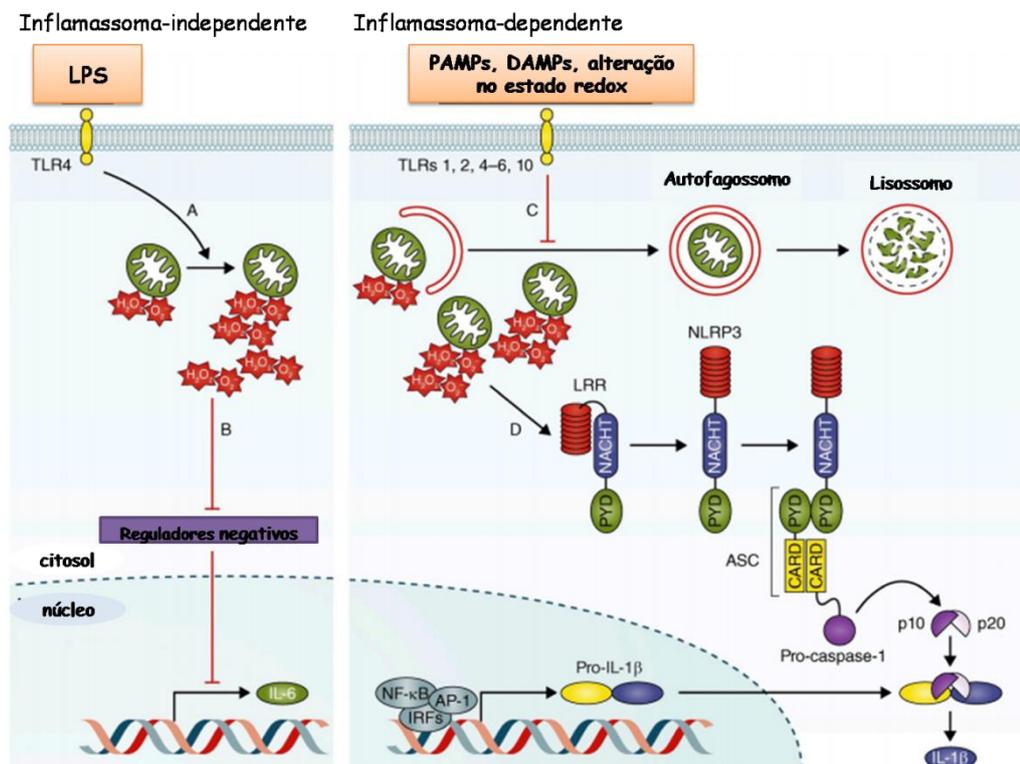


Figura 5: Mecanismo sugerido para a produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de ROS. Adaptado de (NAIK; DIXIT, 2011).

É bem estabelecida a relação entre a produção de EROs e a inflamação, ainda que os mecanismos moleculares não estejam completamente elucidados. Durante a resposta febril, por outro lado, foram encontrados poucos trabalhos investigando o papel das EROs, de forma que a relação entre essas espécies e a febre não foi estabelecida e, portanto, mais estudos são necessários nesta área. Riedel e colaboradores (2003) demonstraram que durante a febre induzida por LPS em coelhos, há um aumento da concentração de peróxidos plasmáticos, que é revertido pelo tratamento com azul de metileno e, ácido α -lipóico – agentes antioxidantes e pela aspirina. Anteriormente esse mesmo grupo demonstrou que durante a febre, há um aumento de malonaldeído em tecidos periféricos, e como este é um produto da peroxidação lipídica, indica-se que estruturas celulares são atacadas por EROs durante a febre (RIEDEL; MAULIK, 1999).

De acordo com esses autores, a elevação de temperatura corporal por pirógenos seria induzida por um desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes celulares, visto que se detectou a ocorrência de estresse oxidativo no cérebro, dependente de uma relação entre a quantidade de glutathione reduzida e a glutathione oxidase no local (RIEDEL et al., 2003).

Em 2011 Wrotek e colaboradores demonstraram que a n-acetilcisteína (NAC), um agente mucolítico e antioxidante bastante utilizado na prática clínica, reduz a febre induzida por LPS ou turpentina em ratos. Recentemente, esses autores verificaram que o efeito antipirético da NAC está relacionado com o aumento da concentração de IL-10, citocina com ação antipirética endógena (WROTEK et al., 2016).

Diversos estudos têm demonstrado em diferentes modelos experimentais que fármacos antiinflamatórios apresentam ação antioxidante (MAHARAJ et al., 2004; MERRILL; GOLDBERG, 2001; MILATOVIC et al., 2011; MOUITHYS-MICKALAD et al., 2004), além de agir como sequestradores de NO^* (COSTA; VIEIRA; FERNANDES, 2006; SENBEL; ABDELMONEIM; OMAR, 2014) o que sugere que parte de seu mecanismo de ação possa estar relacionado com a redução na concentração de EROs e ERNs.

A resposta febril é um processo multifatorial e embora seja uma das situações clínicas mais comuns, seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente elucidados, assim como o mecanismo de ação dos antitérmicos. A investigação da concentração de EROs e ERNs durante a febre e antipirese pode

revelar vias de sinalização que podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Quantificar a produção temporal de EROs no hipotálamo, fígado, tecido adiposo marrom e sangue de ratos durante a febre induzida por LPS;
- ✓ Investigar o efeito dos tratamentos com ibuprofeno, paracetamol, dipirona, celecoxibe e n-acetilcisteína sobre a concentração de EROs durante a antipirese;
- ✓ Quantificar a produção temporal de NO no sangue de ratos durante a resposta febril induzida por LPS;
- ✓ Investigar o efeito dos tratamentos com ibuprofeno, paracetamol, dipirona, celecoxibe e n-acetilcisteína sobre a concentração de NO durante a antipirese.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os ensaios farmacológicos foram realizados utilizando ratos (*Rattus norvegicus*) da variedade *Wistar*, machos, pesando entre 200 e 250 g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) e ficaram alojados em ambiente com temperatura de $24^{\circ} \pm 1$ °C, sob um ciclo claro-escuro de 12 h, 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 entre 8:00 e 18:00. Este 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).

3.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL

Para o monitoramento da temperatura dos animais, foram implantados transmissores de temperatura (*Data Loggers Subcue*, Calgary Canadá) na cavidade peritoneal dos ratos. Os transmissores foram desinfetados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Cloridrato de Cetamina 10 %, Ketamina Agener[®], Agener União, São Paulo, Brasil) e xilazina 2 % (Calmiun[®], Agener União, São Paulo, Brasil), nas doses de 60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (ip). Após tricotomia e anti-sepsia da pele, foi feita laparotomia e o transmissor lavado com solução salina estéril foi inserido na cavidade peritoneal. Em seguida, o músculo e a pele da incisão foram separadamente suturados. Após a cirurgia os animais receberam tratamento com antibiótico (Cloridrato de Oxitetraciclina, Terramicina[®], Pfizer, São Paulo, Brasil) e antiinflamatório (dexametasona, Labovet Produtos

Veterinários Ltda, Bahia, Brasil). Aguardou-se um período de recuperação de sete dias para a realização dos experimentos farmacológicos nos animais.

3.3. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS

A temperatura corporal dos ratos durante os ensaios foi medida através dos transmissores implantados na cavidade peritoneal. Os animais permaneceram na sala de experimentação, com temperatura controlada, por pelo menos 12 h antes do início dos experimentos. A temperatura corporal foi mensurada em intervalos de 15 min, iniciados 2 h antes de qualquer injeção até o final do experimento. A temperatura basal de cada animal foi determinada pelas quatro medições anteriores a qualquer tratamento. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, temperatura ambiente controlada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (GORDON, 1990).

O índice de febre foi calculado subtraindo-se o valor da temperatura basal das medidas individuais obtidas após a injeção do LPS até a eutanásia dos animais. Foi calculada a área sob a curva (ASC) para cada animal usando para isto o índice de febre expresso em unidades arbitrárias.

3.4. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS

3.4.1. Produção de EROs em diferentes tempos da febre induzida por LPS

Para determinar a produção de EROs durante a resposta febril, ratos *Wistar* receberam injeção endovenosa de LPS ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) ou seu veículo (salina 0,9 %, 2 mL/Kg). A dose de LPS usada foi padronizada anteriormente para os experimentos em nosso laboratório.

A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante toda a duração do experimento. Após 2,5 ou 5 h os animais foram

anestesiados para coleta de sangue e então eutanasiados por decapitação para a dissecação do hipotálamo, tecido adiposo marrom e fígado.

3.4.2. Padronização de dose dos antipiréticos

Com o objetivo de determinar as doses dos antitérmicos capazes de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS em nossas condições experimentais os animais receberam pré-tratamento com cada um dos fármacos por via oral. As doses escolhidas para cada fármaco foram selecionadas de acordo com dados da literatura (KANASHIRO et al., 2009), sendo elas: 120 mg/kg de dipirona (Cristália Prods. Quims. Farmaceut. Ltda., São Paulo, Brasil), 20 mg/kg de ibuprofeno (Sigma ChemCo., St. Louis, EUA), 10 mg/kg de celecoxibe (Celebra[®], Pfizer, São Paulo Brasil) ou 180 mg/kg de paracetamol (Sigma ChemCo., St. Louis, EUA). Os fármacos foram diluídos em água estéril, com exceção do paracetamol, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 20 %. Os animais controle receberam gavagem com água estéril ou DMSO 20 %.

Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam injeção endovenosa de LPS (endotoxina de *E. coli* 0111:B4, Sigma ChemCo., St. Louis, EUA) na dose de 5 µg/kg ou seu veículo (solução salina, 2 mL/Kg). A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante 6 h. Em seguida, cada animal foi eutanasiado para a retirada dos transmissores de temperatura.

Para avaliar os efeitos antipiréticos da n-acetílcisteína, os animais receberam o fármaco por via oral, na dose de 500 mg/Kg 30 min antes da injeção endovenosa de LPS (5 µg/kg) ou solução salina estéril. Os animais controles receberam água por via oral. A partir da injeção do estímulo cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante 5 h. Em seguida, cada animal foi eutanasiado para a retirada dos transmissores de temperatura e coleta dos tecidos.

3.5. COLETA DOS TECIDOS

Ratos Wistar foram aleatoriamente separados em grupos de cinco animais, e foram repetidos os experimentos farmacológicos descritos acima. Após 5h do estímulo com injeção endovenosa de LPS, os animais foram anestesiados para a coleta dos tecidos. Primeiramente foi feita incisão no tórax do animal para expor o coração. Com uma seringa heparinizada, foi feita punção no ventrículo direito para a coleta de sangue. Em seguida foi dissecado parte do seguimento medial anterior do lóbulo esquerdo do fígado. Os animais foram então decapitados e a calota craniana aberta para que o cérebro fosse exposto. Para a dissecação do hipotálamo foram considerados os seguintes limites: borda anterior do quiasma óptico, borda anterior dos corpos mamilares e o sulco hipotalâmico lateral, com uma profundidade de 2 mm (PAXINOS; WATSON, 2013). O tecido adiposo marrom foi dissecado na região interescapular dos animais, onde é observada uma massa lobulada de gordura de cor marrom. Todos os tecidos sólidos coletados foram fatiados em quatro pedaços de aproximadamente 2x2 mm e colocados em tubo contendo 400 µL de tampão Krebs- HEPES (KHB).

3.6. PREPARO DE AMOSTRAS PARA MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR EPR

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, em tampão Krebs HEPES (KHB) (NOX-7.6, Noxygen, Alemanha), dissolvido em água bi-destilada e deionizada. Preparou-se uma solução estoque com concentração de 10 mM com a *spin probe*: 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) (NOX-2, Noxygen, Alemanha), dissolvida em KHB contendo 25 mM de deferoxamina (DF) (NOX-9, Noxygen, Alemanha), um quelante de ferro e trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC) (NOX-10, Noxygen, Alemanha), um quelante de cobre, na concentração de 5 mM. As soluções foram mantidas resfriadas durante todo o decorrer dos experimentos.

Para a quantificação de HbNO, 1 mL de sangue foi colocado em seringa heparinizada. As seringas foram centrifugadas a 2000 g por 5 min e então congeladas em N₂(l).

Para a quantificação de EROs no sangue foi preparada uma solução de CMH a 400 µM e heparina sódica (100 UI/ml) (Hepamax-S[®], Blausiegel Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil). Foi adicionado sangue a essa solução na proporção 1:1, e incubado sob agitação por 30 min a 37 °C. Após esse tempo foi adicionado em uma seringa onde foi colocada 200 µL de água, congelada em nitrogênio líquido, em seguida 50 µL da amostra de sangue, que também foi congelada e então mais 200 µL de água, congelando então todo o conteúdo da seringa.

Os tecidos dissecados foram lavados três vezes com KHB. Após essa lavagem, foi adicionada a cada tecido uma solução de 200 µM de CMH e 50 UI/mL de heparina sódica, e foi levada a incubação sob agitação a 37°C por 1 h. Terminada a incubação, 450 µL do sobrenadante foram colocados em seringa e imediatamente congelados em N₂(l). Os tecidos foram então secos em *speed vac* e então pesados.

Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até as medidas em EPR fossem realizadas.

3.7. MEDIDAS DE EPR

Ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica baseada na absorção de radiação eletromagnética, geralmente na região das microondas, por uma amostra paramagnética, (como por exemplo, espécies com um ou mais elétrons desemparelhados), quando são submetidos a um campo magnético. Essas absorções acontecem apenas em combinações de frequências e campo magnético muito bem definidas, que dependem da espécie paramagnética e suas características (HAWKINS; DAVIES, 2014). A partir desse princípio foram otimizados os parâmetros para a leitura das amostras.

As amostras congeladas foram transferidas das seringas para *Dewer* repleto com nitrogênio líquido. Todas as medidas de EPR foram realizadas à temperatura de nitrogênio líquido (77 K, equivalente a - 196 °C). Para a quantificação de HbNO, a quantidade de NO detectado foi determinada a partir da curva de calibração para a

intensidade do sinal EPR de eritrócitos tratados com concentrações conhecidas de nitrito (1, 10 e 100 μM) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (20 mg). Os eritrócitos foram preparados por centrifugação imediata do sangue de ratos a 2000 g durante 5 min.

Para a curva de calibração das medidas de EROs, foram preparadas amostras a partir de uma solução-mãe de 10 mM do padrão: 3-carboxi-proxilo (CP•) (NOX-8.2, Noxygen, Alemanha) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50, e 100 μM . Exatamente 450 μL das amostras de calibração foram transferidos seringas de 1 mL e congelados instantaneamente em N_2 (l).

As medidas de EPR foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX500, utilizando a banda X (9,35 GHz), potência 2 mW e campo de modulação de 200 Gauss, constante de tempo de 10 ms, tempo de varredura de 600 G e 5 varreduras adicionados em conjunto para cada medição. Os parâmetros e a análise dos dados foram baseados em metodologia padronizada e adaptados de acordo com as necessidades do nosso estudo.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm EPM. As comparações nos experimentos com dois grupos foram efetuadas por teste *t de Student*. As outras comparações estatísticas foram efetuadas por análise de variância a um fator (ANOVA *one-way*) seguida por teste de Tukey, com a utilização do programa estatístico Graph Pad Prism 7.0. O nível de significância considerado foi de 5 % ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DE DIFERENTES ANTITÉRMICOS SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS

Com o objetivo de padronizar as doses dos antitérmicos capazes de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS, os animais foram tratados por via oral com paracetamol, dipirona, ibuprofeno, celecoxibe ou com seus respectivos veículos, 30 min antes da administração intravenosa de 5 µg/kg de LPS ou do seu veículo (salina 1 mL/kg). Na dose utilizada, o LPS produziu febre prolongada, com perfil bifásico, que se iniciou cerca de 1,5 h após a sua injeção intravenosa, com picos de temperatura observados em aproximadamente 2,5 h e 5 h após a administração. A febre se manteve ao longo de todo período de observação de 6 h (Figura 6).

As doses orais dos antitérmicos utilizadas no presente estudo foram selecionadas com base no trabalho de Kanashiro e colaboradores (2009), e de forma semelhante ao verificado por estes autores, reduziram eficientemente a resposta febril induzida por LPS.

O pré-tratamento dos animais com dipirona (120 mg/kg) produziu redução de 31 % nos valores de temperatura mensurados entre 1,5 e 6 h após a injeção de LPS (Figura 6).

O ibuprofeno na dose de 20 mg/kg aboliu a febre até aproximadamente 4 h e manteve a redução da resposta febril durante as 6 h do curso do experimento, sendo observada uma redução de 50 % na área sobre a curva do grupo em relação ao grupo controle positivo (Água/LPS) (Figura 7).

Os animais pré-tratados com celecoxibe não apresentaram febre durante as 6 h de experimento (Figura 8), com redução de 76 % da temperatura em relação ao grupo Água/LPS.

Nenhum dos medicamentos causou alteração da temperatura dos animais controles que receberam salina por via intravenosa.

O paracetamol na dose de 180 mg/kg reduziu somente a primeira fase da resposta febril (Figura 9). Doses maiores causaram hipotermia significativa e não apresentaram aumento na duração do efeito do fármaco (dados não mostrados).

Como será detalhado adiante, o tempo escolhido para a análise da produção de espécies reativas foi de 5 h após o estímulo pirogênico. Assim, como o tratamento não apresentava resposta antipirética neste tempo, o paracetamol foi excluído dos experimentos posteriores.

A elevação de temperatura verificada na primeira hora após as injeções foi observada em todos os grupos experimentais, e decorre do estresse ocasionado pela manipulação dos animais durante a administração dos tratamentos e estímulos.

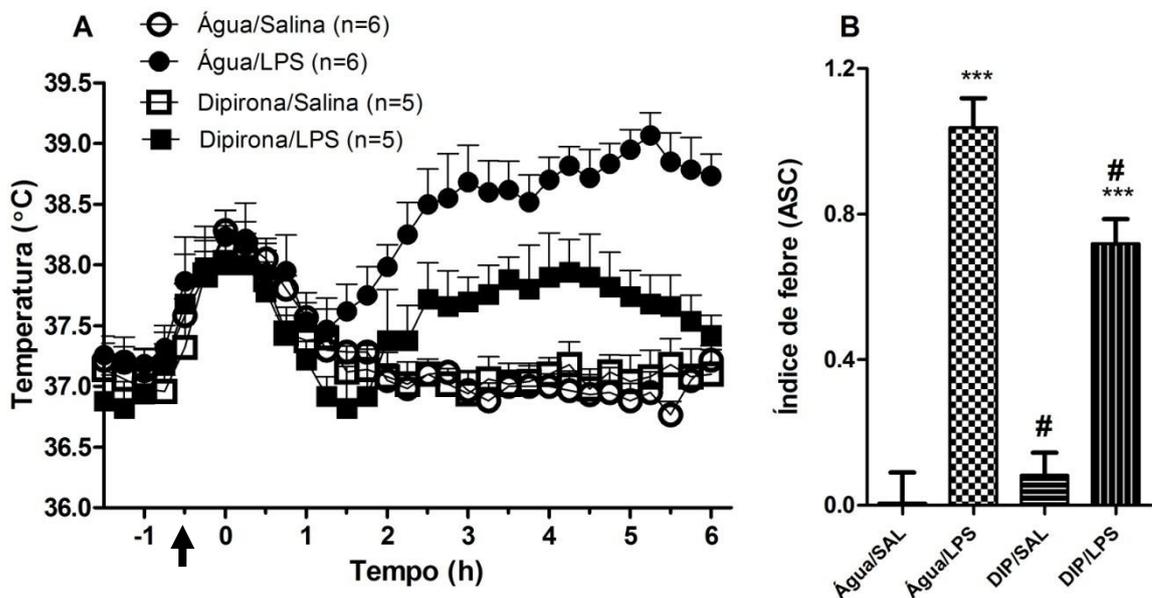


Figura 6: Efeito da administração oral de dipirone sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS. A dipirone foi administrada por via oral na dose de 120 mg/kg, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e água vo. A seta indica o momento do tratamento. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais. No painel B, as barras representam a média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo Água/salina. #p <0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo Água/LPS; *one-way* ANOVA, seguido por teste de Tukey.

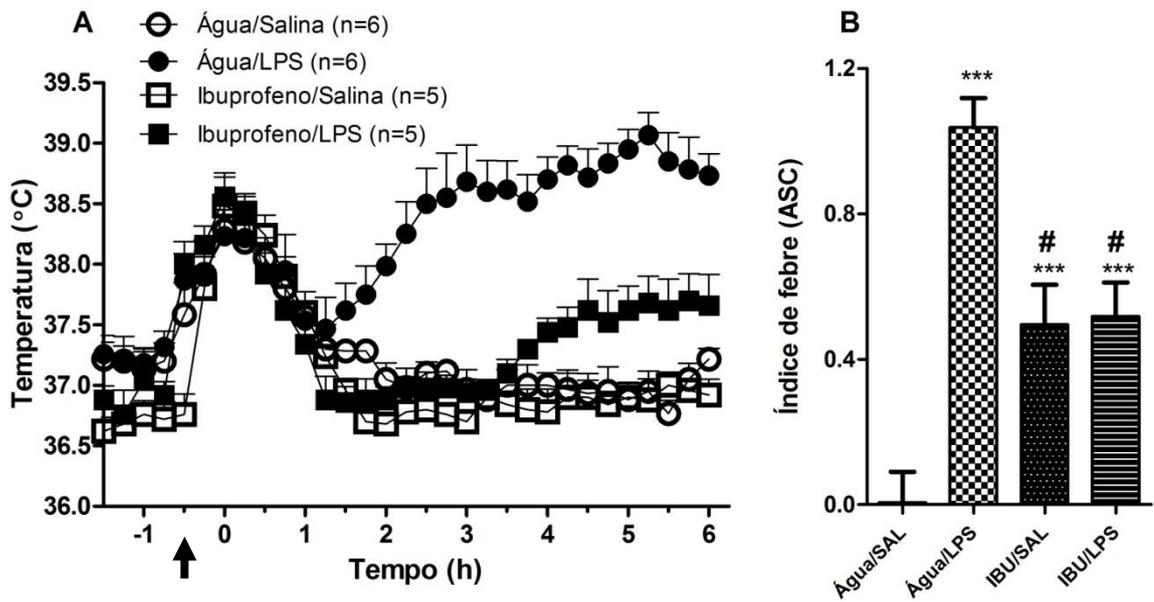


Figura 7: Efeito da administração oral de ibuprofeno sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS. O ibuprofeno foi administrado por via oral na dose de 20 mg/kg, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9 % iv, e água vo. A seta indica o momento do tratamento. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo Água/salina. #p <0,05 quando comparado ao grupo Água/LPS; *one-way* ANOVA, seguido por teste de Tukey.

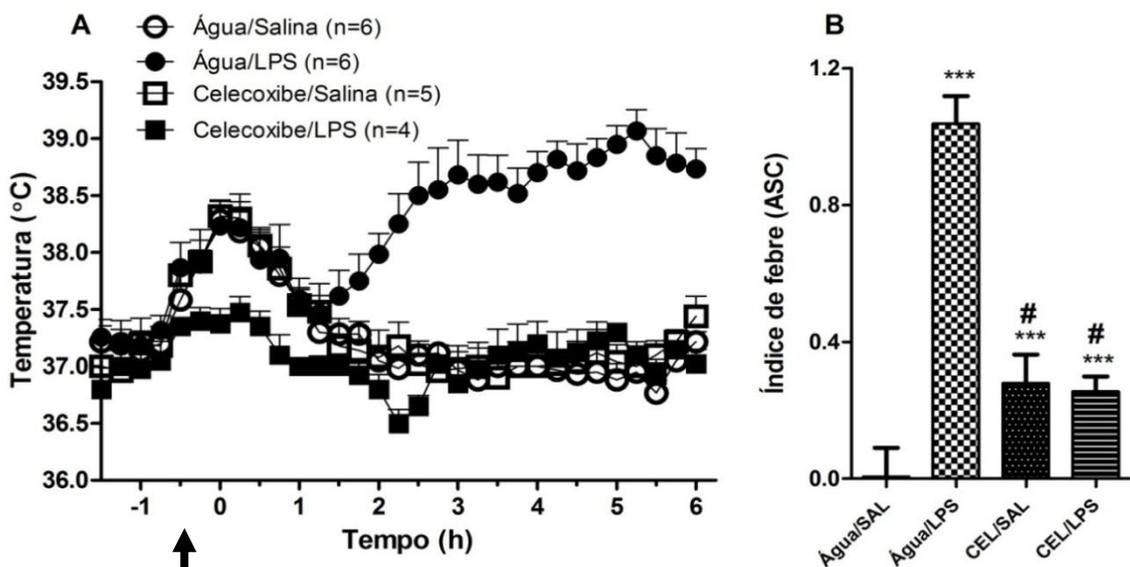


Figura 8: Efeito da administração oral de celecoxibe sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS. O celecoxibe foi administrado por via oral na dose de 10 mg/kg, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9 % iv, e água vo. A seta indica o momento do tratamento. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo Água/salina. #p <0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo Água/LPS; *one-way* ANOVA, seguido por teste de Tukey.

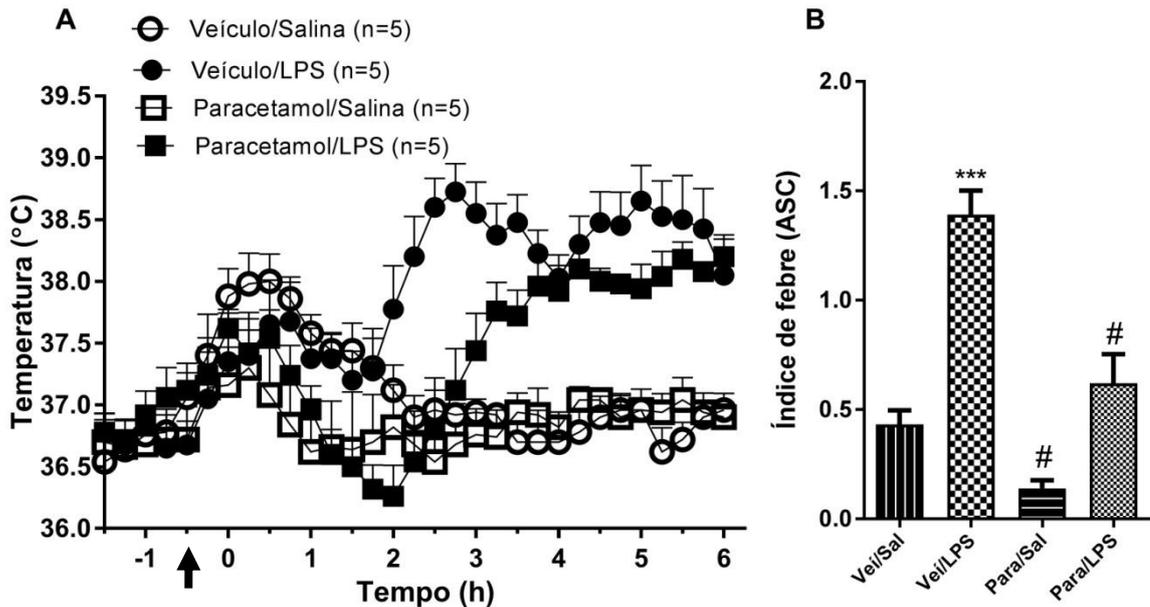


Figura 9: Efeito da administração oral de paracetamol sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS. O paracetamol foi administrado por via oral na dose de 180 mg/kg, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9 % iv, e DMSO 20 % vo. A seta indica o momento do tratamento. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,001$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo/LPS; *one-way* ANOVA, seguido por teste de Tukey.

4.2. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO HIPOTÁLAMO, FÍGADO, TECIDO ADIPOSEO MARROM E SANGUE DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio durante o curso da resposta febril, foram escolhidos dois tempos, correspondentes aos picos da febre característica do LPS (2,5 h e 5 h) para a eutanásia dos animais e coleta dos tecidos para os ensaios. Na Figura 10 podemos observar o perfil da febre induzida pelo LPS em 2,5 h, e a diferença de temperatura em relação à temperatura basal dos animais no momento da eutanásia (painéis A e B respectivamente), assim como dos animais eutanasiados após 5 h do estímulo pirogênico (painéis C e D). Todos os animais que

receberam LPS apresentaram elevação da temperatura corporal. A solução salina estéril não induziu alteração de temperatura nos animais do grupo controle.

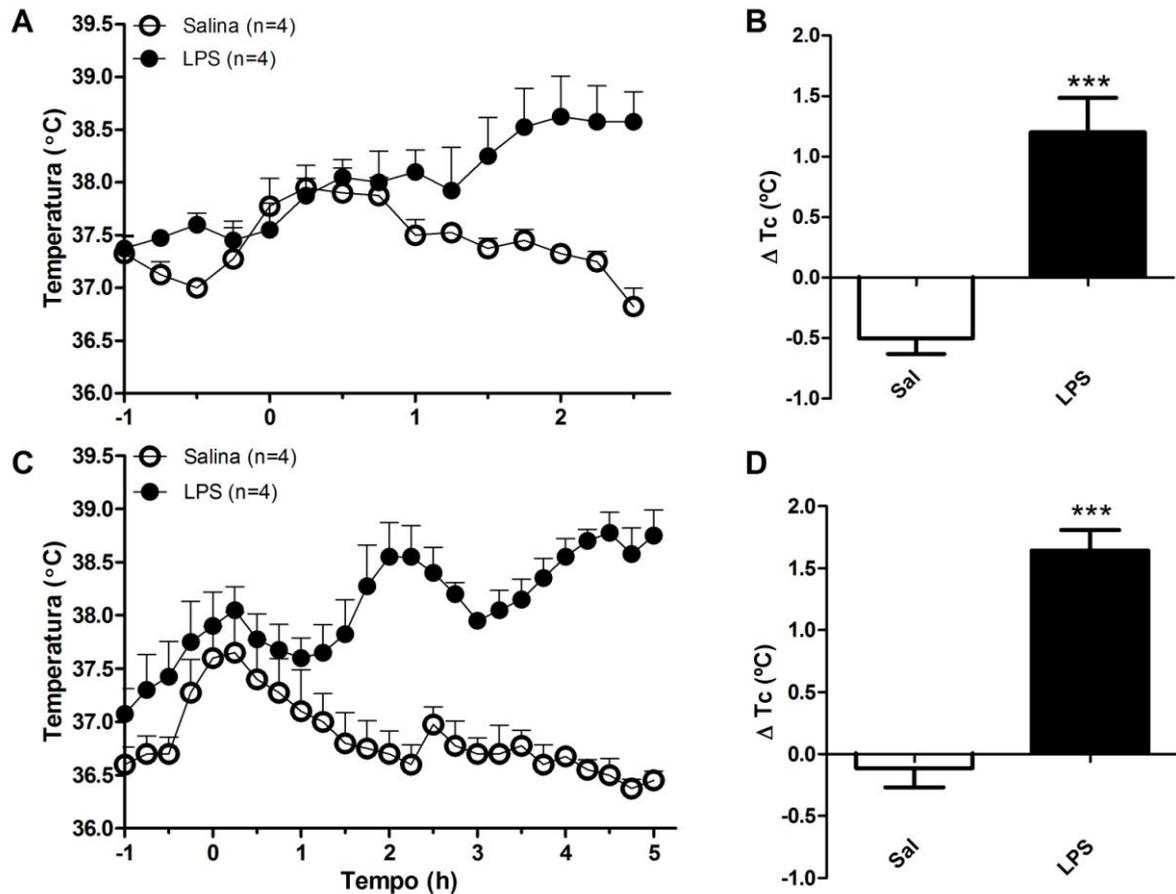


Figura 10: Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal de ratos 2,5 ou 5 h após o estímulo. O LPS foi administrado por via intravenosa (iv) na dose de 5 µg/Kg. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9 % (1 mL/Kg). Nos painéis A e C, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, até 2,5 h e 5 h após o estímulo, respectivamente. Nos painéis B e D, as barras representam a média ± EPM da diferença da temperatura corporal (em °C) no momento da coleta dos tecidos, em 2,5h e 5 h respectivamente, comparada a temperatura basal. (n) = número de animais. ***p < 0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina; teste *t de Student*.

Para a detecção e quantificação de EROs produzidas, os tecidos foram incubados com a *spin probe* CMH. A Figura 11 apresenta o espectro característico de EPR obtido a partir do sobrenadante do tecido adiposo marrom incubado com CMH de ratos que receberam LPS ou salina por via intravenosa. Pode-se observar uma maior amplitude no sinal correspondente ao LPS. As características do sinal

são as mesmas para todos os tecidos analisados, variando apenas em sua amplitude. A intensidade de sinal de EPR é definida pela derivada da absorção, considerando a amplitude do sinal obtido de um pico a outro do espectro.

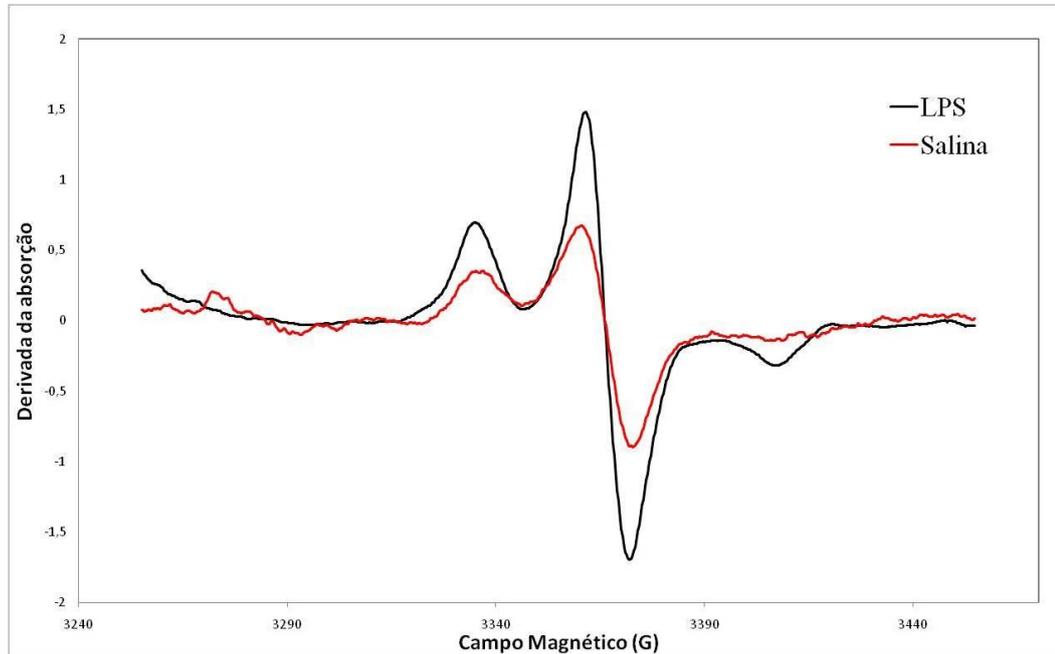


Figura 11: Espectro típico da spin probe CMH no TAM de animais 5 h após a administração de LPS ou salina (iv). A linha vermelha representa o espectro correspondente a animal do grupo salina, enquanto a linha preta corresponde a animal do grupo LPS. A amplitude do sinal de EPR é definida pelo valor de pico a pico mostrado na figura.

Entre os animais eutanasiados 2,5 h após o estímulo pirogênico, não foram encontradas diferenças significativas na produção de EROs em nenhum dos tecidos analisados (Figura 12). Quando a coleta dos tecidos foi realizada 5 h após o estímulo, pode ser observado um aumento na produção de EROs no fígado (49 %), hipotálamo (41 %) e tecido adiposo marrom (45 %) no grupo de animais que receberam LPS em relação ao grupo controle (Figura 13). Nas análises do sangue não foram encontradas diferenças na concentração de EROs em nenhum dos grupos.

Como foram encontradas alterações significativas apenas no tempo de 5 h após a injeção do estímulo, esse foi momento escolhido para a eutanásia dos animais nos experimentos posteriores.

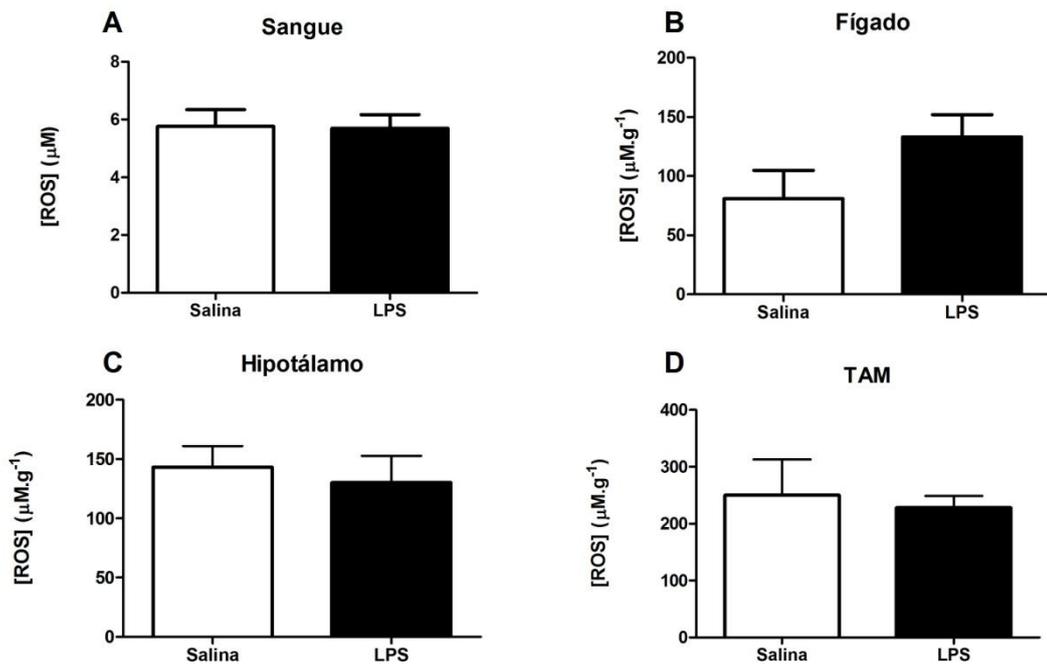


Figura 12: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM 2,5 h após a administração de LPS. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controle (em branco) e nos que receberam estímulo (em preto), nos diferentes tecidos coletados 2,5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n=4$). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina; teste *t* de Student.

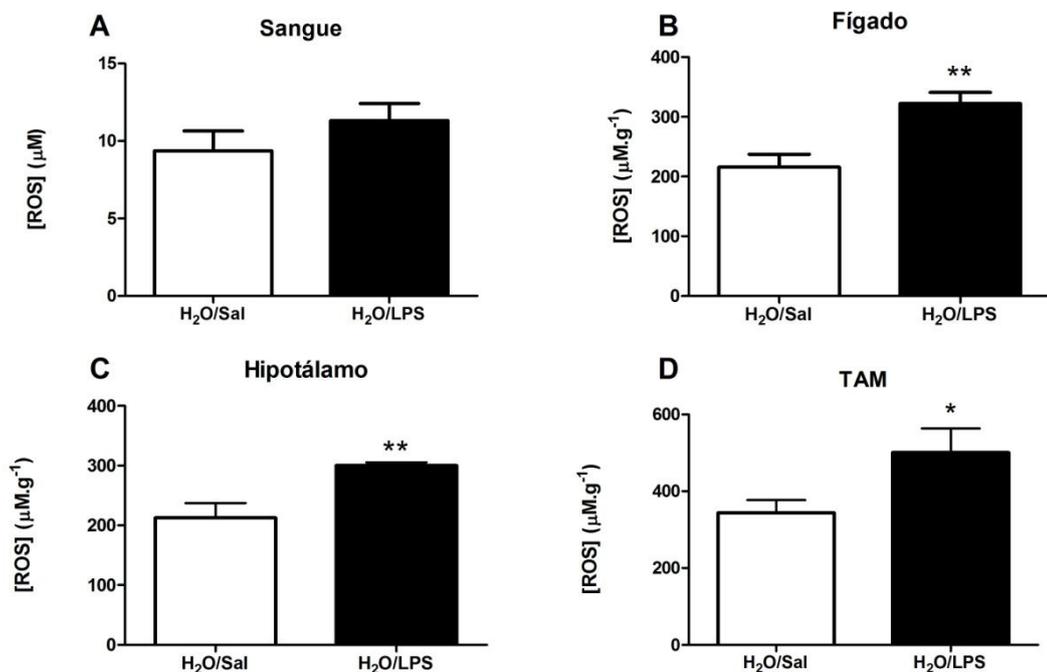


Figura 13: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM 5 h após a administração de LPS. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controle (em branco) e nos que receberam estímulo (em preto), nos diferentes tecidos coletados 5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n=4$). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina; teste *t* de Student.

Os resultados obtidos mostraram diferença na produção de EROs entre os tecidos sólidos analisados. Verificou-se que no TAM a produção de EROs é maior que no hipotálamo e no fígado, tanto no grupo controle, quanto no grupo que recebeu LPS como estímulo, o que indica maior taxa de produção basal de espécies reativas no TAM em relação aos outros tecidos (Figura 14).

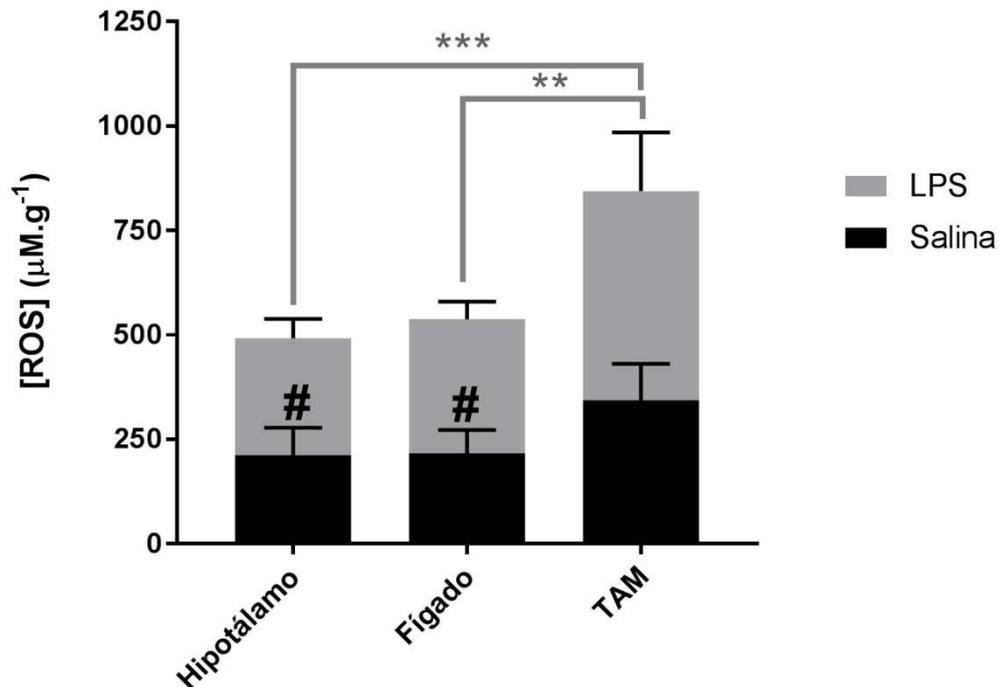


Figura 14: Produção de EROs por diferentes tecidos em animais controle e estimulados com LPS. É observada uma maior produção de espécies reativas no tecido adiposo marrom em relação ao hipotálamo ($p = 0,0106$) e ao fígado ($p = 0,0128$) no grupo dos animais que recebeu injeção de solução salina 0,9 % ($n = 7$). Nos animais tratados com LPS, também há aumento da produção de espécies reativas no tecido adiposo marrom em relação ao hipotálamo ($p = 0,0003$) e ao fígado ($p = 0,0032$) ($n = 5$). # $p < 0,05$, quando comparado a TAM (salina) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, *Two-way ANOVA*, seguido por teste de Tukey

4.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES ANTITÉRMICOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS NO HIPOTÁLAMO, FÍGADO, TECIDO ADIPOSEO MARROM E SANGUE DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS

Visando investigar o efeito de antitérmicos sobre a produção de EROs em diferentes tecidos, animais receberam por via oral dipirona, ibuprofeno ou celecoxibe 30 min antes do estímulo pirogênico. Os animais foram eutanasiados após 5 h da

injeção do LPS, momento escolhido por promover maior produção de EROs e no qual os medicamentos ainda apresentavam seus efeitos antitérmicos, como pode ser observado na Figura 15, que representa a diferença da temperatura corporal dos animais no momento da coleta dos tecidos em relação a sua temperatura basal.

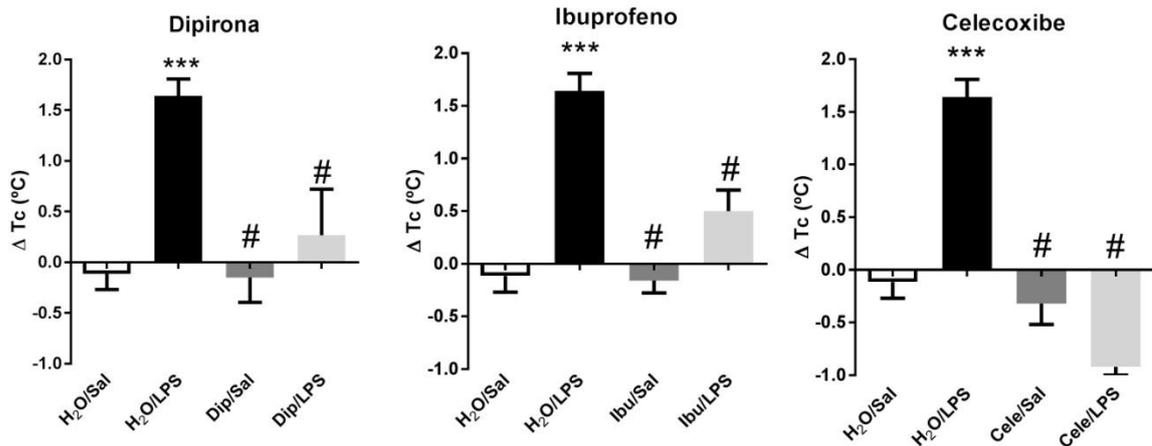


Figura 15: Temperatura corporal tratada com diferentes antitérmicos 5 h após estímulo pirogênico. As barras representam a média \pm EPM da diferença da temperatura corporal (em °C) no momento da coleta dos tecidos 5 h após a injeção de LPS (5 μ g/kg) ou salina (2 ml/kg), comparada a temperatura basal. (n = 4-7). ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo H₂O/Sal. #p <0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo H₂O/LPS; one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey.

Nos animais tratados com dipirone, não foram encontradas diferenças significativas na concentração de EROs no sangue (Figura 16). No hipotálamo verificou-se diferença entre o grupo H₂O/Sal e Dip/LPS. No fígado desses animais pode ser observado um aumento de aproximadamente 87 % na concentração de EROs em relação ao seu controle negativo (Dip/Sal) (Figura 16B). É observado um aumento também no TAM do grupo, que apresenta uma concentração de EROs 68% maior que no grupo Dip/Sal (Figura 16D).

Em todos os tecidos analisados não foram encontradas diferenças na concentração de EROs entre os grupos H₂O/LPS e Dip/LPS, o que indica que o aumento da produção de EROs é devido ao estímulo pirogênico e não em decorrência do tratamento com a dipirone.

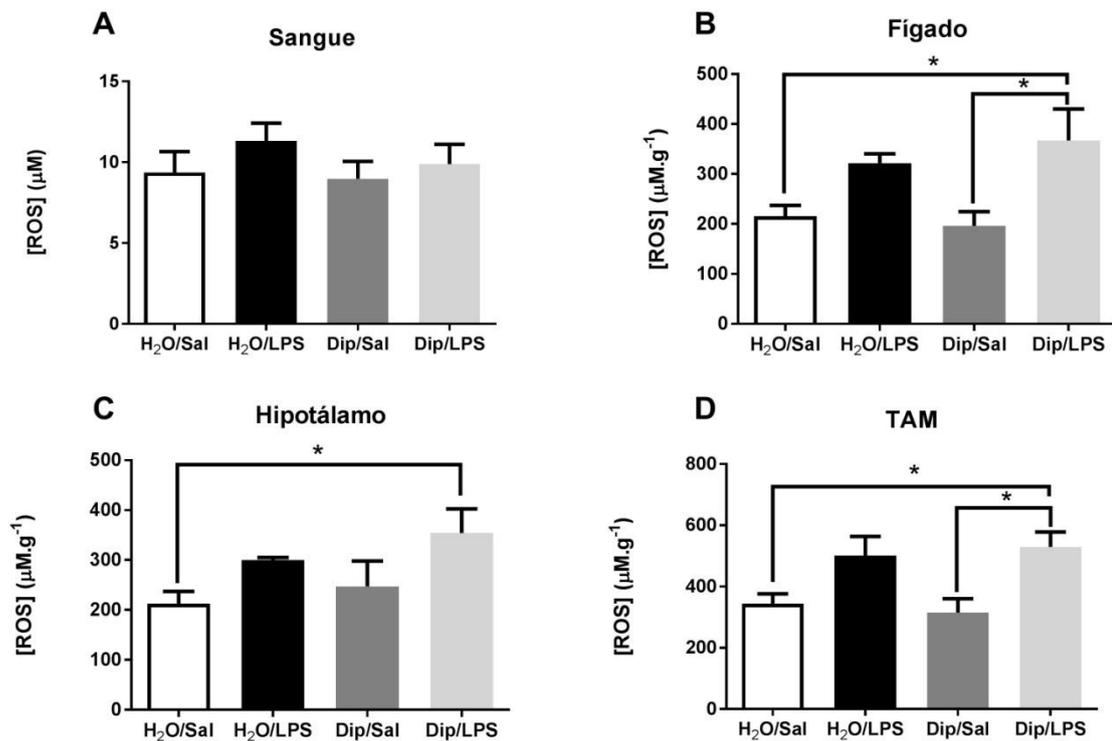


Figura 16: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com dipirona. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controles e tratados com o fármaco e sacrificados 5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n = 5-7$). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$, segundo *one-way ANOVA*, seguido de teste de Tukey.

O tratamento com ibuprofeno não levou a alterações significativas no sangue, hipotálamo ou TAM dos animais. Foi encontrado um aumento de 72 % na concentração de EROs no fígado dos animais tratados com o fármaco após o estímulo com LPS, em comparação ao grupo Ibu/Sal. Não foram encontradas alterações significativas quando comparadas ao grupo controle positivo (H₂O/LPS) em nenhum dos tecidos analisados (Figura 17).

O celecoxibe provocou um aumento de 133 % na produção de EROs no tecido adiposo marrom dos animais durante a resposta febril, quando comparado ao grupo Cele/Sal. Pode ser observada uma tendência ($p = 0,087$) de elevação na concentração de EROs quando comparado ao grupo H₂O/LPS. No fígado e sangue não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 18). A ANOVA de uma via aponta também diferença significativa entre os grupos H₂O/Sal e Cele/LPS no hipotálamo dos animais.

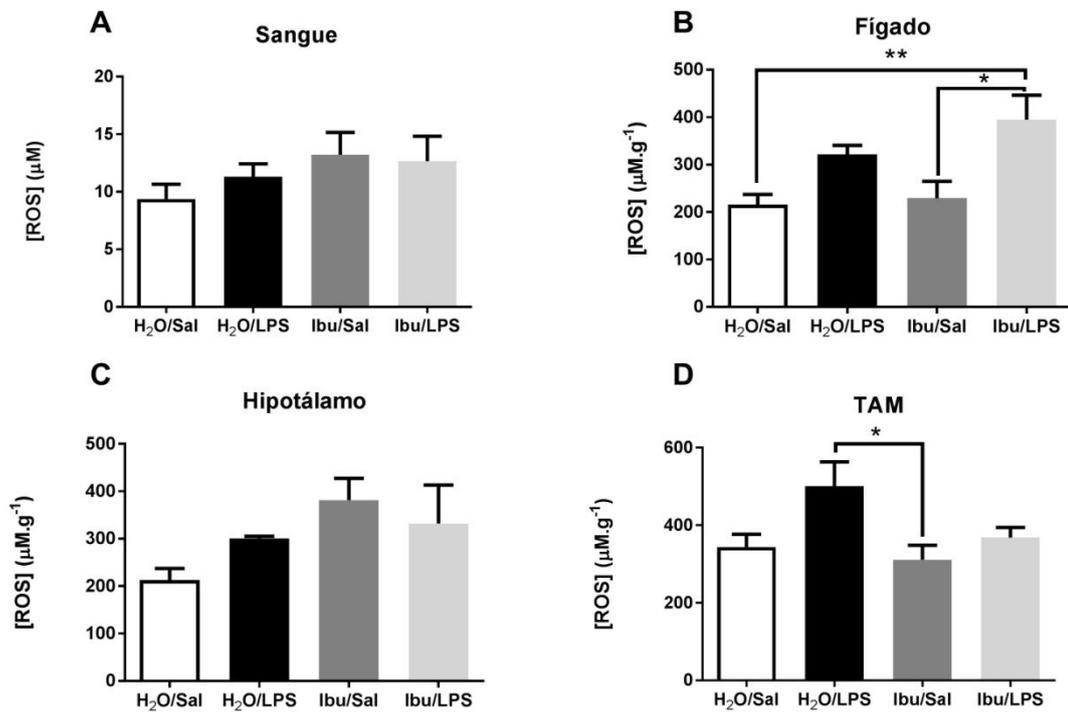


Figura 17: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com ibuprofeno. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controles e tratados com o fármaco e sacrificados 5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n=5-7$). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *one-way ANOVA*, seguido de teste de Tukey.

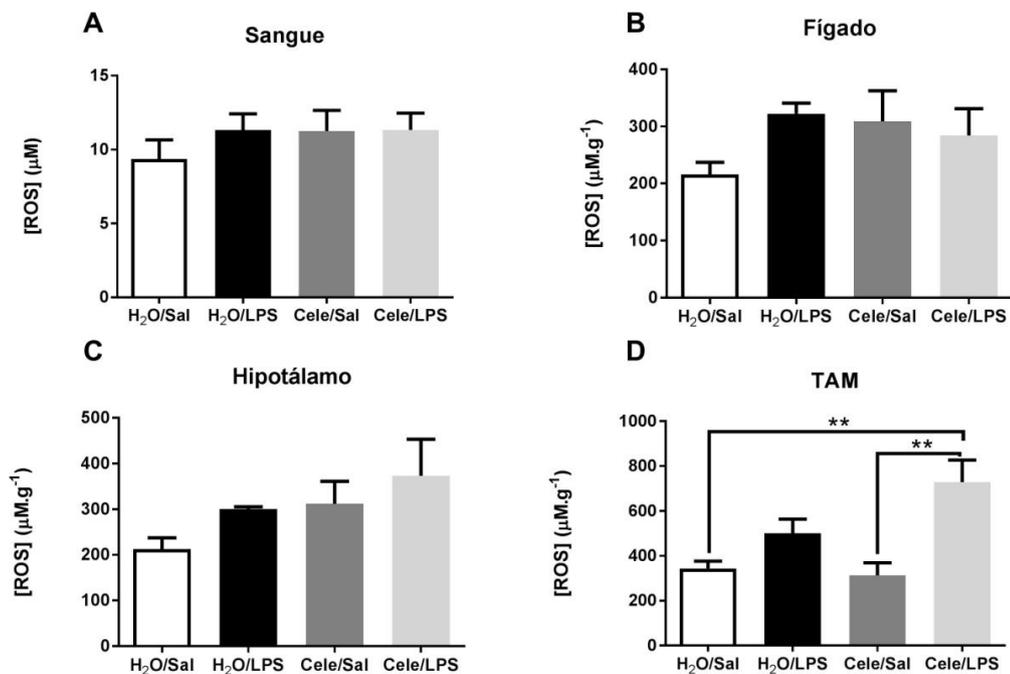


Figura 18: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com celecoxibe. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controles e tratados com o fármaco e sacrificados 5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n=5-7$). Os dados representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$; *one-way ANOVA*, seguido de teste de Tukey.

4.4. EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NA FEBRE INDUZIDA POR LPS E NA PRODUÇÃO DE EROS PELO SANGUE, FÍGADO, HIPOTÁLAMO E TAM

A n-acetilcisteína é utilizada na clínica principalmente devido ao seu efeito mucolítico. Entretanto, sabe-se que ela é uma excelente fonte de grupamentos sulfidríla e é convertida no organismo em metabólitos capazes de estimular a síntese de glutatona e agir como um seqüestrador de radicais livres. A n-acetilcisteína também apresenta efeito antitérmico, razão pela qual foi utilizada neste estudo.

A n-acetilcisteína foi administrada por via oral na dose de 500 mg/kg, 30 min antes da injeção intravenosa de LPS. Na figura 19, pode-se observar que os animais tratados com o fármaco apresentaram uma redução da resposta febril de 18 %, efeito que se estendeu até a quinta hora após a administração do LPS, momento que os tecidos foram coletados para a análise da produção de EROs. A n-acetilcisteína não alterou a temperatura corporal dos animais controle que receberam solução salina por via intravenosa.

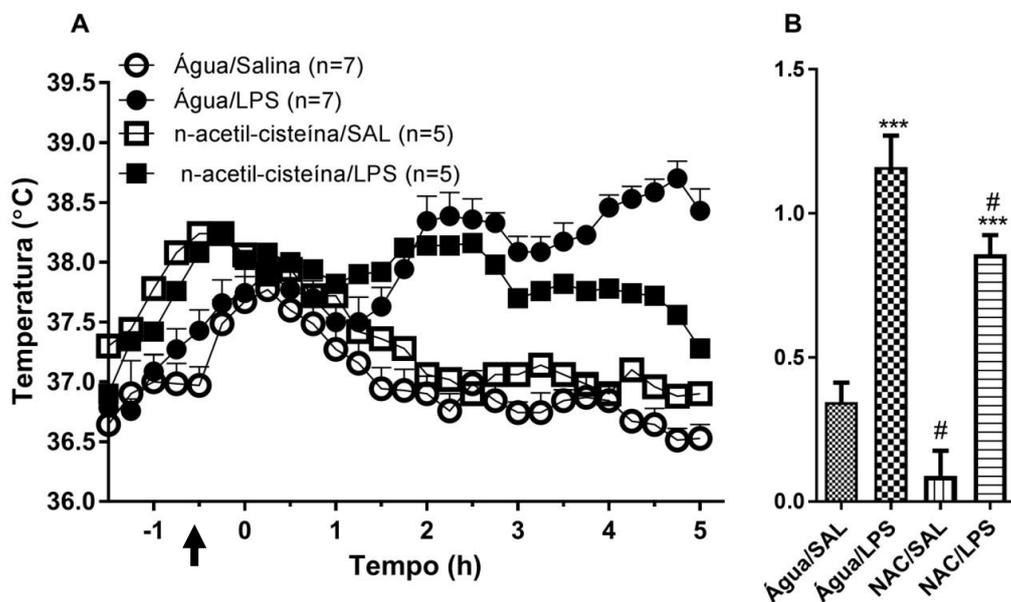


Figura 19: Efeito da administração oral de n-acetilcisteína sobre a resposta febril induzida pela injeção intravenosa de LPS. A n-acetilcisteína foi administrada por via oral na dose de 500mg/kg, 30 min antes da injeção iv de LPS (5µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e água vo. A seta indica o momento do tratamento. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais. No painel B, as barras representam média± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. #p <0,05 quando comparado ao grupo veículo/LPS. one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey.

Com o intuito de investigar se a n-acetilcisteína apresentava perfil antioxidante quando administrada por via oral em doses antipiréticas, procedeu-se a análise de quantificação de EROs por EPR no sangue, fígado, hipotálamo e TAM dos animais. Não foram encontradas alterações significativas no sangue ou TAM entre os grupos. A ANOVA de uma via indicou um aumento significativo no fígado dos animais nos grupos que receberam LPS em relação aos seus respectivos controles. No hipotálamo dos animais, pode ser verificada diferença entre o grupo H₂O/Sal e NAC/LPS (Figura 20).

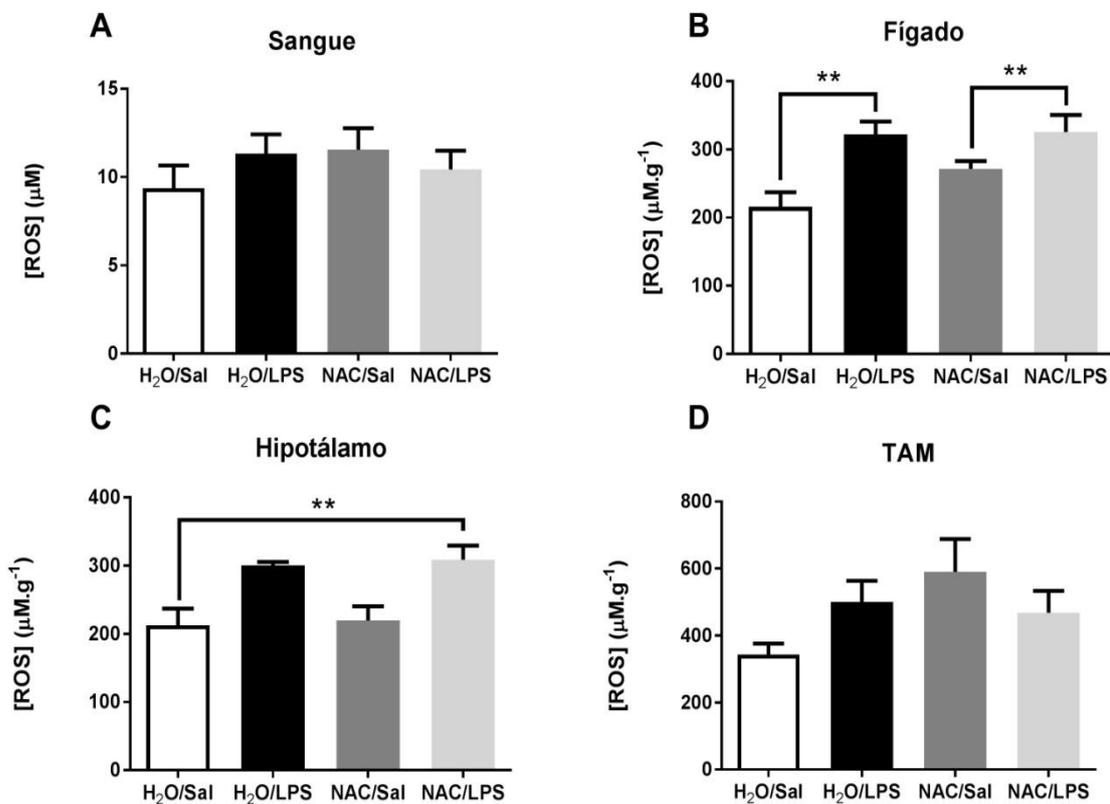


Figura 20: Concentração de EROs no (A) sangue, (B) fígado, (C) hipotálamo e (D) TAM de animais tratados com NAC. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupo controles e tratados com o fármaco e sacrificados 5 h após a injeção iv de LPS ou salina ($n = 5-7$). Os dados representam a média \pm EPM. ****** $p < 0,01$; *one-way ANOVA*, seguido por teste de Tukey.

4.5. FORMAÇÃO DE HEMOGLOBINA NITROSILADA DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS E TRATAMENTO COM FÁRMACOS COM PROPRIEDADES ANTIPIRÉTICAS

Com o objetivo de avaliar a produção de óxido nítrico periférico durante a febre e antipirese, foi quantificada a formação de Hemoglobina Nitrosilada (HbNO) em amostras de sangue.

A Hemoglobina Nitrosilada formada no sangue tem espectro de EPR característico e pode ser quantificada pela análise da amplitude de sinal, comparada a amplitude da curva de calibração preparada com eritrócitos lavados com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, que reduz oxihemoglobina em hemoglobina, e incubados com NaNO_2 , um doador de NO, em concentrações conhecidas. É medida a amplitude do espectro na região correspondente a HbNO como é indicado na Figura 21.

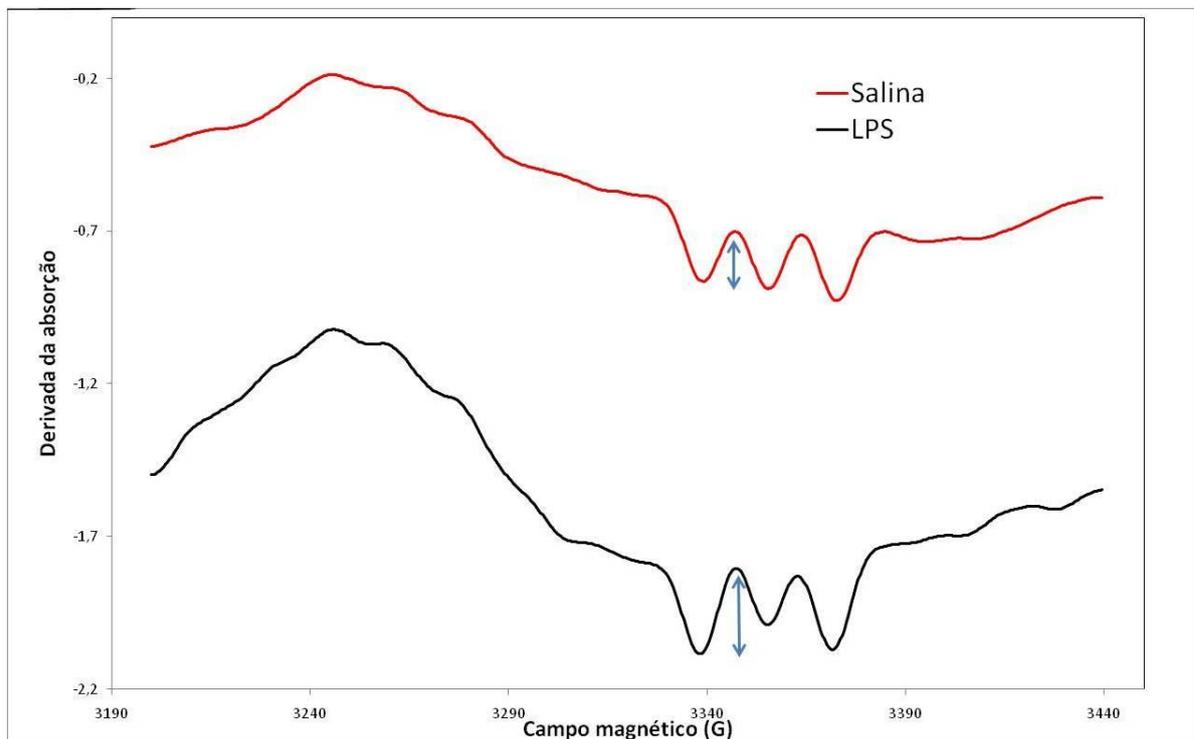


Figura 21: Espectro de EPR típico do sangue de animais 5h após a administração salina ou LPS (iv). A linha vermelha representa o espectro correspondente a animal do grupo salina. A linha preta representa o espectro correspondente a animal do grupo LPS, onde pode ser observada uma maior amplitude no espectro. A amplitude do sinal de EPR é definida pela amplitude do sinal observada na região correspondente a hemoglobina, como é indicado pela seta na figura.

Primeiramente, foi analisada a formação de HbNO durante os dois picos da febre induzida pelo LPS. Não foram encontradas diferenças significativas na formação de HbNO entre os grupos LPS e seu controle negativo (salina) nos animais que tiveram o sangue coletado 2,5 h após o estímulo pirogênico (Figura 22A). Já nos animais onde a coleta ocorreu 5 h após o estímulo, pode ser observado um aumento na quantidade de HbNO em 15 vezes no grupo LPS em relação ao grupo salina (Figura 22B). Como o aumento na produção de NO pode ser observado apenas 5 h após o estímulo, assim como ocorreu com a produção de EROs, os experimentos também foram conduzidos com a coleta de sangue nesse tempo.

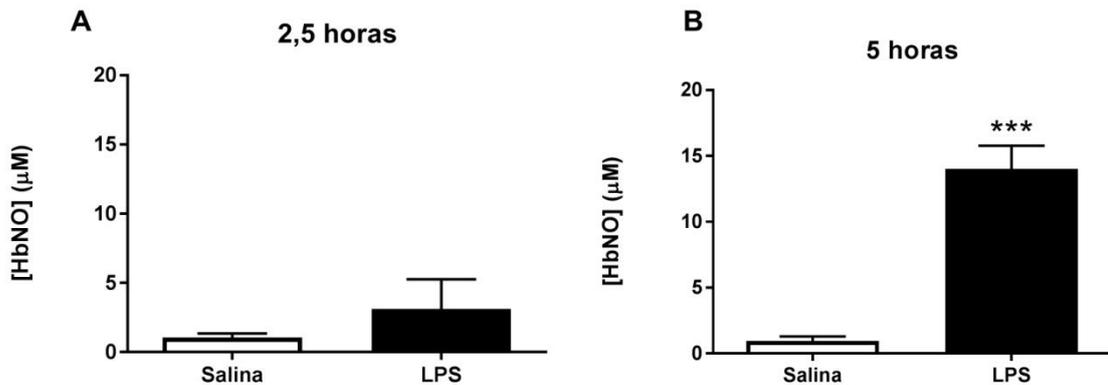


Figura 22: Concentração de HbNO no sangue 2,5 h 5 h após a administração de LPS. As colunas representam a concentração de HbNO em μM nos grupo controle (em branco) e nos que receberam estímulo (em preto), sacrificados 2,5 h (A) ou 5 h (B) após a injeção iv de LPS ou salina (n=4-6). Os dados representam a média ± EPM. ***p<0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina; teste t de Student.

Para avaliar se os fármacos antipiréticos exercem alguma influência na produção de NO, animais receberam por via oral dipirona, ibuprofeno ou celecoxibe 30 minutos antes do estímulo pirogênico. Foi coletado sangue dos animais através de punção cardíaca 5 h após a injeção do LPS, momento escolhido por haver uma maior formação de HbNO e no qual os medicamentos ainda apresentavam seus efeitos antitérmicos.

Como pode ser observado na figura 23, na ausência de estímulo pirogênico, nenhum dos fármacos promoveu alterações na formação de HbNO quando comparados ao grupo H₂O/Sal.

Nos grupos que receberam antitérmicos/LPS verificou-se que os tratamentos com ibuprofeno, celecoxibe e n-acetilcisteína não alteraram a concentração de HbNO, quando comparados ao grupo H₂O/LPS. Entretanto, no grupo tratado com dipirona a concentração de HbNO foi reduzida em 66 % quando comparada ao grupo H₂O/LPS (Figura 22A).

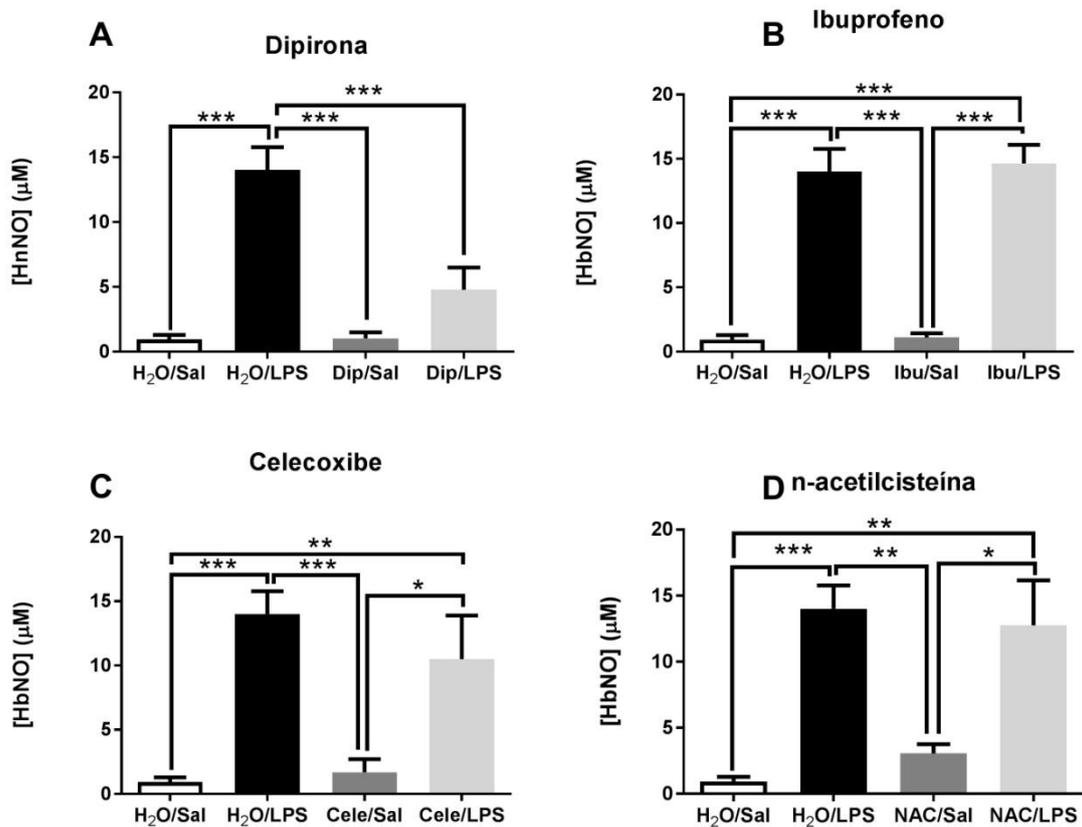


Figura 23: Concentração de HbNO no sangue de animais tratados com dipirona (A), Ibuprofeno (B), Celecoxibe (C) ou n-acetilcisteína (D). As colunas representam a concentração de HbNO em µM no sangue de animais tratados com diferentes fármacos 30 minutos a injeção iv de LPS ou salina (n =5-6). Os dados representam a média ± EPM. *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina; *one-way ANOVA*, seguido de teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um panorama geral acerca da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por diferentes tecidos durante a febre induzida pelo LPS e a antipirese promovida por diferentes fármacos.

A febre é o aumento da temperatura corporal, que acontece por resposta do corpo à invasão do organismo por patógenos, sendo um componente importante da resposta inflamatória de fase aguda (IUPS THERMAL COMMISSION, 2001). Um dos principais modelos experimentais para o estudo da febre é a injeção de LPS pela via endovenosa, que promove uma resposta que mimetiza as reações que acontecem durante a infecção do organismo por bactérias Gram-negativas (REIS et al., 2011).

A administração de LPS promove febre de diferentes perfis, podendo ser monofásica, bifásica, multifásica, ou mesmo hipertermia, dependendo da dose, via de administração e temperatura ambiente (ROMANOVSKY et al., 1998). A dose utilizada neste trabalho (5 µg/Kg, iv) induziu resposta febril moderada e contínua nos animais, apresentando um padrão de febre bifásica semelhante ao relatado na literatura como resposta típica a doses moderadas de LPS (MALVAR et al., 2011; ROMANOVSKY et al., 1998; ZHANG et al., 2003).

Diversos estudos demonstraram que as fases da febre induzida por LPS são mediadas por mecanismos diferentes. Székely et al. (2000) demonstraram que a primeira fase da resposta febril é abolida em ratos que tiveram as fibras neurais aferentes dessensibilizadas com capsaisina, o que indica que esta via estaria envolvida apenas na primeira fase da resposta, mas não na segunda. Outros autores evidenciaram ainda que a primeira fase da febre pode ocorrer devido a ativação dessa via aferente subdiafragmática pela PGE₂ produzida pelos macrófagos hepáticos, chamados Células de Kupffer (LI et al., 2006). A segunda fase da febre é atribuída à ação de citocinas diretamente no sistema nervoso central. Estudos demonstram que a PGE₂ é produzida dentro do cérebro, principalmente pelas células endoteliais através da indução de COX-2 e de PGE sintase microsomal-1 (mPGES-1) (SIMM et al., 2016; VASILACHE; QIAN; BLOMQVIST, 2015).

Apesar dos mecanismos que culminam em diferentes fases da febre não serem totalmente elucidados, há um consenso que eles são mediados por vias diferentes. No presente trabalho foram escolhidos para as análises preliminares da produção de espécies reativas os dois picos da febre, com o objetivo de avaliar a concentração das EROs em cada uma das duas fases da resposta.

É bem estabelecido que EROs são formadas na resposta inflamatória e são moléculas de sinalização que desempenham um papel importante na progressão de distúrbios inflamatórios. EROs são produzidas por células do sistema imune, como neutrófilos, podem levar a disfunção endotelial por oxidação de proteínas de sinalização celular, como por exemplo as tirosinas fosfatases, ou por danos a outras estruturas celulares (MITTAL et al., 2014).

O aumento na produção de EROs tem sido verificado em modelos de choque séptico, inflamação, dor, asma, doenças neurodegenerativas, dentre outros (CLOSA; FOLCH-PUY, 2004; GELDERMAN et al., 2007; KIM et al., 2015; PRAUCHNER, 2016; VIGGIANO et al., 2005). Apesar de ser bem estabelecido o aumento de EROs na inflamação, poucos estudos relatam a associação entre o estresse oxidativo e a febre.

Os estudos realizados até o momento se baseiam em técnicas indiretas de detecção de EROs. A técnica de EPR utilizada neste estudo é uma ferramenta robusta e muito sensível, sendo assim o padrão ouro para detecção de espécies paramagnéticas, tais como as EROs. (HAWKINS; DAVIES, 2014). O uso de *spin probes*, como as hidroxilaminas cíclicas, permite a quantificação das espécies formadas em um determinado sistema. Elas reagem com o $O_2^{\cdot-}$ com uma velocidade de aproximadamente $10^3 - 10^4 M^{-1}s^{-1}$, o que favorece a competição com antioxidantes intracelulares e aumenta a eficiência para a detecção de $O_2^{\cdot-}$. O CMH, *spin probe* utilizada neste estudo, é altamente permeável e pode detectar o $O_2^{\cdot-}$ extracelular e intracelular (DIKALOV; HARRISON, 2014).

A análise de diferentes tecidos revela que a taxa de produção de $O_2^{\cdot-}$ é variável em cada um deles. Estudo utilizando a técnica de EPR para analisar a formação de espécies reativas em ratos demonstrou que há uma maior produção basal de EROs no jejuno, duodeno e rim e uma baixa produção no fígado, coração e cérebro. Após o estímulo com LPS (10 mg), há um aumento na produção principalmente no fígado e coração quando comparado ao grupo controle (KOZLOV et al., 2003). Nos tecidos analisados no presente estudo, o TAM apresentou uma

maior taxa basal de produção EROs em relação ao fígado e hipotálamo. Quando a análise foi realizada nos mesmos tecidos após a injeção de LPS observou-se um aumento de EROs mais pronunciado nesse mesmo tecido.

O tecido adiposo marrom é o principal local de termogênese metabólica em pequenos mamíferos, que na exposição a baixas temperaturas, é responsável por cerca de 60 % do consumo total de oxigênio. O TAM é caracterizado por um grande número de mitocôndrias, gotículas lipídicas e por sua capacidade oxidativa extremamente alta (REBIGER; LENZEN; MEHMETI, 2016).

A UCP-1, principal marcador do TAM vem sendo alvo de diversos estudos. Essa proteína leva a diminuição do potencial de membrana quando está ativa, e, como a produção de EROs depende de potencial de membrana, a UCP-1 influencia a produção de EROs (MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2014). Shabalina e colaboradores (2014) demonstraram que apenas EROs produzidas pelo complexo de succinato desidrogenase seria regulada por UCP-1, sendo que essa enzima não diminui a produção de EROs quando esta é realizada por outros complexos da cadeia respiratória.

Trabalhos recentes demonstraram que citocinas pró-inflamatórias induzem uma redução significativa na expressão de marcadores de tecido adiposo marrom, entre eles a UCP-1. Essa redução é acompanhada por um grande aumento na produção de EROs e subsequente perda de viabilidade de adipócitos marrons (REBIGER; LENZEN; MEHMETI, 2016).

Diferentemente do que observado no fígado, hipotálamo e TAM, nossos dados não indicam alteração significativas na concentração de EROs nas amostras de sangue total em nenhum dos grupos analisados. São relatados aumento de EROs no sangue em modelos de sepse, obesidade e pós exercícios físicos (FURUKAWA et al., 2004; MARTINS et al., 2003; MRAKIC-SPOSTA et al., 2012).

O sangue interage com todos os órgãos e tecidos do corpo e, conseqüentemente, com muitas possíveis fontes de espécies reativas. Os testes clássicos quantificam os níveis de EROs principalmente no plasma, através de marcadores indiretos do estresse oxidativo. Entretanto, os glóbulos vermelhos podem exercer atividade antioxidante e pró-oxidante. Os eritrócitos são responsáveis por uma redução de NO[•] intracelular muito eficiente, devido a quantidade de ferro presente dentro das células, o que os tornam "coletores" efetivos de espécies reativas (MRAKIC-SPOSTA et al., 2012). Assim, essas células podem

ser eficientes em sua ação antioxidante quando são produzidas alterações sutis na quantidade de EROs, como a que pode acontecer em doses moderadas de LPS.

Nossos dados demonstram que não existem alterações significativas na produção de EROs no cérebro e nos tecidos periféricos avaliados de animais eutanasiados 2,5 h após a injeção do estímulo. Na segunda fase da febre, por outro lado, foram detectados aumentos significativos de $O_2^{\cdot-}$ no cérebro, fígado e TAM dos animais.

Já havia sido demonstrado que durante a febre há presença de estresse oxidativo, sendo encontrados nos tecidos produtos de peroxidação lipídica que são marcadores indiretos do aumento da produção de EROs (RIEDEL; MAULIK, 1999). De acordo com Riedel e colaboradores (2003), o desbalanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes endógenas no cérebro tem um papel importante na alteração do ponto de regulação hipotalâmico, dependendo principalmente do sistema de glutatona reduzida e glutatona oxidada.

Corroborando nossos dados Huo et al (2011) demonstraram que em cultura de células de microglia desafiadas com LPS há um aumento da produção de EROs apenas na sexta hora após o estímulo, não sendo encontradas alterações significativas em relação ao controle em tempos anteriores, apontando que a produção de EROs pode ser um pouco mais tardia em relação a outros mediadores inflamatórios.

As espécies reativas podem atuar como segundos mensageiros que ativam a via do fator de transcrição NF- κ B (ASEHNOUNE et al., 2004) que, quando liberado através da sua via de ativação clássica, resulta na expressão coordenada de conjuntos de genes de substâncias envolvidos nas respostas inflamatória e imune inata, tais como IL-6, TNF- α , IL-1- β , IL-8, RANTES, iNOS e ainda COX-2, enzima essencial para a produção de PGE₂ (XIAO, 2004).

Além de ativar a via de NF- κ B, as EROs podem ainda levar a expressão de COX-2 pela via de MAPK. O principal mecanismo de ativação de cascatas de MAPK mediado por EROs pode envolver a inibição direta de fosfotirosina fosfatase e de serina/treonina fosfatases, que são susceptíveis a oxidação de EROs nos seus centros ativos (MENG; ZHANG, 2013).

Apesar dos estudos apontarem que EROs podem participar da gênese dos processos infecciosos, nossos resultados apontam o aumento da produção de EROs num momento mais tardio, verificado 5 h após o estímulo com LPS. Para investigar

melhor o papel das EROs durante a febre mais experimentos precisam ser realizados para que se determine se elas participam da gênese da segunda fase da resposta febril, são componentes da manutenção da resposta ou ainda, se são consequência dos danos causados pelo aumento da temperatura.

Os antitérmicos estão entre os medicamentos mais utilizados na clínica. Foi investigado então o efeito de diferentes fármacos sobre o aumento na produção de EROs induzido pela resposta febril.

O paracetamol é um fenol, e assim como outros fenóis, parece ter propriedades antioxidantes. Modelos de isquemia/reperfusão cardíaca e de doenças neurodegenerativas *in vivo* revelam que o fármaco pode conferir proteção a tecidos durante o estresse oxidativo, devido a essa propriedade antioxidante (MAHARAJ et al., 2004; MERRILL; GOLDBERG, 2001). O paracetamol é um fármaco que tem início de efeito mais lento quando comparado a outros antitérmicos e a duração de seu efeito é mais curta, de forma que em 5 h após um estímulo pode-se notar um pequeno efeito o medicamento (KANASHIRO et al., 2009). Neste estudo, a dose de paracetamol utilizada apresentou efeito antitérmico até aproximadamente 3 h após a administração de LPS, não reduzindo a febre durante a segunda fase da resposta, motivo pelo qual o fármaco foi excluído do estudo.

Estudos *in vitro* indicam que a dipirona tem a capacidade de sequestrar radicais OH, mas não é capaz de captar o $O_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 (COSTA et al., 2006b). Esses dados vão de encontro aos resultados encontrados neste estudo que utiliza modelo *in vivo*. Em nenhum dos tecidos analisados dos animais tratados com antitérmicos foram encontradas alterações significativas na produção de EROs em relação aos respectivos controles. O aumento de EROs encontrado é devido ao LPS e os efeitos antitérmicos da dipirona não estão relacionados com a inibição da produção de EROs.

Costa e colaboradores (2006a) através de estudos *in vitro* apontam que o ibuprofeno tem capacidade antioxidante inferior a outros medicamentos antiinflamatórios. Estudo conduzido com crianças prematuras com canal arterial persistente demonstrou que o tratamento com ibuprofeno não apresentou alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo (AKAR et al., 2016). Assim como aconteceu com a dipirona, não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos tecidos analisados, quando comparado ao grupo controle, e indicando

que o efeito antipirético do ibuprofeno não está relacionado com a redução na concentração de EROs.

Estudos recentes demonstraram que o celecoxibe, um inibidor de COX-2 usado com adjuvante no tratamento de câncer, pode exercer seu efeito por meio do aumento da liberação de EROs, já que a morte celular de células de carcinoma seriam dependentes da maior concentração de EROs obtida após o tratamento com o celecoxibe (SUNG et al., 2016). Nas doses utilizadas nesse estudo o celecoxibe parece não alterar a produção de EROs. Entretanto, pode ser observado uma tendência de aumento de EROs no TAM dos animais que receberam injeção de LPS após o pré-tratamento com celecoxibe ($p = 0,0875$).

A n-acetilcisteína é um fármaco utilizado na clínica como mucolítico. Além da sua ação mucolítica, a NAC vem sendo estudada e utilizada em situações caracterizadas pela diminuição de glutathiona reduzida (GSH) ou estresse oxidativo, já que a NAC é um precursor da GSH, um antioxidante endógeno.

Wrotek e colaboradores (2011) demonstraram que o pré-tratamento com NAC na dose de 200 mg por via intraperitoneal reduziu a resposta febril induzida por LPS em ratos e posteriormente o mesmo grupo demonstrou que essa atividade seria dependente de IL-10 (WROTEK et al., 2016).

Nós investigamos se, em doses antipiréticas, a NAC apresentaria também um efeito antioxidante e verificamos que o pré-tratamento com a NAC não alterou a concentração de EROs em nenhum dos tecidos estudados. Tsikas e colaboradores (1998) demonstraram que após a administração oral de 600 mg do medicamento, o pico da concentração plasmática que ocorre 60 min é de 4,6 μM . *In vivo*, o efeito antioxidante é dose-dependente, além de variar também quando o tratamento é agudo ou crônico. Em tratamentos agudos, os efeitos antioxidantes só aparecem em concentrações plasmáticas acima de 3,4 mM, já em tratamentos crônicos, que duram semanas a meses, os efeitos antioxidantes aparecem em doses de 600 mg ao dia, o que corresponde a concentrações plasmáticas de 4,6 μM (SADOWSKA; MANUEL-Y-KEENOY; DE BACKER, 2007). Esses estudos indicam que a NAC apresenta efeito antioxidante em doses maiores do que as antipiréticas ou durante períodos mais prolongados de tratamento.

O estresse nitrosativo é bem menos estudado que o estresse oxidativo apesar da importância biológica que os produtos gerados durante o processo, como o

peroxinitrito, pode ter, já que este é uma molécula altamente reativa (VALKO et al., 2007).

O óxido nítrico é uma pequena molécula, que contém um elétron desemparelhado na sua última camada. Ele é um radical abundante no organismo e atua como importante sinalizador de processos biológicos em diversas condições fisiológicas como neurotransmissão, regulação da pressão arterial, e regulação imune (VALKO et al., 2007). Além disso, NO também tem papel na termorregulação e febre.

Foi demonstrado que a produção de NO pelos macrófagos peritoneais é aumentada quando há elevação de temperatura na febre, favorecendo a disponibilidade de NO na periferia (PRITCHARD, 2005). Outro estudo demonstrou que a inibição intra-arterial de óxido nítrico sintase com L-NAME provocou uma queda na temperatura de cobaias e também atenuou a febre induzida por LPS independentemente de alterações em algumas citocinas circulantes induzidas por LPS (ROTH et al., 1998).

Além dos efeitos periféricos, várias evidências reforçam o conceito de que a ação de NO no sistema nervoso central seja importante para a termorregulação. Injeção central de L-NAME causa aumento da temperatura corporal em ratos, indicando que centralmente, o NO pode ter um papel antipirético (SIMON, 1998). Steiner *et al* (2002) verificaram que a resposta febril induzida pelo LPS parece estar associada a uma redução progressiva de NO e cGMP na área pré-óptica, já que os níveis são reduzidos em 4 h, mas não em 1 h após a injeção do LPS. Esses achados demonstram o papel dual do NO na febre, que periféricamente parece ter efeito pirogênico e centralmente, um papel antipirético.

A reação da hemoglobina com o NO protege o organismo contra o estresse nitrosativo. A HbNO apresenta um sinal característico de EPR permitindo a sua mensuração através de um método robusto e sensível pra avaliar a biodisponibilidade de NO circulante.

Neste estudo verificou-se que, 5 h após o estímulo pirogênico, a formação de HbNO foi quinze vezes maior que nos animais que receberam salina. Estes dados corroboram estudos anteriores que indicam que o NO circulante aumenta quando há aumento da temperatura. É demonstrado que o NO periférico modula três importantes mecanismos termorregulatórios: os vasos cutâneos, o tecido adiposo marrom e o músculo esquelético (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014). Em nosso

estudo não foram observadas diferenças significativas na HbNO formada no primeiro pico da febre, o que indica que o NO está envolvido na segunda, mas não na primeira fase da resposta febril ou ainda, que NO formado após 5 h é resultante de um acúmulo de NO ao longo da resposta febril. Outros experimentos são necessários para relacionar o aumento de HbNO como causa ou consequência da resposta febril.

Saad e colaboradores (2016) demonstraram que o efeito analgésico do ibuprofeno na dor pós-cirúrgica está envolvido com os níveis de óxido nítrico na medula espinhal. Entretanto, nossos resultados apontam que periféricamente, o efeito analgésico do ibuprofeno não está relacionado com o aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico.

Em modelo de isquemia e reperfusão renal em ratos, foi observado que o celecoxibe aumenta a biodisponibilidade de NO, e que isto seria o mecanismo provável para explicar os efeitos benéficos do fármaco nesse tratamento (SENBEL; ABDELMONEIM; OMAR, 2014). Contudo, nossos resultados mostram que durante a febre, o celecoxibe não altera a biodisponibilidade de NO.

Estudos utilizando modelos de sepse demonstraram que a n-acetilcisteína pode diminuir a formação de HbNO, e esse mecanismo seria mediado pela inibição da expressão de iNOS (BERGAMINI et al., 2001) e inibição da ativação de NF- κ B (ROTA et al., 2002; VASILACHE; QIAN; BLOMQUIST, 2015). Entretanto, em nosso modelo experimental, que envolve baixas doses de LPS, a NAC não alterou a produção de HbNO, o que sugere que seu efeito antipirético não seja dependente da produção de NO.

Dentre os fármacos analisados neste estudo, a dipirona foi o único que reduziu significativamente a formação de HbNO. A dipirona já foi relatada como um potente seqüestrador de NO e ONOO⁻ *in vitro* (COSTA; VIEIRA; FERNANDES, 2006). Lorenzetti e colaboradores demonstraram que o efeito analgésico da dipirona pode ser devido a estimulação da via arginina-NO atuando em neurônios periféricos primários e na medula espinhal (LORENZETTI; FERREIRA, 1996).

Devido o papel dual do NO encontrado em relação aos seus efeitos periféricos e centrais, experimentos precisam ser conduzidos para determinar se o mecanismo de ação da dipirona está relacionado com inibição de vias de NO periféricamente, e avaliar ainda os efeitos centrais promovidos pela dipirona e sua relação com o óxido nítrico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo apresentam uma visão geral sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante sobre a febre e a influência que a dipirona, ibuprofeno, celecoxibe e n-acetilcisteína exercem sobre a produção dessas espécies.

Nossos resultados demonstraram que, durante a febre induzida pelo LPS, há um aumento da produção de EROs no tecido adiposo marrom, hipotálamo e fígado de ratos. Além disso, também foi observado que o TAM, dentre os tecidos analisados, tem uma maior taxa de produção de EROs.

O tratamento com celecoxibe, ibuprofeno, dipirona ou n-acetilcisteína não alterou a produção de EROs durante a antipirese, o que pode indicar que seu mecanismo de ação não está relacionado com essa via.

Os resultados mostraram também que durante a febre, há um aumento importante da biodisponibilidade de NO, e que o pré-tratamento com dipirona promove a redução dessa biodisponibilidade.

Estudos complementares são necessários para avaliar os mecanismos que induzem o aumento da produção de EROs na febre e para entender como a dipirona afeta a biodisponibilidade de óxido nítrico.

7. PERSPECTIVAS

Para que os mecanismos pelos quais acontecem as alterações da produção de EROs durante a febre, é necessário investigar primeiramente se o aumento de EROs encontrado durante a febre pode ser parte do seu mecanismo de gênese e manutenção ou se seria consequência das respostas induzidas para o aumento de temperatura. Para isso, uma das ferramentas utilizadas será a injeção central de sequestradores de EROs e avaliar se a indisponibilidade de EROs no hipotálamo região responsável pelo controle da temperatura, causaria alterações no perfil da resposta febril.

Pretendemos analisar ainda os efeitos do NO em outros tecidos, como o hipotálamo e tecido adiposo marrom através de DETC, uma *spin trap* que em combinação com ferro permite a detecção de NO pela técnica de EPR (ÜÇAL et al., 2017).

Os resultados indicaram que a dipirona diminui a biodisponibilidade de NO. Para investigar se o mecanismo de ação desse medicamento estaria relacionado com inibição de vias de NO, poderão ser realizados experimentos farmacológicos utilizando inibidores das diferentes enzimas que sintetizam o N, como o L-NAME, ou ainda doadores de NO, para avaliar se a extinção ou aumento da biodisponibilidade de NO reduz ou potencializa os efeitos dos fármacos.

Outra abordagem para o estudo do estresse oxidativo e nitrosativo é através da análise de proteínas que são biomarcadores de estresse oxidativo. Durante o estresse, EROs podem promover modificações pós-traducionais características, que podem ser detectadas através de técnicas de espectrometria de massas. O estudo das modificações oxidativas / nitrosativas, investigado pela proteômica redox, vem contribuindo para estabelecer uma relação entre as características patológicas da doença e as anormalidades estruturais e funcionais da proteína e maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos (DALLE-DONNE et al., 2005).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AKAR, M. et al. Does ibuprofen treatment in patent ductus arteriosus alter oxygen free radicals in premature infants? **Cardiology in the young**, p. 1–5, 20 jun. 2016.

ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **The American journal of medicine**, v. 111, n. 4, p. 304–15, set. 2001.

ASEHNOUNE, K. et al. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. **J Immunol**, v. 172, n. 4, p. 2522–2529, 2004.

BARTFAI, T.; CONTI, B. Fever. **The Scientific World JOURNAL**, v. 10, p. 490–503, 2010.

BERGAMINI, S. et al. N-Acetylcysteine Inhibits in Vivo Nitric Oxide Production by Inducible Nitric Oxide Synthase. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 4, p. 349–360, ago. 2001.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life sciences**, v. 65, n. 18-19, p. 1865–74, 1999.

BLATTEIS, C. M. et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: A re-assessment. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 76, n. 1-4, p. 1–18, 2005.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 608–18, 1 maio 1998.

BOTTING, R. M. Inhibitors of cyclooxygenases: Mechanisms, selectivity and uses. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. SUPPL. 5, p. 113–124, 2006.

BOTTING, R. M. Vane ' s discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. 2010.

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, 2000.

BOUTAUD, O. et al. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 10, p. 7130–7135, 2002.

BRANCO, L. G. S.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous Mediators in Temperature Regulation. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 1301–1338.

BRUNE, K. The early history of non-opioid analgesics. **Acute Pain**, v. 1, n. 1, p. 33–40, 1997.

BULUA, A. C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS): Commentary. **International Journal of Advances in Rheumatology**, v. 9, n. 3, p. 108, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926–13931, 15 out. 2002.

CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**, v. 56, n. 4, p. 185–191, 2004.

COLLINS, S.; YEHUDA-SHNAIDMAN, E.; WANG, H. Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of β -adrenergic signaling networks. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 3, p. S28–S33, out. 2010.

COSTA, D. et al. Antioxidant Activity and Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst Mediated by Arylpropionic Acid Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 1659–1670, 2006a.

COSTA, D. et al. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 4, p. 632–640, fev. 2006b.

COSTA, D.; VIEIRA, A.; FERNANDES, E. Dipyrone and aminopyrine are effective scavengers of reactive nitrogen species. **Redox Report**, v. 11, n. 3, p. 136–142, 19 jun. 2006.

CRISTIANA, F.; NINA, Z.; ELE, A. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches. In: **Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 32–68.

CRUNFLI, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 3, p. 246–255, 2015.

CYPESS, A. M. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 9 abr. 2009.

CZERSKA, M. et al. Today's oxidative stress markers. **Medycyna pracy**, v. 66, n. 3, p. 393–405, 2015.

DALLE-DONNE, I. et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 1, p. 55–99, jan. 2005.

DE SOUZA, G. E. P. et al. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrone in rats. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 51, n. 1, p. 24–32, 2002.

DIKALOV, S.; FINK, B. ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide In Vivo and in Tissues. In: **Pharmacological reports : PR**. [s.l.: s.n.]. v. 58 Suppl. 597–610.

DIKALOV, S. I.; HARRISON, D. G. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p. 372–382, 10 jan. 2014.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of endotoxin research**, v. 10, n. 4, p. 201–22, 2004.

FAGO, A. et al. Oxygen binding to partially nitrosylated hemoglobin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 9, p. 1894–1900, set. 2013.

FERNANDES, E. et al. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 9, p. 1008–1017, 2003.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 179–91, 2003.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GELDERMAN, K. A. et al. Rheumatoid Arthritis: The Role of Reactive Oxygen Species in Disease Development and Therapeutic Strategies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 10, p. 1541–1568, out. 2007.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, maio 1990.

GRAHAM, G. G. et al. The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 201–232, 2013.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p. 1–7.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, n. 1981, p. 1–85, 1990.

HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1891–1904, 2000.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 708–721, fev. 2014.

HINZ, B. et al. Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 10, p. 2343–2351, 2007.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BRUNE, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 2, p. 383–390, 2008.

HÖGESTÄTT, E. D. et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31405–31412, 2005.

HUO, Y. et al. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. **BMC neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 49, 2011.

IUPS THERMAL COMMISSION. Glossary of terms for thermal physiology. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 51, n. 2, p. 245–280, 2001.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 1977–93, 1 maio 2004.

KANASHIRO, A. et al. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 5, p. R1631–R1640, 1 maio 2009.

KATO, M. et al. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 12, p. 1679–85, 2001.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

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.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 25 dez. 2015.

LEWIS, D. F. V. Oxidative stress: The role of cytochromes P450 in oxygen activation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 10, p. 1095–1100, out. 2002.

LI, S. et al. Acetaminophen: Antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 85, n. 3-4, p. 89–99, mar. 2008.

LI, Z. et al. Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 5, p. R1262–70, 2006.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral

analgesia. **Inflammation Research**, v. 45, n. 6, p. 308–311, jun. 1996.

LUCAS, R. et al. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 6, p. 635–637, 2005.

MAHARAJ, D. S. et al. Acetaminophen and aspirin inhibit superoxide anion generation and lipid peroxidation, and protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Neurochemistry International**, v. 44, n. 5, p. 355–360, 2004.

MALVAR, D. D. C. et al. The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE 2 synthesis in the hypothalamus. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1401–1409, 2011.

MALVAR, D. D. C. et al. Dipyron metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE 2-dependent and -independent fever while 4-AA only blocks PGE 2-dependent fever. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3666–3679, 2014.

MARTINS, P. S. et al. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 20, n. 3, p. 208–212, 2003.

MENG, F.-G.; ZHANG, Z.-Y. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 464–469, jan. 2013.

MERRILL, G. F.; GOLDBERG, E. Antioxidant properties of acetaminophen and cardioprotection. **Basic Research in Cardiology**, v. 96, n. 5, p. 423–430, 2001.

MILATOVIC, D. et al. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 219–226, 2011.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, mar. 2014.

MORRISON, S. F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Autonomic Neuroscience**, v. 196, p. 14–24, abr. 2016a.

MORRISON, S. F. Central control of body temperature. **F1000Research**, v. 5, n. May, p. 880, 12 maio 2016b.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 741–756, 6 maio 2014.

MOUTHYS-MICKALAD, A. et al. Effects of COX-2 inhibitors on ROS produced by Chlamydia pneumoniae-primed human promonocytic cells (THP-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 4, p. 1122–1130, 2004.

MRAKIC-SPOSTA, S. et al. Assessment of a Standardized ROS Production Profile in Humans by Electron Paramagnetic Resonance. **Oxidative Medicine and Cellular**

Longevity, v. 2012, p. 1–10, 2012.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 2011.

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 12 mar. 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 1 jan. 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 7. ed. [s.l.] Academic Press, 2013.

PENNING, T. D. et al. Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1 H -pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1347–1365, abr. 1997.

PIERRE, S. C. et al. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 494–503, 2007.

PRAUCHNER, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, dez. 2016.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: past, present, and future. **American journal of therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 143–7, mar. 2000.

PRITCHARD, M. T. Nitric oxide production is regulated by fever-range thermal stimulation of murine macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 3, p. 630–638, 13 maio 2005.

RAINSFORD, K. D. Fifty years of ibuprofen: advancing pain and fever management. **International Journal of Clinical Practice**, v. 67, n. SUPPL. 178, p. 1–2, jan. 2013.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale- Farmacologia**. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REBIGER, L.; LENZEN, S.; MEHMETI, I. Susceptibility of brown adipocytes to pro-inflammatory cytokine toxicity and reactive oxygen species. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 2, p. e00306–e00306, 3 mar. 2016.

REIS, R. C. et al. Central substance P NK1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain Research**, v. 1384, p. 161–169, abr. 2011.

RIEDEL, W. et al. Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 247, n. 1-2, p. 83–94, 2003.

RIEDEL, W.; MAULIK, G. Fever: An integrated response of the central nervous system to oxidative stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 196, n. 1-2, p.

125–132, 1999.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **The American journal of physiology**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. R332–8, jul. 1998.

ROTA, C. et al. N -Acetylcysteine Negatively Modulates Nitric Oxide Production in Endotoxin-Treated Rats Through Inhibition of NF- κ B Activation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 221–226, fev. 2002.

ROTH, J. et al. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea-pigs. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 436, n. 6, p. 858–862, 1998.

ROTH, J. et al. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 229–245, 2009.

ROTH, J.; BLATTEIS, C. M. Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1563–1604, 2014.

SAAD, S. S. T. et al. Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice. **Neuroscience letters**, v. 614, p. 33–8, 12 fev. 2016.

SADOWSKA, A. M.; MANUEL-Y-KEENOY, B.; DE BACKER, W. A. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects: A review. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 9–22, fev. 2007.

SCHEELE, C.; NIELSEN, S. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. **Redox Biology**, v. 12, p. 770–775, ago. 2017.

SENBEL, A. M.; ABDELMONEIM, L.; OMAR, A. G. Celecoxib modulates nitric oxide and reactive oxygen species in kidney ischemia/reperfusion injury and rat aorta model of hypoxia/reoxygenation. **Vascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 24–31, 25 jul. 2014.

SHABALINA, I. G. et al. ROS production in brown adipose tissue mitochondria: The question of UCP1-dependence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1837, n. 12, p. 2017–2030, dez. 2014.

SIMM, B. et al. Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. **Neuroscience**, v. 313, p. 23–35, 2016.

SIMON, E. Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation. **Amino acids**, v. 14, n. 1-3, p. 87–93, 1998.

STEINER, A. A. et al. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R584–R593, 1 fev. 2002.

SUNG, M.-W. et al. Celecoxib enhances the inhibitory effect of 5-FU on human

squamous cell carcinoma proliferation by ROS production. **The Laryngoscope**, set. 2016.

SZÉKELY, M. et al. Multiple neural mechanisms of fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1-3, p. 78–82, 2000.

TANSEY, E. A.; JOHNSON, C. D. Recent advances in thermoregulation. **Advances in Physiology Education**, v. 39, n. 3, p. 139–148, 2015.

TSIKAS, D. et al. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 708, n. 1-2, p. 55–60, 1998.

ÜÇAL, M. et al. Comprehensive Profiling of Modulation of Nitric Oxide Levels and Mitochondrial Activity in the Injured Brain: An Experimental Study Based on the Fluid Percussion Injury Model in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 34, n. 2, p. 475–486, 15 jan. 2017.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 9 abr. 2009.

VASILACHE, A. M.; QIAN, H.; BLOMQUIST, A. Immune challenge by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide directs gene expression in distinct blood-brain barrier cells toward enhanced prostaglandin E2 signaling. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, n. February, p. 31–41, 2015.

VIGGIANO, A. et al. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. **Brain Research**, v. 1050, n. 1-2, p. 72–78, jul. 2005.

WALTON, E. L. The dual role of ROS, antioxidants and autophagy in cancer. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 2, p. 89–92, abr. 2016.

WOOD, A. J. J.; FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 6, p. 433–442, 9 ago. 2001.

WROTEK, S. et al. Antipyretic activity of N-acetylcysteine. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 669–675, 2011.

WROTEK, S. et al. N-Acetyl-L-cysteine exacerbates generation of IL-10 in cells stimulated with endotoxin in vitro and produces antipyresis via IL-10 dependent pathway in vivo. **Immunology Letters**, v. 177, p. 1–5, 2016.

XIAO, W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. **Cellular & molecular immunology**, v. 1, n. December, p. 425–435, 2004.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, p. 176–186, 2001.

ZHANG, Y. H. et al. Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 463, n. 1, p. 3–12, 2003.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221–225, 2011.

9. ANEXOS



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

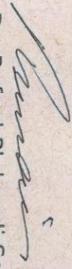
Brasília, 5 de maio de 2015.



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.




 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.