

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FISIOTERAPIA

EDUARDA SIQUEIRA SPANAMBERG

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NO COMPORTAMENTO TIPO DOENTIO
INDUZIDO POR LPS**

Araranguá

2022

EDUARDA SIQUEIRA SPANAMBERG

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NO COMPORTAMENTO TIPO DOENTIO
INDUZIDO POR LPS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Fisioterapia do Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde
da Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do título de Bacharel em
Fisioterapia.

Orientadora: Dra. Roberta de Paula Martins

Araranguá

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Spanamberg, Eduarda Siqueira
EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NO COMPORTAMENTO TIPO
DOENTIO INDUZIDO POR LPS / Eduarda Siqueira Spanamberg ;
orientador, Roberta de Paula Martins, 2022.
44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá,
Graduação em Fisioterapia, Araranguá, 2022.

Inclui referências.

1. Fisioterapia. 2. Neuroinflamação. 3. N-acetilcisteína.
4. Estresse oxidativo. 5. Comportamento tipo-doentio. I.
Martins, Roberta de Paula. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Fisioterapia. III. Título.

EDUARDA SIQUEIRA SPANAMBERG

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NO COMPORTAMENTO TIPO DOENTIO
INDUZIDO POR LPS**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Fisioterapia” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Araranguá, 18 de julho de 2022.

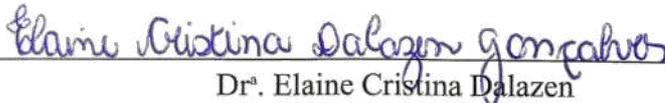


Prof. Dr^a. Gisele Agustini Lovatel
Coordenadora do Curso

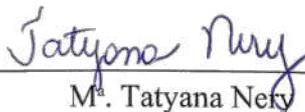
Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Roberta de Paula Martins
Orientadora
(Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr^a. Elaine Cristina Dalazen
Avaliadora
(Universidade Federal de Santa Catarina)



M^a. Tatyana Nery
Avaliadora
(Universidade Federal de Santa Catarina)

Este trabalho é dedicado aos meus avós, especialmente em memória da minha avó Ivone, e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha família, em especial aos meus pais Paulo e Paula, pelo constante incentivo e apoio para alcançar este objetivo.

À minha orientadora, Prof. Roberta Martins, pelo constante suporte desde a minha entrada na iniciação científica, pela grande dedicação em todo este período no qual me orientou, pelos vários incentivos que promoveram o meu crescimento acadêmico e pessoal e pela confiança depositada em mim para a execução deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio e auxílio na execução dos experimentos.

Aos demais familiares e amigos que me incentivaram durante esta fase da graduação.

RESUMO

A neuroinflamação é uma resposta inflamatória desenvolvida por mediadores químicos e expressa por alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. É desencadeada por toxinas como o lipopolissacarídeo (LPS), induzindo a síntese de citocinas, por exemplo, a pró-IL-1 β , a qual será maturada pelo inflamassoma NLRP3, um complexo proteico cuja montagem é ativada por estímulos como a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). A N-acetilcisteína (NAC) possui ação antioxidante direta e indireta no ciclo da glutatona (GSH), principal antioxidante celular. Este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento com NAC comportamento tipo-doentio no modelo de neuroinflamação induzida por LPS. Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, distribuídos em quatro grupos: controle, NAC, LPS e LPS + NAC, e foram tratados com salina (0,9% NaCl), NAC (100 mg/kg), LPS (0,33 mg/kg) e LPS associado a NAC, respectivamente. Durante sete dias os animais receberam salina ou NAC por via oral. Ao final deste período, foi administrado salina ou LPS por injeção intraperitoneal. Após quatro horas, os grupos foram submetidos a avaliação comportamental nos testes de interação social e borrifagem de sacarose, seguida de eutanásia e dissecação de córtex pré-frontal e hipocampo. A administração de LPS causou prejuízo no comportamento social, evidenciado por reduções significativas no número e no tempo de interação com outro camundongo, e o tratamento com NAC não foi capaz de proteger os animais deste efeito. A mesma resposta foi observada no comportamento de autolimpeza, o qual apresentou-se reduzido nos grupos que receberam LPS nos parâmetros de número e tempo de limpeza, entretanto, o tratamento com NAC foi capaz de proteger os camundongos do aumento no tempo de latência de interação induzida por LPS. Estes resultados corroboram com trabalhos prévios da literatura, os quais não descrevem diferenças significativas relacionadas a administração de NAC sobre parâmetros comportamentais de interação social e autolimpeza. O tratamento subcrônico com NAC não previne a manifestação do comportamento tipo-doentio induzido por LPS.

Palavras-chave: N-Acetilcisteína. Lipopolissacarídeo. Estresse Oxidativo. Neuroinflamação. Comportamento tipo-doentio.

ABSTRACT

Neuroinflammation is an inflammatory response developed by chemical mediators and expressed by biochemical, physiological and behavioral changes. It is triggered by toxins such as lipopolysaccharide (LPS), inducing the synthesis of cytokines, for example, pro-IL-1 β , which will be matured by the NLRP3 inflammasome, a protein complex which assembly is activated by stimuli such as generation of reactive oxygen species (ROS). N-acetylcysteine (NAC) has direct and indirect antioxidant action through the glutathione (GSH) cycle, the main cellular antioxidant. This work aims to investigate the effects of NAC treatment on LPS-induced neuroinflammation model. Male Swiss mice were distributed in four groups: control, NAC, LPS and LPS + NAC, and treated with saline (0.9% NaCl), NAC (100 mg/kg), LPS (0.33 mg/kg) and LPS associated with NAC, respectively. For seven days the animals received saline or NAC orally. At the end of this period, saline or LPS was administered by intraperitoneal injection. After four hours, the groups were submitted to behavioral assessment in the social interaction and splash tests, followed by euthanasia and dissection of prefrontal cortex and hippocampus. LPS administration caused impairment in social behavior, evidenced by significant reductions in the number and time of interaction with another mice, and NAC treatment was not able to protect the animals from this effect. The same response was observed in grooming behavior, which was reduced in the groups that received LPS in the parameters of number and time of grooming, but treatment with NAC was able to protect mice from the increase in latency to interaction induced by LPS. These results are in accordance with previous studies in the literature, which do not describe significant differences related to NAC administration on behavioral parameters of social interaction and grooming. Subchronic treatment with NAC does not prevent the manifestation of LPS-induced sickness behavior.

Keywords: N-Acetylcysteine. Lipopolysaccharide. Oxidative Stress. Antioxidants. Central Nervous System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura proteica do inflamassoma NLRP3.....	17
Figura 2 – Mecanismos de recrutamento do inflamassoma NLRP3.....	18
Figura 3 – Sistema antioxidante enzimático.....	20
Figura 4 - Desenho experimental.....	26
Figura 5 – Alterações no comportamento social.	29
Figura 6 – Alterações no comportamento de autolimpeza (<i>grooming</i>).	31
Figura 7 – Consumo hídrico e alimentar diário.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações no peso corporal.....	33
Tabela 2 – Alterações na termorregulação (temperatura central).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Proteína associada à apoptose com domínio CARD
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspases
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GO	Glutaciona oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutaciona sintetase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IKK	IκB quinase
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Domínio rico em repetições de leucina
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NAC	N-acetilcisteína
NADP ⁺ :	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Proteína NLR contendo domínio pirina 3
NOD	Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
NOX	NADPH-oxidase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxila
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Prx	Peroxirredoxinas
PYD	Domínio pirina
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD	Superóxido dismutase
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	Adaptador indutor de interferon- β contendo domínio TIR
TRX	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
TRX-S ₂	Tiorredoxina oxidada
TXNIP	Proteína de interação com a tiorredoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	NEUROINFLAMAÇÃO	15
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO	19
1.3	N-ACETILCISTEÍNA E AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	21
1.4	PERGUNTA DE PESQUISA.....	23
1.5	JUSTIFICATIVA	23
1.6	HIPÓTESE	23
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	ANIMAIS	25
3.2	TRATAMENTOS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
3.3	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	27
3.3.1	Interação social	27
3.3.2	Teste de borrifagem de sacarose	27
3.4	AVALIAÇÃO DO CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR	28
3.5	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	28
3.6	AVALIAÇÃO DA TERMORREGULAÇÃO	28
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	29
4.1.1	Interação social	29
4.1.2	Borrifagem de sacarose	30
4.2	CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR.....	32
4.3	PESO CORPORAL	32

4.4	TERMORREGULAÇÃO	33
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO.....	36
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROINFLAMAÇÃO

A neuroinflamação corresponde a uma condição de caráter inflamatório que afeta o sistema nervoso central (SNC). É desencadeada por estímulos potencialmente nocivos ou mecanismos neuroprotetores, que iniciam uma resposta imune mediada por citocinas e mediadores inflamatórios produzidos, principalmente, por células da micróglia (DANTZER et al., 2008). Manifestada por eventos bioquímicos, imunológicos, fisiológicos e comportamentais (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; LASSELIN et al., 2020).

Os possíveis desfechos provocados pela neuroinflamação dependem do fator causal e da geração de mediadores anti ou pró-inflamatórios através da ativação microglial e sinalização celular (TANG; LE, 2016; CHIU et al., 2016). Em condições controladas, a inflamação promove reparo tecidual e remodelamento em resposta a menores insultos ou plasticidade neuronal consequente de processos de aprendizagem e memória. De outro modo, sob circunstâncias infecciosas, exposição a neurotoxinas, graves lesões ao SNC ou estímulos crônicos, como no contexto das doenças neurodegenerativas, esta resposta geralmente é expressa por maior severidade e induz efeitos deletérios no tecido nervoso (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016), como morte celular, danos neuronais, prejuízos de cognição e memória (SHABAB et al., 2017; HEIN e O'BANION, 2009; ZHAO et al., 2019). Em relação aos aspectos comportamentais, a literatura descreve a ocorrência de um padrão de alterações conjuntamente nomeado de comportamento tipo-doentio, caracterizado por um estado de letargia, depressão, hipofagia, redução na locomoção, exploração, autolimpeza, interação social, maternal e sexual, além de resposta febril ou hipotermia (KELLEY et al., 2003; LASSELIN et al., 2020; SHIRAKI et al, 2021).

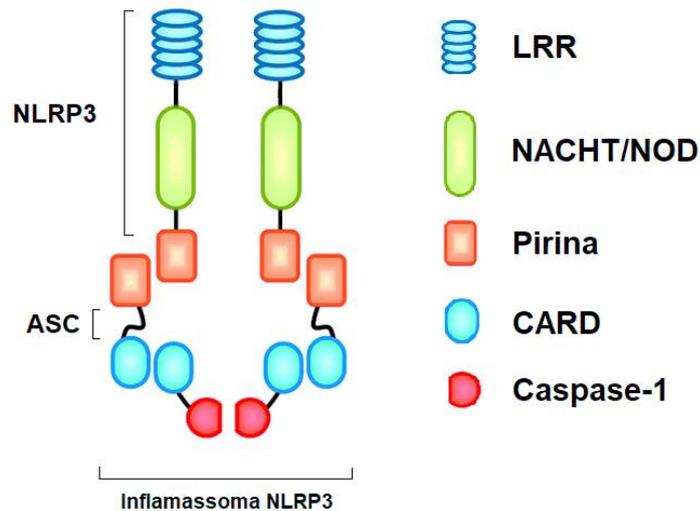
O comportamento tipo-doentio é uma consequência das ações de mediadores inflamatórios, principalmente a interleucina- 1β (IL- 1β), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) (DANTZER et al., 2008). Um dos fatores que promovem a síntese destes mediadores é a presença de infecções sistêmicas, causadas por agentes patogênicos como o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina derivada da membrana externa de bactérias gram-negativas (ERICKSON e BANKS, 2011; QIN et al., 2007). Estudos prévios demonstram que a exposição sistêmica ao LPS é capaz de induzir o comportamento tipo-doentio em roedores

mediante a ativação da micróglia e produção de mediadores inflamatórios, o que desencadeia a neuroinflamação em resposta ao estímulo infeccioso (HOOGLAND et al., 2015).

No SNC, a porção lipídica do LPS é reconhecida pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR4, do inglês, *Toll-like receptor 4*) expresso por células da glia (PARK et al., 2009), formando uma interação responsável por desencadear uma sequência de reações de fosforilação. Esta cascata é iniciada pelo fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88, do inglês *Myeloid differentiation factor 88*) e pelo adaptador indutor de interferon- β contendo domínio TIR (TRIF, do inglês *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), que recruta o complexo I κ B quinase (IKK, do inglês *IkappaB kinase*) que atua fosforilando a proteína I κ B. Normalmente, esta proteína forma uma unidade com o fator nuclear kappa B (NF- κ B) no citosol, e sua fosforilação tem como finalidade desvincular o NF- κ B para sua translocação até o núcleo celular (GLEZER et al., 2000; SAKAI et al., 2017; DORRINGTON e FRASER, 2019). A atividade do NF- κ B no núcleo permite a transcrição de citocinas ativas, como IL-6, ou pró-citocinas, como a pró-IL-1 β , proteínas traduzidas em formas inativas, que são submetidos a um processo de maturação dependente da ação do inflamassoma para assumir a conformação ativa (LIU et al., 2017).

O inflamassoma corresponde a um complexo de proteínas que apresenta atividade proteolítica e realiza a maturação das citocinas IL-1 β e IL-18. A sua montagem ocorre por meio da oligomerização de três elementos principais: a proteína NLR contendo domínio pirina 3 (NLRP3, do inglês *NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 3*), a proteína associada à apoptose com domínio CARD (ASC, do inglês *apoptosis associated speck like protein containing a CARD*) e a enzima caspase-1. A unidade NLRP3 contém um domínio rico em repetições de leucina (LRR, do inglês *leucine-rich repeat*), um domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NATCH ou NOD, do inglês *nucleotide-binding and oligomerization domain*) e um domínio pirina 3 (PYD, do inglês *pyrin domain*). A ASC atua como ligante entre as demais estruturas do complexo (Figura 1). A montagem deste complexo culmina na ativação do terceiro elemento da estrutura, a enzima caspase-1, responsável pela formação de citocinas biologicamente ativas, a partir da clivagem de proteínas inativas oriundas da transcrição gênica executada pelo NF- κ B (ABDERRAZAK et al., 2015; ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015; WILMANSKI; PETNICKI-OCWIEJA; KOBAYASHI, 2008).

Figura 1 - Estrutura proteica do inflamassoma NLRP3.



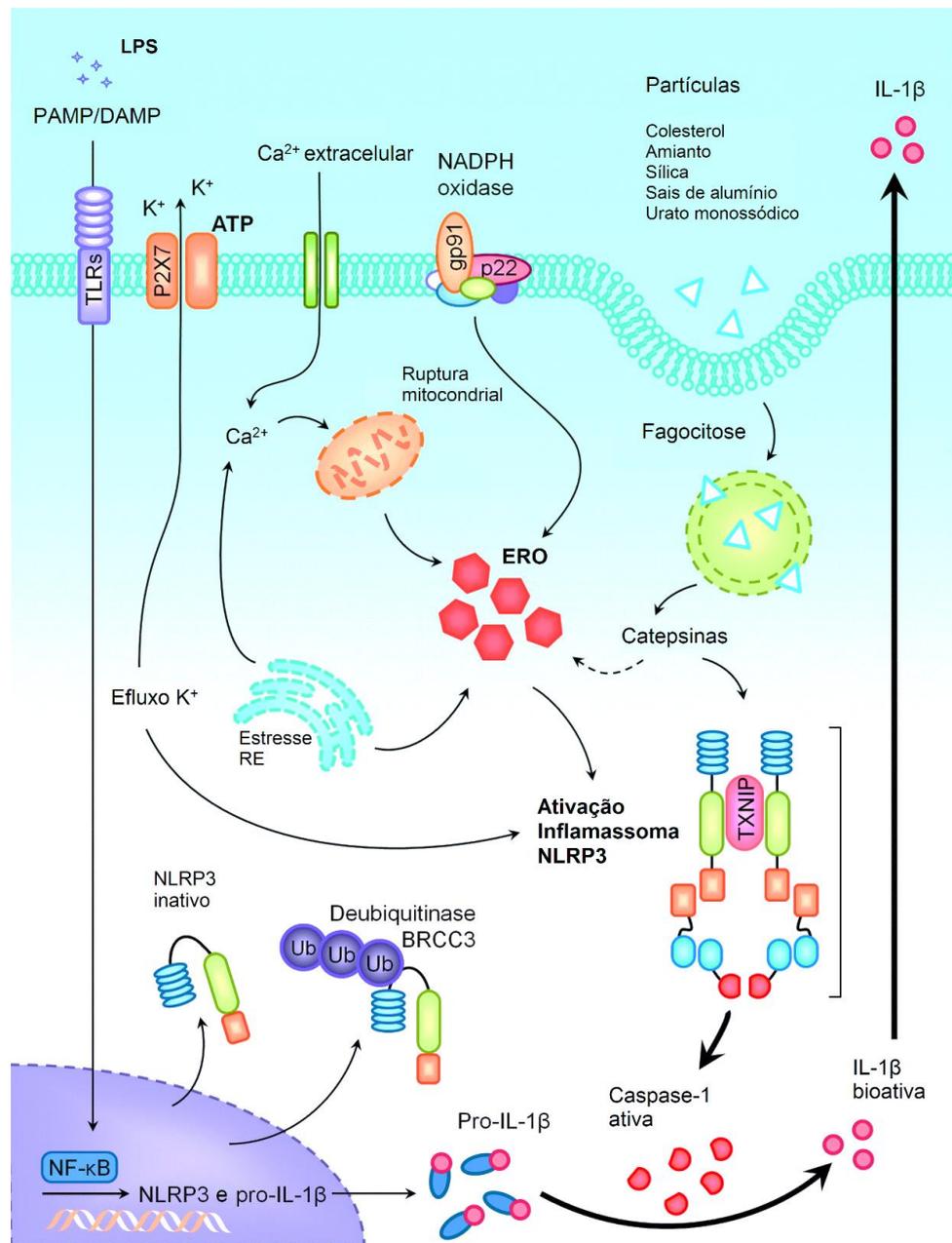
O complexo inflamassoma é formado pelas unidades: NLRP3, ASC e caspase-1. A ligação destes componentes é intermediada pela proteína ASC, a qual conecta-se com o NLRP3 por meio da interação de domínios de pirina, e em outra extremidade utiliza um domínio CARD para ligar-se à enzima caspase-1. ASC: proteína associada à apoptose com domínio CARD; CARD: domínio de recrutamento e ativação de caspases; LRR: domínio rico em repetições de leucina; NOD: domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo; NLRP3: proteína NLR contendo domínio pirina 3. Fonte: Modificado de ABAIS et al., 2015.

O recrutamento para montagem do inflamassoma é desencadeado pelos mecanismos de *priming* e ativação. A fase de *priming* é iniciada pela ligação de IL-1 β ou TNF- α com receptores de membrana, ou pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), como ocorre na interação entre LPS e TLR4 para deflagrar a via sinalização de NF- κ B, o elemento-chave desta fase, para induzir a expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β . Esta etapa também é responsável por modificações pós-traducionais que ocorrem, principalmente, por processos de desubiquitinação e fosforilação dos domínios de NLRP3, os quais também atuam como sítios de regulação do inflamassoma. Em seguida, a fase de ativação é a etapa necessária para executar a montagem do inflamassoma e iniciar a atividade proteolítica de caspase-1. É desencadeada por diversos estímulos incluindo mudanças no fluxo iônico de K $^+$ e Ca $^{2+}$, fagocitose de partículas tóxicas, RNA viral, dano lisossomal, disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ABAIS et al., 2015; ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015; KELLEY et al., 2019; SWANSON; DENG; TING, 2019) (Figura 2).

A geração de ERO parece ser um acréscimo imprescindível para a ativação do inflamassoma NLRP3 (TSCHOPP; SCHRODER, 2010; ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015).

Os prováveis mecanismos que baseiam esta hipótese incluem a desintegração da unidade formada pela proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) e tiorredoxina (Trx) induzida pelo estresse oxidativo, permitindo a interação de TXNIP com o componente NLRP3, necessária para a ativação do complexo (ZHOU et al., 2010; MEYERS e ZHU, 2020) ou a inibição da enzima NADPH-oxidase (NOX), uma das fontes de geração de ERO, capaz de impedir a ativação de caspase-1 e a síntese de IL-1 β (CRUZ et al., 2007; YU et al., 2016).

Figura 2 – Mecanismos de recrutamento do inflamassoma NLRP3.



O recrutamento do inflamassoma NLRP3 para a produção de IL-1 β é desencadeado por duas etapas. A fase de *priming* é desencadeada por ligantes de TLR, como o LPS, ou ativação de receptores de citocinas, sendo necessária

para a síntese proteica de mediadores inflamatórios e NLRP3. A fase de ativação depende de eventos celulares como o efluxo de K^+ e Ca^{2+} , fagocitose de partículas nocivas e produção de ERO, oriundos da enzima NADPH oxidase, da disfunção mitocondrial ou lisossomal e estresse no retículo endoplasmático, que contribuem para a montagem do inflamassoma e ativação da sua porção proteolítica, a enzima caspase-1. DAMP: padrão molecular associado a dano; ERO: espécie reativa de oxigênio; IL-1 β : interleucina-1 β ; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; NF-kB: fator nuclear kappa B; NLRP3: proteína NLR contendo domínio pirina 3; PAMP: padrão molecular associado a patógenos; RE: retículo endoplasmático; TLRs: receptores tipo Toll; TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina. Fonte: modificado de ABAIS et al., 2015.

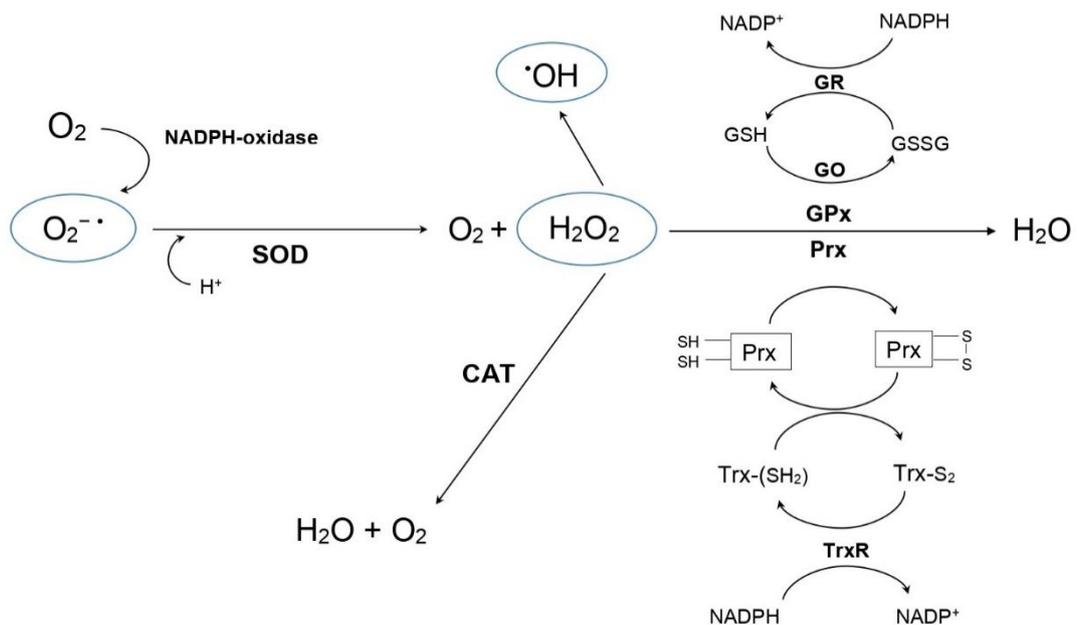
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO

Em condições fisiológicas, a síntese de ERO, moléculas originadas a partir de reações de redução do oxigênio, ocorre em consequência de processos metabólicos celulares, como a atividade enzimática da NOX ou geração de ATP pela cadeia respiratória na mitocôndria, considerada a maior fonte de espécies reativas, produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), que é substrato para a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é neutralizado em forma de água ou reduzido para um novo radical hidroxila ($\cdot OH$). As ERO possuem um grande potencial oxidativo em relação a macromoléculas celulares (MOLDOGAZIEVA et al., 2020; SLIMEN et al., 2014). Em um contexto de desequilíbrio entre a sua geração e neutralização, há um nível crescente destes elementos, caracterizando um estado de estresse oxidativo, no qual importantes estruturas celulares estarão sujeitas a danos por oxidação ou peroxidação, incluindo ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020; SLIMEN et al., 2014). Uma série de características estruturais e bioquímicas, confere ao tecido cerebral uma maior suscetibilidade à danos oxidativos, principalmente, a maior taxa metabólica, aumento da fosforilação oxidativa, defesa antioxidante reduzida e abundância de ácidos graxos insaturados sujeitos a peroxidação lipídica (COBLEY; FIORELLO; BAILEY; 2018; CHEN; ZHONG; 2014).

A defesa da integridade celular através da degradação de ERO é executada pelo sistema antioxidante endógeno, constituído por enzimas que catalisam reações de oxirredução. O grupo de enzimas superóxido dismutases (SOD) atuam na conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), acrescido do cátion hidrogênio (H^+), em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é substrato para as enzimas catalases (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prx). A CAT, de forma independente, é responsável pela dissociação de H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 , enquanto as enzimas GPx e Prx decompõem H_2O_2 em H_2O através da transferência de elétrons derivados, respectivamente, de glutaciona (GSH) e tiorredoxina (Trx) reduzidas. Simultaneamente à reação catalisada por GPx, a GSH é oxidada pela enzima

glutathione oxidase (GO), doando elétrons para a redução de H_2O_2 (MOLDOGAZIEVA et al., 2020; COLLIN, 2019). A glutathione oxidada (GSSG) resultante será reconvertida para GSH pela redução catalisada pela enzima glutathione redutase (GR), utilizando o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH) como concesso de elétrons, formando o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado (NADP^+). Na ação antioxidante de Prx, a neutralização de H_2O_2 ocorre por oxidação da própria enzima, que é reconvertida para sua forma reduzida recebendo elétrons da Trx reduzida (MOLDOGAZIEVA et al., 2020; MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020). Para a manutenção desta função dependente de Trx, a enzima tiorredoxina redutase (TrxR) realiza a adição de elétrons na tiorredoxina oxidada (Trx-S_2), empregando o NADPH como agente redutor para a ressíntese de Trx reduzida (MUSTACICH; POWIS, 2000) (Figura 3).

Figura 3 – Sistema antioxidante enzimático.



Principais reações químicas de neutralização de ERO catalisadas pelo sistema antioxidante enzimático. A enzima NADPH-oxidase é uma das fontes celulares geradoras de ERO, responsável pela produção do $\text{O}_2^{\cdot -}$, um radical neutralizado por ação da SOD. Um dos produtos da reação catalisada pela enzima SOD, é o radical H_2O_2 , que será convertido em H_2O e O_2 pelas das enzimas CAT, GPx e Prx ou reduzido em $\cdot\text{OH}$. A decomposição de H_2O_2 pela enzima GPx é dependente do ciclo de oxirredução de GSH ou de Trx na reação catalisada por Prx, ambos os ciclos utilizam NADPH como doador de elétrons. CAT: catalase; GO: glutathione oxidase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione redutase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; H^+ : cátion hidrogênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; O_2 : molécula de oxigênio; NADP^+ : fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado; NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido; $\text{O}_2^{\cdot -}$: radical superóxido; $\cdot\text{OH}$: radical hidroxila; Prx: peroxirredoxina; SOD: superóxido dismutase; TrxR: tiorredoxina redutase; Trx-S_2 : tiorredoxina oxidada; Trx-(SH)_2 : tiorredoxina reduzida. Fonte: elaborado pela autora.

Entre os recursos antioxidantes endógenos, os mecanismos dependentes de GSH demonstram ter uma função crítica para a manutenção do equilíbrio redox celular. Além da coparticipação na redução de H_2O_2 , a GSH é utilizada nas reações de S-glutationilação, alterações pós-traducionais reversíveis decorrentes da incorporação de glutatona em resíduos específicos de cisteína de proteínas, um mecanismo que previne a oxidação de macromoléculas essenciais (MIEYAL; CHOCK, 2012; GIUSTARINI et al., 2004). Outras influências da GSH sobre o balanço redox são determinadas pelo seu nível intracelular e taxa entre a concentração em forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), que geram efeitos sobre a regulação na atividade de fatores nucleares, incluindo o NF- κ B (FRATELLI et al., 2005; PINEDA-MOLINA et al., 2011), citotoxicidade através da expressão de p53 causando apoptose de células nervosas (DU et al., 2008), e danos neuronais e cognitivos consequentes da depleção de glutatona em processos neurodegenerativos e doenças neuropsiquiátricas (AOYAMA; NAKAKI, 2013; GONZÁLEZ-FRAGUELA et al., 2018; GU; CHAUHAN; CHAUHAN, 2015).

1.3 N-ACETILCISTEÍNA E AÇÃO ANTIOXIDANTE

A N-acetilcisteína (NAC) é um fármaco da classe dos expectorantes com ação mucolítica, constituído pela forma acetilada do aminoácido L-cisteína. Sua aplicação clínica é principalmente direcionada para doenças respiratórias e gastrointestinais, intoxicação por paracetamol e disfunções neurológicas e psiquiátricas (MOKHTARI et al., 2017; ŠALAMON et al., 2019). Além das propriedades mucolíticas, a NAC apresenta ação antioxidante direta através do grupo tiol (-SH) livre em sua composição, o qual neutraliza radicais livres, ou indireta por meio da sua inserção no ciclo de GSH (DHOUIB et al., 2016; SAMUNI et al., 2013). Estudos recentes buscam avaliar os efeitos antioxidantes e neuroprotetores da utilização de NAC como tratamento em processos inflamatórios ou neurodegenerativos, e os mecanismos envolvidos com suas ações farmacológicas (TARDIOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2018).

A atividade antioxidante direta da NAC envolve a reação redox entre o grupo tiol presente em sua composição com ERO ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), principalmente com os radicais hidroxila ($\cdot OH$), dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) e trióxido de carbono ($CO_3^{\cdot -}$), e apresenta menor potencial redutor em relação ao radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SAMUNI et al., 2013).

Como mecanismo antioxidante indireto, a NAC é responsável pelo aumento na disponibilidade de cisteína (SHAHRIPOUR; HARRIGAN; ALEXANDROV; 2014), um dos

precursores da síntese de GSH, produzida a partir de uma molécula de glutamato e uma cisteína, formando γ -glutamilcisteína, que é combinada com o aminoácido glicina por ação da glutathione sintetase (GS), originando a GSH (GU; CHAUHAN; CHAUHAN, 2015). No cérebro, esta síntese é modulada pela disponibilidade dos precursores glicina e glutamato, que desempenham funções como neurotransmissores, portanto, não estão disponíveis amplamente no meio extracelular. A cisteína é o componente menos disponível no tecido nervoso, em razão de seus efeitos neurotóxicos provocados por altas concentrações deste aminoácido. À vista disso, atua como um dos reguladores da produção de GSH (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003; AOYAMA; NAKAKI, 2013). A maior oferta intracelular de cisteína derivada de NAC promove a manutenção do nível de GSH e consequente otimização da defesa antioxidante e sobrevivência celular (SHAHRIPOUR; HARRIGAN; ALEXANDROV, 2014).

Além de efeitos antioxidantes, a NAC demonstra ter ação farmacológica em outros fatores relacionados à ativação do inflamassoma e neuroinflamação. Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam a redução na ativação de NF- κ B, associada a maior expressão de p53 e proteína I κ B (CHEN et al., 2008; PAJONK et al., 2002; WANG et al., 2013). Em relação as citocinas pró-inflamatórias, a administração de NAC promoveu a diminuição a produção de TNF- α em células expostas ao LPS e a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido cerebral de roedores expostos a citotoxicidade induzida por cisplatina ou estresse crônico (ABDEL-WAHAB e MOUSSA, 2019; FERNANDES e GUPTA, 2019; KARAPINAR et al., 2016).

Em modelos animais, alguns dos efeitos da NAC relacionados a aspectos bioquímicos e comportamentais já foram descritos na literatura. Um modelo de neuroinflamação induzida por estresse crônico evidenciou que o tratamento de 7 dias com NAC (50 e 100 mg/kg – oral) preveniu o prejuízo locomotor e ocorrência de imobilidade, e aumentou os níveis de serotonina no hipocampo e córtex pré-frontal (FERNANDES; GUPTA, 2019). Um estudo com filhotes de roedores que receberam LPS (2 mg/kg – i.p.) durante 3 dias, demonstrou que o tratamento crônico (23 dias) com NAC (150 mg/kg – oral) evitou a redução das funções enzimáticas de CAT e SOD, e a depleção de glutathione no hipocampo (RODRIGUES et al., 2013). Outra pesquisa realizada com ratos adultos submetidos a bulbectomia olfatória, identificou aumento significativo da atividade enzimática da SOD no córtex frontal, hipocampo e estriado dorsal, em resposta ao tratamento crônico (10 dias) com NAC (50 e 100 mg/kg – i.p.) (SMAGA et al., 2012).

1.4 PERGUNTA DE PESQUISA

A questão desta pesquisa é baseada na estratégica PICO, considerando: camundongos que apresentam comportamento tipo-doentio induzido por LPS como a População; tratamento com N-acetilcisteína como a Intervenção; camundongos que apresentam comportamento tipo-doentio induzido por LPS e não receberam tratamento com NAC como Comparador; prevenção do comportamento tipo-doentio como Desfecho.

“O tratamento com N-acetilcisteína previne o comportamento tipo-doentio induzido por LPS em camundongos?”

1.5 JUSTIFICATIVA

A neuroinflamação é uma condição relacionada a uma série de doenças infecciosas, neuropsiquiátricas, neurodegenerativas e até mesmo ao processo de envelhecimento. Os desfechos associados a esta resposta inflamatória correspondem a prejuízos de cognição e memória ou disfunções motoras, causados por morte neuronal, degeneração axonal e danos à bainha de mielina (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016; STEPHENSON et al., 2018). Os antioxidantes demonstram ser uma estratégia terapêutica potencialmente aplicável em quadros de depressão, esquizofrenia, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (MOKHTARI et al., 2017; VEURINK; PERRY; SINGH, 2020). Os efeitos da NAC no sistema antioxidante endógeno, na produção de citocinas e nas manifestações comportamentais, indicam uma estratégia farmacológica com potencial para inibir a neuroinflamação e o comportamento doentio induzidos por LPS, e possivelmente atuar como um complemento para a defesa antioxidante endógena na forma de intervenção preventiva ao estresse oxidativo envolvido em processos patológicos de doenças neurodegenerativas.

1.6 HIPÓTESE

O efeito antioxidante da NAC impede o acúmulo intracelular de ERO e consequentemente inibe a liberação de TXNIP e sua função na ativação do inflamassoma NLRP3. Desta forma, a maturação de IL-1 β será reduzida, e este mecanismo previne a manifestação do comportamento tipo-doentio induzido por LPS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento subcrônico com NAC na manifestação do comportamento tipo-doentio do modelo de neuroinflamação induzida por LPS em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com NAC sobre parâmetros fisiológicos de alteração do peso corporal e consumo de água e ração.
- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com NAC sobre a possível alteração da temperatura central induzida por LPS.
- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com NAC no comportamento tipo-doentio induzido por LPS, determinado por parâmetros comportamentais de interação social e autolimpeza.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram executados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo N° 8614220419 (Anexo A).

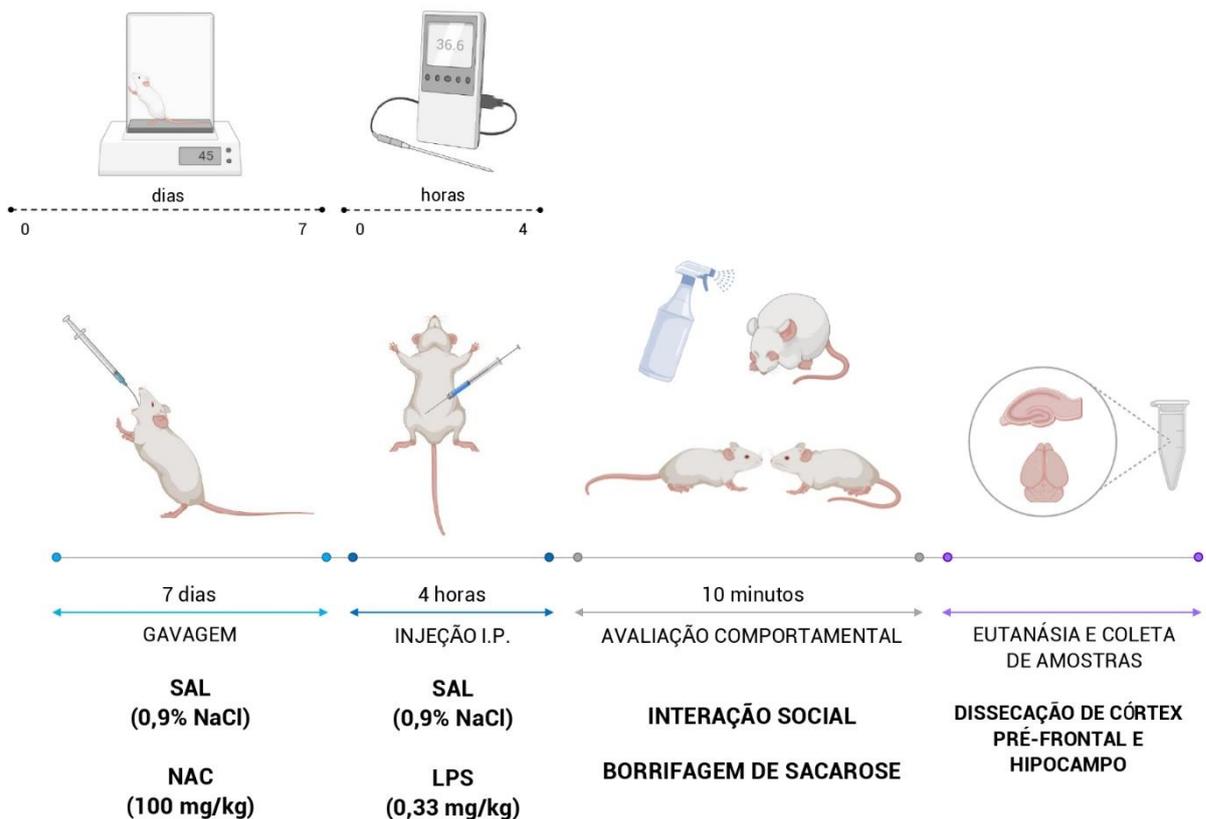
Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, de 10 semanas de idade, obtidos do biotério central da UFSC e acondicionados no biotério setorial do Laboratório de Biologia do Exercício (LABIOEX) vinculado ao Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde, localizado na UFSC – Campus Araranguá. O uso exclusivo de animais machos foi limitado pela possível influência do ciclo estral nos parâmetros comportamentais (GIACOMETTI; HUH; RAGHUPATHI, 2021) que foram avaliados, e pela impossibilidade de reprodução do experimento em camundongos fêmeas devido ao curto prazo para a execução do projeto. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno em grupos de 3 animais por caixa (30 x 20 x 13 cm), mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, iniciando o ciclo claro às 7:00h, com acesso *ad libitum* a água potável e ração comercial padrão (marca Puro Trato fornecida pelo Biotério Central da UFSC). Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação. Os tecidos do córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecados e armazenados a -80°C para utilização em análises bioquímicas, futuramente.

3.2 TRATAMENTOS E DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de ambientação no biotério, os camundongos receberam uma administração diária de salina ou NAC por via oral (gavagem) durante sete dias. A escolha da administração por via oral foi baseada na aplicação da NAC em ensaios clínicos como suplementação (DEVIRIM-LANPIR; HILL; KNECHTLE, 2021; PIRABBASI et al., 2016). No oitavo dia, foi realizada a administração de LPS ou salina por injeção intraperitoneal (i.p.). Após quatro horas, os animais foram submetidos a avaliação de comportamento, seguida de anestesia (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.), eutanásia e dissecação do encéfalo para testes bioquímicos (Figura 4). Assim, os animais foram divididos em quatro grupos: (CTL) grupo

controle, tratado com veículo de NaCl 0,9%; (LPS) grupo LPS, tratado exclusivamente com LPS (*Escherichia coli* LPS; 0,33 mg/kg; serotipo 0127:B8); (NAC) grupo NAC, tratado exclusivamente com NAC (100 mg/kg); e (LPS+NAC) grupo LPS + NAC tratado com LPS associado a NAC. A escolha da dose de LPS foi baseada em trabalhos prévios que identificaram um aumento na expressão gênica no córtex e hipocampo, e na concentração plasmática de IL-1 β em camundongos (HENRY et al., 2008; HENRY et al., 2009). A dose de NAC foi determinada a partir de estudos que demonstraram a sua ação na redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias e aumento na atividade enzimática antioxidante no tecido cortical e hipocampo, e em aspectos comportamentais relacionados a locomoção (FERNANDES; GUPTA, 2019; SMAGA et al., 2012; GARG et al., 2018).

Figura 4 - Desenho experimental.



Durante sete dias os animais receberam uma administração diária por via oral (gavagem) de NAC (100 mg/kg) ou salina (0,9 NaCl) de acordo com o grupo correspondente. O peso corporal foi avaliado no dia anterior (dia 0) e no dia final do tratamento oral (dia 7). No oitavo dia, a temperatura central foi avaliada e em seguida os animais receberam LPS (0,33 mg/kg) ou salina (0,9 NaCl) por injeção intraperitoneal. Quatro horas após a injeção i.p., a temperatura central foi reavaliada e logo após os animais foram submetidos aos testes de interação social e borrifagem de sacarose para avaliação comportamental, com duração de 5 minutos por teste, totalizando 15 minutos. Em seguida, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg i.p.) e eutanasiados. A estrutura encefálica foi retirada para a dissecação do córtex pré-frontal e hipocampo. i.p.:

intraperitoneal; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; NAC: N-acetilcisteína; SAL: salina. Fonte: elaborado pela autora em BioRender©.

3.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais foram realizados quatro horas após a administração intraperitoneal de LPS ou salina. Todos os testes foram executados durante o ciclo claro dos animais e documentados em vídeo para realização das análises.

3.3.1 Interação social

Para avaliação da interação social, uma fêmea foi introduzida no mesmo ambiente em que se encontrava o camundongo macho. Ambos animais ficaram livres para interagir durante 5 minutos. Foram consideradas interações, os comportamentos de perseguir a fêmea e farejar o nariz, corpo ou região anogenital da fêmea (HSIEH et al., 2017). Neste teste foram avaliados os parâmetros: número de interações (número total de vezes), tempo de interação (tempo total em segundos) e latência de interação (tempo em segundos do início do teste até a ocorrência do primeiro contato com a fêmea).

3.3.2 Teste de borrifagem de sacarose

O teste de borrifagem de sacarose foi aplicado para avaliar o comportamento de anedonia dos camundongos através da autolimpeza (*grooming*), caracterizada por limpeza da pelagem através de lambidas ou raspagens. A ação de *grooming* foi induzida artificialmente por meio de uma única borrifagem de solução contendo 10% de sacarose no dorso do animal (D'AUDIFFRET et al., 2010). A avaliação teve duração de 5 minutos, e foram analisados os parâmetros: latência de *grooming* (tempo em segundos do início do teste até a ocorrência do primeiro *grooming*), número (número total de vezes) e tempo de *grooming* (tempo total em segundos).

3.4 AVALIAÇÃO DO CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR

O consumo hídrico e alimentar foi monitorado diariamente do primeiro ao sétimo dia de tratamento por via oral. A cada 24 horas, a quantidade de água de cada gaiola era transferida para uma proveta para mensuração do consumo em mL, e a ração era transferida para um recipiente e o peso em gramas era mensurado utilizando uma balança de precisão (SF-400).

3.5 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso em gramas de cada animal foi avaliado no dia anterior ao início do tratamento, para o cálculo do volume administrado por via oral (gavagem), e posteriormente, no último dia de tratamento oral para o cálculo do volume da injeção intraperitoneal. Cada animal era posicionado em um recipiente para contenção e pesado em uma balança de precisão (SF-400).

3.6 AVALIAÇÃO DA TERMORREGULAÇÃO

A termorregulação foi avaliada através da temperatura corporal central, considerando uma medida basal (antes da injeção i.p. de salina ou LPS) e uma medida final (após quatro horas da injeção i.p.). Para a mensuração deste parâmetro, foi utilizado um termistor eletrônico com sonda retal (BIO-TK8851, Bioseb, França), a qual era lubrificada com vaselina sólida e inserida aproximadamente dois centímetros no reto de cada animal (VIGOLO et al., 2015).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de comparação entre todos os grupos foram utilizados o teste Kruskal-Wallis para dados não normais e a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias e teste *post hoc* de Bonferroni para dados normais. Em análises entre dois grupos, foram utilizados os teste Mann-Whitney para dados não normais e T de *Student* para dados normais. Foram consideradas diferenças significativas se $P < 0,05$. Todas as análises e elaboração gráfica foram executadas no software GraphPad Prism 8. Os resultados normais foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), e não normais como mediana \pm intervalo interquartil (IQR).

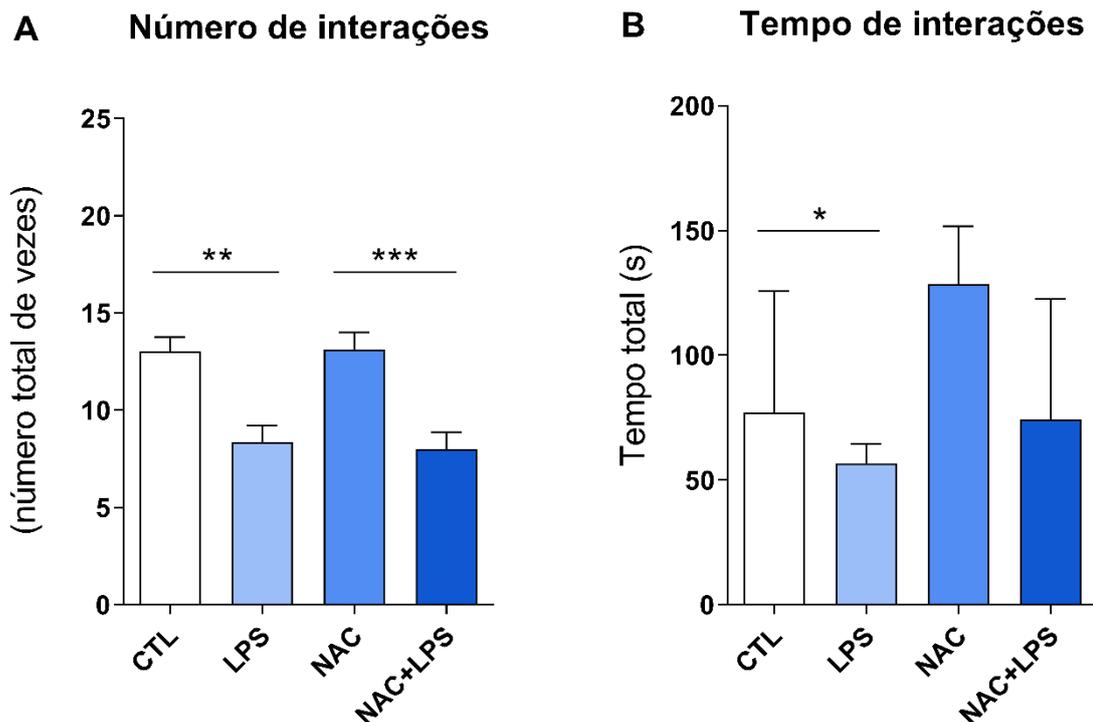
4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

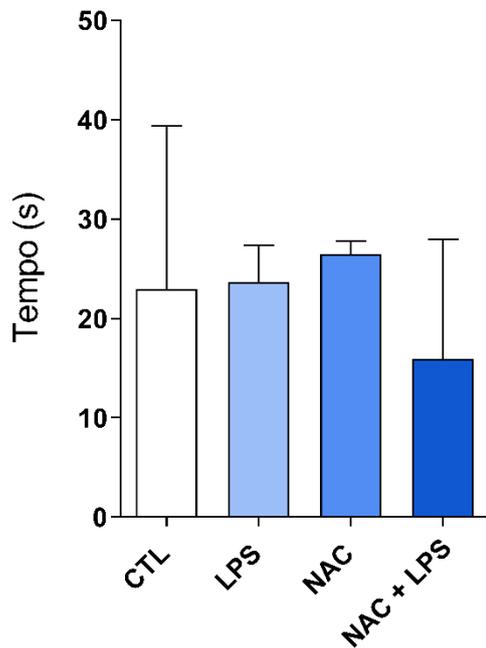
4.1.1 Interação social

Ambos os grupos tratados com LPS demonstraram alterações comportamentais no teste de interação. O grupo LPS apresentou redução significativa no número total de interações realizadas (Figura 5A) em relação ao CTL, assim como o grupo NAC + LPS em relação a NAC ($F_{(3, 28)} = 11,07$; $p < 0,0001$). No tempo total de interação (Figura 5B), houve uma diferença significativa entre LPS e CTL ($U = 8$; $p = 0,0426$). Na latência de interação, os grupos apresentaram médias de tempo similares, portanto, não foram encontradas diferenças significantes (Figura 5C). O tratamento prévio com NAC não impediu redução do número e tempo de interação com outro animal induzida pela administração de LPS (Figura 5A e B), entretanto, o tratamento isolado com NAC não causou prejuízos no comportamento social, se comparado ao grupo CTL no número ($U = 28,50$; $p = 0,7704$) e no tempo de interações ($U = 16$; $p = 0,2238$).

Figura 5 – Alterações no comportamento social.



C Latência de interação

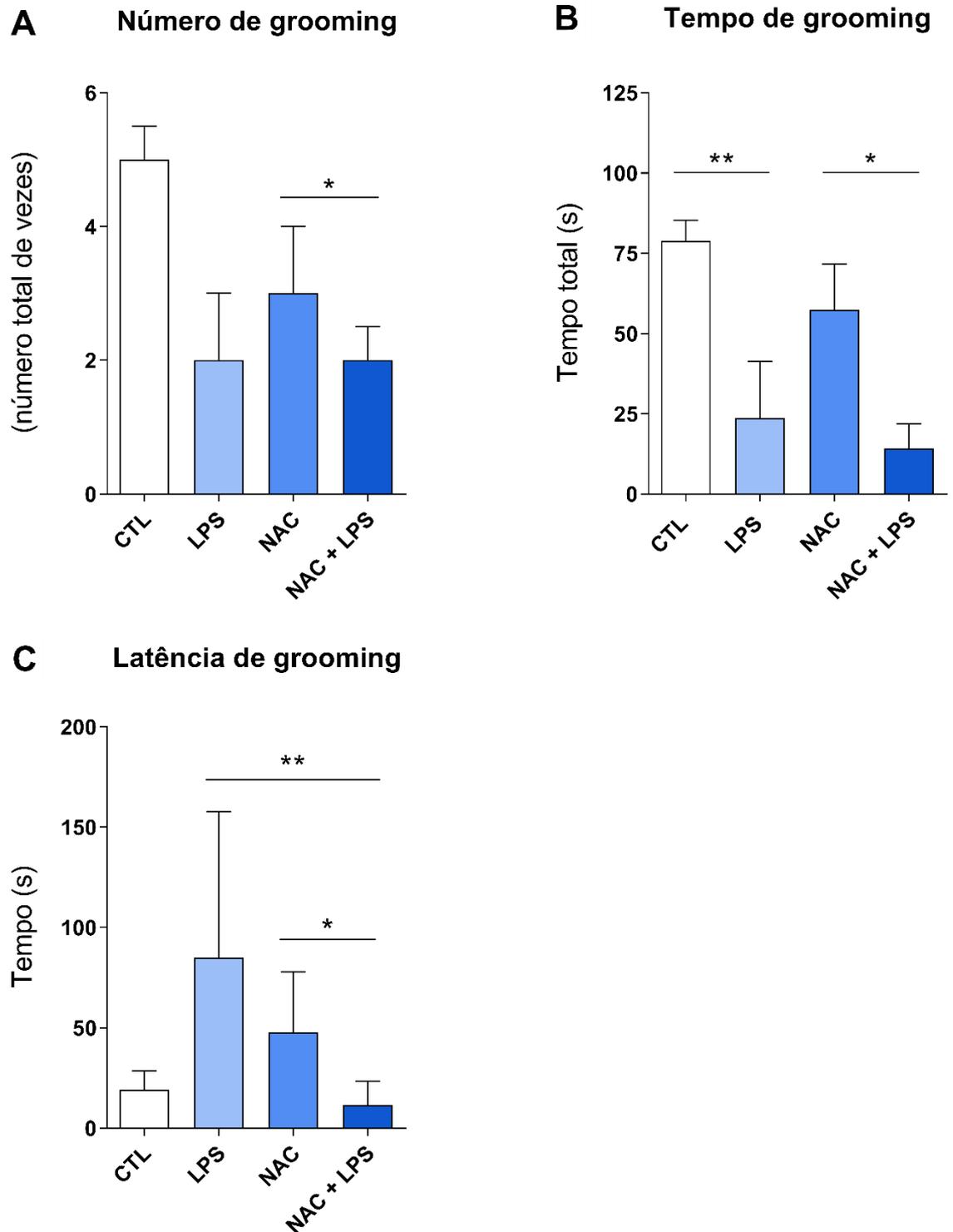


Efeitos do tratamento subcrônico com NAC sobre a interação social. Camundongos suíços (n = 9 animais por grupo) receberam durante sete dias uma administração oral de salina (0,9% NaCl) ou NAC (100 mg/kg). No oitavo dia, receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg). Após quatro horas, avaliou-se o comportamento tipo-doentio através da análise do número (A), tempo de interações (B) e latência de interação (C) no teste de interação social. Mostra-se o valor da média + SEM (A) e mediana + IQR (B, C). ***P<0.001; **P<0.01 (ANOVA de uma via); *P<0.05 (Mann-Whitney); CTL: controle; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; NAC: N-acetilcisteína.

4.1.2 Borrifagem de sacarose

A administração de LPS induziu alterações no comportamento de autolimpeza, expresso através da ação de *grooming*, induzida no teste de borrifagem de sacarose. Em relação ao número total de *grooming* (Figura 6A), o grupo NAC + LPS expressou uma redução significativa em comparação ao grupo NAC (U = 12; p = 0,0161). No tempo total de *grooming* (Figura 6B), os grupos LPS e NAC + LPS apresentaram menores médias de tempo em comparação aos grupos CTL (U = 2; p = 0,0087) e NAC (U = 8; p = 0,0350), respectivamente. A administração aguda de LPS induziu prejuízo no comportamento de autolimpeza, caracterizado pela redução no tempo de *grooming* nestes animais, o qual não foi atenuado através do tratamento subcrônico com NAC. Entretanto, o tratamento subcrônico com NAC foi capaz de reduzir a latência de *grooming* (Figura 6C) aumentada pelo LPS (H = 14,13; p = 0,0027).

Figura 6 – Alterações no comportamento de autolimpeza (*grooming*).



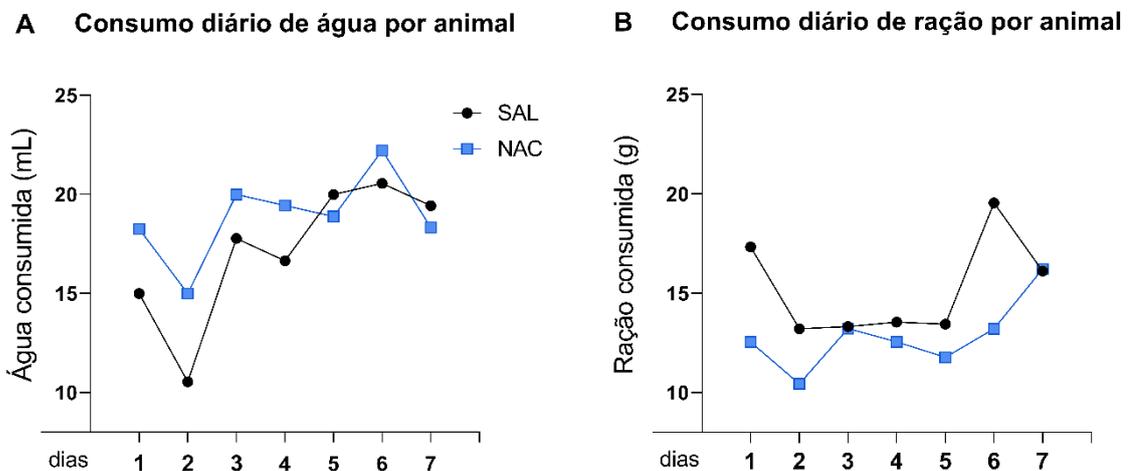
Efeitos do tratamento subcrônico com NAC sobre a autolimpeza. Camundongos suíços ($n = 9$ animais por grupo) receberam durante sete dias uma administração oral de salina (0,9% NaCl) ou NAC (100 mg/kg). No oitavo dia, receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg). Após quatro horas, avaliou-se o comportamento tipo-doiçentio através da análise do número (A), tempo (B) e latência de *grooming* (C) no teste de borrifagem de sacarose.

Mostra-se o valor da mediana + IQR. ** $P < 0.01$ (B - Mann-Whitney; C - Kruskal-Wallis); * $P < 0.05$ (A, B - Mann-Whitney; C - Kruskal-Wallis). CTL: controle; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; NAC: N-acetilcisteína.

4.2 CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR

Não houveram mudanças significativas relacionadas ao tratamento com NAC no padrão de consumo hídrico (Figura 7A) e alimentar (Figura 7B) em relação grupo SAL, ao longo dos sete dias tratamento.

Figura 7 – Consumo hídrico e alimentar diário.



Curva tempo-efeito da NAC sobre a média de consumo individual de água e ração. Camundongos suíços ($n = 18$ animais por grupo) receberam durante sete dias uma administração oral de salina (0,9% NaCl) ou NAC (100 mg/kg). Avaliou-se o consumo diário individual de água e ração. Mostra-se o valor da média.

4.3 PESO CORPORAL

A NAC isoladamente não induziu uma alteração no peso corporal dos animais distinta do padrão observado no grupo SAL. Após sete dias, a administração oral de salina ($t = 3,239$; $df = 17$; $p = 0,0048$) ou NAC ($t = 3,130$; $df = 17$; $p = 0,0061$) causou uma redução no peso corporal em relação a mesma medida avaliada previamente ao início do tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Alterações no peso corporal.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
SAL	46,11 ± 1,04	44,83** ± 0,94
NAC	45,06 ± 0,82	43,89** ± 0,87

Curva tempo-efeito da NAC sobre o peso corporal. Camundongos suíços (n = 18 animais por grupo) receberam durante sete dias uma administração oral de salina (0,9% NaCl) ou NAC (100 mg/kg). Avaliou-se o peso corporal no dia anterior ao início do tratamento (peso inicial) e no último dia de tratamento (peso final). Mostra-se o valor da média + SEM. **P<0,01 em relação ao peso inicial do grupo correspondente (t de *Student*).

4.4 TERMORREGULAÇÃO

Na temperatura inicial, a qual representa o nível basal da temperatura central dos animais previamente à injeção de salina ou LPS, os grupos apresentaram médias de temperatura semelhantes e não foram evidenciadas diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2 – Alterações na termorregulação (temperatura central).

	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)
CTL	35,78 ± 0,17	35,94 ± 0,24
LPS	36,06 ± 0,24	35,57 ± 0,46
NAC	35,89 ± 0,23	36,04 ± 0,21
NAC + LPS	36,13 ± 0,23	34,70 ± 0,40

Efeitos do tratamento subcrônico com NAC sobre temperatura central. Camundongos suíços (n = 9 animais por grupo) receberam durante sete dias uma administração oral de salina (0,9% NaCl) ou NAC (100 mg/kg). No oitavo dia, receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg). Avaliou-se a resposta termorregulatória através da mensuração da temperatura central (retal) no tempo 0 hora (temperatura inicial) e após 4 horas (temperatura final). Mostra-se o valor da média + SEM. P>0,05 em relação a temperatura inicial grupo correspondente (ANOVA de duas vias).

5 DISCUSSÃO

Os resultados achados demonstram que o modelo experimental realizado foi capaz de induzir as alterações comportamentais caracterizadas como comportamento tipo-doentio nos animais que receberam o tratamento com LPS, e corroboram com estudos prévios que identificaram reduções nos parâmetros de interação social e autolimpeza (KELLEY et al., 2003; LASSELIN et al., 2020; SHIRAKI et al., 2021).

As alterações no comportamento social induzida por uma administração aguda de LPS já foram descritas previamente como um achado associado ao comportamento tipo-doentio associado à neuroinflamação (HENRY et al., 2008; GODBOUT et al., 2005; YEH et al., 2018; REIS et al., 2022). A redução da interação social apresentada pelos animais tratados com LPS (Fig. 5), não foi atenuada pelo tratamento de sete dias com NAC (100 mg/kg), o que corrobora com resultados de um estudo à respeito das propriedades ansiolíticas da NAC em um modelo de estresse induzido por hipertermia (SANTOS et al., 2017), o qual não identificou melhora no tempo de interação social em camundongos tratados com NAC (60 e 100 mg/kg) durante quatro dias.

O prejuízo no comportamento de autolimpeza também é uma alteração associada ao comportamento tipo-doentio induzido por LPS já descrita na literatura (CAMARGO et al., 2018; CASARIL et al., 2019; SOUZA et al., 2019). O tratamento com NAC não reverteu este prejuízo em relação ao número e tempo de *grooming* nos animais tratados com LPS (Fig. 6), um resultado semelhante foi observado em um modelo de neuroinflamação induzida por estresse crônico (FERNANDES; GUPTA, 2019), o qual não identificou diferença no número de *grooming* em animais tratados com NAC (100 mg/kg) durante sete dias. Entretanto, a administração de NAC reduziu o tempo de latência de *grooming* (Fig. 6C) em relação aos animais tratados exclusivamente com LPS, resultado ainda não descrito na literatura.

Não foram encontradas diferenças significativas no consumo hídrico e alimentar entre os animais tratados com NAC ou salina, entretanto, estudos mostram que a NAC é capaz de reduzir o comportamento de consumo alimentar compulsivo (HURLEY et al., 2016) e alterações metabólicas induzidas por uma dieta hipercalórica (MA; GAO; LIU; 2016) em roedores.

A redução no peso corporal dos animais encontrada ao final do tratamento não mostra uma associação com o tratamento isolado com NAC, pois ambos os grupos apresentaram um peso corporal diminuído em relação ao dia prévio do início do tratamento (Tabela 1). Não foram

identificadas mudanças significativas no peso corporal de animais tratados com NAC (200 mg/kg) ou NAC + LPS (50µg/kg) num período de vinte e quatro horas, em um estudo que avaliou o efeito da atividade antipirética da NAC (WROTEK et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados demonstram que o tratamento subcrônico com NAC não foi capaz de proteger os animais da manifestação do comportamento tipo-doentio, caracterizado pelas alterações nos padrões de interação social e autolimpeza, induzida pela administração aguda de LPS. Assim como não promoveu modificações no peso corporal, consumo hídrico e alimentar.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para investigar os possíveis efeitos do tratamento subcrônico com NAC no sistema antioxidante endógeno e na ativação do inflamassoma NLRP3 e associá-los aos resultados comportamentais encontrados, serão realizadas análises bioquímicas em amostras de tecidos cerebrais coletados durante a execução deste trabalho. Estas análises irão incluir a mensuração dos níveis de GSH, da atividade enzimática de GPx e GR e nível de IL-1 β nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo.

REFERÊNCIAS

- ABAIS, Justine M. *et al.* Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 13, p. 1111-1129, 2015.
- ABDEL-WAHAB, Wessam M; MOUSSA, Farouzia I. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. **Drug Design, Development And Therapy**, v. 13, p. 1155-1162, 2019.
- ABDERRAZAK, Amna *et al.* NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 4, p. 296-307, 2015.
- AOYAMA, Koji; NAKAKI, Toshio. Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21021-21044, 2013.
- CAMARGO, Anderson *et al.* The resilient phenotype elicited by ketamine against inflammatory stressors-induced depressive-like behavior is associated with NLRP3-driven signaling pathway. **Journal Of Psychiatric Research**, v. 144, p. 118-128, 2021.
- CASARIL, Angela Maria *et al.* Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system. **Journal Of Psychiatric Research**, v. 115, p. 1-12, 2019.
- CHEN, Gang *et al.* Inhibitory Effect on Cerebral Inflammatory Response following Traumatic Brain Injury in Rats: A Potential Neuroprotective Mechanism of N-Acetylcysteine. **Mediators Of Inflammation**, v. 2008, p. 1-8, 2008.
- CHEN, Wei-Wei; ZHANG, Xia; HUANG, Wen-Juan. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3391-3396, 2016.
- CHEN, Zhichun; ZHONG, Chunjiu. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 271-281, 2014.
- CHIU, Chong-Chi *et al.* Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. **Journal Of Neuroscience Methods**, v. 272, p. 38-49, 2016.
- COBLEY, James Nathan; FIORELLO, Maria Luisa; BAILEY, Damian Miles. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 15, p. 490-503, 2018.
- COLLIN, Fabrice. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2407, 2019.

CRUZ, Cristiane M. *et al.* ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2871-2879, 2007.

D'AUDIFFRET, Alexandre C. *et al.* Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **Journal Of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 1041-1051, 2010.

DANTZER, Robert *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DEVIRIM-LANPIR, Asli; HILL, Lee; KNECHTLE, Beat. How N-Acetylcysteine Supplementation Affects Redox Regulation, Especially at Mitohormesis and Sarcophormesis Level: current perspective. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 153, 2021.

DHOUIB, Ines Elbini *et al.* A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sciences**, v. 151, p. 359-363, 2016.

DISABATO, Damon; QUAN, Ning; GODBOUT, Jonathan P. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. **Journal Of Neurochemistry**, v. 139, p. 136-153, 2016. Suplemento 2.

DORRINGTON, Michael G.; FRASER, Iain D. C. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. **Frontiers In Immunology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

DRINGEN, Ralf; HIRRLINGER, Johannes. Glutathione Pathways in the Brain. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 4, p. 505-516, 2003.

DU, Tai *et al.* Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 1, n. 44, p. 44-55, 2008.

ELLIOTT, Eric I.; SUTTERWALA, Fayyaz S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 35-52, 2015.

ERICKSON, Michelle A.; BANKS, William A. Cytokine and Chemokine Responses in Serum and Brain After Single and Repeated Injections of Lipopolysaccharide: Multiplex Quantification with Path Analysis. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 25, n. 8, p. 1637-1648, 2011.

FERNANDES, Joneth; GUPTA, Girdhari Lal. N-acetylcysteine attenuates neuroinflammation associated depressive behavior induced by chronic unpredictable mild stress in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 356-365, 2019.

FRATELLI, Maddalena *et al.* Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 102, n. 39, p. 13998-14003, 2005.

- GARG, Geetika *et al.* N-acetyl-L-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 96, n. 12, p. 1189-1196, 2018.
- GIACOMETTI, Laura L.; HUH, Jimmy W.; RAGHUPATHI, Ramesh. Sex and estrous-phase dependent alterations in depression-like behavior following mild traumatic brain injury in adolescent rats. **Journal Of Neuroscience Research**, v. 100, n. 2, p. 490-505, 2021.
- GIUSTARINI, Daniela *et al.* S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 201-212, 2004.
- GLEZER, Isaias *et al.* O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000.
- GODBOUT, J.P. *et al.* α -Tocopherol attenuates NF κ B activation and pro-inflammatory cytokine production in brain and improves recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 169, n. 1-2, p. 97-105, 2005.
- GONZÁLEZ-FRAGUELA, Maria Elena *et al.* Glutathione depletion: Starting point of brain metabolic stress, neuroinflammation and cognitive impairment in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 137, p. 120-131, 2018.
- GU, Feng; CHAUHAN, Ved; CHAUHAN, Abha. Glutathione redox imbalance in brain disorders. **Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 18, n. 1, p. 89-95, 2015.
- HEIN, Amy M; O'BANION, M Kerry. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. **Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 1, p. 15-32, 2009.
- HENRY, Christopher J *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Journal Of Neuroinflammation**, v. 5, n. 15, 2008.
- HENRY, Christopher J. *et al.* Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 23, n. 3, p. 309-317, 2009.
- HOOGLAND, Inge C.M. *et al.* Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Jornal Of Neuroinflammation**, v. 12, n. 114, 2015.
- HSIEH, Lawrence S. *et al.* Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks. **Neuroscience Letters**, v. 637, p. 142-147, 2017.
- HURLEY, M. M. *et al.* N-acetylcysteine decreases binge eating in a rodent model. **International Journal Of Obesity**, v. 40, n. 7, p. 1183-1186, 2016.

KARAPINAR, Senem Pinar *et al.* The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Archives Of Oral Biology**, v. 63, p. 48-54, 2016.

KELLEY, Keith W. *et al.* Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 17, n. 1, p. 112-118, 2003.

KELLEY, Nathan *et al.* The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019.

LASSELIN, Julie *et al.* Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: Relevance for symptoms of anxiety and depression. **Neuroscience And Biobehavioral Reviews**, v. 115, p. 15-24, 2020.

LIU, Ting *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction And Target Therapy**, v. 2, n. 17023, 2017.

MA, Yongjie; GAO, Mingming; LIU, Dexi. N-acetylcysteine Protects Mice from High Fat Diet-induced Metabolic Disorders. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 8, p. 2033-2042, 2016.

MENDES, Ana Paula Alves; PEREIRA, Rafaela Corrêa; ANGELIS-PEREIRA, Michel Cardoso de. ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: CONCEITOS FUNDAMENTAIS SOB OS ASPECTOS DA NUTRIÇÃO E DA CIÊNCIA DOS ALIMENTOS. In: CORDEIRO, Carlos Alberto Martins (org.). **Tecnologia de Alimentos Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos – volume 2**. Guarujá: Editora Científica Digital, 2020. Cap. 20. p. 296-312.

MEYERS, Allison K.; ZHU, Xuewei. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammation. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1-22, 2020.

MIEYAL, John J.; CHOCK, P. Boon. Posttranslational Modification of Cysteine in Redox Signaling and Oxidative Stress: Focus on S-Glutathionylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 6, p. 471-475, 2012.

MOKHTARI, Vida *et al.* A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. **Cell Journal**, v. 19, n. 1, p. 11-17, 2017.

MOLDOGAZIEVA, N. T. *et al.* Dual Character of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Halogen Species: Endogenous Sources, Interconversions and Neutralization. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, p. 56-78, 2020. Suplemento 1.

MUSTACICH, Debbie; POWIS, Garth. Thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 346, p. 1-8, 2000.

PAJONK, Frank *et al.* N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 15, n. 32, p. 536-543, 2002.

PARK, Beom Seok *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. **Nature**, v. 458, p. 1191-1195, 2009.

PINEDA-MOLINA, Estela *et al.* Glutathionylation of the p50 Subunit of NF- κ B: a Mechanism for Redox-Induced Inhibition of DNA Binding. **Biochemistry**, v. 40, n. 47, p. 14134-14142, 2011.

PIRABBASI, Elham *et al.* Efficacy of Ascorbic Acid (Vitamin C) and N-Acetylcysteine (NAC) Supplementation on Nutritional and Antioxidant Status of Male Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients. **Journal Of Nutritional Science And Vitaminology**, v. 62, n. 1, p. 54-61, 2016.

QIN, Liya *et al.* Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 453-462, 2007.

REIS, Letícia *et al.* Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity. **Neuroscience Letters**, v. 781, p. 136680, 2022.

RODRIGUES, Fernanda S. *et al.* N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutamic Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-18, 2013.

SAKAI, Jiro *et al.* Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

ŠALAMON, Špela *et al.* Medical and Dietary Uses of N-Acetylcysteine. **Antioxidants (Basel)**, v. 8, n. 5, p. 111, 2019.

SAMUNI, Yuval *et al.* The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 8, p. 4117-4129, 2013.

SHABAB, Tara *et al.* Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal Of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624-633, 2017.

SHAHRIPOUR, Reza Bavarsad; HARRIGAN, Mark R; ALEXANDROV, Andrei V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain And Behavior**, v. 4, n. 2, p. 108-122, 2014.

SHIRAKI, Chinatsu *et al.* Role of TRPM8 in switching between fever and hypothermia in adult mice during endotoxin-induced inflammation. **Brain, Behavior, And Immunity - Health**, v. 16, n. 100291, 2021.

SLIMEN, Imen Belhadj *et al.* Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International Journal Of Hyperthermia**, v. 30, n. 7, p. 513-523, 2014.

SMAGA, Irena *et al.* N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: Behavioral and biochemical analyses in rats. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 280-287, 2012.

STEPHENSON, Jodie *et al.* Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 204-219, 2018.

SWANSON, Karen V.; DENG, Meng; TING, Jenny P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 5, p. 477-489, 2019.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p. 1181-1194, 2016.

TARDIOLO, Giuseppe; BRAMANTI, Placido; MAZZON, Emanuela. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 12, n. 23, 2018.

TSCHOPP, Jurg; SCHRODER, Kate. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 210-215, 2010.

VEURINK, Gerald; PERRY, George; SINGH, Sandeep Kumar. Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease. **Open Biology**, v. 6, n. 10, 2020.

WANG, Hong-Wei *et al.* N-acetylcysteine Administration is Associated with Reduced Activation of NF- κ B and Preserves Lung Dendritic Cells Function in a Zymosan-Induced Generalized Inflammation Model. **Journal Of Clinical Immunology**, v. 33, p. 649-660, 2013.

WILMANSKI, Jeanette M.; PETNICKI-OCWIEJA, Tanja; KOBAYASHI, Koichi S. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 1, p. 13-30, 2008.

WROTEK, Sylwia *et al.* Antipyretic activity of N-acetylcysteine. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 669-675, 2011.

YEH, Ching-Hua *et al.* Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Plos One**, v. 13, n. 1, p. e0191070, 2018.

YU, Xin *et al.* HBV Inhibits LPS-induced NLRP3 Inflammasome Activation and IL-1 β Production via Suppressing NF- κ B Pathway and ROS Production. **Journal Of Hepatology**, v. 66, n. 4, p. 693-702, 2016.

ZHAO, Jiayi *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-12, 2019.

ZHOU, Rongbin *et al.* Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136-140, 2010.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



**Comissão de Ética no
Uso de Animais**



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE UM POTENCIAL INIBIDOR DO INFLAMASSOMA NLRP3 NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR LPS", protocolada sob o CEUA nº 8614220419 (ID 001300), sob a responsabilidade de **Roberta de Paula Martins e equipe; Ana Cristina de Bem Alves; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Aderbal Silva Aguiar Junior; Rafael Cypriano Dutra** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 09/07/2019.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE EFFECT OF A POTENTIAL NLRP3 INFLAMMASOME INHIBITOR IN THE BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL CHANGES INDUCED BY LPS", utilizing 936 Heterogenics mice (males or females), protocol number CEUA 8614220419 (ID 001300), under the responsibility of **Roberta de Paula Martins and team; Ana Cristina de Bem Alves; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Aderbal Silva Aguiar Junior; Rafael Cypriano Dutra** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 07/09/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2024** Área: **Bioquímica**

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	5 a 8 semanas	N:	936
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 35 g		
Linhagem:	Suíço						

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF), Bloco A, no Departamento de Ciências da Saúde, Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde, Campus Araranguá.

Florianópolis, 11 de novembro de 2021

Luciana A Honorato

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina