

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS E DA  
TEMPERATURA DE OVINOS SUBMETIDOS À  
ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL**

**Rafael Ferreira de Araujo**  
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS E DA  
TEMPERATURA DE OVINOS SUBMETIDOS À  
ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL**

**Rafael Ferreira de Araujo**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Nogueira Mendes**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Regina Peiró**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2013

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Araujo, Rafael Ferreira de

A663a

Avaliação do perfil sérico de citocinas e da temperatura de ovinos submetidos à endotoxemia experimental / Rafael Ferreira de Araujo. -- Araçatuba: [s.n], 2013  
94 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof. Adj. Luiz Cláudio Nogueira Mendes

Coorientadora: Profa. Adj. Juliana Regina Peiró

1. Ovinos. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Endotoxemia. 4. Perfil de citocinas. 5. Termometria. 6. Termografia

CDD 636.3



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Avaliação do perfil sérico de citocinas e da temperatura de ovinos submetidos à endotoxemia experimental.

**AUTOR:** RAFAEL FERREIRA DE ARAUJO

**ORIENTADOR:** Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

*Linah*  
Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE

*Lilian Gregory*  
Dra. LILIAN GREGORY

*Francisco Leydson Formiga Feitosa*  
Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

*Jose Correa de Lacerda Neto*  
Dr. JOSÉ CORRÊA DE LACERDA NETO

*Luiz Claudio Nogueira Mendes*  
Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 5 de dezembro de 2013.

*Luiz Claudio Nogueira Mendes*  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES  
- Orientador -

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**RAFAEL FERREIRA DE ARAUJO** – nascido no Rio de Janeiro, RJ, em 13 de dezembro de 1979. Filho de Paulo Sergio Simões de Araujo e Regina Lucia Ferreira de Araujo. Médico Veterinário graduado em 2005 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ. Em 2006 obteve o título de Especialista em Sanidade de Ruminantes pela Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), Duque de Caxias - RJ. Em 2009 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Jaboticabal. Em setembro de 2010 foi admitido por meio de concurso público para o cargo de professor do ensino básico, técnico e tecnológico do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense (IFC), *Campus* de Araquari, onde permaneceu até julho de 2012. Iniciou o curso de Doutorado em 2011, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Araçatuba, no programa de pós-graduação em Ciência Animal, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica. Em julho de 2012 foi admitido por meio de concurso público para o cargo de professor do magistério superior da Universidade Federal do Acre (UFAC), *Campus* de Rio Branco. Em julho de 2013 foi redistribuído para a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* de Realeza - PR.

*“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais, e nesse dia, um crime contra um animal será um crime contra a humanidade.”*

*Leonardo da Vinci*

*Aos meus pais, Paulo e Regina, pelo apoio, confiança e incentivo à minha formação.*

*Com eterna gratidão,*

*OFEREÇO este trabalho.*

*À minha esposa Rúbia  
pelo apoio, incentivo, companheirismo  
e principalmente compreensão nos momentos de ausência*

*DEDICO*

*HOMENAGEM*  
*À minha família,*  
*e em especial ao avô Jaime e a avó Antonieta (in memoriam)*  
*pelo carinho compartilhado*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Nogueira Mendes, pela oportunidade, confiança, orientação e pelos ensinamentos compartilhados durante a elaboração deste trabalho.

À Profa. Juliana Regina Peiró pelos conhecimentos compartilhados e colaboração na execução e interpretação do teste de Elisa.

À Profa. Valéria Marçal Félix de Lima pelos conhecimentos de imunologia e empréstimo do software de leitura do teste de Elisa.

À Profa. Dra. Sílvia Helena Venturolli Perri, pela realização das análises estatísticas e sugestões.

Aos colegas da Pós-Graduação, Bianca Gerardi, Larissa G. Ávila e Renata N. Figueiredo, e da Graduação, Marina G. de Carvalho e Eduardo M. Panelli, pelo apoio essencial para o desenvolvimento do projeto e momentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela receptividade e pelos ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xix
I. INTRODUÇÃO.....	20
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Estrutura e Antigenicidade do LPS.....	22
2.2. Interação do LPS com Componentes do Sistema Imune.....	23
2.3. Ação do LPS sobre o Sistema Imune Inato.....	23
2.4. Produção de Citocinas a partir da Ação do LPS sobre o Sistema Imune Inato.....	25
2.5. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ).....	26
2.6. Interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ ).....	28
2.7. Interleucina-2 (IL-2).....	29
2.8. Interleucina-13 (IL-13).....	29
2.9. Efeito da Via de Administração e da Dose do LPS sobre a Cinética do TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	30
2.10. Modificação da Temperatura Corporal em Resposta ao LPS.....	33
2.11. Avaliação da Temperatura Corporal por meio de Termometria por Termômetro de Infravermelho.....	34
2.12. Avaliação da Temperatura Corporal por meio de Termografia por Imagem Infravermelha.....	36
III. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Caracterização dos Animais.....	42
4.2. Inoculação de LPS ( <i>Escherichia coli</i> ).....	42
4.3. Momento das Avaliações.....	42

4.4. Coleta e Preparação das Amostras de Sangue.....	43
4.5. Análise Laboratorial – Perfil das Citocinas Séricas.....	43
4.6. Análise da Temperatura Retal.....	44
4.7. Análise da Temperatura da Superfície Corpórea.....	44
4.8. Análise Estatística do Perfil das Citocinas Séricas.....	44
4.9. Análise Estatística da Temperatura Retal.....	45
4.10. Análise Estatística da Temperatura da Superfície Corpórea.....	45
V. RESULTADOS.....	46
5.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ).....	46
5.2. Interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ ).....	47
5.3. Interleucina-2 (IL-2).....	47
5.4. Interleucina-13 (IL-13).....	49
5.5. Temperatura Retal.....	51
5.6. Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato.....	52
5.7. Termografia - Câmera Flir i60.....	61
VI. DISCUSSÃO.....	71
VII. CONCLUSÃO.....	79
VIII. REFERÊNCIAS.....	80
IX. ANEXO.....	94

**LISTA DE TABELAS****Página**

Tabela 1. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	46
Tabela 2. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Interleucina-2 (IL-2), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	48
Tabela 3. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	49
Tabela 4. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Retal (TR) mensurada pelo Termômetro Clínico de Mercúrio, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	51
Tabela 5. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Frente (TF) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	53
Tabela 6. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Dorso (TD) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	54

Tabela 7. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Axilar (TA) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	56
Tabela 8. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	57
Tabela 9. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	59
Tabela 10. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Períneo (TP) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	60
Tabela 11. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Fronte (TF) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	62
Tabela 12. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Dorso (TD) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	63

Tabela 13. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Axilar (TA) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	65
Tabela 14. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	66
Tabela 15. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	68
Tabela 16. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Períneo (TP) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	69

**LISTA DE FIGURAS****Página**

Figura 1. Concentração sérica de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	47
Figura 2. Concentração sérica de Interleucina-2 (IL-2), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	48
Figura 3. Concentração sérica de Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , EV) em cada momento de avaliação.....	50
Figura 4. Concentração sérica de Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, do grupo tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , EV) em cada momento de avaliação.....	50
Figura 5. Temperatura Retal (TR) mensurada pelo Termômetro Clínico de Mercúrio, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	52
Figura 6. Temperatura da Fronte (TF) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	53
Figura 7. Temperatura do Dorso (TD) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle	

(NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	55
Figura 8. Temperatura Axilar (TA) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	56
Figura 9. Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	58
Figura 10. Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	59
Figura 11. Temperatura do Períneo (TP) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	61
Figura 12. Temperatura da Frente (TF) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	62
Figura 13. Temperatura do Dorso (TD) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	64

Figura 14. Temperatura Axilar (TA) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	65
Figura 15. Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	67
Figura 16. Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	68
Figura 17. Temperatura do Períneo (TP) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de <i>E. coli</i> , IV) em cada momento de avaliação.....	70

## **AVALIAÇÃO DO PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS E DA TEMPERATURA SUPERFICIAL CORPÓREA DE OVINOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL**

**RESUMO** – O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil sérico de citocinas e da temperatura da superfície corpórea de ovinos submetidos à endotoxemia experimental. Foram empregados dez ovinos, com aproximadamente quatro anos de idade do Setor de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Os animais foram segregados aleatoriamente em dois grupos compostos por cinco animais cada: grupo tratado inoculado com LPS (*Escherichia coli* 055: B5: Sigma, St. Louis, MO) na dose de 400 ng/Kg; grupo controle inoculado com 2 mL de solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). Foi realizado o exame físico dos animais, no momento de sua admissão, bem como a coleta de sangue para o perfil de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-13), e as 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas, após a administração do LPS ou solução fisiológica. As citocinas foram mensuradas pelo teste de ELISA. A temperatura retal foi avaliada por um termômetro clínico de mercúrio. A temperatura de superfície corpórea foi avaliada por termômetro infravermelho de mão e de não contato e por termografia de imagem infravermelha nas regiões da frente, dorso, axilar, face externa e interna da coxa, e períneo. As concentrações séricas de citocinas não sofreram alterações significativas. A temperatura retal atingiu o pico de 40,6°C em 4 horas após a inoculação do LPS. A temperatura da superfície corpórea, mensurada pela termografia por imagem infravermelha, foi inicialmente aumentada em 6 horas após a inoculação do LPS, entretanto a temperatura máxima da pele foi registrada em 12 horas. Esta situação ocorreu com a temperatura das regiões da frente, dorso, axilar, face externa e interna da coxa dos ovinos. Este foi o primeiro trabalho relacionado ao perfil sérico de citocinas de ovinos submetidos à endotoxemia. Conclui-se que a termografia por imagem infravermelha pode ser utilizada para a análise de temperatura da pele dos ovinos, assim esta técnica deveria ser incorporada a rotina clínica dos

médicos veterinários como ferramenta auxiliar de diagnóstico precoce da endotoxemia.

**Palavras-chave:** ovinos, lipopolissacarídeos, endotoxemia, perfil de citocinas, termometria, termografia.

## EVALUATION OF SERUM CYTOKINE PROFILE AND BODY TEMPERATURE DURING EXPERIMENTAL ENDOTOXEMIA IN SHEEP

**SUMMARY** – The present study aimed to evaluate the serum cytokine profile and the temperature of the body surface of sheep undergoing experimental endotoxemia. Ten suffolk sheep with approximately four years of age were used. The animals were randomly separated into two groups comprising five animals each: one group was treated with LPS (*Escherichia coli* 055: B5: Sigma, St. Louis, MO) at a dose of 400 ng/kg, the control group was inoculated with 2 mL of 0.9% physiological solution of sodium chloride (NaCl). We conducted a physical examination of animals at the time of his admission, and blood collection for the profile of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-13), and at 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 and 60 hours after administration of LPS or saline. Cytokines were measured by ELISA. Rectal temperature was measured by a clinical thermometer. The body surface temperature was measured by infrared hand-held and non-contact thermometer and thermography and infrared imaging were done in regions of the forehead, back, underarm, face external and inner thigh, and perineum. Serum levels of cytokines did not change significantly. Rectal temperature peaked at 40.6°C in 4 hours after the LPS inoculation. The body surface temperature, measured by infrared thermography was initially increased at 6 hours after the LPS inoculation, however, the maximum skin temperature was recorded at 12 hours. This situation occurred with the temperature regions of the forehead, back, underarm, face external and internal thigh sheep. This study show for the first time the cytokine profile of sheep submitted to endotoxemia. The results obtained in this study show for the thermography infrared imaging can be used for the analysis of skin temperature of the sheep, so this technique should be incorporated into routine clinical veterinarians as auxiliary tool for early diagnosis of endotoxemia.

**Keywords:** sheep, lipopolysaccharide, endotoxemia, cytokine profile, thermometry, thermography.

## I. INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes. A ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. A criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

A ovinocultura é uma atividade agropecuária em ascensão em todo o território nacional, visto que o Brasil possuía 15,5 milhões de cabeças ovinas (VIANA, 2008) e atualmente possui aproximadamente 17,6 milhões de cabeças ovinas (IBGE, 2011). Os ovinos estão concentrados em grande número no estado do Rio Grande do Sul e na região nordeste. No entanto, a criação ovina nos estados de São Paulo, Paraná e na região Centro-Oeste é crescente, possuindo estas regiões, grande potencial para a produção de carne ovina. No estado de São Paulo, a ovinocultura é uma atividade que vem despertando enorme interesse constatando alternativa viável ao agronegócio, principalmente para pequenas propriedades (CARDOSO et al., 2011). Segundo o IBGE (2011), o estado de São Paulo possui aproximadamente 452 mil ovinos dos quais 7.100 animais se concentram na cidade de Araçatuba.

A infecção, geral ou localizada, é uma causa importante de morbidade e mortalidade em animais pecuários. Durante a sepse, a liberação de endotoxinas bacterianas resulta em superativação do sistema imunológico do hospedeiro e liberação descontrolada de mediadores endógenos. Essa resposta precipita a ocorrência de uma cascata de alterações metabólicas e hemodinâmicas, que frequentemente resultam em falha múltipla dos órgãos (VAALA & HOUSE, 2006). A endotoxemia é um problema substancial na medicina veterinária (STAUB et al, 2001) e a detecção precoce do tipo de bactéria ou material infeccioso é importante para a sobrevivência do paciente (AURELL & WISTROM, 1998).

A endotoxina possui lipopolissacarídeo (LPS) na sua composição química. Este é um dos principais componentes das bactérias Gram-negativas

e seu maior fator de virulência. O LPS tem se mostrado potente estimulador da resposta inflamatória do sistema imune, bem como modulador de diversas citocinas e hormônios (HODGSON, 2006). Dessa forma, as bactérias Gram-negativas são responsáveis pelos mecanismos que se desenvolvem na sepse e no choque séptico.

Pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos da endotoxemia em ovinos e diante da gravidade desse distúrbio sistêmico, torna-se necessária a caracterização mais específica das alterações clínicas e laboratoriais da endotoxemia nos ovinos, possibilitando o diagnóstico e tratamento mais precoce com prognóstico menos reservado. A utilização de métodos mais específicos, como a análise do perfil de citocinas e o exame termográfico, tornam mais preciso o diagnóstico preciso e auxiliam a detecção e monitoramento da progressão e da gravidade de processos inflamatórios. Desta forma, tenta-se interferir de maneira mais rápida e eficiente, contra essa enfermidade. Evitam-se prejuízos econômicos às criações ovinas, devido à mão-de-obra adicional, gastos com medicamentos e suplementação alimentar e, principalmente, diminuição da produção de lã e carne. Permitindo que a atividade continue se expandindo na região de forma progressiva.

O fato dos ovinos em situações relacionadas a distúrbios pulmonares responderem fisiologicamente de forma similar aos humanos e demonstrarem a mesma sensibilidade pulmonar ao LPS (FERNANDEZ-BUSTAMANTE et al., 2012), permite que os estudos experimentais com esta espécie não fiquem limitados apenas a avanços na veterinária, mas também em medicina humana.

A escassez de estudos sistemáticos relacionados ao diagnóstico precoce da endotoxemia em animais pecuários por meio de exames complementares mais eficazes e a importância econômica e sanitária da ovinocultura motivaram o presente estudo, que se propôs a avaliar o perfil sérico de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-13), da temperatura retal e da temperatura da superfície corpórea de ovinos submetidos à endotoxemia experimental pela infusão intravenosa de 400 ng/Kg de LPS de *Escherichia coli*.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estrutura e Antigenicidade do LPS

Um dos componentes celulares do folheto externo da membrana das bactérias Gram-negativas é o LPS, também conhecido como endotoxina. Uma única célula de *Escherichia coli*, contém aproximadamente  $3,5 \times 10^6$  moléculas de LPS (RIETSCHEL et al., 1994). Cada molécula de LPS possui três domínios estruturais: região “O”, constituída por polissacarídeo polar, que se projeta em direção ao ambiente aquoso do meio extracelular; região “A”, de natureza lipídica com características hidrofóbicas, imersa na membrana externa da bactéria; e, por fim, a região central, também constituída por glicopolissacarídeos (RAETZ, 1993; AURELL & WISTROM, 1998).

A região “O” é altamente variável e contém antígenos específicos para cada cepa bacteriana, embora seja de baixa virulência (OSLON et al., 1995). A extensão do antígeno “O” é bastante diversificada, decorrente das diferentes características morfológicas das bactérias, por exemplo, colônias lisas apresentam antígenos “O” mais extensos que colônias rugosas (RAETZ, 1993).

A região central glicolipídica é relativamente constante entre as bactérias. Ela pode ser subdividida em um núcleo externo constituído por açúcares comuns e um interno formado por duas ou mais unidades do açúcar ácido 2-ceto-3-deoxioctônico, cuja abreviatura em língua inglesa é KDO (VAN AMERSFOORT et al., 2003). Esta região é mediadora de grande parte dos efeitos tóxicos das endotoxinas (ROBERT, 2006).

A região “A” lipídica é o componente do LPS com variação mínima entre as bactérias Gram-negativas (OSLON et al., 1995; ERRIDGE et al., 2002). Estudos demonstram que o lipídio “A” é o responsável pela indução dos efeitos fisiopatológicos do LPS (KOYAMA, 1999; HODGSON, 2006). Quando ele é exposto às células imunes, desencadeia a produção de citocinas e outros mediadores, como prostaglandinas, leucotrienos, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (KOYAMA, 1999; VAN AMERSFOORT et al, 2003).

## 2.2. Interação do LPS com Componentes do Sistema Imune

Segundo Robert (2006), embora a endotoxina seja onipresente no ambiente, isoladamente ou como componente das bactérias Gram-negativas, normalmente a porta de entrada da mesma no organismo animal ocorre através da mucosa intestinal, caso esta estrutura esteja danificada ou infectada por bactérias. Nesta situação, a endotoxina poderá chegar à circulação sanguínea em concentrações suficientes para causar os sinais clínicos da enfermidade.

No organismo o LPS se associa às proteínas de ligação de LPS (LPS Binding Protein - LBP) (VIRIYAKOSOL & KIRKLAND, 1995) e a proteínas do sistema de complemento, em especial ao fator 3 (C3) (JOINER et al., 1984), presentes na corrente sanguínea. Anticorpos circulantes também se ligam ao LPS. Anticorpos naturais, especialmente da classe M são descritos como os principais responsáveis pela sua neutralização (PLOEGART, 2011).

Após a formação do complexo endotoxina-LBP ocorre a ligação ao receptor protéico CD14. O CD14 existe tanto na forma solúvel como constituinte de membrana de monócitos e macrófagos (ANTAL-SZALMAS et al., 1997). Evidências experimentais apontam os macrófagos pulmonares e as células de Kupffer (LIU et al., 1998) como os principais alvos desta ligação. Tanto o CD14 solúvel no plasma, quanto o ligado à membrana de células da linhagem histiocítica funcionam como receptores de LPS (BREKKE et al., 2008).

## 2.3. Ação do LPS sobre o Sistema Imune Inato

Após a ligação do LPS com o CD14 na membrana de macrófagos ocorre a associação deste complexo com receptores *Toll Like* do tipo 4 (TLR-4), por intermédio da ligação com a proteína adaptadora extracelular fator mielóide de diferenciação 2 (MD2) (KIM et al., 2007). Assim, a ligação do LPS induz a formação de um receptor multimérico na forma de letra M, composto por duas

cópias do complexo TLR4-MD-2-LPS, arranjados simetricamente (PARK et al., 2009).

O LPS interage com um grande bolso hidrofóbico da proteína MD-2 e se conecta diretamente a dois componentes do multímero. Cinco das seis cadeias lipídicas de LPS são enterradas profundamente no bolso hidrofóbico da proteína MD-2, enquanto a cadeia remanescente fica exposta à superfície da mesma proteína, formando uma interação hidrofóbica com as fenilalaninas conservadas do TLR4 (KIM et al., 2007; OHTO et al., 2007). Desta forma, a proteína MD-2 sofre alteração estrutural na fração F126, para suportar a interface hidrofóbica do núcleo e as interações hidrofílicas do TLR4 (PARK et al., 2009).

A comparação entre as estruturas de antagonistas tetra-acilados ligadas a MD-2 indicam que duas outras cadeias lipídicas do LPS têm a capacidade de deslocar a glicosamina fosforilada (KOBAYASHI et al., 2006; KIM et al., 2007). Esta mudança estrutural permite que os grupos de fosfato de LPS possam contribuir com a dimerização do receptor pela formação de interações iônicas com um conjunto de resíduos carregados positivamente em TLR4 e MD-2 (PARK et al., 2009).

Na sequência desses eventos, ocorre a ativação da via de sinalização intracelular, que desencadeará a resposta inflamatória sistêmica. O primeiro passo desta via de sinalização se inicia com a clivagem da proteína adaptadora citoplasmática, conhecida por fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), através da interação de duas regiões citoplasmática de moléculas de TLR4 (KAGAN & MEDZHITOV et al., 2006). Estas interações resultam na formação de ligações homotípicas entre os domínios ricos em tirosina das moléculas de TLR4 (GRAY et al., 2006).

A proteína adaptadora citoplasmática, MyD88, interage com uma cinase-4 associada a receptor de Interleucina-1 (IRAK-4) (JANSSENS & BEYAERT, 2003), em seguida as proteínas IRAK-4 se ligam a outra cinase da mesma família, IRAK-1, que é fosforilada e ativada. Após este evento a IRAK-1 se desacopla do complexo protéico e se associa com a proteína fator 6 associado

à TNF (TRAF-6), ativando-a (MANSELL et al., 2004). Este processo resultará na ativação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) (KAWAI & AKIRA, 2007).

Em células em repouso, dímeros de NF- $\kappa$ B estão presentes em estado inativo, isto ocorre porque nesta condição os mesmos estão ligados a proteínas inibidoras denominadas de I $\kappa$ Bs (KARIN & BEN-NERIAH et al., 2000). A ativação de NF- $\kappa$ B é iniciada pela degradação das proteínas inibidoras, realizada por um complexo enzimático chamado de I $\kappa$ B cinase (Inibitor Kappa Beta Kinase - IKK) (ZANDI et al., 1997).

A ativação do NF- $\kappa$ B leva à expressão de diversos genes associados à resposta inflamatória do hospedeiro. O resultado final da ativação desta cascata é a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), pelas células de Kupffer (WERLING & JUNGI, 2003). Essas citocinas ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, desencadeando a liberação de outros mediadores químicos envolvidos na inflamação (YOU, 2008).

#### **2.4. Produção de Citocinas a partir da Ação do LPS sobre o Sistema Imune Inato**

As citocinas são hormônios protéicos secretados pelas células da imunidade inata e adaptativa que regulam muitas das atividades destas células. Elas também são consideradas mediadores inflamatórios (NAOUM, 2009). Seus efeitos podem ser locais ou sistêmicos e incluem indução de proliferação celular, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular (MATSUDA & HATTORI, 2006). O grupo de citocinas se subdivide em interleucinas e interferons (NAOUM, 2009).

Após a ação do LPS sobre os macrófagos do fígado, a primeira citocina identificada no plasma sanguíneo é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (JACOBI, 2002). A produção desta citocina se inicia em torno de 30 minutos com o pico em 1 hora no modelo experimental humano. Enquanto ocorre o pico de TNF- $\alpha$  no sangue, inicia-se a detecção da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) que

atinge o pico em 2 horas (GLUCK & OPAL, 2004). Efeitos sistêmicos da ação dessas citocinas já podem ser percebidos, especialmente os fenômenos vasculares, como diapedese e ativação da cascata de coagulação (VESTWEBER et al., 2007).

Após 2 horas do estímulo por LPS, macrófagos hepáticos humano iniciam a produção de interleucina-12 (IL-12) cujo pico ocorrerá em torno de 3 horas (ROGGE et al., 1997). Como resultado da atividade biológica da IL-12 tem-se a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) a partir de células natural killer (NK) e células T (DÖFFINGER et al., 2002). Esta produção de IFN- $\gamma$ , ativa os macrófagos a destruírem os microrganismos fagocitados, o que levará a consequências mais tardias da resposta imune inata (TRINCHIERI, 1998).

A IL-12 e o IFN- $\gamma$  também estimulam a resposta de imunidade adaptativa subsequente e a direcionam para as células Th1, as quais são as mediadoras da imunidade celular e a resposta mais efetiva para destruir bactérias intracelulares e o LPS das bactérias gram-negativas (DÖFFINGER et al., 2002).

O TNF- $\alpha$  tem sido considerado como a principal citocina produzida a partir da ação do LPS sobre o organismo. Este evento ocupa uma posição central na cascata fisiopatológica da endotoxemia juntamente com a produção e secreção das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em resposta ao LPS (ROSSOL et al., 2011).

## **2.5. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina de ação inflamatória, que se apresenta de duas formas distintas: a primeira está ligada à membrana de 26 kDa; enquanto a segunda é solúvel. Esta última forma possui peso molecular de 17 kDa e é derivada da primeira, a partir de um processo de clivagem promovido pela ação da enzima metaloproteinase conversora de TNF- $\alpha$  (BRADDLEY, 2008).

A principal fonte celular de TNF- $\alpha$  são os monócitos e macrófagos ativados, embora células T estimuladas por antígenos, células NK e mastócitos também possam secretar essa proteína (AGGARWAL, 2003).

O TNF- $\alpha$  está envolvido em diversos processos celulares, incluindo a produção de outras citocinas, síntese de proteínas de fase aguda, indução de expressão de moléculas de adesão, proliferação celular, diferenciação e morte celular (LIU, 2005), contribuindo assim para a ocorrência de processos fisiopatológicos como o choque séptico.

O TNF- $\alpha$  apresenta importante papel no desencadeamento dos fenômenos inflamatórios ligados à hipertermia (DINARELLO et al., 1996). Esta citocina tem propriedade biológica de atuar sobre as mesmas células que a secretam, fagócitos mononucleares, a fim de estimular a produção de IL-1 $\beta$ . Estas duas citocinas também atuam de forma conjunta na síntese de proteínas de fase aguda no fígado (GRUYS et al., 2005).

O TNF- $\alpha$  provoca proteólise periférica através do catabolismo muscular, o que favorece a captação de aminoácidos pelo fígado. Esta citocina também causa hiperglicemia induzida pelo glucagon (GRUYS et al., 2005). A IL-1 $\beta$ , mediada por glicocorticóides, ativa o sistema pituitário-adrenal favorecendo o fluxo de aminoácido ao organismo (PETERSEN et al., 2004). Como consequência ocorre à síntese de proteínas de fase aguda positiva, por exemplo, fibrinogênio e proteína amilóide A do soro.

As células de Kupffer passam a desempenhar papel intermediário, visto que também possuem a capacidade de secretar IL-6. Esta citocina deprime o sistema fagocítico mononuclear e causa diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e assim permite a liberação das proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (PALTRINIERI, 2007).

A produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS pode ser aumentada e estabilizada pelos monócitos a partir da produção de IFN- $\gamma$ , e assim bloqueia ativamente a ação da IL-10, uma citocina endógena e com propriedades antiinflamatórias (DONNELLY et al., 1995).

## 2.6. Interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ )

A IL-1 se apresenta na forma de uma proteína precursora associada à membrana de fagócitos mononucleares e peso molecular de aproximadamente 31 KDa. Esta citocina sofre processo de clivagem pela protease cisteína caspase-1 que resultará na forma solúvel e plasmática da IL-1, reconhecida como IL-1 $\beta$ , com um potencial de ação inflamatório e peso molecular de 17 KDa (MARTINON et al., 2002).

A IL-1 $\beta$  tem a principal função semelhante ao TNF- $\alpha$ , com ação mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções, tanto na imunidade natural quanto na inflamação (OSLON et al., 1995). Os efeitos biológicos semelhantes ocorrem devido aos receptores para ambas citocinas sinalizarem para proteínas homólogas e ativarem os mesmos fatores de transcrição (VAN DER POLL et al., 1997). Entretanto também há diferenças entre TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , visto que a IL-1 $\beta$  não induz a morte apoptótica das células, e mesmo em concentrações plasmáticas elevadas não causa as alterações fisiopatológicas do choque séptico (HOFMANN et al., 2002).

A IL-1 $\beta$  é secretada por fagócitos mononucleares, principalmente monócitos e macrófagos, induzidos por LPS ou mediada pela ação de outra citocina, como o TNF- $\alpha$ . Entretanto, a IL-1 $\beta$  também pode ser produzida por células endoteliais vasculares (DINARELLO, 1996).

A IL-1 $\beta$  estimula as células T a secretarem IL-2, aumenta as atividades quimiotáticas e fagocitárias de monócitos e macrófagos, promove a regulação da leucopoiese a partir de neutrófilos da medula óssea, induz a produção de IL-6, o que auxiliará o processo de trombocitose e, novamente, assim como na ação do TNF- $\alpha$  levará à secreção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (NAOUM, 2009).

Contudo, a atividade biológica mais importante desempenhada pela IL-1 $\beta$  é a atuação como pirógeno endógeno para causar febre, por meio de sua ligação a receptores celulares da rede vascular do hipotálamo, e assim estimular a síntese da prostaglandina (DINARELLO, 2004). Para a ocorrência

desse efeito endócrino torna-se necessário a elevada concentração de IL-1 $\beta$  na corrente sanguínea.

A resposta de monócitos a IL-1 $\beta$  também está sujeito à regulação em etapas posteriores da resposta imune. Na resposta imune adaptativa sob estimulação da IL-1 $\beta$ , serão produzidas IL-4 e IL-13, citocinas estimuladoras de células Th2, as quais diminuirão a atividade dos monócitos. Este mecanismo de controle é amplificado através da ação destas citocinas, aumentando a expressão dos receptores de IL-1 (IL-1R1). Em contrapartida, IFN- $\gamma$ , que é uma citocina estimuladora de célula Th1, inibirá a expressão dos receptores de IL-1 (IL-1R1), reduzindo a ação de IL-1 $\beta$  (DICKENSHEETS & DONNELLY, 1997).

## **2.7. Interleucina-2 (IL-2)**

A IL-2 é sintetizada principalmente por células T ativadas, especificamente do tipo CD4+, sendo produzida em menor quantidade por células B e monócitos. Esta citocina atua sobre as mesmas células que a produzem, isto é, funciona como um fator de crescimento autócrino, e também possui uma ação parácrina (NAOUM, 2009).

A IL-2 é responsável pelo período de transição entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Assim, a IL-2 caracteriza-se como o principal fator estimulador de células T, pois induz expansão clonal deste tipo celular e ainda estimula a proliferação e ativação de células natural killer (NK) (MA et al., 2006). Esta citocina estimula as células B na síntese de anticorpos (NAOUM, 2009).

## **2.8. Interleucina-13 (IL-13)**

A IL-13 é secretada pelas células T auxiliares, principalmente do tipo 2 (Th2) e CD8+. Esta citocina pode ser considerada um dos marcadores da imunidade adaptativa em suas etapas mais tardias (NAOUM, 2009).

A IL-13 estimula a liberação de quimiocina, por exemplo, eotaxina, cuja função é o recrutamento de eosinófilos para ações imunológicas. Esta citocina inibe a atividade quimiotática e fagocitária de macrófagos, o que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (VAN DYKEN & LOCKSLEY, 2013).

A IL-13 também induz a diferenciação de monócitos e de células B, o que permite as trocas de isótipos de imunoglobulina, e assim aumenta os níveis de IgM e IgG (WILLS-KARP, 2004).

## **2.9. Efeito da Via de Administração e da Dose do LPS sobre a Cinética do TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

O estudo dos efeitos do LPS *in vivo* é realizado a partir da sua administração por via intravenosa, principalmente através da canulação da veia jugular externa. Esse procedimento pode ser executado por duas metodologias: infusão contínua lenta por aproximadamente 30 minutos ou infusão imediata rápida, denominada *in bolus*.

A administração intravenosa de LPS por infusão contínua lenta tende a simular o que ocorre durante o quadro de infecção natural por bactérias gram-negativas, visto que a liberação do LPS ocorre de forma lenta e gradativa na circulação sanguínea. Na fase inicial pode se verificar a diminuição do débito cardíaco associada à redução da resistência vascular sistêmica (TRABER et al., 1989).

Em contrapartida, a administração intravenosa de LPS *in bolus* causa o aumento imediato da resposta inflamatória sistêmica que poderia desencadear quadro clínico superagudo dos sinais clínicos referente ao processo infeccioso. Esses efeitos são evidenciados por depressão do miocárdio causado pela redução do débito cardíaco e pelo aumento da hipertensão pulmonar que culminam com elevação da resistência vascular sistêmica. Outro fator relevante é a ocorrência de um quadro de neutropenia severa (TRABER et al., 1989).

A dose de LPS, utilizada para indução de endotoxemia experimental em modelos animais, varia de acordo com a espécie. Em animais de laboratório, a dose para ratos pode oscilar entre 5 µg/Kg e 1 mg/Kg enquanto que para coelhos, a dose é de 60 µg/Kg (GIVALOIS et al., 1994). Em suínos, a dose está em torno de 100 µg/Kg (WRIGHT et al., 2000).

Para ruminantes, a dose pode estender-se entre 2 ng/Kg e 10 µg/Kg, entretanto para ovinos a dose limite é 3 µg/Kg (KABAROFF et al., 2006). Estes animais são extremamente sensíveis à endotoxina uma vez que dosagens relativamente baixas de LPS têm a capacidade de induzir efeitos sobre o sistema cardiovascular, em particular a circulação pulmonar (OSLON et al., 1995).

A concentração sérica de TNF- $\alpha$  atinge o pico em aproximadamente 1 a 2 horas em diversas espécies de mamíferos com quadro clínico de endotoxemia após a inoculação experimental ou a exposição natural ao LPS (VAN AMERSFOORT et al., 2003; HODGSON, 2006). A concentração sérica máxima de IL-1 $\beta$  ocorre 90 minutos após o pico de TNF- $\alpha$ , ou seja, em torno de 3 a 4 horas (OSLON et al., 1995).

A administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 0,5 mg/Kg em camundongos demonstra um pico da concentração sérica plasmática de TNF- $\alpha$  em torno de 2000 ng/mL, em 1 hora após a inoculação do LPS (SU et al., 2010).

Em ovinos adultos que apresentavam fístulas linfáticas pulmonares crônicas, a administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 1 µg/Kg resulta na concentração plasmática máxima de TNF- $\alpha$  em 0,6 ng/mL, entre 1 e 2 horas após a inoculação do LPS (STAUB et al., 2001).

A administração de LPS por infusão contínua por 30 minutos pela via intravenosa na dose de 1 µg/Kg (FENG et al., 2009) e 2 µg/Kg (FENG et al., 2010) em ovinos neonatos demonstra respectivamente um pico de TNF- $\alpha$ , 78 ng/mL e 75 ng/mL, após 1 hora de inoculação do LPS.

A administração de LPS por infusão contínua por 30 minutos pela via intravenosa na dose de 10 µg/Kg em ovinos adultos com intuito de verificar a

inflamação pulmonar regional apresenta o pico de IL-1 $\beta$  na concentração plasmática em torno de 700 ng/mL (FERNANDEZ-BUSTAMANTE et al., 2012).

Quando bezerros de aproximadamente 20 dias de idade são submetidos à administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 0,1  $\mu$ g/Kg, o pico de TNF- $\alpha$ , 240 UI/mL, ocorre em torno de 2 horas após a inoculação seguida de seu retorno ao nível basal em 4 horas (BIENIEK et al., 1998).

A administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 2,5  $\mu$ g/Kg em garrotes (CARROLL et al., 2009) e novilhas (CARROLL et al., 2011) da raça Angus demonstrou um pico de TNF- $\alpha$ , respectivamente de 7500 pg/mL e 8000 pg/mL, em 1,5 horas após a inoculação. A IL-1 $\beta$  atinge a concentração máxima plasmática de 50 pg/mL para garrotes e 45 pg/mL para novilhas, após 3 horas de inoculação do LPS. Entretanto, quando a avaliação é realizada para novilhas da raça Romosinuano, a concentração sérica de TNF- $\alpha$  atinge 7000 pg/mL, em 2 horas após a inoculação, e a IL-1 $\beta$  se eleva a 90 pg/mL após 3 horas de inoculação do LPS (CARROLL et al., 2011).

Em vacas adultas lactantes da raça Holandesa, a administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 2,5  $\mu$ g/Kg resultou na concentração sérica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , 558 U/mL e 91 U/mL respectivamente, em 2 horas após a inoculação do LPS (OHTSUKA et al., 1997).

Contudo, a administração de LPS na dose de 1  $\mu$ g/mL em células de Kupffer bovinas *in vitro* induz a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que aumentam gradativamente a concentração a partir de 3 horas após a inoculação de LPS, atingindo respectivamente 90 pg/mL e 360 pg/mL. O pico de TNF- $\alpha$  ocorre em 12 horas com concentração de 250 pg/mL, enquanto a concentração máxima de IL-1 $\beta$  é atingida em 24 horas por 680 pg/mL (YOSHIOKA et al., 1998).

Em polimorfonucleares de vacas lactantes da raça Holandesa submetidos à inoculação de LPS nas doses de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL, *in vitro*, há aumento da síntese de TNF- $\alpha$  que atinge o pico de 1  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 1,2  $\mu$ g/mL, respectivamente. Entretanto, a concentração de IL-1 $\beta$  alcança o pico de 600  $\mu$ g/mL, 640  $\mu$ g/mL e 700  $\mu$ g/mL para as mesmas doses de LPS (SOHN et al., 2007).

## 2.10. Modificação da Temperatura Corporal em Resposta ao LPS

O LPS liberado durante quadro de infecção, localizada ou sistêmica, invade a circulação sanguínea pela via venosa, principalmente por veias pulmonares, hepáticas e intestinais, chega ao coração, e posteriormente, através da artéria carótida atinge o órgão circunventricular (OVLT). Esta estrutura anatômica, localizada na região anterior do hipotálamo, possui a função de manutenção da termorregulação (BLATTEIS, 1992).

Desta forma, existem dois mecanismos de ação do LPS que resultam no aumento da temperatura corporal. O primeiro é uma ação direta dessa substância sobre a região do córtex denominada OVLT. Isto acontece graças à presença de receptores do tipo TLR-4 no endotélio fenestrado do OVLT que são alvos de ligação do LPS (MATSUMURA & KOBAYASHI, 2004).

O segundo ocorre a partir da ação de citocinas, cuja secreção também foi estimulada pelo LPS, em macrófagos pulmonares e células de Kupffer. Estas citocinas pirogênicas, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL6, também possuem receptores na região OVLT (SCHILTZ & SAWCHENKO, 2003).

Os dois mecanismos levarão a ativação da enzima ciclooxygenase tipo 2 (COX-2) (SCHILTZ & SAWCHENKO, 2002), cuja atividade sobre os lipídeos de membrana resultarão na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (IVANOV & ROMANOVSKY, 2004), que atuará no receptor 3 de PGE<sub>2</sub> (EP3) do OVLT do hipotálamo (LAZARUS, 2006). A síntese desta prostaglandina leva a produção de um segundo mensageiro, denominado adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (ELMQUIST et al., 1996).

O AMPc, em concentração intracelular elevada, atuará nos neurônios efetores periféricos termossensíveis contribuindo para o processo de despolarização celular. Este evento tem a finalidade de ativar os mecanismos fisiológicos para a conservação do calor, por exemplo, a vasoconstrição da circulação periférica e o conseqüente aumento da temperatura do centro termorregulador hipotalâmico (BOULANT, 1998).

Em ruminantes, principalmente bovinos e ovinos, o aumento da temperatura retal poderia ser considerado febre a partir de 39,7°C e 40,5°C, respectivamente (JONES et al., 1989).

A administração de LPS por via intravenosa *in bolus* em ovinos adultos nas doses de 1 µg/Kg (STAUB et al., 2001), 200 ng/Kg (BRIARD, 2009) e 400 ng/Kg (BRIARD, 1999; GERARDI, 2012) eleva a temperatura retal, respectivamente em 42°C entre 3 e 4 horas, 41°C em 6 horas, 43°C em 6 horas e 40,6°C em 4 horas após a inoculação do LPS.

Quando ovinos neonatos são empregados como modelo experimental para a administração de LPS por infusão contínua durante 30 minutos pela via intravenosa na dose de 2 µg/Kg, a temperatura retal atinge pico de 41°C após 2 horas de inoculação do LPS (FENG et al., 2010).

Quando garrotes da raça Angus são utilizados como modelo experimental para administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 2,5 µg/Kg, ocorre uma elevação da temperatura retal até o pico de 40°C após 4,5 horas e retorno da mesma ao nível basal em 8 horas após a inoculação do LPS (CARROLL et al., 2009). Entretanto, novilhas da raça Angus e da raça Romosinuano submetidas ao mesmo desafio apresentam aumento da temperatura retal de 39,8°C e 40,5°C, respectivamente, após 4 horas de inoculação do LPS (CARROLL et al., 2011).

Em bezerros, com idade de aproximadamente 20 dias, a temperatura retal eleva-se até 40°C entre 2 e 5 horas após a administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 0,1 µg/Kg (BIENIEK et al., 1998).

## **2.11. Avaliação da Temperatura Corporal por meio de Termometria Infravermelha**

A mensuração da temperatura corpórea dos animais com quadro clínico de febre é usualmente realizada com termômetro clínico de mercúrio ou digital por via retal. Entretanto, alguns países europeus estão restringindo o uso do termômetro clínico de mercúrio, visto que este metal pode causar intoxicação

aos animais e seres humanos, e contaminação ambiental (CHIAPPINI et al., 2009).

A termometria por infravermelho tem sido empregada como método alternativo de aferição da temperatura corpórea de humanos. Esta mensuração pode ser realizada na região da orelha, especificamente pela membrana timpânica do ducto auricular (CRAIG et al., 2002). Entretanto, há variação significativa entre as temperaturas retal e da orelha em aproximadamente 0,7°C (HAY et al., 2004; BASAK et al., 2013).

A utilização do termômetro infravermelho em humanos na região frontal da cabeça apresenta resultados similares ao termômetro clínico de mercúrio na região axilar, pois os dois métodos apresentam sensibilidade e especificidade respectivamente de 88,7% e 89,9% (CHIAPPINI et al., 2011). Entretanto, a sensibilidade e a especificidade podem atingir 99% em humanos de faixa etária entre 0 e 48 meses quando as temperaturas corpóreas são comparadas por meio do termômetro clínico de mercúrio pela via retal e do termômetro infravermelho na região frontal da cabeça (TERAN et al., 2012).

Os termômetros infravermelhos de não contato também têm sido utilizados em macacos, das espécies *Aotus sp* e *Macaca fascicularis*, para avaliar a temperatura corpórea das respectivas regiões: axilar, umbilical e inguinal (SHELTON et al., 2006); fronte, axilar, ombro e abdominal (SIKOSKI et al., 2007). Entretanto, os resultados são considerados desfavoráveis quando comparados a aferição pela utilização do termômetro clínico de mercúrio pela via retal.

Em animais de produção, a termometria por infravermelho tem sido aplicada em caprinos da região nordeste do Brasil, principalmente no clima semiárido, com intuito de avaliar a sua adaptabilidade para a produção de carne e de leite por meio de respostas fisiológicas. Destas, pode-se destacar a temperatura superficial corpórea que vem sendo utilizada para determinar os gradientes térmicos entre temperatura interna do animal e do pelame, assim como a temperatura do pelame e do ambiente (SOUZA et al., 2008).

Em bovinos da raça Angus, a administração de LPS por via intravenosa *in bolus* na dose de 2,5 µg/Kg não apresentou alterações significativas da

temperatura da superfície corpórea da paleta e da coxa mensurada pelo termômetro infravermelho, visto que permaneceram entre 28°C e 30°C durante os momentos de avaliação. Entretanto, a temperatura da superfície corpórea da orelha apresentou diminuição de 30°C para 22°C em aproximadamente 1,5 horas após a inoculação do LPS (CARROLL et al., 2009).

A termometria por infravermelho tem sido utilizada com sucesso em ovinos após tosquia com objetivo de avaliar a temperatura da superfície corpórea nas regiões da axila, face interna da coxa e períneo. Contudo, as regiões da frente, dorso e face externa da coxa não apresentaram resultados significativos (MENDES et al., 2013).

Os termômetros infravermelhos de mão e de não contato têm sido utilizados rotineiramente em animais para aferir a temperatura da superfície corpórea. Esta técnica pode ser realizada à distância e sem a necessidade de conter o animal. Assim, reduz-se o estresse da introdução repetida do termômetro clínico de mercúrio pela via retal e permite o maior número de avaliações, de maneira rápida, segura e confiável (LALONI et al., 2002).

## **2.12. Avaliação da Temperatura Corporal por meio de Termografia por Imagem Infravermelha**

A termografia por imagem infravermelha é uma técnica diagnóstica moderna e não invasiva, que permite avaliar e quantificar as alterações de temperatura na superfície da pele de forma global (SANCHES, 2009). Esta técnica é fundamentada no princípio da radiação térmica, visto que todo objeto pertencente ao planeta Terra transmite calor por ondas infravermelhas detectadas por um espectro de luz. A intensidade desta radiação é diretamente proporcional a temperatura do objeto e suas respectivas propriedades de radiação da camada superficial (KNIZKOVA et al., 2007).

A mensuração da radiação térmica é expressa como temperatura, medida por graus Celsius, por meio de uma câmera termográfica. Os dados obtidos pela câmera são processados por um software e demonstrados em

forma de mapeamento, o qual prevê o detalhamento das análises de temperatura superficial do objeto com as suas variações (PASCOE et al., 2006).

Alguns fatores externos podem interferir nos resultados do exame termográfico, dentre eles: movimentação do animal e áreas de tricotomia ou tosadas; emissividade de radiação do animal; distância entre animal e câmera; temperatura ambiental e umidade relativa do ar (KNIZKOVA et al., 2007; TURNER, 2007; GLOSTER et al., 2011). Os animais devem ser aclimatados em baias individuais com iluminação fraca durante 10 a 20 minutos. A temperatura ambiente deve ser inferior a 30°C (TURNER, 1991), Além disso, devem-se evitar banhos ou duchas quentes, agentes tópicos, e exercícios ou fisioterapia até duas horas antes do exame (BRIOSCHI, 2003).

A temperatura superficial da pele apresenta-se normalmente 5°C mais baixa que a temperatura corpórea mensurada pela via retal. Este fenômeno ocorre devido à dissipação do calor por radiação, convecção, condução ou evaporação (TURNER, 2007).

O metabolismo tecidual é, em geral, constante, entretanto, as variações da superfície corpórea da pele são observadas por alterações da perfusão tecidual local. O padrão térmico normal de qualquer área se baseia no grau de complexidade de sua rede vascular, constituída de capilares, vênulas e veias, e nos contornos da superfície avaliada. Assim as regiões corporais com atividade metabólica intensificada apresentam temperatura mais elevada (HARPER, 2000; TURNER, 2003). Este fato deve ser levado em consideração durante a interpretação do padrão térmico normal de algumas regiões corpóreas, por exemplo, dorso-lombar, axilar, peitoral, ventral e face interna da coxa (TURNER, 2007; MOURA et al., 2011).

A termografia por imagem infravermelha tem sido empregada em medicina humana desde a década de 60 para diagnosticar febre, inflamação e lesões musculoesqueléticas. Contudo, esta tecnologia ainda é pouco explorada pela medicina veterinária, pois a sua utilização tem sido mais recorrente a partir do final da década de 90. Como principais características desta técnica, se

destacam a não necessidade de contenção do animal e a realização do exame a distância máxima de 20 metros (FLEMING, 2008).

A termografia por imagem infravermelha está se tornando uma importante ferramenta clínica e experimental em humanos para auxiliar no diagnóstico de diversas enfermidades. Estas podem ser enumeradas por alterações dos músculos mastigatórios e trapézio superior causando disfunção temporomandibular (COSTA et al., 2013), doenças vasculares como varizes e trombose venosa (BRIOSCHI, 2003), tumores de mama (SCHAEFER et al., 2009) e carcinoma basocelular (FLORES-SAHAGÚN, 2010).

Na medicina veterinária, a técnica da termografia foi inicialmente empregada na clínica de equinos, visto que estes animais são considerados atletas. Assim, esta ferramenta atua no diagnóstico das principais enfermidades que acometem o sistema locomotor, como abscessos subsoleares, laminite, desmíte, tendinite, síndrome do navicular, miosites e lombalgia (JONES, 1998; EDDY et al., 2001; FANTINI et al., 2011).

Na pecuária, especialmente na produção de ruminantes, a termografia por imagem infravermelha tem sido utilizada para auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos da termorregulação em função das alterações da temperatura superficial da pele e o impacto das condições ambientais sobre o bem-estar animal (KNIZKOVA et al., 2002; KOTRBA et al., 2007).

Esta técnica também pode ser empregada para estabelecer uma zona de conforto térmico, através da mensuração dos valores de umidade relativa do ar e temperatura ambiental na qual o indivíduo está inserido, e assim, compará-los aos parâmetros fisiológicos considerados normais, para a temperatura retal e as frequências cardíaca e respiratória, de cada espécie animal (EUSTÁQUIO FILHO, 2011; FIORELLI et al., 2012).

Estudos recentes demonstram que a termografia por imagem infravermelha está sendo testada de forma positiva na nutrição animal, com objetivo de verificar a qualidade do processo de ensilagem do milho por meio da elevação da temperatura ocorrida durante o processo de fermentação (JUNGES, 2010).

A termografia por imagem infravermelha também tem sido aplicada, ainda de forma experimental, como método de detecção precoce de algumas doenças infecciosas. Tem-se como exemplo, bezerros infectados pelos vírus da diarreia viral bovina (SCHAEFER et al., 2004) ou com síndrome respiratória bovina (SCHAEFER et al., 2007), nos quais são detectados processos inflamatórios dos seios nasais e frontais em aproximadamente 4-7 dias antes do início dos sinais clínicos da enfermidade.

Vale ressaltar que a técnica da termografia se mostrou promissora para a identificação precoce de bovinos infectados pelo vírus da febre aftosa através da assimetria da temperatura dos cascos. Contudo, a termografia por imagem infravermelha poderia ser empregada apenas como método de triagem para auxiliar o diagnóstico desta enfermidade (RAINWATER-LOVETT, et al., 2009).

Na pecuária leiteira, a termografia por imagem infravermelha tem sido abordada para o diagnóstico precoce de acidose ruminal subaguda (GATTO et al., 2010) e laminite (NIKKHAH et al., 2005). Sabe-se que a primeira enfermidade é uma condição pré-existente para o aparecimento dos sinais clínicos de claudicação em vacas durante o período de lactação devido à consequente inflamação das lâminas do casco.

Em vacas lactantes, a verificação de mastite por varredura da glândula mamária através da técnica de termografia permite a identificação do processo inflamatória em aproximadamente 4-6 dias antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos da enfermidade (COLAK et al., 2008; HOVINEN et al., 2008).

A termografia por imagem infravermelha também pode ser utilizada no campo da reprodução animal, como a avaliação da fertilidade de touros (STEWART, 2008) ou a torção testicular em ovinos (CAPRARO et al., 2008) mediante a avaliação de aumento da temperatura da superfície escrotal.

Os Estados Unidos, por meio da Food and Drug Administration (FDA), reconhecem a termografia por imagem infravermelha como meio auxiliar de diagnóstico válido para a prática médica. Esta técnica não exige contato físico com o animal, não é invasiva e não requer administração de contraste ou a utilização de radiação iônica. Ainda assim, a termografia apresenta grande

sensibilidade. Estudos relacionados à acurácia da técnica têm aumentado de forma significativa nos últimos anos, seja pelo aprimoramento do conhecimento da dinâmica e emissão do infravermelho pelo corpo seja pelas de melhorias dos programas computacionais (softwares) (ANDRADE FILHO, 1999).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar o perfil sérico de citocinas e da temperatura de ovinos submetidos à endotoxemia experimental.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o perfil sérico de citocinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-13 (IL-13) de ovinos submetidos à endotoxemia experimental.
- Avaliar as alterações da temperatura retal por meio do termômetro clínico de mercúrio de ovinos submetidos à endotoxemia experimental.
- Avaliar as alterações da temperatura da pele por meio do termômetro infravermelho de mão e de não contato e da termografia por imagem infravermelha de ovinos submetidos à endotoxemia experimental.

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Caracterização dos Animais**

Foram empregadas dez ovelhas da raça Suffolk de aproximadamente 4 anos de idade e 80 Kg de peso vivo, provenientes do Setor de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Durante o período experimental, os animais foram alojados em baias individuais e alimentados com silagem de milho, ração comercial e sal mineral para ovinos, além de água de boa qualidade à vontade. Estes animais foram segregados aleatoriamente em dois grupos compostos por cinco animais cada: controle (GC) e tratado (GT).

### **4.2. Inoculação de LPS (*Escherichia coli*)**

Os animais do grupo controle (GC) foram inoculados com 2 mL de solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). Os animais pertencentes ao grupo tratado (GT) foram inoculados com LPS (*Escherichia coli* 055: B5: Sigma, St. Louis, MO) na dose de 400 ng/Kg. O LPS foi diluído em 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%), submetido a sonicação (Kondortech® CD-4820) em três pulsos de 480 segundos cada, e administrado *in bolus* por via intravenosa na veia jugular, a qual estava canulada com catéter 18G.

### **4.3. Momento das Avaliações**

A quantificação das citocinas séricas e a mensuração das temperaturas retal e superficial corpórea dos ovinos foram avaliadas imediatamente antes da inoculação do LPS e, posteriormente às 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas.

#### **4.4. Coleta e Preparação das Amostras de Sangue**

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue venoso pelo sistema à vácuo, em frascos de vidro siliconizados sem anticoagulante, para as análises das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-13) do soro sanguíneo. Após a formação do coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.000 G durante 10 minutos, obtendo-se alíquotas de 1,5 mL e 150  $\mu$ L de soro, que foram armazenadas em tubos do tipo eppendorf, previamente identificados, e congelados (-80°C) até o momento da realização das análises.

#### **4.5. Análise Laboratorial – Perfil das Citocinas Séricas**

A atividade plasmática das citocinas foi quantificada através do teste de ELISA simplificado do tipo captura (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-13 - Human Biotrak Easy ELISA, GE Healthcare, Viena, Áustria), seguindo-se as recomendações do fabricante. Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, o padrão foi colocado na posição A1/A2 a H1/H2. Foram adicionados 150  $\mu$ L de água destilada, em duplicata, em todos os poços contendo o padrão e também nos poços reservados ao branco. Foram adicionados ainda mais 100  $\mu$ L de água destilada aos poços reservados ao branco. A partir da coluna 3, 100  $\mu$ L de água destilada, em duplicata, foram adicionados aos poços reservados para as amostras a serem testadas. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de cada amostra, em duplicata, nestes poços. As microplacas foram cobertas e incubadas durante 3 horas em temperatura ambiente (25°C) no agitador horizontal de microplacas. A remoção do sobrenadante e a lavagem dos poços foi repetida 3 vezes com uma solução tampão de lavagem. Após esta etapa, 100  $\mu$ L de solução de substrato TMB foram adicionados em todos os poços, inclusive para o branco. As microplacas foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos. Para finalizar a reação, 100  $\mu$ L da solução de bloqueio foram adicionados em todos os poços, incluindo-se os brancos. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro (Spectra Count, Packard,

Missouri City, USA) com um filtro de 450 nm. As amostras diluídas foram multiplicadas pelo fator de diluição e a mensuração das concentrações das citocinas foi realizada por um software (GraphPad PRISM, La Jolla, CA92037, USA).

#### **4.6. Análise da Temperatura Retal**

A temperatura retal foi aferida por um termômetro clínico de mercúrio.

#### **4.7. Análise da Temperatura da Superfície Corpórea**

A temperatura da superfície corpórea foi mensurada por um termômetro infravermelho de mão e de não contato (Fluke 62 - Fluke Corporation - USA) a uma distância máxima de 30 centímetros das regiões da frente, dorso, axila, face interna e externa da coxa, e períneo dos animais. A medição da temperatura foi realizada diretamente sobre a pele, após a separação da lã. A termografia foi realizada através da câmera Flir i60 (Flir Systems - USA) em tempo real, após 20 minutos de adaptação do animal a sala fechada e climatizada a 20°C. As imagens foram gravadas e analisadas através do programa Quick Report<sup>®</sup>.

#### **4.8. Análise Estatística do Perfil Sérico das Citocinas**

Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  e submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias. As respectivas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e as estatísticas consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1999).

#### **4.9. Análise Estatística da Temperatura Retal**

Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias. As respectivas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e as estatísticas consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1999).

#### **4.10. Análise Estatística da Temperatura da Superfície Corpórea**

Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias. As respectivas médias foram submetidas a dois testes estatísticos: teste de Dunnett para comparar cada momento avaliado ao primeiro momento de cada grupo; e teste de Tukey para comparar os grupos em cada momento avaliado. As estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1999).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )

A concentração sérica de TNF- $\alpha$ , expressada em log de pg/mL, não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos controle e tratado nos momentos avaliados. Dentro do grupo tratado não houve variações da concentração sérica de TNF- $\alpha$  após a inoculação do LPS (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TNF- $\alpha$ ( $\bar{x} \pm S$ )					
	Controle			Tratado (LPS)		
0	1,95	$\pm$ 0,45	Aa	2,03	$\pm$ 0,58	Aa
2	1,57	$\pm$ 0,58	Aa	1,90	$\pm$ 0,76	Aa
4	1,53	$\pm$ 0,59	Aa	2,01	$\pm$ 0,69	Aa
6	1,96	$\pm$ 0,33	Aa	1,86	$\pm$ 0,94	Aa
12	2,06	$\pm$ 0,10	Aa	1,97	$\pm$ 0,86	Aa
24	1,98	$\pm$ 0,36	Aa	1,76	$\pm$ 1,25	Aa
36	2,18	$\pm$ 0,21	Aa	1,75	$\pm$ 0,72	Aa
48	1,93	$\pm$ 0,32	Aa	1,82	$\pm$ 0,89	Aa
60	2,19	$\pm$ 0,15	Aa	1,90	$\pm$ 0,53	Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

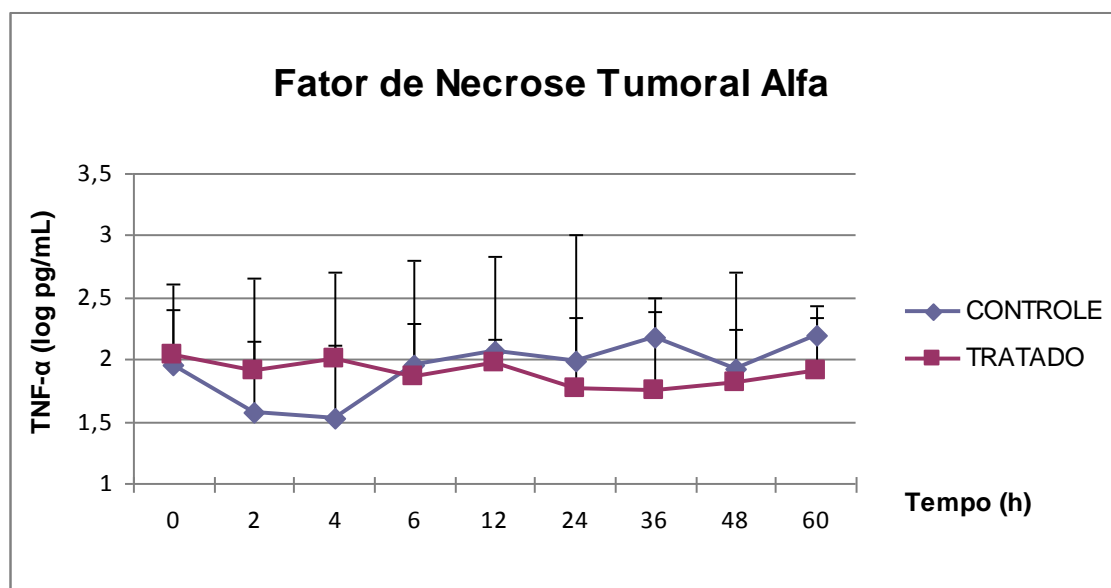


Figura 1. Concentração sérica de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

## 5.2. Interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ )

A concentração sérica da IL-1 $\beta$  observada foi inferior ao limite de detecção do teste de ELISA de pg/mL.

## 5.3. Interleucina-2 (IL-2)

A concentração sérica de IL-2, expressada em log de pg/mL, não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado nos momentos avaliados. Dentro do grupo tratado ocorreu diminuição da concentração sérica de IL-2 em 36 horas, seguido de aumento em 60 horas após a inoculação do LPS (Tabela 2, Figuras 2 e 4).

Tabela 2. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Interleucina-2 (IL-2), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	IL-2 ( $\bar{x} \pm S$ )			
	Controle		Tratado (LPS)	
0	4,26 $\pm$ 1,85	Ab	3,29 $\pm$ 1,67	Abc
2	4,17 $\pm$ 1,82	Ab	3,32 $\pm$ 1,63	Ab
4	4,12 $\pm$ 1,92	Ab	3,35 $\pm$ 1,54	Aab
6	3,92 $\pm$ 2,19	Ab	3,33 $\pm$ 1,46	Ab
12	3,94 $\pm$ 2,19	Ab	3,31 $\pm$ 1,49	Ab
24	4,05 $\pm$ 2,02	Ab	3,28 $\pm$ 1,43	Abc
36	4,84 $\pm$ 1,59	Aa	2,60 $\pm$ 1,12	Ad
48	4,11 $\pm$ 2,00	Ab	2,82 $\pm$ 1,96	Acd
60	4,03 $\pm$ 2,04	Ab	3,82 $\pm$ 1,84	Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

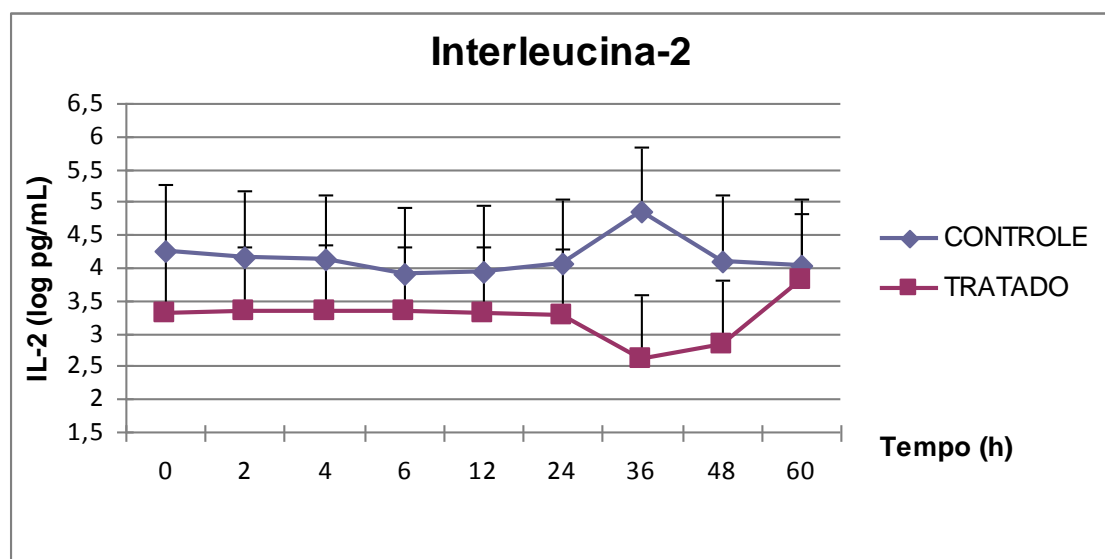


Figura 2. Concentração sérica de Interleucina-2 (IL-2), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

#### 5.4. Interleucina-13 (IL-13)

A concentração sérica de IL-13, expressada em log de pg/mL, não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos controle e tratado nos momentos avaliados. Dentro do grupo tratado ocorreu aumento da concentração sérica de IL-13 em 60 horas após a inoculação do LPS (Tabela 3 e Figuras 3 e 4).

Tabela 3. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da concentração sérica de Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	IL-13 ( $\bar{x} \pm S$ )					
	Controle			Tratado (LPS)		
0	2,70	$\pm$ 2,17	Abc	3,11	$\pm$ 1,32	Ab
2	2,61	$\pm$ 2,15	Abc	3,04	$\pm$ 1,36	Ab
4	3,42	$\pm$ 1,93	Aa	3,07	$\pm$ 1,38	Ab
6	2,74	$\pm$ 1,95	Abc	2,85	$\pm$ 1,25	Ab
12	2,84	$\pm$ 1,96	Ab	2,93	$\pm$ 1,34	Ab
24	2,79	$\pm$ 1,84	Ab	3,06	$\pm$ 1,27	Ab
36	2,76	$\pm$ 1,78	Abc	3,09	$\pm$ 1,25	Ab
48	2,65	$\pm$ 2,03	Abc	2,85	$\pm$ 1,46	Ab
60	2,31	$\pm$ 2,28	Ac	3,57	$\pm$ 0,86	Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

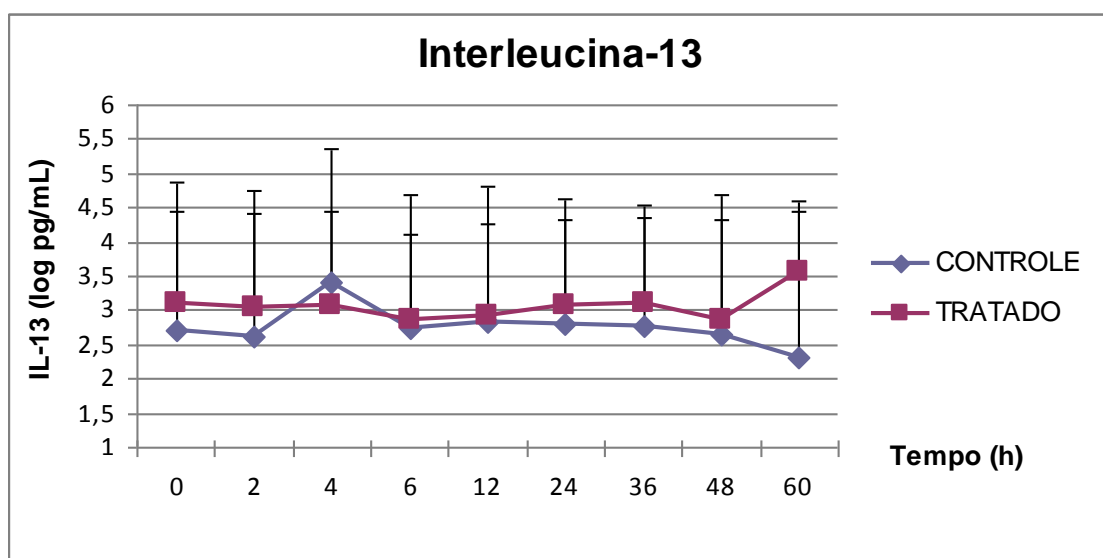


Figura 3. Concentração sérica de Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

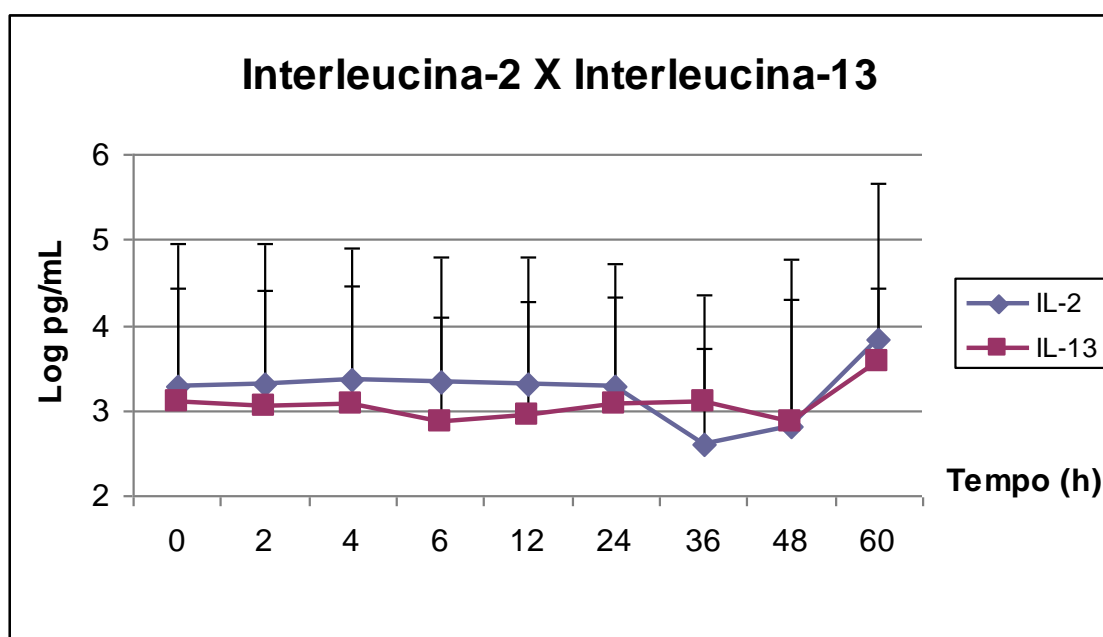


Figura 4. Concentração sérica de Interleucina-2 e Interleucina-13 (IL-13), em log de pg/mL, do grupo tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

### 5.5. Temperatura Retal

A temperatura retal aumentou gradativamente até atingir o pico febril 4 horas após a inoculação do LPS (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Retal (TR) mensurada pelo Termômetro Clínico de Mercúrio, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TR ( $\bar{x} \pm S$ )			
	Controle		Tratado (LPS)	
0	38,8 ± 0,2	Aa	38,7 ± 0,2	Ad
2	39,4 ± 0,2	Aa	39,6 ± 0,4	Ab
4	39,2 ± 0,3	Ba	40,6 ± 0,8	Aa
6	39,4 ± 0,1	Aa	39,5 ± 0,4	Ab
12	39,3 ± 0,3	Aa	39,3 ± 0,3	Abc
24	39,2 ± 0,4	Aa	38,8 ± 0,2	Acd
36	39,4 ± 0,6	Aa	39,1 ± 0,2	Abcd
48	39,1 ± 0,2	Aa	38,9 ± 0,1	Acd
60	39,0 ± 0,3	Aa	39,2 ± 0,3	Abcd

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

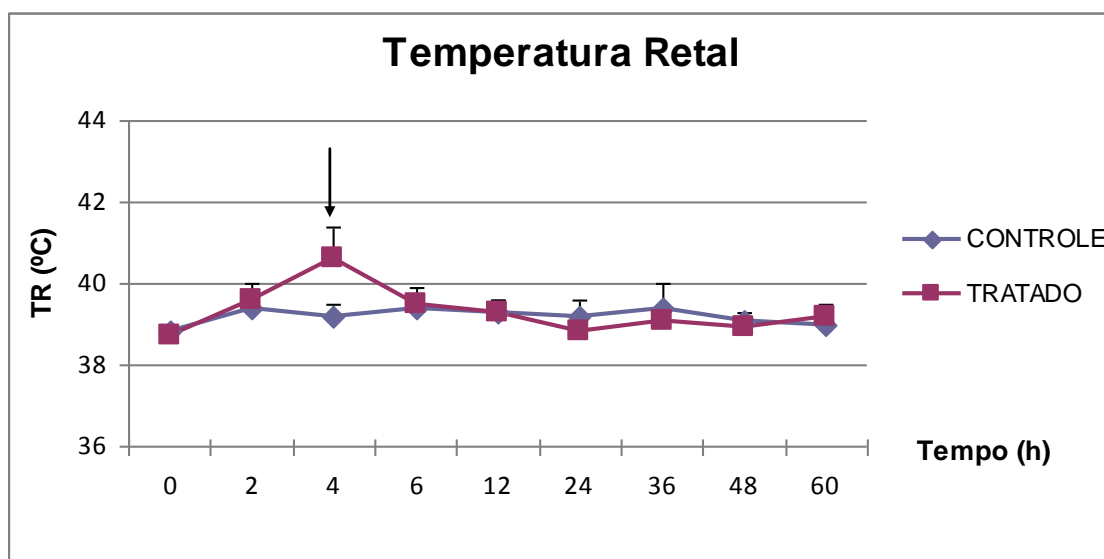


Figura 5. Temperatura Retal (TR) mensurada pelo Termômetro Clínico de Mercúrio, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

#### 5.6. Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato

A temperatura da fronte foi significativamente maior 12 horas após a inoculação do LPS, seguida de diminuição às 48 horas no grupo tratado quando comparada ao grupo controle (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Fronte (TF) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TF ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	29,0	±	0,8	A	24,0	±	2,0	B
2	32,2	±	0,9	A*	25,6	±	1,6	B
4	31,9	±	0,9	A*	28,5	±	1,8	B*
6	32,2	±	0,4	A*	30,7	±	1,1	B*
12	27,7	±	0,8	B	30,3	±	1,3	A*
24	27,4	±	1,1	A*	28,2	±	2,5	A*
36	28,2	±	1,0	A	28,1	±	1,1	A*
48	29,6	±	1,4	A	26,1	±	1,6	B
60	27,9	±	0,9	A	28,1	±	2,7	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

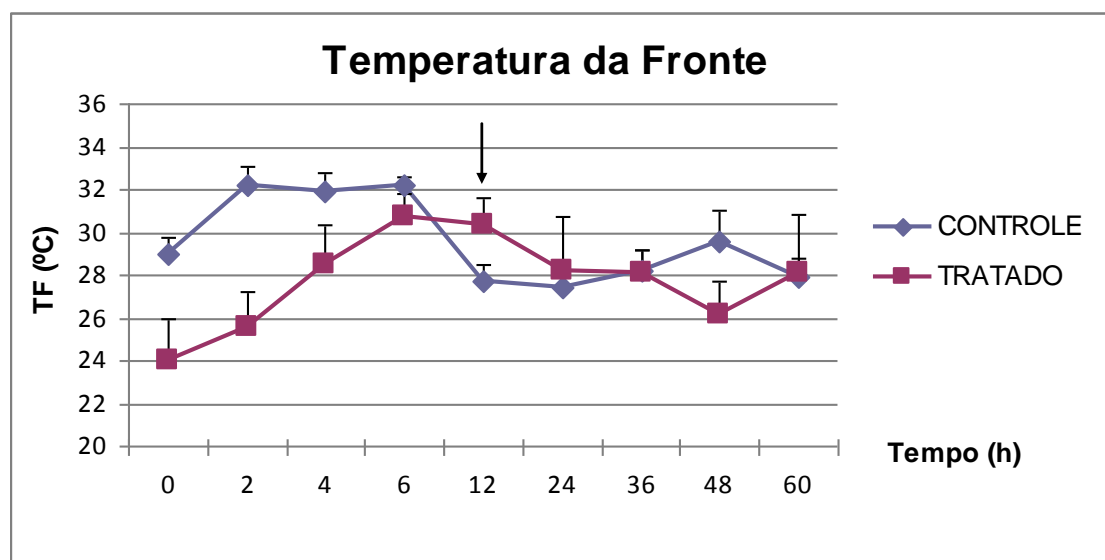


Figura 6. Temperatura da Fronte (TF) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Notou-se aumento significativo da temperatura do dorso até atingir o pico de 28°C em 6 horas após a inoculação de LPS no grupo tratado. Entretanto não houve diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os grupos controle e tratado (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Dorso (TD) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TD ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	24,9	±	1,5	A	18,2	±	1,9	B
2	26,9	±	1,8	A*	20,7	±	2,2	B
4	27,5	±	0,9	A*	25,4	±	1,8	A*
6	28,6	±	0,2	A*	28,0	±	1,6	A*
12	23,4	±	0,3	A*	27,3	±	0,8	A*
24	24,3	±	1,1	A	22,3	±	4,2	A*
36	24,2	±	1,3	A	23,1	±	2,4	A*
48	23,7	±	0,6	A	20,7	±	2,6	A
60	23,0	±	0,5	A*	24,2	±	3,1	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p<0,05$ ).

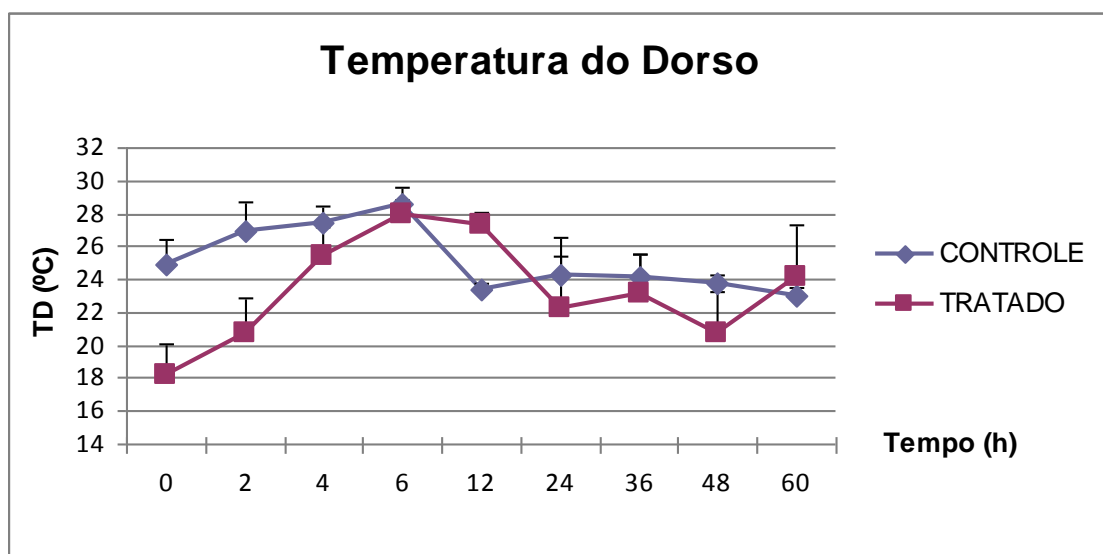


Figura 7. Temperatura do Dorso (TD) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Em relação à temperatura axilar não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) após a inoculação de LPS entre os grupos controle e tratado, e dentro do grupo tratado (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Axilar (TA) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TA ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	30,2	±	3,6	A	31,3	±	1,1	A
2	30,7	±	4,4	A	29,9	±	1,6	A
4	32,4	±	5,2	A	32,2	±	1,3	A
6	32,9	±	4,4	A	33,2	±	1,3	A
12	28,5	±	4,7	A	33,9	±	2,8	A
24	28,9	±	4,7	A	32,4	±	3,2	A
36	32,1	±	4,2	A	32,3	±	1,0	A
48	29,7	±	5,5	A	32,5	±	1,8	A
60	28,1	±	3,4	A	33,1	±	0,5	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

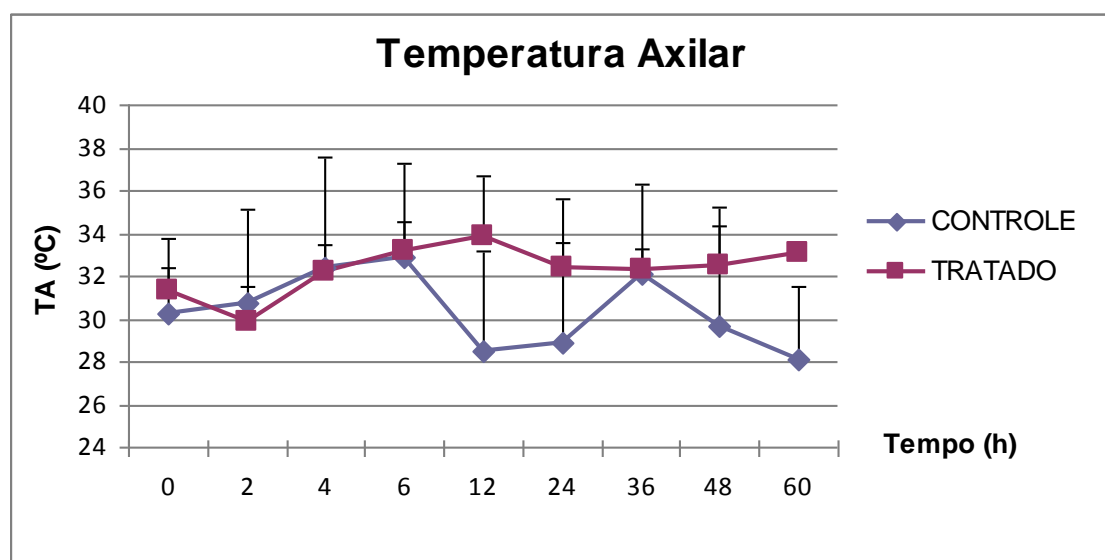


Figura 8. Temperatura Axilar (TA) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Quando a face externa da coxa foi mensurada, ocorreu aumento significativo da temperatura que atingiu o pico de 26,8°C 6 horas após a inoculação de LPS no grupo tratado. Contudo não houve diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os grupos controle e tratado (Tabela 8 e Figura 9).

Tabela 8. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TFEC ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	25,9	±	2,0	A	18,3	±	1,2	B
2	26,7	±	1,7	A	20,8	±	2,8	B
4	27,0	±	1,2	A	24,7	±	1,3	A*
6	28,7	±	0,7	A*	26,8	±	1,4	A*
12	24,5	±	1,7	A	26,6	±	0,9	A*
24	24,9	±	0,9	A	21,5	±	3,9	A
36	24,6	±	0,5	A	23,9	±	2,0	A*
48	23,9	±	1,3	A	21,3	±	3,3	A
60	23,0	±	0,5	A*	24,5	±	2,1	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p<0,05$ ).

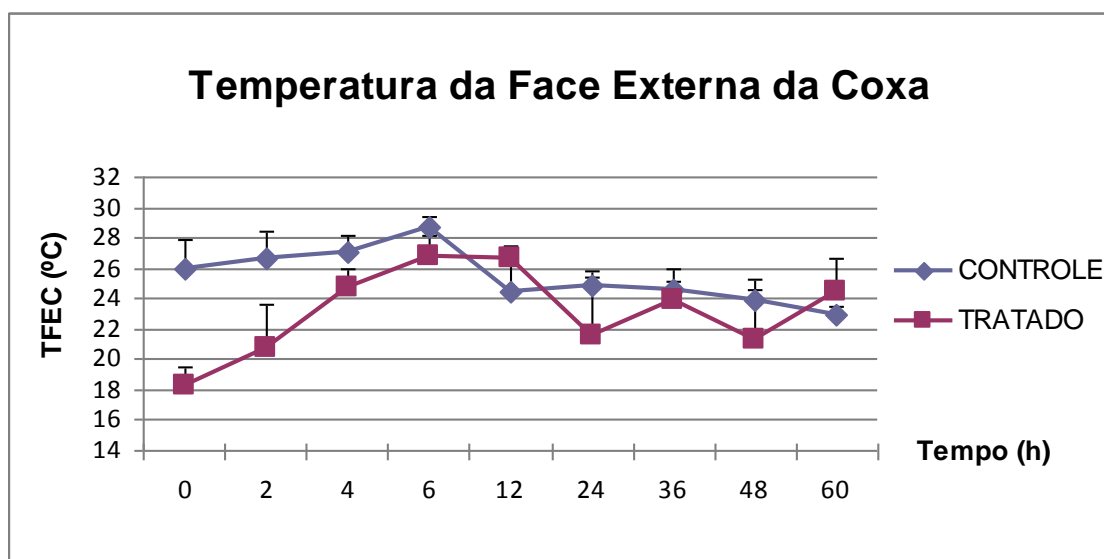


Figura 9. Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

A mensuração da temperatura da face interna da coxa apresentou aumento significativo em 12 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero. Contudo não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado (Tabela 9 e Figura 10).

Tabela 9. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TFIC ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	30,0	±	3,2	A	31,4	±	2,1	A
2	32,3	±	3,3	A	29,7	±	3,1	A
4	33,1	±	3,1	A	32,7	±	0,7	A
6	34,8	±	2,8	A	33,5	±	1,1	A
12	29,3	±	3,0	A	34,6	±	1,5	A*
24	33,4	±	2,4	A	32,5	±	2,3	A
36	32,5	±	5,1	A	32,6	±	1,0	A
48	30,7	±	7,0	A	32,3	±	2,5	A
60	26,4	±	4,1	A	32,9	±	1,3	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

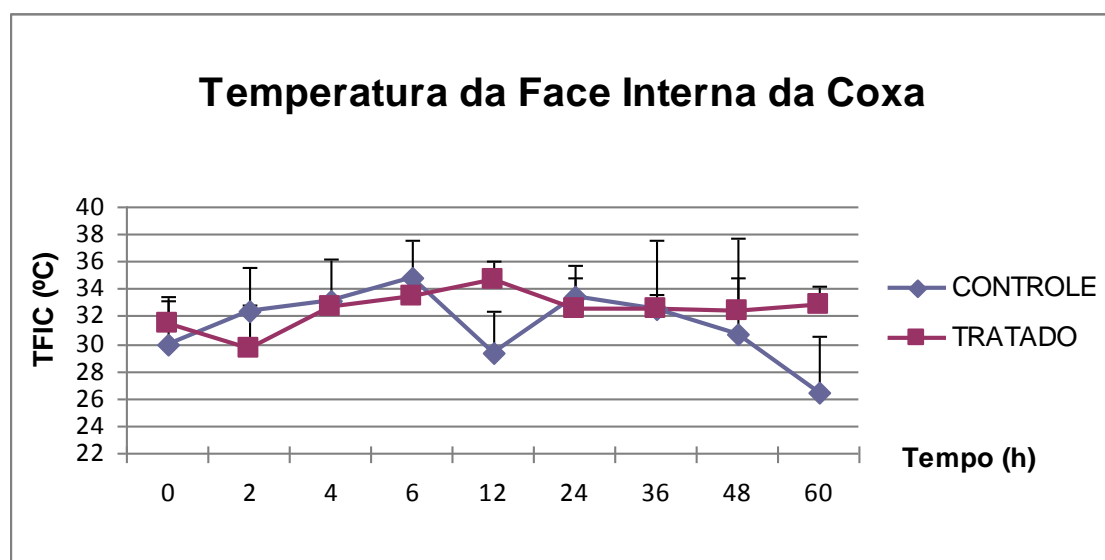


Figura 10. Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

A temperatura do períneo diminuiu significativamente 36 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparada ao grupo controle. Dentro do grupo tratado, a temperatura do períneo atingiu o pico de 36,7°C em 12 horas após a inoculação de LPS, entretanto não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) em relação ao momento zero (Tabela 10 e Figura 11).

Tabela 10. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Períneo (TP) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TP ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	37,6	±	1,6	A	34,5	±	1,8	B
2	38,6	±	1,2	A	34,4	±	2,2	B
4	39,3	±	0,5	A	36,3	±	2,6	B
6	39,9	±	0,6	A	35,6	±	1,7	B
12	37,0	±	3,5	A	36,7	±	0,4	A
24	36,0	±	3,8	A	35,1	±	1,3	A
36	38,1	±	2,2	A	34,9	±	1,7	B
48	36,7	±	3,1	A	33,2	±	4,2	A
60	36,7	±	1,5	A	34,9	±	1,4	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p<0,05$ ).

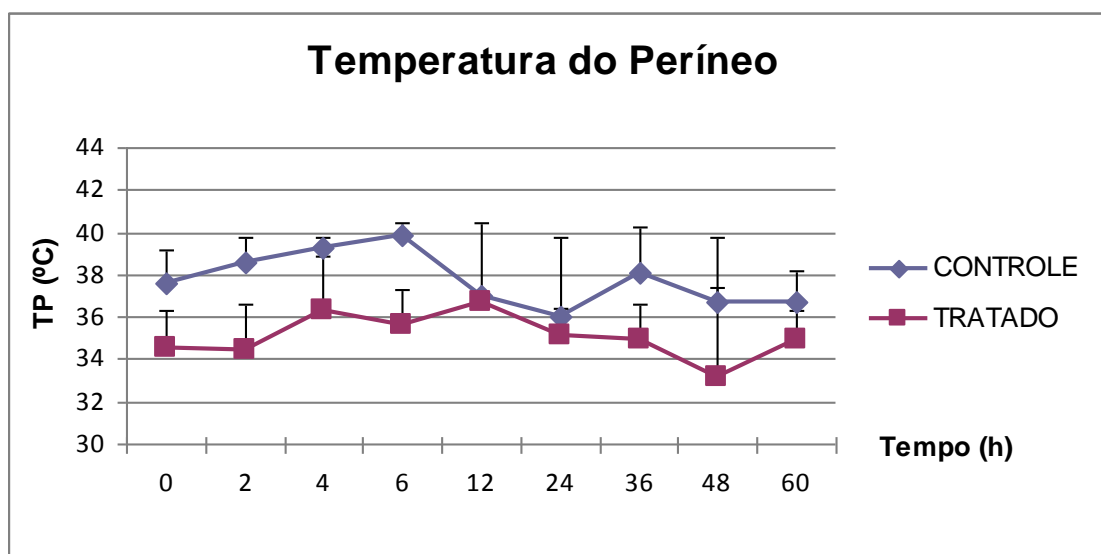


Figura 11. Temperatura do Períneo (TP) mensurada pelo Termômetro Infravermelho de Mão e de Não Contato, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

### 5.7. Termografia - Câmera Flir i60

A temperatura da frente aumentou significativamente em 12 e 60 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparada ao grupo controle. A temperatura da frente elevou-se significativamente até atingir o pico de 35°C em 6 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero (Tabela 11 e Figura 12).

Tabela 11. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Fronte (TF) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TF ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	30,5	±	1,3	A	29,8	±	1,9	A
2	32,6	±	1,3	A*	30,6	±	1,8	A
4	32,0	±	0,8	A	33,4	±	1,7	A*
6	32,1	±	1,6	A	35,0	±	1,6	A*
12	27,6	±	1,1	B*	34,0	±	1,1	A*
24	28,5	±	0,8	A*	30,8	±	1,8	A
36	28,5	±	1,0	A*	32,2	±	1,4	A*
48	28,6	±	1,3	A	30,2	±	2,1	A
60	27,5	±	1,0	B*	32,2	±	1,9	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

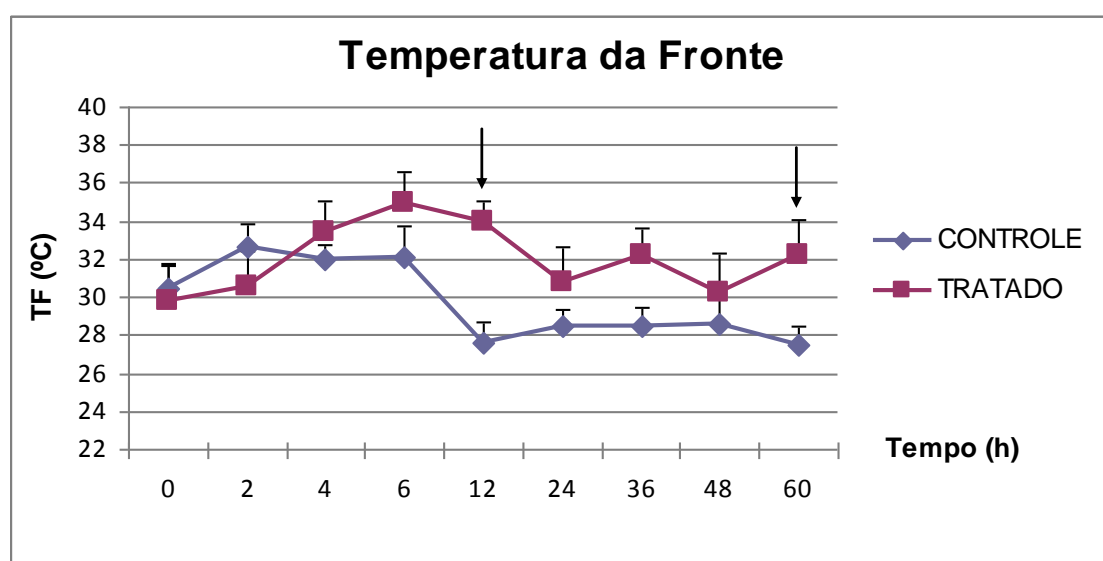


Figura 12. Temperatura da Fronte (TF) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

A temperatura do dorso apresentou aumento significativo em 6, 12, 36 e 60 horas após a inoculação de LPS no grupo tratado quando comparada ao

grupo controle. A temperatura do dorso elevou-se significativamente até atingir o pico de 32,4°C em 12 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero (Tabela 12 e Figura 13).

Tabela 12. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Dorso (TD) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TD ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	25,3	±	2,3	A	23,7	±	1,2	A
2	26,3	±	2,3	A	26,3	±	1,2	A
4	26,9	±	0,9	A	30,3	±	0,9	A*
6	28,0	±	0,8	B*	31,9	±	1,0	A*
12	22,9	±	0,4	B*	32,4	±	2,6	A*
24	23,0	±	0,3	A	25,8	±	2,7	A
36	23,0	±	0,8	B*	28,4	±	2,4	A*
48	23,1	±	1,1	A*	25,5	±	1,5	A
60	23,3	±	0,8	B	29,2	±	2,5	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

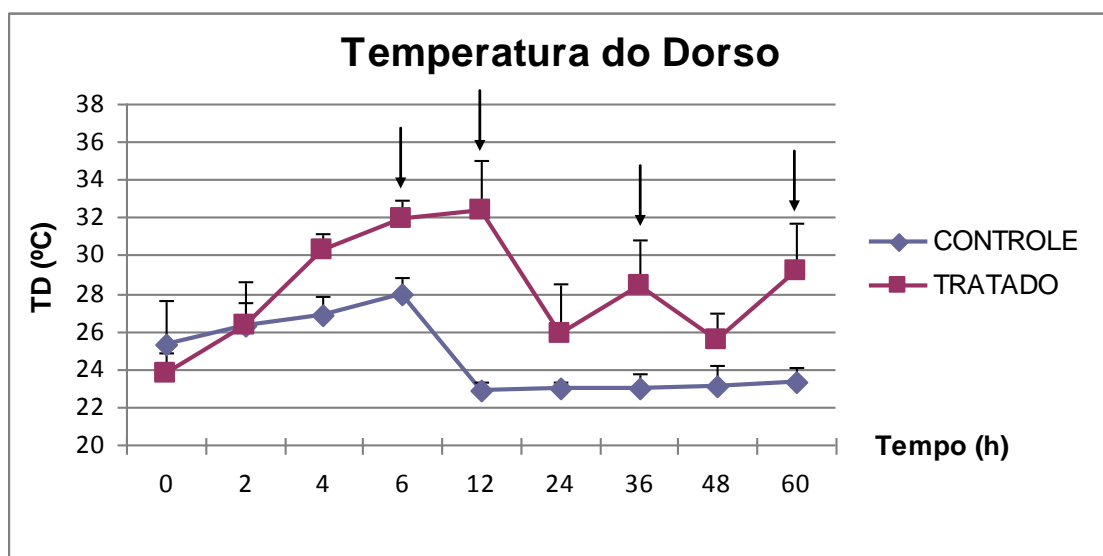


Figura 13. Temperatura do Dorso (TD) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Em relação à temperatura axilar houve aumento significativo 12 horas após a inoculação de LPS no grupo tratado quando comparada ao grupo controle. A temperatura axilar elevou-se significativamente até o pico de 37,5°C em 6 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero (Tabela 13 e Figura 14).

Tabela 13. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura Axilar (TA) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TA ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	31,8	±	0,8	A	35,3	±	0,7	A
2	34,4	±	1,3	A	34,8	±	1,8	A
4	33,7	±	0,9	A	36,8	±	1,9	A
6	34,5	±	1,1	A	37,5	±	1,1	A*
12	30,9	±	1,3	B	36,3	±	3,1	A
24	31,8	±	3,1	A	34,9	±	1,8	A
36	31,7	±	1,6	A	36,2	±	0,8	A
48	31,3	±	2,8	A	35,4	±	1,2	A
60	32,2	±	2,6	A	36,4	±	1,0	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

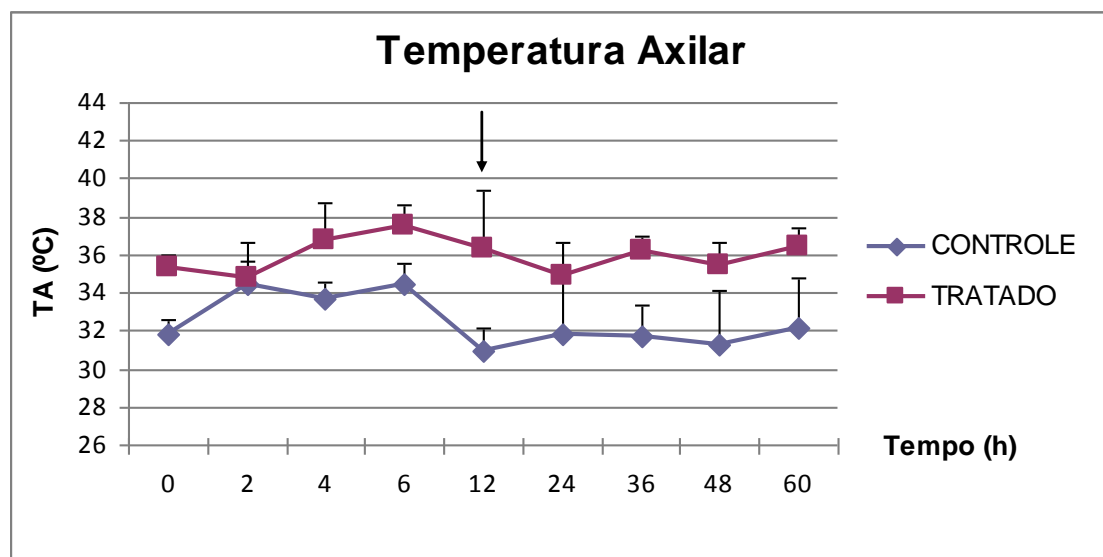


Figura 14. Temperatura Axilar (TA) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Quando a temperatura da face externa da coxa foi mensurada, ocorreu aumento significativo em 12 e 60 horas após a inoculação de LPS no grupo tratado quando comparada ao grupo controle. A temperatura da face externa da coxa elevou-se significativamente até atingir o pico de 30,9°C em 6 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero (Tabela 14 e Figura 15).

Tabela 14. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TFEC ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	26,2	±	2,8	A	24,0	±	1,8	A
2	28,1	±	1,1	A	26,3	±	1,7	A
4	28,0	±	1,8	A	29,3	±	1,7	A*
6	28,3	±	1,4	A	30,9	±	1,1	A*
12	24,4	±	0,8	B	30,8	±	1,6	A*
24	24,7	±	1,4	A	25,8	±	2,7	A
36	24,6	±	1,7	A	29,1	±	1,5	A*
48	23,3	±	1,2	A*	26,0	±	1,6	A
60	23,0	±	0,8	B*	29,1	±	1,6	A*

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

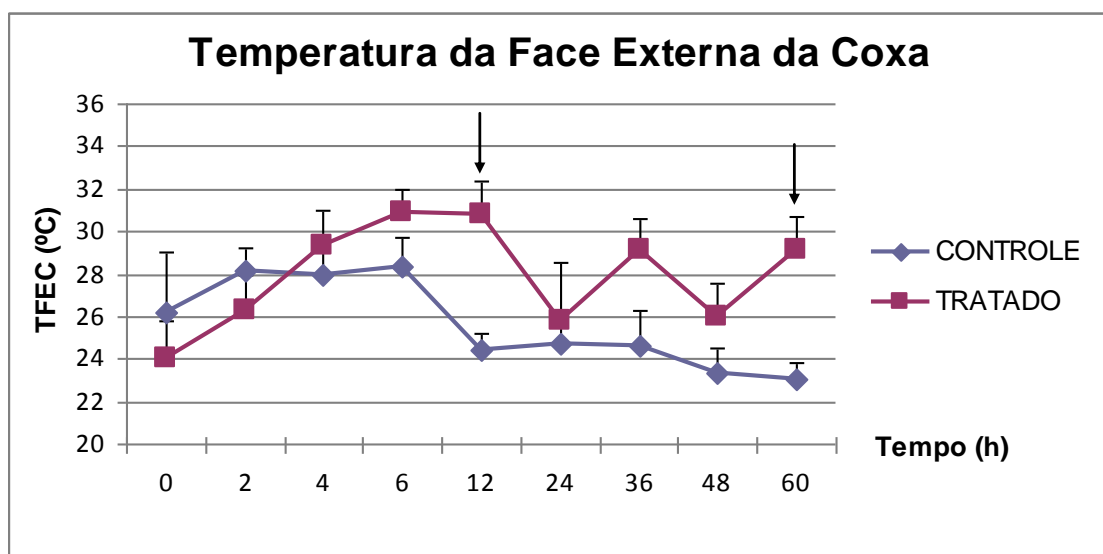


Figura 15. Temperatura da Face Externa da Coxa (TFEC) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

A mensuração da temperatura da face interna da coxa apresentou aumento significativo em 12 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado, quando comparada ao grupo controle. A temperatura da face interna da coxa elevou-se até atingir o pico de 37,6°C em 12 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado, entretanto não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao momento zero (Tabela 15 e Figura 16).

Tabela 15. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TFIC ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	31,2	±	1,4	A	34,6	±	0,9	A
2	34,6	±	2,4	A*	34,0	±	1,7	A
4	34,5	±	1,4	A*	36,5	±	1,0	A
6	34,8	±	1,4	A*	37,4	±	1,6	A
12	31,9	±	2,2	B	37,6	±	0,6	A
24	31,5	±	2,5	A	35,4	±	1,7	A
36	31,4	±	2,9	A	36,5	±	0,9	A
48	31,4	±	2,2	A	33,1	±	5,5	A
60	31,7	±	2,0	A	36,3	±	1,0	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

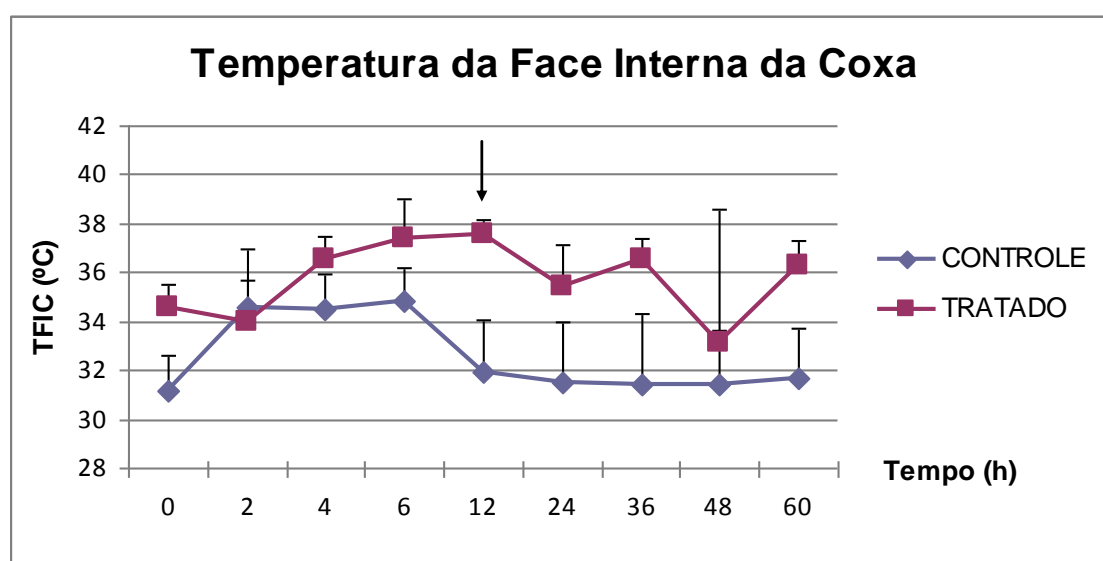


Figura 16. Temperatura da Face Interna da Coxa (TFIC) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

A temperatura do períneo não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos controle e tratado. Contudo, a temperatura do períneo elevou-se significativamente até atingir o pico de 39,4°C 4 horas após a inoculação do LPS no grupo tratado quando comparado ao momento zero (Tabela 16 e Figura 17).

Tabela 16. Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da Temperatura do Períneo (TP) mensurada pela Câmera Flir i60, em °C, segundo os grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

Tempo (horas)	TP ( $\bar{x} \pm S$ )							
	Controle				Tratado (LPS)			
0	37,8	±	0,6	A	37,8	±	0,6	A
2	38,1	±	2,5	A	38,4	±	1,1	A
4	38,5	±	0,9	A	39,4	±	1,0	A*
6	38,9	±	0,3	A	39,1	±	0,5	A*
12	37,8	±	0,8	A	38,9	±	0,5	A*
24	38,5	±	0,5	A	37,5	±	0,2	A
36	37,9	±	0,3	A	38,5	±	0,4	A
48	37,7	±	1,0	A	37,7	±	0,9	A
60	36,6	±	0,9	A	38,4	±	0,8	A

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

\* Houve diferença significativa em relação ao tempo zero hora pelo teste de Dunnett ( $p<0,05$ ).

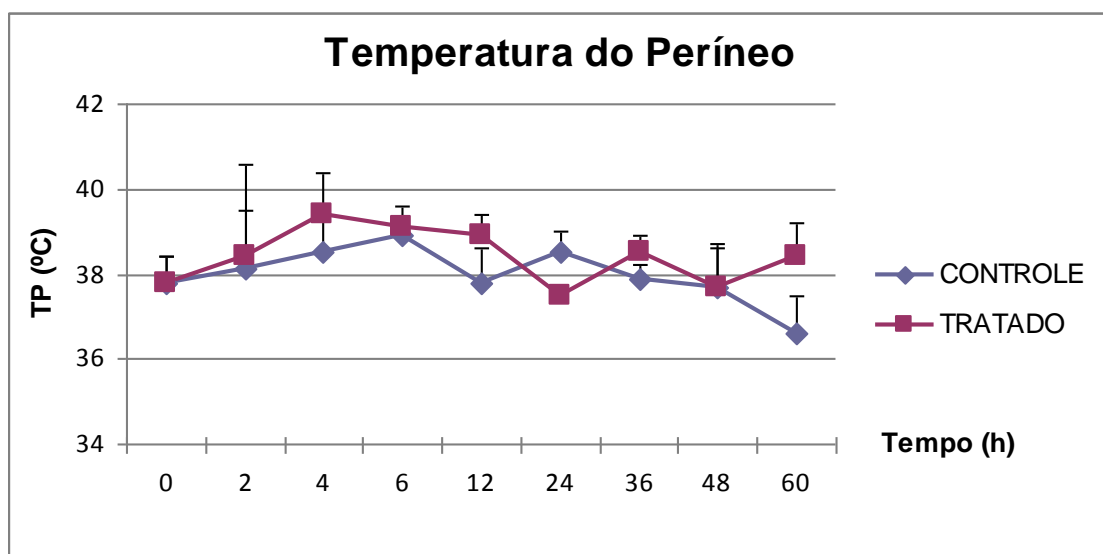


Figura 17. Temperatura do Períneo (TP) mensurada pela Termografia da Câmera Flir i60, em °C, dos grupos controle (NaCl 0,9%, IV) e tratado (400 ng/Kg de LPS de *E. coli*, IV) em cada momento de avaliação.

## VI. DISCUSSÃO

O delineamento experimental foi elaborado com o intuito de mensurar o perfil sérico de citocinas de ovinos submetidos à endotoxemia experimental. A resposta imunológica do presente trabalho foi avaliada durante aproximadamente 3 dias, nos momentos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a administração do LPS. A resposta imune inata se inicia a partir da interação entre o LPS e as células mononucleares fagocíticas. Posteriormente, estas células passam a produzir e secretar citocinas de ação pró-inflamatória, por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Os resultados do presente estudo demonstraram que não ocorreram alterações significativas das concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após a inoculação de LPS de *E. coli* neste modelo experimental. Em contrapartida, estudos anteriores descrevem aumento progressivo na concentração sérica de TNF- $\alpha$  até atingir o pico em aproximadamente 1-2 horas em ovinos (STAUB et al., 2001), bezerros (BIENIEK et al., 1998), garrotes (CARROLL et al., 2009), novilhas (CARROLL et al., 2011) e vacas em lactação (OHTSUKA et al., 1997) com quadro clínico de endotoxemia após a inoculação experimental de LPS por via intravenosa.

Quando a IL-1 $\beta$  é avaliada, sua concentração sérica máxima ocorre 90 minutos após o pico de TNF- $\alpha$ , ou seja, em torno de 3-4 horas em ovinos (FERNANDEZ-BUSTAMANTE et al., 2012), garrotes (CARROLL et al., 2009), novilhas (CARROLL et al., 2011) e vacas em lactação (OHTSUKA et al., 1997) após a inoculação experimental de LPS por via intravenosa.

A observação de inexistência de variação significativa nas concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na mensuração da resposta imune inata do presente estudo pode ser atribuída ao fato dos ovinos serem um modelo experimental *outbreed*, ou seja, animais não isogênicos. Desta forma, a variação genética individual dos animais utilizados neste experimento influenciaria a resposta da imunidade inata avaliada neste trabalho, o que de

certa maneira explica a não percepção de diferenças entre as concentrações séricas de citocinas dos animais pertencente aos grupos tratado e controle.

Camundongos da linhagem BalbC quando desafiados com LPS mostraram de forma bem definida um pico de TNF- $\alpha$  uma hora após a inoculação de LPS (DOMINGOS et al., 2009). Resultado análogo foi obtido também quando se utilizou macrófagos peritoniais isolados a partir de camundongos da linhagem C3H/HeJ, nota-se o pico de TNF- $\alpha$  1 hora após o tratamento das células com LPS (SU et al., 2010). Resultados assim mostram o alcance da utilização de modelos animais isogênicos, entretanto a validade dos mesmos para a clínica, no caso a médica veterinária, deve ser feita com cautela. Uma vez que a população dos animais domésticos exibe grande variabilidade genética quanto a resposta imune. Uma perspectiva para avaliar o alcance destas observações é estender o estudo a uma população maior.

Outro efeito seria a via de administração do LPS. No presente trabalho, a administração de LPS ocorreu por via intravenosa *in bolus*, porém sem alteração da cinética de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estudos realizados em diferentes espécies de animais domésticos como ovinos (STAUB et al., 2001), bezeros (BIENIEK et al., 1998), garrotes (CARROLL et al., 2009), novilhas (CARROLL et al., 2011) e vacas lactantes (OHTSUKA et al., 1997) nas quais a administração de LPS também foi realizada pela via intravenosa *in bolus*, registraram elevação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  atingiu um pico de concentração. Em ovinos neonatos também se observou que a administração de LPS pela via intravenosa por infusão contínua, apresenta resposta imune similar a dos autores acima, registrando-se elevação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , 30 e 120 minutos após a administração do LPS (FENG et al., 2009; FENG et al., 2010).

A discrepância dos dados encontrados para citocinas entre o presente trabalho e os acima descritos poderia ser atribuída às diferenças entre espécies, no entanto é descrito na literatura a resposta do organismo à inoculação de LPS em ovinos neonatos (FENG et al., 2009; FENG et al., 2010), o que indica também possível efeito do estado de maturação do sistema imune. Vale ressaltar que animais neonatos podem apresentar resposta imunológica

mais lenta apesar de serem considerados imunocompetentes, pois seu sistema imunológico ainda está em fase de desenvolvimento.

Por outro lado, os animais utilizados neste experimento foram adultos de quatro anos, os quais possivelmente entraram em contato com microrganismos possuidores de LPS na sua composição mais de uma vez ao longo da vida, decorrentes de possíveis infecções gastrointestinais, pulmonares e da glândula mamária. Embora a resposta ao LPS curse geralmente com quadro endotoxêmico, na literatura também é descrita a tolerância imunológica a esta molécula. Por uma via de sinalização intracelular em macrófagos alternativa aquela que leva a ativação e expressão do NF- $\kappa$ B. É possível que a discrepância entre estes resultados seja devido a este fenômeno.

Segundo BISWAS & LOPEZ-COLLAZO (2009), o efeito da tolerância ao LPS se caracteriza por redução na produção e liberação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, seguido de aumento na produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias, dentre as quais se incluem a IL-10 e o TGF $\beta$ . Embora este fenômeno não esteja bem esclarecido para o modelo experimental ovino, acredita-se que isto possa ter ou não ocorrido o que precisa ser posteriormente avaliado com a determinação destas citocinas anti-inflamatórias, além de outros.

Segundo LIU et al (2008), o efeito da tolerância endotoxêmica em células de Kupffer de camundongos da linhagem C57BL/6J poderia ser demonstrado através da pré-exposição destes animais a 10 ng/mL de LPS, seguido de um desafio na dose de 100 ng/mL de LPS em aproximadamente 24 horas após a pré-exposição. Assim, ocorreria o estímulo a produção de TNF- $\alpha$  e a consequente diminuição da expressão gênica de IRAK-M. Este evento poderia ser explicado pela regulação negativa da IRAK-M no processo de sinalização aos receptores *toll-like*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que não ocorreram alterações significativas das concentrações séricas de IL-2 e IL-13 após a inoculação de LPS de *E. coli* neste modelo experimental. Entretanto, houve aumento destas citocinas no grupo tratado 60 horas após a inoculação do LPS. Este resultado ressalta que não houve interferência de outras respostas imunes

sobre os animais do experimento, pois a IL-2 é responsável pelo período de transição entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa e a IL-13 permite as trocas de isótipos de imunoglobulina, o que caracteriza a imunidade adaptativa. Esta situação poderia ser explicada pelo fato do LPS ser um antígeno independente de células T, visto que desencadeia resposta imune inespecífica. Desta maneira, o LPS induz a proliferação de células B, que se multiplica em imunoglobulinas do tipo M (IgM) ou se diferencia em plasmócitos, o que não estimula a formação de imunoglobulinas com maior especificidade, por exemplo, imunoglobulinas do tipo G (IgG).

Estas concentrações baixas de IL-2 poderiam estar relacionadas ao fato desta citocina ser a responsável pelo período de transição entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, que ocorre em aproximadamente 4-5 dias após a estimulação do antígeno. Esta situação não foi avaliada no estudo que determinou a concentração de IL-2 somente até 60 horas após a inoculação do LPS. Outro fator importante segundo MA et al (2006) é que a IL-2 atua como o principal fator estimulador de células T, pois induz expansão clonal deste tipo celular e, ainda, estimula a proliferação e ativação de células natural killer (NK).

A concentração sérica baixa de IL-13 descrita pelo presente trabalho poderia ser explicada pelo fato desta citocina ser considerada um dos marcadores da imunidade adaptativa, uma vez que sua função está associada a trocas de isótipos de imunoglobulina, principalmente IgE. Segundo WILLS-KARP (2004), a IL-13 é uma citocina produzida por células T, células natural killer (NK) e eosinófilos, que também desempenha a função de promover fibrose na fase de reparação tecidual de processos inflamatórios crônicos, por exemplo, bronquite asmática e parasitose gastrointestinal.

A mensuração das citocinas do presente estudo foi realizada pelo teste de ELISA empregando-se um kit comercial humano. Segundo SCHEERLINCK (1999), ocorre reatividade cruzada entre citocinas humanas e de origem animal devido à homologia entre estas ser maior que 69%. Este fato poderia contribuir para alteração da concentração sérica das citocinas neste trabalho. Outro fator relevante seria o problema do teste de ELISA detectar citocinas biologicamente inativas ou apenas fragmentos delas. Isto poderia ser relevante em amostras

biologicamente complexas como o soro. Soma-se ao anteposto, o fato das citocinas circularem muitas vezes ligadas a receptores solúveis ou proteínas carreadoras, o que poderia ocasionar inibição da ação dos anticorpos utilizados como reagentes no teste de ELISA, os quais são capazes de detectar apenas a fração livre das citocinas.

Estes resultados são inéditos e extremamente relevantes para a literatura, visto que não há estudos anteriores que descrevam o perfil cinético de IL-2 e IL-13 após a administração de LPS empregando-se qualquer espécie de ruminante como modelo experimental.

Quatro horas após a inoculação do LPS a temperatura retal alcançou o seu valor máximo. Este resultado sugere que no modelo ovino, o mecanismo de desenvolvimento de febre pode ser independente da elevação das citocinas pirogênicas, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Outro fator interessante descrito por GERARDI (2012) foi à concentração sérica máxima de IL-6 alcançada somente 60 horas após a inoculação de 400 ng/Kg de LPS.

A explicação plausível para este fato é a ação direta do LPS sobre os receptores toll-like tipo 4 no endotélio fenestrado do órgão circumventricular (MATSUMURA & KOBAYASHI, 2004). Esta estrutura anatômica, localizada na região anterior do hipotálamo, tem função termorregulatória (BLATTEIS, 1992), por meio da ativação da enzima ciclo-oxigenase tipo 2, responsável pela síntese de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) a partir do ácido aracdônico (IVANOV & ROMANOVSKY, 2004).

Resultados similares foram descritos em ovinos adultos submetidos à administração de LPS por via intravenosa *in bolus* nas doses de 1  $\mu$ g/Kg (STAUB et al., 2001), 200 ng/Kg (BRIARD et al., 2009) e 400 ng/Kg (BRIARD et al., 2009) nas quais a temperatura retal elevou-se, respectivamente, para 42°C, entre 3 e 4 horas, 41°C, em 6 horas e 43°C em 6 horas após a inoculação do LPS.

O termômetro infravermelho de mão e não contato não apresentou alterações significativas na mensuração da temperatura superficial corpórea nas regiões da frente, dorso, axila, faces interna e externa da coxa, e períneo após a inoculação do LPS. Estes resultados são distintos ao descrito por

CARROLL et al (2009) que observaram em garrotes a diminuição da temperatura da superfície corpórea da orelha de 30°C para 22°C aproximadamente 1,5 horas após a inoculação do LPS. Em relação às temperaturas da superfície corpórea da paleta e da coxa, estas permaneceram constantes entre 28°C e 30°C durante os momentos de avaliação.

Resultados similares ao presente trabalho foram descritos por MENDES et al (2013), estudo com ovinos após a tosquia nas quais avaliou-se a temperatura da superfície corpórea nas regiões da frente, dorso e face externa da coxa, por meio de termometria infravermelha. A ausência de alteração da temperatura da pele na região da frente estaria relacionada ao fato desta área ser deslanada e assim receberia a radiação solar diretamente, enquanto a região do dorso que possui uma cobertura espessa de lã, não. Já a face externa da coxa poderia ser prejudicada pelos hábitos das ovelhas de deitar sobre a coxa, e assim promover a troca de temperatura por condução com o solo, além desta região permanecer umedecida durante o período da manhã, devido à maior umidade presente na superfície do solo. Entretanto, os mesmos autores defendem a utilização da termometria por infravermelho nas regiões da axila, face interna da coxa e períneo, visto que estas áreas facilitam o processo de termorregulação dos ovinos, pois são desprovidas de lã.

Quando a técnica da termometria infravermelha foi empregada na clínica de primatas, os resultados observados por SHELTON et al (2006) e SIKOSKI et al (2007) em macacos das espécies *Aotus sp* e *Macaca fascicularis* respectivamente, assim como os descritos no presente estudo também foram considerados desfavoráveis para a avaliação da temperatura superficial corpórea das regiões axilar e frontal.

Resultados contrários ao presente estudo são referidos em medicina humana, que tem utilizado com sucesso o termômetro infravermelho na região frontal da cabeça para mensurar febre. Esta técnica, comparada ao termômetro clínico de mercúrio na região axilar, apresenta resultados similares, pois a sensibilidade e especificidade entre os métodos podem atingir respectivamente 88,7% e 89,9% (CHIAPPINI et al., 2011). Segundo TERAN et al (2012), a

sensibilidade e a especificidade aumentam significativamente para 99% em humanos de faixa etária de 0-48 meses.

Esta técnica tem aplicabilidade prática principalmente para a mensuração de estresse térmico, porém deve ser associada a exames físicos específicos, como as frequências respiratórias e cardíacas. Contudo, a técnica da termometria por infravermelho não obteve resultados satisfatórios quando empregada para o diagnóstico clínico de endotoxemia experimental.

Os resultados obtidos para a termografia por imagem infravermelha demonstraram que a técnica tem capacidade de identificar o aumento da temperatura superficial corpórea decorrente do estímulo causado pela administração do LPS por via intravenosa. As regiões da frente, dorso, axila, face externa e interna da coxa apresentaram aumento significativo de temperatura 12 horas após a inoculação do LPS.

A temperatura elevada da superfície da pele está diretamente relacionada ao pico febril, ocorrido em 4 horas após a inoculação do LPS. Este fenômeno também é explicado pela ação do LPS nos receptores do tipo TLR-4 no endotélio fenestrado do órgão circunventricular (MATSUMURA & KOBAYASHI, 2004) que irá desencadear a cascata do ácido aracdônico até a síntese de prostaglandina (IVANOV & ROMANOVSKY, 2004). Somado ao fato anteposto, o organismo animal necessita manter a homeostasia por meio da termorregulação. Este evento favorece a dissipação do calor através da pele ou do aumento da frequência respiratória.

Segundo TURNER (2007) e MOURA et al (2011), as regiões dorso-lombar, axilar, peitoral, ventral e coxal interna apresentam intensa atividade metabólica visto que apresentam o grau de complexidade da rede vascular. Estas regiões são providas de considerável circulação venosa que demonstrará um padrão térmico mais acentuado. Esta situação poderia ser justificada pelos resultados favoráveis de elevação da temperatura da pele no presente trabalho encontrados principalmente nas regiões da frente, axila e face interna da coxa.

Outro fator relevante para a técnica de termografia é a correta interpretação das imagens a serem analisadas, pois a temperatura superficial da pele é normalmente 5°C mais baixa que a temperatura corpórea mensurada

pela via retal. Segundo TURNER (2007), isto ocorre devido à dissipação do calor por radiação, convecção, condução e principalmente evaporação. A partir deste fato, o procedimento adotado no presente estudo do exame termográfico iniciou-se com a aclimatação dos animais em baias individuais com iluminação fraca entre 10 e 20 minutos e temperatura ambiente inferior a 30°C. Posteriormente, regulou-se a distância entre animal e câmera com objetivo de minimizar as possíveis interferências externas na mensuração da temperatura superficial corpórea.

A técnica da termografia tem sido pouco explorada pela clínica de ovinos, somente há relato do emprego desta ferramenta por CAPRARO et al (2008) no diagnóstico de torção testicular. Assim, o presente estudo é pioneiro no diagnóstico de uma das principais enfermidades que venham a acometer esta espécie de ruminante.

Na contramão da medicina de ovinos, a termografia por imagem infravermelha passou a ser utilizada com êxito a partir dos anos 2000 na clínica de bovinos. Esta técnica está sendo aplicada na área de doenças infecciosas para o diagnóstico de diarreia viral bovina (SCHAEFER et al., 2004) e síndrome respiratória bovina (SCHAEFER et al., 2007) através do aumento da temperatura superficial corpórea mensurada nas regiões frontal e nasal decorrente dos processos inflamatórios localizados. Este fato ressalta a importância das imagens captadas na região da fronte do presente estudo, visto que a endotoxemia tem a capacidade de ocasionar lesões pulmonares.

Na clínica de equinos, a termografia por imagem infravermelha está sendo utilizada desde a década de 90. Segundo JONES (1998), EDDY et al (2001) e FANTINI et al (2011), esta técnica é uma ferramenta capaz de diagnosticar precocemente as principais patologias relacionadas ao aparelho locomotor, por exemplo laminite, tendinite e lombalgia. Esta indicação de diagnóstico de lombalgia permite empregar a técnica para detectar o aumento da temperatura da pele, principalmente da região dorsal, em ovinos submetidos à endotoxemia.

## VII. CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação do perfil sérico de citocinas e da temperatura de superfície corpórea de ovinos submetidos à endotoxemia experimental, empregando-se a dose de 400 ng/Kg de LPS, permitiram concluir que:

- a) Não ocorreu alteração dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .
- b) O pico febril dos ovinos detectado pelo termômetro clínico de mercúrio ocorre em 4 horas após a inoculação do LPS.
- c) A técnica de termometria infravermelha, utilizando-se um termômetro infravermelho de mão e de não contato, não é eficaz para mensurar o aumento de temperatura da pele dos ovinos.
- d) A termografia por imagem infravermelha realizada nas regiões da fronte, dorso, axilar, faces interna e externa da coxa detectou alterações térmicas a partir das 6 horas após a inoculação do LPS, atingindo os maiores valores, às 12 horas, podendo ser adotada como mais um meio auxiliar para o diagnóstico de processos infecciosos sistêmicos.

## VIII. REFERÊNCIAS

ANDRADE FILHO, A.C.C. Teletermografia: princípios físicos, fisiológicos e fisiopatológicos da produção da imagem e suas indicações na clínica de dor e reabilitação. **Acta Fisiátrica**, v. 6, n. 2, p. 55-59, 1999.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

ANTAL-SZALMAS, P.; VAN STRIJP, J.A.G.; WEERSINK, A.J.L.; VERHOEF, J.; VAN KESSEL, K.P.M. Quantitation of surface CD14 on human mono-cytes and neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 61, p. 721-728, 1997.

AURELL, C.A. & WISTROM, A.O. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 253, n. 1, p.119-123, 1998.

BASAK, T.; ACIKSOZ, S.; TOSUN, B.; AKYUZ, A.; ACIKEL, C. Comparison of three different thermometers in evaluating the body temperature of healthy young adult individuals. **International Journal of Nursing Practice**, v. 19, p. 471-478, 2013.

BIENIEK, K.; SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KAMINSKA, T.; KONDRACKI, M.; WITEK, M.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 297-307, 1998.

BLATTEIS, C.M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Progress in Brain Research**, v. 91, p. 409-412, 1992.

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 29, p. 108-115, 1998.

BRADDLEY, J.R. TNF- mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BREKKE, O.L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; PHARO, A.; FUNG, M.; RIESENFELD, J.; MOLLNES, T.E. Combined inhibition of complement and a

CD14 abolish E. coli induced cytokine, chemokine and growth factor synthesis in human whole blood. **Molecular Immunology**, v.45, p. 3804-3813, 2008.

BRIARD, N.; GUILLAUME, V.; FRACHEBOIS, C.; RICO-GOMEZ, M.; SAUZE, N.; OLIVER, C.; DUTOUR, A. Endotoxin injection increases growth hormone and somatostatin secretion in sheep. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2662-2669, 2009.

BRIOSCHI, M.L.; MACEDO, J.F.; MACEDO, R.A.C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 2, p. 151-160, 2003.

CARDOSO, D.; CURCI, V.C.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; VERÍSSIMO, C.J.; MÉO, S.C.; MOLENTO, M.B. Situação da Resistência de helmintos de ovinos a anti-helmínticos na região de Araçatuba, estado de São Paulo. Disponível em: [www.infotece.cnptia.embrapa.br](http://www.infotece.cnptia.embrapa.br) Acessado em: 15/05/2013.

CAPRARO, G.A.; COUNGHILIN B.F.; MADER T.J.; SMITHLINE, H.A. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2688-2693, 2008.

CARROLL, J.A.; BURDICK, N.C.; REUTER, R.R.; CHASE, C.C. Jr.; SPIERS, D.E.; ARTHINGTON, J.D.; COLEMAN, S.W. Differential acute phase immune responses by angus and romosinuano steers following an endotoxin challenge. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, p. 163-173, 2011.

CARROLL, J.A.; REUTER, R.R.; CHASE, C.C.Jr.; COLEMAN, S.W.; RILEY, D.G.; SPIERS, D.E.; ARTHINGTON, J.D.; GALYEAN, M.L. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, v. 15, p. 81-89, 2009.

CHIAPPINI, E.; PRINCIPI, N.; LONGHI, R.; TOVO, P.A.; BECHERUCCI, P.; BONSIGNORI, F.; ESPOSITO, S.; FESTINI, F.; GALLI, L.; LUCCHESI, B.; MUGELLI, A.; MARTINO, M. Management of fever in children. **Clinical Therapeutics**, v. 31, p. 1826-1843, 2009.

CHIAPPINI, E.; SOLLAI, S.; LONGHI, R.; MORANDINI, L.; LAGHI, A.; OSIO, C.E.; PERSIANI, M.; LONATI, S.; PICCHI, R.; BONSIGNORI, F.; MANNELLI, F.; GALLI, L.; MARTINO, M. Performance of non-contact infrared thermometer for detecting febrile children in hospital and ambulatory settings. **Journal of Clinical Nursing**, v. 20, p. 1311-1318, 2011.

COLAK, A.; POLAT, B.; OKUMUS, Z.; KAYA, M.; YANMAZ, L.E.; HAYIRLI, A. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 91, n. 11, p. 4244-4248, 2008.

COSTA, A.C.S.; FILHO, A.V.D.; PACKER, A.C.; RODRIGUES-BIGATON, D. Intra and inter-rater reliability of infrared image analysis of masticatory and upper trapezius muscles in women with and without temporomandibular disorder. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 17, n. 1, p. 24-31, 2013.

CRAIG, J.V.; LANCASTER, G.A.; TAYLOR, S.; WILLIAMSON, P.R.; SMYTH, R.L. Infrared ear thermometry compared with rectal thermometry in children: a systematic review. **The Lancet**, v. 360, p. 603-609, 2002.

DICKENSHEETS, H.L. & DONNELLY, R.P. IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 12, p. 6226-6233, 1997.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of Endotoxin Research**, v. 10, n. 4, p. 201-222, 2004.

DOMINGOS, M.O.; ANDRADE, R.G.; BARBARO, K.C.; BORGES, M.M.; LEWIS, D.J.; NEW, R.R.C. Influence of the A and B subunits of cholera toxin (CT) and *Escherichia coli* toxin (LT) on TNF- $\alpha$  release from macrophages. **Toxicon**, v. 53, p. 570-577, 2009.

DONNELLY, R.P.; FREEMAN, S.L.; HAYES, M.P. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1420-1427, 1995.

DÖFFINGER, R.; DUPUIS, S.; PICARD, C.; FIESCHI, C.; FEINBERG, J.; BARCENAS-MORALES, G.; CASANOVA, J.L. Inherited disorders of IL-12 and IFN- $\gamma$  mediated immunity: a molecular genetics update. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 12-13, p. 903-909, 2002.

EDDY, A.L.; HOOGMOED, L.M.; SNYDER, J.R. The role of thermography in the management of equine lameness. **Veterinary Journal**, v. 162, n. 3, p. 172-181, 2001.

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

ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.E.; JACOBSON, C.D.; SAPER, C.B. Distribution of fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **Journal of Comparative Neurology**, v. 371, p. 85-103, 1996.

EUSTÁQUIO FILHO, A.; TEODORO, S.M.; CHAVES, M.C.; SANTOS, P.E.F.; SILVA, M.W.R.; MURTA, R.M.; CARVALHO, G.G.P.; SOUZA, L.E.B. Zona de conforto térmico de ovinos da raça santa inês com base nas resposta fisiológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1807-1814, 2011.

FANTINI, P.; PALHARES, M.S. Lombalgia em equinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 4, p. 359-363, 2011.

FENG, S.Y.S.; PHILLIPS, D.J.; STOCKX, E.M.; YU, V.Y.H.; WALKER, A.M. Endotoxin has acute and chronic effects on the cerebral circulation of fetal sheep. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. 640-650, 2009.

FENG, S.Y.S.; SAMARASINGHE, T.; PHILLIPS, D.J.; ALEXIOU, T.; HOLLIS, J.H.; YU, V.Y.H.; WALKER, A.M. Acute and chronic effects of endotoxin on cerebral circulation in lambs. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 3, p. 760-766, 2010.

FERNANDEZ-BUSTAMANTE, A.; EASLEY, R.B.; FULD, M.; MULREANY, D.; CHON, D.; LEWIS, J.F.; SIMON, B.A. Regional pulmonary inflammation in an endotoxemic ovine acute lung injury model. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 183, n. 2, p. 149-158, 2012.

FIORELLI, J.; SHMIDT, R.; KAWABATA, C.Y.; OLIVEIRA, C.E.L.; JUNIOR, H.S.; ROSSIGNOLO, J.A. Eficiência térmica de telhas onduladas de fibrocimento aplicadas em abrigos individuais para bezerros expostos ao sol e à sombra. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 64-67, 2012.

FLEMING, G. J. Thermography - not just an expensive toy. **Annals of North American Veterinary Conference**, p. 1912-1913, 2008.

FLORES-SAHAGÚN, J. H. **Análise e diagnóstico de carcinoma basocelular a partir de imagem infravermelha**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e

Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 95f, 2010.

GATTO, M.; GIANESELLA, M.; MORGANTE, M. Applicazione della termografia nella diagnosi di acidosi ruminale subacuta della vacca da latte. **Large Animal Review**, v. 16, p. 7-12, 2010.

GERARDI, B. **Interleucina 6 e proteinograma sérico de ovinos submetidos à endotoxemia experimental**. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária *Campus* de Araçatuba, 51f, 2012.

GIVALOIS, L.; DORNAND, J.; MEDAOUCHE, M.; SOLIER, M.D.; BRISTOW, A.F.; IXART, G.; SIAUD, P.; ASSENMACHER, I.; BARBANEL, G. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 164-170, 1994.

GLOSTER, J.; EBERT, K.; GUBBINS, S.; BASHIRUDDIN, J.; PATON, D.J. Normal variation in thermal radiated temperature in cattle: implications for foot-and-mouth disease detection. **Biomed Central Veterinary Research**, v. 7, p. 73, 2011.

GLUCK, T. & OPAL, S.M. Advances in sepsis therapy. **Drugs**, v. 64, n. 8, p. 837-859, 2004.

GRAY, P.; DUNNE, A.; BRIKOS, C.; JEFFERIES, C.A.; DOYLE, S.L.; O'Neill, L.A. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton' tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 10489-10495, 2006.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

HARPER, D.L. The value of infrared thermography in a diagnosis and prognosis of injuries in animals. **Proceedings the Inframation**, p. 115-122, 2000.

HAY, A.D.; PETERS, T.J.; WILSON, A.; FAHEY, T. The use of infrared thermometry for the detection of fever. **British Journal of General Practice**, v. 54, p. 448-450, 2004.

HODGSON, J.C. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 157-175, 2006.

HOFMANN, S.R.; ETTINGER, R.; ZHOU, Y.J.; GADINA, M.; LIPSKY, P.; SIEGEL, R.; CANDOTTI, F.; O'SHEA, J.J. Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 2, n. 6, p. 495-506, 2002.

HOVINEN, M.; SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HANNINEN, L.; PASTELL, M.; AISLA, A.M.; PYORALA, S. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. **Journal Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4592-4598, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2011. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) Acessado em: 15/05/2013.

IVANOV, A.I. & ROMANOVSKY, A.A. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1977-1993, 2004.

JACOBI, J. Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 59, n. 1, p. 3-8, 2002.

JANSSENS, S. & BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Molecular Cell**, v. 11, p. 293-302, 2003.

JOINER, K. A.; GOLDMAN, R.; SCHMETZ, M.; BERGER, M.; HAMMER, C.H.; FRANK, M.M.; LEIVE, L. A quantitative analysis of C3 binding to O-antigen capsule, lipopolysaccharide, and outer membrane protein of E. coli O111B4. **The Journal of Immunology**, v. 132, p. 369-375, 1984.

JONES, E.Y.; STUART D.I.; WALKER N.P. Structure of tumour necrosis factor. **Nature**, v. 338, p. 225-228, 1989.

JONES, W.E. Thermography. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 18, n. 7, p. 422-423, 1998.

JUNGES, D. **Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbia por termografia em infravermelho**. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Alimentação Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 100f, 2010.

KABAROFF, L.C.; RODRIGUEZ, A.; QUINTON, M.; BOERMANS, H.; KARROW, N.A. Assessment of the ovine acute phase response and hepatic gene expression in response to *Escherichia coli* endotoxin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 113-124, 2006.

KAGAN, J.C. & MEDZHITOV, R.; Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 125, p. 943-955, 2006.

KAWAI, T. & AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 24-32, 2007.

KARIN, M. & BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621-663, 2000.

KIM, H.M.; PARK, B.S.; KIM, J.I.; KIM, S.E.; LEE, J.; OH, S.C.; ENKHBAYAR, P.; MATSUSHIMA, N.; LEE, H.; YOO, O.J.; LEE, J.O. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. **Cell**, v. 130, n. 5, 906-917, 2007.

KNIZKOVA, I.; KUNC, P.; GURDIL, G.A.K.; PINAR, Y.; SELVI, K.Ç. Applications of infrared thermography in animal production. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v. 22, n. 3, p. 329-336, 2007.

KNIZKOVA, I.; KUNC, P.; KOUBKOVA, M.; FLUSSER, J.; DOLEZAL, O. Evaluation of naturally ventilated dairy barn management by a thermographic method. **Livestock Production Science**, v. 77, p. 349-353, 2002.

KOBAYASHI, M.; SAITOH, S.; TANIMURA, N.; TAKAHASHI, K.; KAWASAKI, K.; NISHIJIMA, M.; FUJIMOTO, Y.; FUKASE, K.; AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 6211-6218, 2006.

KOTRBA, R.; KNIZKOVA, I.; KUNC, P.; BARTOS, L.K. Comparison between the coat temperature of the eland and dairy cattle by infrared thermography. **Journal of Thermal Biology**, v.32, p.355-359, 2007.

KOYAMA, S.; SATO, E.; NOMURA, H.; KUBO, K.; MIURA, M.; YAMASHITA, T.; NAGAI, S.; IZUMI, T. The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. **The European Respiratory Journal**, v. 14, p. 545-552, 1999.

LALONI, L.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M.; PINHEIRO, M.G.; PEREIRA, D.F. Avaliação da relação entre temperatura da superfície corporal e produção de vacas jersey submetidas à climatização na pré-ordenha. **Ciência & Engenharia**, v. 11, n. 2, p. 35-37, 2002.

LAZARUS, M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 451-455, 2006.

LIU, S.; KHEMLANI, L.S.; SHAPIRO, R.A.; JOHNSON, M.L.; LIU, K.; GELLER, D.L.; WATKINS, S.C.; GOYERT, S.M.; BILLIAR, T.R. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5089-5098, 2008.

LIU, Z.G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Research**. v. 15, n. 1, p. 24-27, 2005.

MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 657-679, 2006.

MANSEEL, A.; BRINT, E.; GOULD, J.A.; O'NEILL, L.A.; HERTZOG, P.J. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF- $\kappa$ B activation by Toll-like receptor TLR2 and TLR4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 37227-37230, 2004.

MARTINON, F.; BRUNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p.417-426, 2002.

MATSUDA, N. & HATTORI, Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, n. 3, p. 189-198, 2006.

MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 2819-2826, 2004.

MENDES, L.C.N.; MATSUKUMA, B.H.; OLIVEIRA, G.; PERES, L.C.T.; GERARDI, B.; FEITOSA, F.L.; PERRI, S.H.V.; PEIRO, J.R. Efeito da tosquia na temperatura corpórea e outros parâmetros clínicos em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 817-825, 2013.

MOURA, D.J.; MAIA, A.P.A.; VERCELLINO, R.A.; MEDEIROS, B.B.L.; SARUBBI, J.; GRISKA, P.R. Uso da termografia infravermelha na análise da termorregulação de cavalo em treinamento. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 1, p. 23-32, 2011.

NAOUM, P.C. Citocinas e interleucinas. **Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto-SP**, 2009. Disponível em: [www.ciencianews.com.br](http://www.ciencianews.com.br)  
Acessado em: 07/04/2013.

NIKKHAH, A.; PLAIZIER, J.C.; EINARSON, M.S.; BERRY, R.J.; SCOTT, S.L.; KENNEDY, A.D. Short Communication: Infrared Thermography and Visual Examination of Hooves of Dairy Cows in Two Stages of Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2749-2753, 2005.

OHTO, U.; FUKASE, K.; MIYAKE, K.; SATOW, Y. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. **Science**, v. 316, p. 1632-1634, 2007.

OHTSUKA, H.; OHKI, K.; TANAKA, T.; TAJIMA, M.; YOSHINO T.; TAKAHASHI, K. Circulating tumor necrosis factor and interleukin-1 after administration of LPS in adult cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 59, n. 10, p. 927-929, 1997.

OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 489-522, 1995.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 125-129, 2007.

PARK, B.S.; SONG, D.H.; KIM, H.M.; CHOI, B.S.; LEE, H.; LEE, J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, p. 1191-1196, 2009.

PASCOE, D.D.; MERCER, J.B.; WEERD, L. In: BRONZINO, J.D. Physiology of Thermal Signals. **The Biomedical Engineering Handbook: medical devices and systems**, 3 ed., CRC Press, USA, cap. 21, p. 21-1–21-27, 2006.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M. Application of acute phase measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PLOEGAERT T.C.; TIJHAAR E.; LAM T.J.; TAVERNE-THIELE A.; VAN DER POEL J.J.; VAN ARENDONK J.A.; SVELKOUK H.F.; PARMENTIER H.K. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: Variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 1-2, p. 88-94, 2011.

RAETZ, C.R.H. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 5745-5753, 1993.

RAINWATER-LOVETT, K.; PACHECO, J.M.; PACKER, C.; RODRIGUEZ, L.L. Detection of oot-and-mouth disease vírus infected cattle using infrared thermography. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 317-324, 2009.

RIETSCHER, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; PADOVA, F.D.; SCHREIER, M.; BRADY, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 8, p. 217-225, 1994.

ROBERT, J.M. In: SMITH, B.P. *Enfermidades do Trato Alimentar*. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, cap. 30, p. 633-641, 2006.

ROGGE, L.; BARBERIS-MAINO, L.; BIFFI, M.; PASSINI, N.; PRESKY, D.H.; GUBLER U.; SINIGAGLIA, F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 5, p. 825-832, 1997.

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D.; KLEIN, C.; SWEET, M.J.; HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

SANCHES, I.J. **Sobreposição de imagens de termografia e ressonância magnética: uma nova modalidade médica tridimensional**. Tese de Doutorado em Engenharia Biomédica, Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 168f, 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc<sup>R</sup>**, Version 8. Cary: 1999.

SCHAEFER, A.L.; COOK, N.; TESSARO, S.V.; DEREGT, D.; DESROCHES, G.; DUBESKI, P.L.; TONG, A.K.W.; GODSON, D.L. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 73-80, 2004.

SCHAEFER, A.L.; COOK, N.J.; CHURCH, J.S.; BASARAB, J.; PERRY, B.; MILLER, C.; TONG, A.K.W. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 376-384, 2007.

SCHAEFER, G.; ZAVISEK, M.; NAKASHIMA, T. Thermography based breast cancer analysis using statistical features and fuzzy classification. **Pattern Recognition**, v. 47, p. 1133-1137, 2009.

SCHEERLINCK, J.P.Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 72, n. 1-2, p. 39-44, 1999.

SCHILTZ, J.C. & SAWCHENKO, P.E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 13, p. 5606- 5618, 2002.

SCHILTZ, J.C.; SAWCHENKO, P.E. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1321-1329, 2003.

SHELTON, L.J.; WHITE, C.E.; FELT, S.A. A comparison of non-contact, subcutaneous, and rectal temperatures in captive owl monkeys (*Aotus sp.*). **Journal of Medical Primatology**, v. 35, p. 346-351, 2006.

SIKOSKI, P.; BANKS, M.L.; GOULD, R.; YOUNG, R.W.; WALLACE, J.M.; NADER, M.A. Comparison of rectal and infrared thermometry for obtaining body temperature in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **Journal of Medical Primatology**, v. 36, n. 6, p. 381-384, 2007.

SOHN, E.J.; PAAPE, M.J.; CONNOR, E.E.; BANNERMAN, D.D.; FETTERER, R.H.; PETERS, R.R. Bacterial lipopolysaccharide stimulates bovine neutrophil production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 and IFN- $\gamma$ . **Veterinary Research**, v. 38, p. 809-818, 2007.

SOUZA, B.B.; SOUZA, E.D.; CEZAR, M.F.; SOUZA, W.H.; SANTOS, J.R.S.; BENICIOET, T.M.A. Temperatura superficial e índice de tolerância ao calor de

caprinos em diferentes grupos raciais no semi-árido nordestino. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 275-280, 2008.

STAUB, N.C.; LONGWORTH, K.E.; SERIKOV, V.; JEROME, H.E.; ELSASSER, T. Detergent inhibits 70-90% of responses to intravenous endotoxin in awake sheep. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 5, p. 1788-1797, 2001.

STEWART, M. **Non-invasive measurement of stress and pain in cattle using infrared thermography**. Tese. Animal Science. Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2008.

SU, X.; SYKES, J.B.; AO, L.; RAEBURN, C.D.; FULLERTON, D.A.; MENG, X. Extracellular heat shock cognate protein 70 induces cardiac functional tolerance to endotoxin: differential effect on TNF- $\alpha$  and ICAM-1 levels in heart tissue. **Cytokine**, v. 51, p. 60-66, 2010.

TERAN, G.G.; TORREZ-LLANOS, J.; TERAN-MIRANDA, T.E.; BALDERRAMA, C.; SHAH, N.S.; VILLARROEL, P. Clinical accuracy of a non-contact infrared skin thermometer in paediatric practice. **Child Care Health and Development**, v. 38, n. 4, p. 471-476, 2012.

TRABER, D.L.; FLYNN, J.T.; HERNDON, D.N.; REDL, H.; SCHLAG, G.; TRABER, L.D. Comparison of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model. **Circulatory Shock**, v. 27, n. 2, p. 123-138, 1989.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Advances in Immunology**, v. 70, p. 83-243, 1998.

TURNER, T.A. Back problems in horses. **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP**, v. 49, 2003. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org) Acessado em: 20/09/2013.

TURNER, T.A. Thermography as an aid in the clinical lameness evaluation. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 7, p. 311-338, 1991.

TURNER, T.A. Use of thermography in equine lameness evaluation. **North American Veterinary Conference - NAVC**, 2007. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org) Acessado em: 20/09/2013.

VAALA, W.E. & HOUSE, J.K. Infecção Neonatal. In: SMITH. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, cap. 19, p. 303-318, 2006.

VAN AMERSFOORT, E.S.; VAN BERKEL, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 379-414, 2003.

VAN DER POLL, T.; COYLE, S.M.; KUMAR, A.; BARBOSA, K.; AGOSTI, J.M.; LOWRY S.F. Down-regulation of surface receptors for TNF and IL-1 on circulating monocytes and granulocytes during human endotoxemia. **The Journal of Immunology**, v.158, n. 3, p. 1490-1497, 1997.

VAN DYKEN, S.J.; LOCKSLEY, R.M. Interleukin-4 and Interleukin-13 mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 317-343, 2013.

VESTWEBER, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. **Immunological Reviews**, v. 218, p. 178-196, 2007.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 4, n. 12, Porto Alegre, 2008.

VIRIYAKOSOL, S. & KIRKLAND, T. Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 190-195, 1995.

WERLING, D. & JUNGI, T.W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, p. 1-12, 2003.

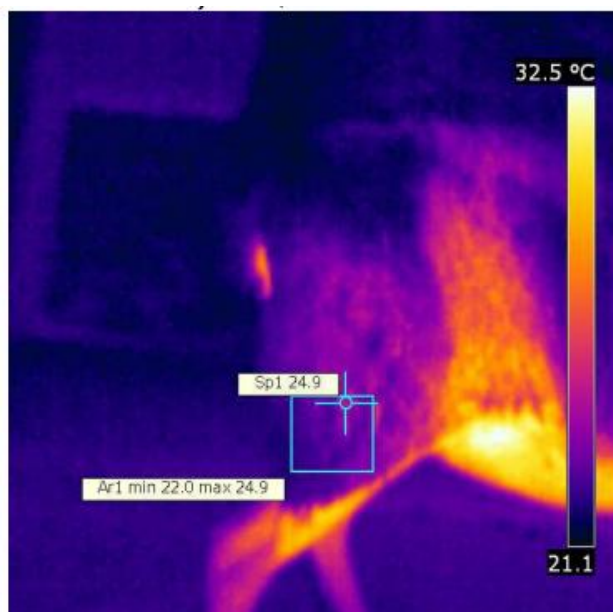
WILLS-KARP, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 175-190, 2004.

WRIGHT, K.J.; BALAJI, R.; HILL, G.M.; DRITZ, S.S.; KNOPPEL, E.L.; MINTON, J.E. Integrated adrenal, somatotropic, and immune responses of growing pigs to treatment with lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 7, p. 1892-1899, 2000.

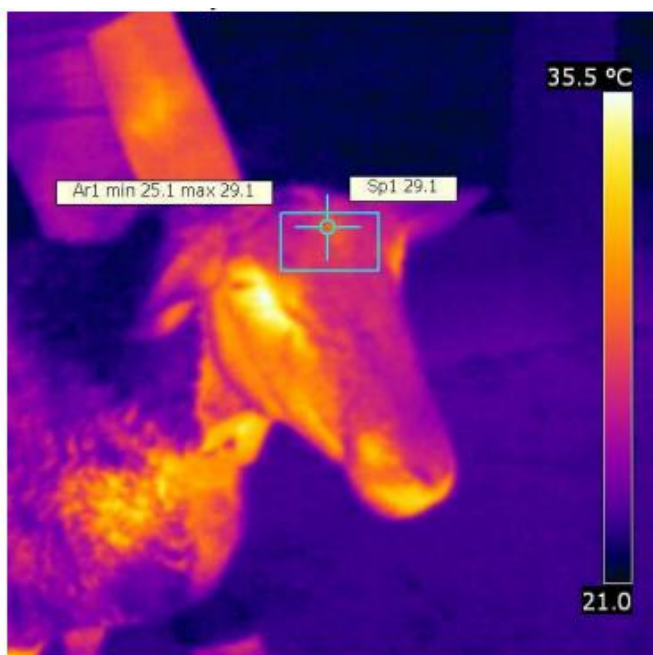
YOU, Q.; KARROW, N.A.; CAO, H.; RODRIGUEZ, A.; MALLARD, B.A.; BOERMANS, H.J. Variation in the ovine cortisol response to systemic bacterial endotoxin challenge is predominantly determined by signalling within the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 230, n. 1, p. 1-8, 2008.

ZANDI, E.; ROTHWARF, D.M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK- $\alpha$  and IKK- $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 243-252, 1997.

## IX. ANEXO



Animal 5 - 12 Horas - Face externa da coxa. Temperatura 24,9°C. Sendo a variação de 22,1 a 24,9°C.



Animal 1 - 12 Horas - Frente. Temperatura máxima 29,1°C. Sendo a variação de 25,1 a 29,1°C.