



UnB

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

Efeito de inibidores de proteínas quinases sobre a resposta febril e a expressão de proteínas em ratos

Marina Firmino da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

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

Brasília, julho de 2013



UnB

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

Marina Firmino da Silva

Dissertação de Mestrado

Efeito de inibidores de proteínas quinases sobre a resposta febril e a expressão de proteínas em ratos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

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

Brasília, julho de 2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me ampara, me sustenta e me guia sempre.

Ao meu orientador Prof. Marcelo, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa. Agradeço o exemplo, à paciência despendida comigo, e à oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Agradeço de coração à Profa. Fabiane, pela co-orientação, pelo apoio desde o início, pelos ensinamentos, por toda a ajuda direta e indireta, e principalmente por toda a paciência com minha ansiedade e nervosismo! Serei eternamente grata por toda a sua atenção comigo!

À Profa Márcia Renata Mortari, por me permitir realizar as cirurgias em seu laboratório. Agradeço também a todos os colegas do laboratório de Neurofarmacologia pelo tratamento dispensado comigo.

À Renaide e à Vanessa, funcionárias do biotério da Universidade de São Paulo pelo fornecimento dos animais, ao Luiz, por todas as guias de transporte fornecidas as pressas.

À Zélia Madeira e ao prof. Ricardo Bentes, pelo auxílio no transporte dos animais.

Ao veterinário do biotério José Jivago e à funcionária Adriana por abrigarem e cuidarem dos nossos ratos.

À todos os colegas, professores e colaboradores do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço com carinho a todos pelas trocas de experiência, e pela convivência.

Em especial, à Bruna e ao Guilherme por toda ajuda e companheirismo. Ao Agenor pela amizade antiga. À Simone, pelo conhecimento repassado, por ter me ajudado MUITO quando eu precisei, pelos “357 mil blots!” e além de toda ajuda, agradeço por ter se tornado uma amiga muito especial. Ao Jaques pelas milhares de consultas que fiz, além do carinho e solicitude. À Micaella que conquistou minha amizade e fez por mim o que só amigos de

verdade fazem uns pelos outros. Micaella, Jaques e Simone não têm palavras para agradecer e demonstrar o quanto vocês são importantes para mim. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Carlos André, pela amizade e por ter me ajudado nas dicas valiosas sobre o *western blotting*!

Ao Professor Bergman por permitir a utilização do aparelho ImageQuant em seu laboratório, e ao Fabrício por ajudar na utilização do mesmo com paciência e solicitude!

À minha família. Aos meus pais, Márcia e Carlos André, que jamais mediram esforços para me darem aquilo que jamais alguém conseguirá me roubar: meus estudos! À minha irmã Gabriela pelo apoio sempre! Obrigada por me apoiarem e por acreditarem que um dia eu chegaria lá! Amo vocês mais do que tudo nesta vida!

Ao meu amor, meu companheiro, meu porto seguro, minha vida, Diego. Muito obrigada por me apoiar, por cuidar de mim e por compreender o abandono em que tenho te deixado às vésperas do nosso casamento. Te amo muito e para sempre!

Ao programa REUNI/CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

A febre é definida como o aumento da temperatura corporal que ocorre como parte da resposta de fase aguda desencadeada após a invasão de um organismo por agentes estranhos. O LPS (lipopolissacarídeo) é um potente indutor de febre, frequentemente utilizado em estudos sobre respostas inflamatórias e febris. Alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento de vias de sinalização dependentes de proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) no desenvolvimento da febre. Neste estudo, investigamos o efeito de inibidores de PKA (H-89) e PKC (celeritrina) sobre a resposta febril induzida por LPS. Analisamos ainda alterações da expressão e atividade destas quinases em resposta aos diferentes tratamentos, 3 e 6 h após a injeção do estímulo pirogênico. Os resultados demonstraram que celeritrina (3 µg/rato) e H-89 (10 µg/rato) reduziram a resposta febril induzida pela injeção iv de LPS (5 µg/Kg) em 36 % e 33,1 %, respectivamente. A administração conjunta de celeritrina e H-89 também reduziu a resposta febril induzida por LPS; entretanto, o efeito inibitório verificado (31,2 %) não foi maior do que o observado após a administração isolada de cada droga. Após os experimentos farmacológicos, os animais foram eutanasiados e tiveram seus hipotálamos dissecados para as análises de expressão e atividade. A análise por *western blotting* não foi capaz de detectar alterações da expressão de PKCε 3 h após a injeção do LPS, tampouco de PKA nos dois tempos analisados. A expressão de PKCε 6 h após a injeção do estímulo pirogênico apresentou-se aumentada nos animais tratados com H-89, sugerindo que, na ausência da ativação de PKA, vias dependentes de PKCε sejam ativadas como mecanismo compensatório. A análise da atividade foi realizada por meio de kits comerciais de ELISA para medir a fosforilação de um substrato realizada por quinases. Não foram encontradas mudanças significativas nos padrões de atividade para nenhuma das proteínas testadas, o que pode ser devido à baixa especificidade do método, visto que o substrato utilizado no ensaio pode ser fosforilado por todas as isoformas de PKA e PKC. Os dados desse trabalho sugerem que vias de sinalização dependentes de PKA e PKC estejam envolvidas na resposta febril induzida por LPS, porém, métodos mais específicos para análise destas enzimas são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos.

Palavras-chave: febre; celeritrina; H-89; expressão proteica; atividade enzimática.

ABSTRACT

Fever is defined as the increase in body temperature that occurs as a component of the acute phase response triggered after invasion of pathogens in the body. Lipopolysaccharide (LPS) is a potent inducer of fever, often used in studies assessing the inflammatory and febrile responses. Some studies have suggested the involvement of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC)-dependent signaling pathways in the development of fever. We investigated the effect of PKA and PKC inhibitors, H-89 and celeritrin respectively, on the febrile response induced by LPS. We also analyzed changes in the expression and activity of these kinases in response to different treatments, 3 and 6 h after the pyrogenic stimulus injection. The results showed that celeritrin (3 mg/rat) and H-89 (10 mg/rat) reduced the febrile response induced by LPS (5 mg/kg, iv) in 36% and 33.1%, respectively. Co-administration of celeritrin and H-89 also reduced the LPS-induced febrile response; however, the inhibitory effect observed (31.2%) was not more effective than that observed after administration of each drug separately. After pharmacological experiments, animals were euthanized, and their hypothalami were dissected for kinases expression and activity analyses. Western blot analyses did not exhibit changes in neither PKC ϵ expression 3 h after LPS injection nor PKA levels in both periods investigated. The expression of PKC ϵ 6 h after injection of pyrogenic stimulus was increased in H-89 treated animals, suggesting that PKC ϵ -dependent pathways are activated as a compensatory mechanism in the absence of PKA activation. The enzymatic activity analysis was performed using commercial ELISA kits specific for measuring substrate phosphorylation mediated by kinases. There were no significant changes in the patterns of activity for any tested enzymes, which may be due to low specificity of the method since the substrates employed in the assays can be phosphorylated by all PKC or PKA isoforms. Data from the present study suggest that PKA and PKC-dependent signaling pathways may be involved in the febrile response induced by LPS, although more specific methods are needed to analyze such enzymes in order to elucidate their involvement in fever molecular mechanisms.

Key-words: fever; celeritrin; H-89; protein expression; enzymatic activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 TERMORREGULAÇÃO, FEBRE E HIPOTÁLAMO.....	11
1.2 PIRÓGENOS EXÓGENOS E ENDÓGENOS	14
1.3 PGE ₂ E VIAS DE SINALIZAÇÃO	17
1.4 PROTEÍNAS QUINASES.....	18
1.4.1 PROTEÍNA QUINASE C (PKC).....	18
1.4.2 PROTEÍNA QUINASE A (PKA)	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS	24
3.2 DROGAS.....	24
3.3 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL.....	25
3.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE CÂNULAS NO VENTRÍCULO LATERAL	25
3.5 AFERIÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS	27
3.6 EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS	27
3.7 DISSECAÇÃO DO HIPOTÁLAMO.....	29
3.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	29
3.9 IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOTTING.....	29
3.10 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PKC E PKA.....	30
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS.	32
4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CELERITRINA, UM INIBIDOR DE PKC, SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE LPS EM RATOS.	33

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE H-89, UM INIBIDOR DE PKA, SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE LPS EM RATOS.	36
4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CONJUNTA DE CELERITRINA E H-89 SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO IV DE LPS EM RATOS	39
4.5 PERFIL DA EXPRESSÃO DE PKA E PKCE NO HIPOTÁLAMO DE RATOS CONTROLE E TRATADOS COM H-89 OU CELERITRINA.....	42
4.6 PERFIL DA ATIVIDADE DA PKA E DA PKC NO HIPOTÁLAMO DE RATOS CONTROLE E TRATADOS COM H-89 OU CELERITRINA.....	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES.....	52
7. PERSPECTIVAS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regulação da temperatura corporal pela apoha.	12
Figura 2: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos na APOHA.....	14
Figura 3: Desenho esquemático da estrutura do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)...	15
Figura 4: Representação esquemática da ligação do LPS ao receptor TLR4.....	16
Figura 5: Representação esquemática das isoformas de PKC, estrutura e classificação.:	19
Figura 6: Representação esquemática da estrutura de PKA, subunidades regulatórias e catalíticas.....	21
Figura 7: Cérebro de rato injetado com corante azul de Evans.....	26
Figura 8: Efeito da injeção de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal de ratos.....	33
Figura 9: Efeito da injeção central de Celeritrina 1 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	34
Figura 10: Efeito da injeção central de Celeritrina 3 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	35
Figura 11: Efeito da injeção central de Celeritrina 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	35
Figura 12: Efeito da injeção central de diferentes doses de Celeritrina sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	36
Figura 13: Efeito da injeção central de H-89 3 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	37
Figura 14: Efeito da injeção central de H-89 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	38
Figura 15: Efeito da injeção central de H-89 30 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	38
Figura 16: Efeito da injeção central de diferentes doses de H-89 sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	39
Figura 17: Efeito da administração conjunta de Celeritrina e H-89, sobre a resposta febril induzida pela injeção iv de LPS em ratos.....	40
Figura 18: Efeito da injeção central de Celeritrina 3 µg/rato e H-89 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.	41
Figura 19: Análise por <i>western blotting</i> da expressão de PKCε (80 KDa).	42
Figura 20: Análise por <i>western blotting</i> da expressão de PKA (42 KDa).	43
Figura 21: Atividade relativa de PKC no hipotálamo.	44
Figura 22: Atividade relativa de PKA no hipotálamo.	45
Figura 23: Modelo de sinalização intracelular proposto para o desenvolvimento da febre LPS.	49

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – análise de variância de uma via
- APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior
- ASC – área sob a curva
- ATP – trifosfato de adenosina
- cAMP – 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate
- CD14 – *CD14 monocyte differentiation antigen*
- CEL - celeritrina
- COX – ciclooxigenases
- cPGES – prostaglandina E sintase citosólica
- CRH – hormônio liberador de corticotropina
- DAG – diacilglicerol
- DTT – *DL-Dithiothreitol*
- ECL – *enhanced luminol-based chemiluminescent substrate*
- EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EP – *prostanoid receptor*
- Epac – proteína de troca ativada diretamente pelo cAMP
- EPM – erro padrão da média
- GDP – difosfato de guanina
- GTP – trifosfato de guanina
- h – hora
- H-89 - *N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide*
- Hepes – *4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid*
- HPA – eixo hipotálamo hipófise adrenal
- HRP-linked – *horseradish peroxidase linked*
- icv – intracerebroventricular
- IL-1 β – interleucina 1 β
- IL-1ra – antagonista do receptor de IL-1
- IL-6 – interleucina 6
- ip – intraperitoneal

iv – intravenosa

KCL – cloreto de potássio

kDa – quilodalton

Kg - quilogramas

LBP – *LPS binding protein*, proteína ligadora de LPS

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

LPS – lipopolissacarídeo

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MD-2 – *MD-2 protein lymphocyte antigen 96*

MDP – muramil-dipeptídeo

min – minutos

mL – mililitros

mPGES – prostaglandina E sintase microssomal

nm – nanômetros

PG – prostaglandina

PGE₂ – prostaglandina E₂

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PLA₂ – fosfolipase A₂

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

siRNA – RNA de interferência

SNC – sistema nervoso central

TLR-4 – *toll-like receptor 4*

TNF- α – fator de necrose tumoral α

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

μ l – microlitros

μ g – microgramas

1. INTRODUÇÃO

1.1 TERMORREGULAÇÃO, FEBRE E HIPOTÁLAMO

A febre é uma importante resposta comandada pelo cérebro, que ocorre como parte da reação de fase aguda durante processos infecciosos e inflamatórios. Trata-se de um componente da complexa estratégia de defesa organizada pelo sistema imune quando o corpo humano é invadido por agentes estranhos, de natureza infecciosa ou não (ZEISBERGER, 1999).

O hipotálamo, mais precisamente a área pré-óptica do hipotálamo anterior, (APOHA) é uma importante estrutura neural responsável pela regulação da temperatura corporal, capaz de detectar variações sutis da temperatura central e periférica. As evidências sobre a importância da APOHA na termorregulação são oriundas de estudos envolvendo estimulação térmica do hipotálamo por meio do implante de termódios. Estes aparelhos podem ser perfundidos com água quente ou fria permitindo pequenas variações de temperatura na área de interesse (BOULANT, 2000).

A utilização das técnicas de estimulação térmica por meio de termódios aliada ao uso de microeletrodos para registrar a atividade de neurônios individuais foi capaz de descrever três tipos básicos de neurônios hipotalâmicos. Esses neurônios são classificados de acordo com a frequência de disparos em diferentes temperaturas. Em torno de 30% dos neurônios são classificados como sensíveis ao calor, visto que sua frequência de disparos elétricos aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura da APOHA. Aproximadamente, 5 % dos neurônios são classificados como sensíveis ao frio, os quais têm a frequência de disparos aumentada durante o resfriamento da APOHA. No entanto, a maioria (60 %) dos neurônios desta região são insensíveis às mudanças de temperatura, ou seja, não alteram suas taxas de disparo durante o aquecimento ou resfriamento da APOHA (**Figura 1**) (BOULANT, 2000, 2006).

Por outro lado, a caracterização neuronal de acordo com a sensibilidade a diversos fatores endógenos demonstrou que a maioria dos neurônios termossensíveis são também sensíveis à variação de osmolaridade, bem como à variação dos níveis de glicose e esteroides no sangue. Sendo assim, o fato de um neurônio ser sensível à temperatura não garante a sua

participação funcional na termorregulação. Estes estudos enfatizam ainda a complexidade das interações entre os diferentes sistemas regulatórios (BOULANT & DEAN, 1986).

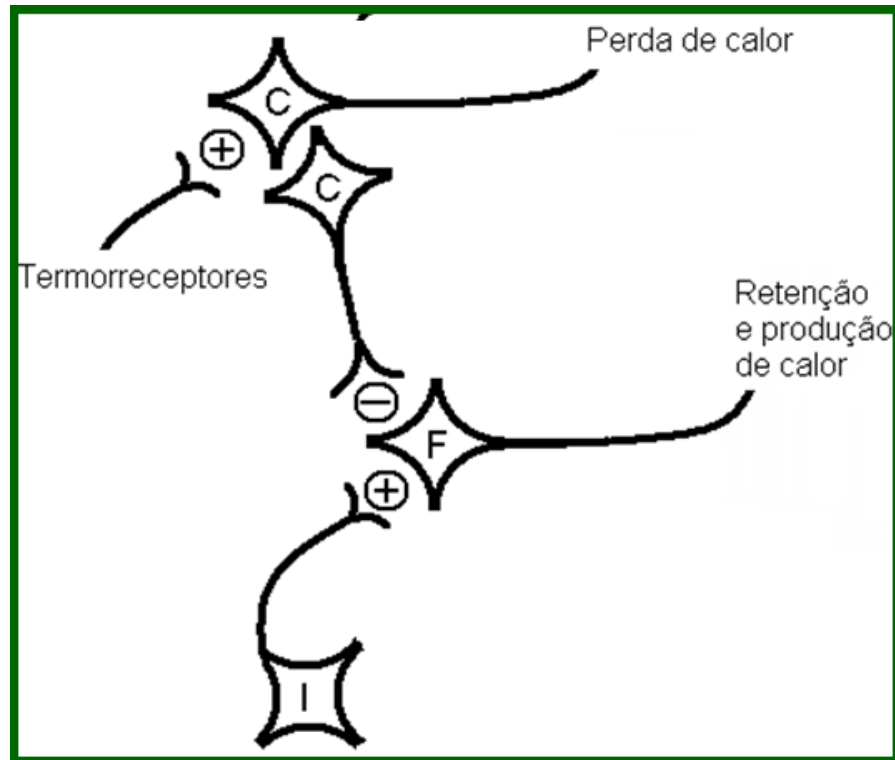


Figura 1: Regulação da temperatura corporal pela APOHA. C – neurônios sensíveis ao calor; F – neurônios sensíveis ao frio; I – neurônios insensíveis às variações de temperatura. (+) estimulação; (-) inibição. Adaptado de: BOULANT, 2000.

O trato espinotalâmico lateral é uma importante via ascendente responsável por transmitir informações a partir de termorreceptores na pele e medula espinhal para vários núcleos na formação reticular do tronco cerebral. Em seguida, essas informações são transmitidas aos neurônios termossensíveis na APOHA. Acredita-se que esses neurônios funcionem como integradores das informações térmicas centrais e periféricas (BOULANT, 2000). Desta forma a área pré-óptica se comunica com áreas efetoras, desencadeando os procedimentos termorregulatórios apropriados para diminuir ou aumentar a temperatura corporal. Em estudos de estimulação térmica, o resfriamento da APOHA inicia mecanismos de retenção de calor, entre os quais estão vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais de conservação de calor. De maneira oposta, o aquecimento provoca

vasodilatação cutânea, sudorese e várias respostas comportamentais que favorecem a perda de calor. Os termorreceptores podem estimular os neurônios sensíveis ao calor, favorecendo respostas de perda de calor. Quando estimulados, estes neurônios são capazes de inibir respostas de conservação de calor através da inibição dos neurônios sensíveis ao frio, impedindo desta forma o aumento da temperatura corporal. Os neurônios insensíveis às variações de temperatura podem estimular os neurônios sensíveis ao frio levando ao aumento da temperatura corporal. Estes mecanismos atuam em conjunto com o objetivo de manter a temperatura corporal em torno de 37°C (**Figura 1**) (BOULANT, 2000). Dados da literatura demonstram que a regulação de temperatura corporal pela APOHA, baseia-se na existência de um mecanismo similar a um termostato, que foi denominado de ponto de regulação térmico (BOULANT, 1998, 2000; BOULANT & DEAN, 1986).

A hipertermia ocorre quando a produção ou ganho de calor é superior à capacidade do corpo de perder este calor, sendo que estes desequilíbrios térmicos podem ocorrer por diversos motivos como, por exemplo, pelo aumento da temperatura externa ou produção excessiva de calor (DINARELLO et al., 1988; ROTH et al., 2009). Cabe ressaltar que, nesta condição, o ponto de regulação hipotalâmico não é alterado.

Durante a febre, por outro lado, os pirógenos alteram a frequência de disparo dos neurônios que regulam a temperatura corporal na APOHA, de forma que o ponto de regulação é alterado para valores superiores de temperatura. Essa alteração ativa respostas termorregulatórias de produção e conservação do calor como, por exemplo, aumento no metabolismo do tecido adiposo marrom, vasoconstrição, piloereção e alterações comportamentais (ROTH et al., 2009). Na resposta febril, os pirógenos inibem os neurônios sensíveis ao calor impedindo o desenvolvimento de respostas de perda de calor. Através dos neurônios insensíveis às variações de temperatura, os pirógenos estimulam os neurônios sensíveis ao frio a desenvolverem respostas de produção e retenção de calor, levando desta forma ao aumento da temperatura corporal (**Figura 2**) (BOULANT, 2000).

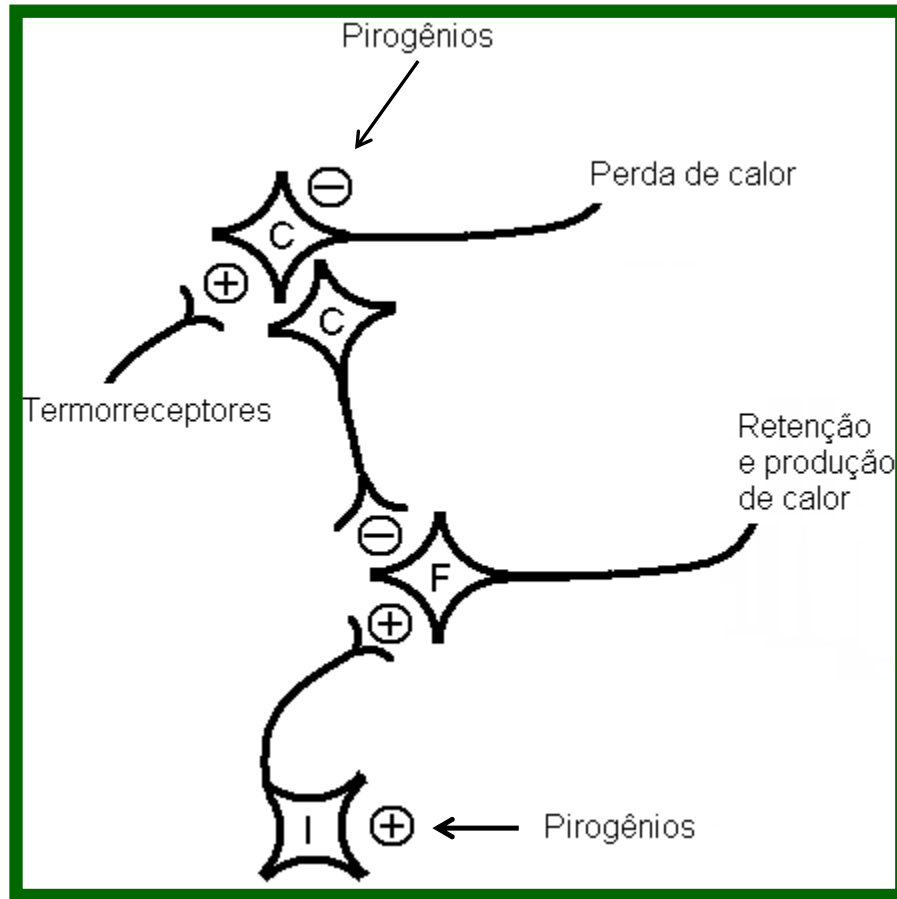


Figura 2: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos na APOHA. C – neurônios sensíveis ao calor; F – neurônios sensíveis ao frio; I – neurônios insensíveis às variações de temperatura. (+) estimulação; (-) inibição. Adaptado de: BOULANT, 2000.

1.2 PIRÓGENOS EXÓGENOS E ENDÓGENOS

Os pirógenos são substâncias consideradas indutores primários da febre e podem ser classificados em exógenos e endógenos. Os pirógenos exógenos geralmente compreendem microorganismos e seus subprodutos, porém qualquer estímulo capaz de induzir uma resposta inflamatória e consequentemente levar à febre pode ser considerado um pirógeno exógeno (ROTH & DE SOUZA, 2001; SOUZA, 2004; ZEISBERGER, 1999). Os pirógenos endógenos são produzidos pelo organismo e liberados na corrente sanguínea após a estimulação do mesmo por pirógenos exógenos. Os principais pirógenos endógenos são as citocinas e os eicosanóides (DINARELLO, 2004).

Diversos componentes, tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas são pirogênicos como, por exemplo, peptidoglicanos, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS),

muramil-dipeptídeo (MDP), dentre outros. No entanto, quando se trata de modelos experimentais de febre, o LPS é o pirógeno exógeno mais conhecido e mais frequentemente utilizado. Seus efeitos são mais uniformes do que os observados com bactérias vivas e atualmente é comercializado em formas altamente purificadas (ZEISBERGER, 1999).

O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, composto por um domínio hidrofóbico, o lipídio A (também conhecido como endotoxina), um oligossacarídeo central e um polissacarídeo distal (**Figura 3**). Os componentes central e distal contribuem para manutenção da integridade e viabilidade da bactéria, ajudando-a a resistir a ação de antibióticos, aos ataques do sistema imune e a outros estresses ambientais (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; RAETZ & WHITFIELD, 2002).

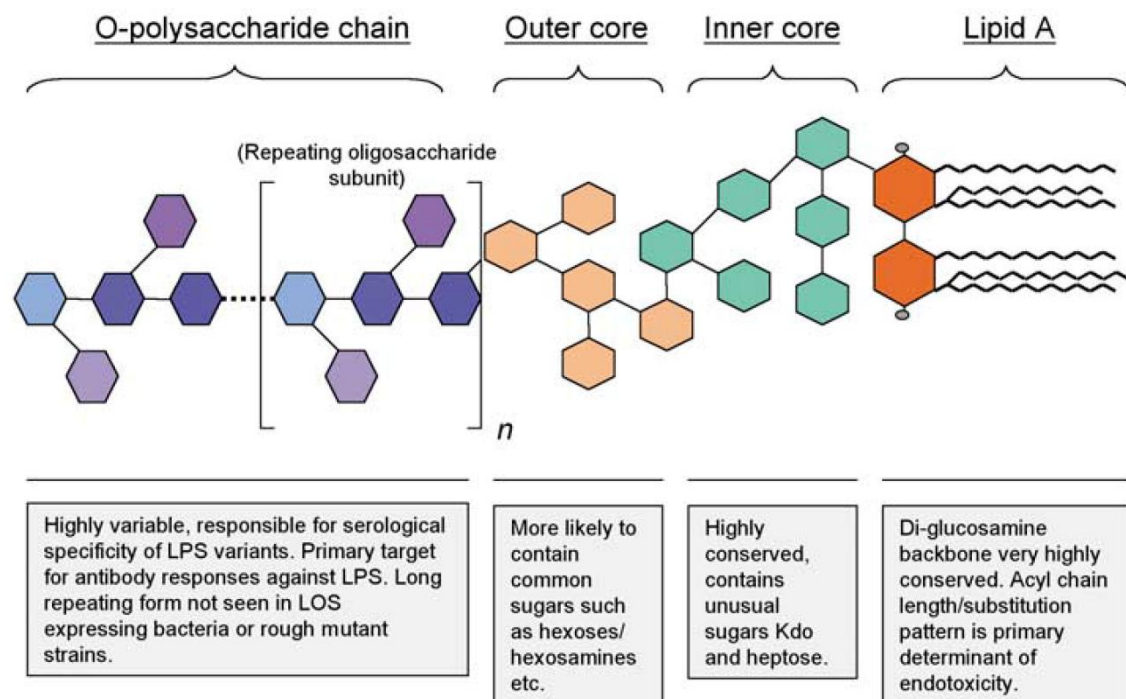


Figura 3: Desenho esquemático da estrutura do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Fonte: ERRIDGE et al., 2002.

O lipídio A, altamente conservado, é o componente responsável pela pirogenicidade do LPS. O sistema imune inato reconhece o LPS através de um sistema sensor presente em macrófagos e células endoteliais. Este sistema sensor é composto por uma proteína plasmática de ligação ao LPS (LBP); um receptor de superfície CD14; uma proteína adaptadora MD-2 e

um receptor transmembranar de transdução de sinal, o TLR-4 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; CARTMELL & MITCHELL, 2005; ROTH et al., 2009) (**Figura 4**). Por meio desta sinalização, os macrófagos são estimulados a desenvolver uma resposta imune adaptativa baseada na produção de mediadores inflamatórios, tais como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (SOUZA, 2004).

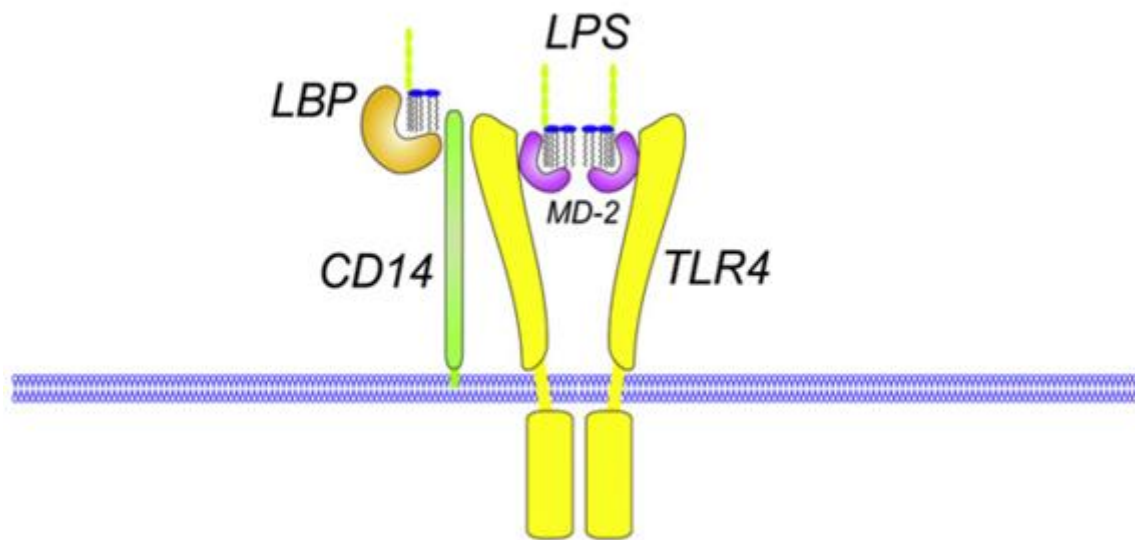


Figura 4: Representação esquemática da ligação do LPS ao receptor TLR4. LPS – Lipopolissacarídeo; LBP – Proteína plasmática de ligação ao LPS; CD14- Receptor de superfície; MD-2 – Proteína adaptadora; TLR-4 - Receptor transmembranar de transdução de sinal. Adaptado de LU; YEH; OHASHI, 2008.

Quando ativados os macrófagos e outros tipos de células mononucleares e polimorfonucleares são, capazes de sintetizar diversas proteínas solúveis e peptídeos, que pertencem, em sua maioria, à classe das citocinas.

As citocinas possuem um papel modulador sobre as atividades funcionais de células e tecidos. Geralmente, atuam no local onde foram produzidas. Entretanto, quando o estímulo é intenso ou persistente, ocorre uma produção exacerbada desses mediadores, de forma que podem chegar a corrente sanguínea e ser rapidamente transportados para diversas áreas do corpo. A injeção central ou periférica de LPS e de outros pirógenos exógenos e endógenos induz a síntese, na APOHA, das três principais citocinas pirogênicas, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 (DANTZER & KELLEY, 2007; KLUGER, 1991 LUHESHI & ROTHWELL, 1996; ROTH et

al., 2009). As atividades biológicas das citocinas são mediadas pela ligação a receptores de membrana específicos que podem ser expressos em diferentes tipos celulares e tecidos (ROTH et al., 2009; ZEISBERGER, 1999).

A administração periférica de: antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), receptor solúvel para o TNF ou anticorpo anti-IL-6 reduz a resposta febril induzida por LPS em ratos, confirmando a importância dessas citocinas para o desenvolvimento da febre (HARDEN et al., 2006; LUHESHI et al., 1996; ROTH et al., 1998).

Apesar da inequívoca participação das citocinas na gênese da febre, diversos estudos demonstram que as respostas febris produzidas por pirógenos, sejam eles exógenos ou endógenos, dependem da ação central de prostaglandinas (PGs), principalmente a PGE₂, considerada o mediador final da febre (BLATTEIS & SEHIC, 1997; COCEANI & AKARSU, 1998; MILTON & WEDLANDT, 1971; ROTH et al., 2009).

1.3 PGE₂ E VIAS DE SINALIZAÇÃO

As enzimas ciclooxigenases (COX) e PGE sintases (PGES) são responsáveis pela síntese de PGE₂ a partir do ácido araquidônico. Este, por sua vez, é liberado pela ação da fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidos das membranas celulares. São conhecidas pelo menos três isoformas de COX: COX-1 - expressa constitutivamente em diversos tipos celulares; COX-2 - induzida em resposta a vários estímulos pirogênicos, por exemplo, LPS; e COX-3, considerada uma variante da COX-1, pois é oriunda do mesmo gene (BREDER & SAPER, 1996; CAO et al., 2001; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

A expressão de COX-2 aumenta consideravelmente durante a inflamação ou outras condições patológicas (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Acredita-se que essa seja a isoforma envolvida na resposta febril, pois sua inibição reduz a febre induzida por diferentes estímulos (CAO et al., 1997). Alguns fármacos antiinflamatórios como o celecoxibe, por exemplo, têm seu mecanismo de ação baseado na inibição desta enzima (CHAN et al., 1995; SEIBERT & MASFERRER, 1994).

Foram identificadas duas isoformas de PGE sintase, uma associada à membrana (mPGES) e outra citosólica (cPGES). A PGES microsomal é induzida em resposta à

estimulação por IL-1 β e possui ligação funcional com COX-2 (MURAKAMI et al., 2000 ; THOREN & JAKOBSSON, 2000).

As PGs exercem seus efeitos biológicos pela ligação a receptores específicos. A ação de PGE₂ pode ser mediada pela ligação a vários subtipos de receptores EP(1-4). Estes receptores pertencem a classe de receptores acoplados a proteína G, e são capazes de se ligar a diferentes mensageiros intracelulares e assim mediar inúmeras respostas celulares (BREYER et al., 2001; COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

O receptor EP3 é abundantemente expresso na área pré-óptica de ratos (EK et al., 2000). Acredita-se que tal receptor esteja envolvido na resposta febril, uma vez que agonistas de EP3 são capazes de mimetizar a resposta febril (PARROTT & VELLUCCI, 1996).

Os demais subtipos de receptores EP também podem ser encontrados no cérebro (HOSOI et al., 1999; ZHANG & RIVEST, 1999). Oka e colaboradores (2000) demonstram que neurônios expressando o receptor EP4 são ativados durante a febre induzida por LPS e sugerem, portanto, o envolvimento destes receptores na produção da febre. Diversos estudos farmacológicos demonstram que os receptores EP1 também podem ser importantes para resposta febril e analgesia (HOSOI et al., 1999; OKA K., OKA T., HORI, 1998; USHIKUBI et al., 1998). Apesar de EP2 ser expresso em várias estruturas do SNC, pouco se sabe a respeito da sua importância para respostas inflamatórias (ZHANG & RIVEST, 1999).

Acredita-se que a sinalização desencadeada pela ligação de PGE₂ aos seus respectivos receptores envolva a participação de proteínas quinases, por exemplo, PKA e PKC (SACHS et al., 2009). Kassuya e colaboradores (2007) demonstraram através de análises por *western blotting* que PKA e PKC são responsáveis pela alodinia (sensação dolorosa causada por estímulo normalmente não doloroso) mecânica induzida por PGE₂ em camundongos.

1.4 PROTEÍNAS QUINASES

1.4.1 PROTEÍNA QUINASE C (PKC)

A família da proteína quinase C (PKC) é composta por fosfotransferases dependentes de serina/treonina. As isoformas de PKC são estruturalmente relacionadas, mas possuem padrões distintos de distribuição e função nos tecidos. São subdivididas em três grupos com base em suas estruturas primárias e propriedades bioquímicas: 1) convencional ou clássicas

(cPKC), que incluem PKC α , β I, β II e γ ; 2) novas (nPKC) representadas pelas PKC δ , ϵ , η e θ ; e 3) atípicas (aPKC) PKC ζ e λ (NISHIZUKA, 1992).

As PKCs convencionais apresentam em sua porção amino-terminal duas regiões conservadas denominadas C1 e C2, que desempenham um papel crítico na regulação da atividade enzimática. O domínio C1 contém um sítio de ligação para diacilglicerol (DAG) e ésteres de forbol, enquanto que o domínio C2 contém um sítio de ligação ao cálcio. Nas isoformas novas e atípicas, observa-se a ausência da região C2. Já a porção carboxi-terminal apresenta duas regiões altamente conservadas em todas as isoformas de PKC: a região C3, que contém a sequência consenso para ligação do ATP e a região C4, responsável pela ligação da proteína ao substrato (**Figura 5**). Quando ocorre a estimulação celular, a PKC citosólica e frequentemente translocada para a membrana plasmática, algumas vezes pode também se deslocar para o núcleo, exercendo assim sua atividade catalítica. No entanto, a associação de PKC com a membrana plasmática nem sempre reflete o estado de ativação da enzima (NISHIZUKA, 1995).

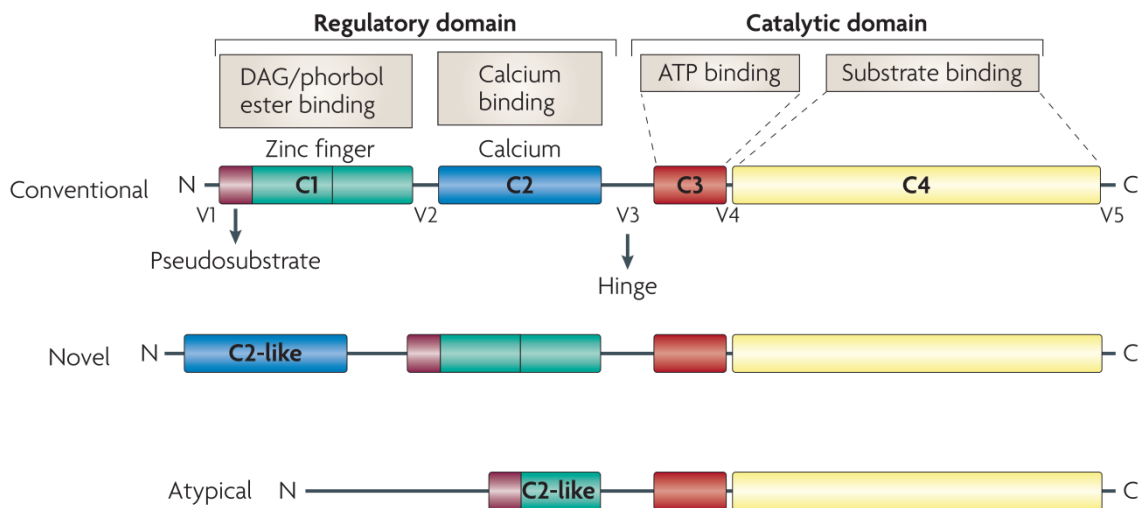


Figura 5: Representação esquemática das isoformas de PKC, estrutura e classificação. Fonte: MACKAY & TWELVES, 2007.

O envolvimento de PKC na resposta febril foi demonstrado pela primeira vez por Kozak e colaboradores em 1997. Os autores utilizaram dois inibidores de PKC, com diferentes constantes de inibição, e verificaram que o pré-tratamento (via subcutânea) com

esses inibidores reduziu tanto a febre, quanto o aumento da concentração plasmática de IL-6 induzida pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos.

Estudo realizado por Thaler e colaboradores (2009) demonstrou a participação de aPKC na febre induzida por LPS. Observou-se aumento na expressão de aPKC no hipotálamo após a injeção sistêmica de LPS. Ao utilizar um inibidor específico de aPKC, demonstrou-se que a ativação neuronal e a produção de citocinas hipotalâmicas requer a atividade dessa isoforma. Em culturas de neurônios hipotalâmicos, também se observou que a ação de LPS em ativar genes alvo do fator de transcrição nuclear NK- κ B também é dependente de aPKC (LEITGES et al., 2001).

Além disso, estudos *in vitro* utilizando mastócitos e astrócitos demonstraram redução na expressão de IL-6 e IL-1 após a incubação com inibidores específicos de PKC (HAHN & MORONI, 1994; NORRIS et al., 1994). Dados da literatura têm demonstrado a importância da PKC em modelos de dor e inflamação. Dentre as diversas isoformas existentes, PKC ϵ tem se destacado quando se trata da sinalização envolvendo PGE₂ como estímulo. Zhou, Li e Zhao (2003) demonstraram que a fosforilação de PKC ϵ em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal é aumentada em resposta a sensibilização aguda induzida por carragenina. De forma semelhante, a sensibilização mecânica induzida por epinefrina ou por dopamina em ratos é bloqueada pela inibição seletiva de PKC ϵ . (KHASAR, McCARTER, LEVINE, 1999; VILLARREAL et al., 2009).

1.4.2 PROTEÍNA QUINASE A (PKA)

A proteína quinase A (PKA) é uma fosfotransferase dependente de cAMP. Na sua forma inativa, a PKA é uma holoenzima formada por duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. Quando há o aumento intracelular de cAMP, duas moléculas de cAMP se ligam às duas subunidades regulatórias da PKA, promovendo a liberação das subunidades catalíticas e a ativação da proteína (TAYLOR; BUECHLER; YONEMOTO, 1990). Existem pelo menos dois tipos de PKA, tipo I e tipo II, sendo identificadas diferentes isoformas para as subunidades regulatórias (RI α ; RI β ; RII α ; RII β) e catalíticas (C α ; C β e C γ) (**Figura 6**). As subunidades α são expressas em diversos tecidos, incluindo o tecido neuronal, enquanto as subunidades β são expressas predominantemente em células neuronais (CADD & MCKNIGHT, 1989). Dados da literatura sobre a localização intracelular da PKA indicam que

PKA tipo I é encontrada predominantemente no citoplasma e PKA tipo II está principalmente associada com as membranas, organelas e citoesqueleto (ROBINSON-WHITE & STRATAKIS, 2002).

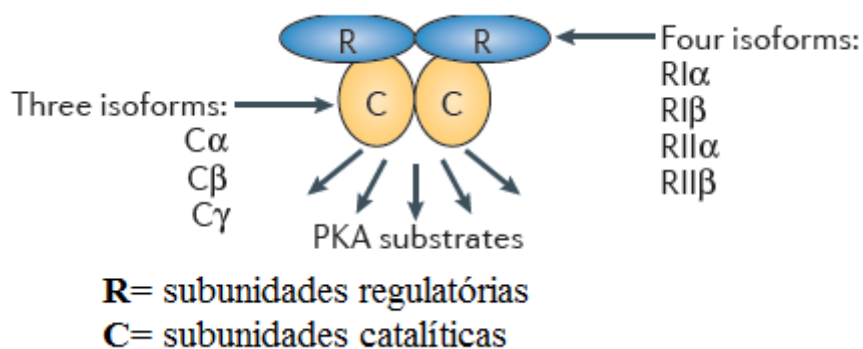


Figura 6: Representação esquemática da estrutura de PKA, subunidades regulatórias e catalíticas. Adaptado de TAYLOR et al., 2012.

A participação da PKA na febre foi descrita pela primeira vez por Wang e colaboradores em 2001. Os autores utilizaram o hormônio liberador de corticotropina (CRH) como estímulo pirogênico e verificaram que a administração central de CRH promoveu tanto a elevação da temperatura colônica quanto da concentração de cAMP no hipotálamo de ratos. A febre induzida por CRH foi inibida pelo pré-tratamento com inibidor de PKA, sugerindo um importante papel para a PKA nas ações pirogênicas do CRH.

Estudo realizado por Zhou e colaboradores (2006) demonstrou que a febre induzida pela administração icv de um agonista de receptor EP3 foi inibida pelo pré-tratamento com um inibidor de PKA e também com um inibidor de PKC, sugerindo o envolvimento de ambas as quinases no mecanismo de indução de febre por um agonista EP3.

Em modelos de dor e inflamação, foi demonstrado que a PKA participa da hipernocicepção inflamatória desenvolvida em resposta a administração de PGE₂ (ALEY & LEVINE, 1999; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999 MALMBERG et al., 1997). Sachs e colaboradores (2009), em estudo avaliando a participação da via da PKA na hipernocicepção mediada por PGE₂, demonstraram que o uso de inibidores tanto de cAMP quanto de PKA foram capazes de prevenir a hipernocicepção induzida pela PGE₂ de maneira dose

dependente. Kassuya e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação de cAMP, PKA e PKC pode ser detectada nas patas de camundongos injetados com PGE₂.

Na resposta febril, estudos realizados por OKA (2004) utilizando agonistas seletivos para receptores de PGs têm sugerido que os receptores EP1 e EP3 estejam envolvidos na ativação mediada por PGE₂. Dados da literatura demonstram ainda que PKA e PKC estão envolvidas na sinalização intracelular desencadeada pela interação de PGE₂ com seus receptores (KASSUYA, et al., 2007; SACHS et al., 2009). Entretanto, até o momento, pouco se sabe a respeito das vias de sinalização intracelulares desencadeadas durante a resposta febril induzida pela injeção iv de LPS. Alguns autores demonstraram a presença de PKCε no hipotálamo (KUO, et al., 2009) e em modelos de inflamação foi demonstrado que PGE₂ pode ativar PKCε (SACHS et al., 2009; VILLAREAL et al., 2009). Sendo assim, no presente estudo, investigou-se se esta isoforma de PKC também seria a isoforma relacionada à resposta febril e se PKA também desempenharia algum papel relevante nesta via de sinalização.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de PKA e de PKC na resposta febril induzida pela injeção iv de LPS, bem como analisar possíveis alterações na expressão e atividade dessas enzimas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do inibidor de PKA H-89 sobre a resposta febril induzida por LPS;
- Avaliar o efeito do inibidor de PKC, celeritrina, sobre a resposta febril induzida por LPS;
- Avaliar o efeito da administração conjunta dos inibidores H-89 e celeritrina sobre a resposta febril induzida pelo LPS;
- Analisar alterações da expressão de PKA e PKC ϵ em hipotálamos dissecados 3 e 6 h após a injeção do estímulo pirogênico em animais pré-tratados com salina, H-89 ou celeritrina;
- Analisar alterações da atividade de PKA e PKC em hipotálamos dissecados 3 e 6 h após a injeção do estímulo pirogênico em animais pré-tratados com salina, H-89 ou celeritrina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180 e 200 g. Os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em sala com temperatura e luminosidade controladas, sob 24 °C, ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso a ração e água. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Neurofarmacologia do IB/UnB e todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do IB/UnB, no período entre 8:00 e 18:00 h. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética no uso animal do IB/UNB sob o número 119943/2011 (Anexos).

3.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Inibidor de PKC: celeritrina (chelerythrine chloride C2932, Sigma Chem Co., St. Louis, EUA);
- Antibiótico: cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, São Paulo, Brasil);
- Antiinflamatório: dexametasona (Azium[®], Mantecorp Ind. Quím. e Farm. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil);
- Inibidor de PKA: H-89 (H-89 dihydrochloride hydrate B1427, Sigma Chem Co., St. Louis, EUA);
- Anestésicos: ketamina (Ketamin[®], Cristália, São Paulo, Brasil); lidocaína e fenilefrina (Novocol 100[®], S. S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil); xilazina (Calmiun[®], Agener União, São Paulo, Brasil).

- Estímulo pirogênico: LPS (endotoxina de *E. coli* 0111:B4, Sigma Chem Co., St. Louis, EUA);

3.3 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL

Anteriormente à cirurgia, transmissores (Subcue data loggers, Calgary, Canadá) foram desinfetados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min.). Os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina nas doses de 60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.. Após a tricotomia e assepsia da pele, uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos peritonais foi feita para inserir o transmissor, previamente lavado com solução salina estéril, na cavidade peritoneal. Em seguida, os músculos e a pele foram suturados separadamente.

3.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE CÂNULAS NO VENTRÍCULO LATERAL

Imediatamente após a cirurgia para implante dos transmissores de temperatura, procedeu-se o implante de cânulas no ventrículo lateral. Os animais foram tricotomizados, posicionados e fixados em aparelho estereotáxico (Insight, Ribeirão Preto, SP). Após a assepsia da pele da parte superior da cabeça, os animais receberam uma injeção local (subcutânea) de lidocaína 2% e fenilefrina 0,04% (0,2 mL), e uma incisão, de aproximadamente 1 cm foi feita para a exposição da calota craniana, a fim de permitir a introdução da cânula intracerebroventricular (icv). Os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e posterior implantação da cânula tendo o bregma como referência foram: -1,5 mm antero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm.

As cânulas esterilizadas, constituídas de um segmento de agulha hipodérmica BD-7, com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foram introduzidas no tecido cerebral

com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. Todas as coordenadas utilizadas foram determinadas com base no Atlas de Paxinos e Watson (1986).

A fixação das cânulas foi feita por meio de uma prótese de acrílico auto-polimerizável com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana. No final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de 0,1 mL de terramicina (10 mg/kg) e 0,1 mL de dexametasona (1 mg/kg) para uso veterinário. Os animais recém-operados foram mantidos nas caixas, sem restrição de água ou ração, em sala com temperatura controlada a 24°C, com ciclos claro/escuro (intervalos de 12 h), por no mínimo 7 dias, para recuperação pós-cirúrgica.

Para verificar o correto posicionamento das cânulas, doze ratos foram anestesiados com quetamina e xilazina (60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e receberam 5 µL de corante azul de Evans (25 mg/mL) no local correspondente à microinjeção. Após obtenção dos encéfalos, efetuou-se um corte frontal na região correspondente à localização da cânula e o local da microinjeção foi verificado macroscopicamente. Observamos que os ventrículos laterais, o terceiro ventrículo, e o centro do hipotálamo apresentavam-se corados, indicando que a cânula estava posicionada corretamente (**Figura 7**).



Figura 7: Cérebro de rato injetado com corante azul de Evans.

3.5 AFERIÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS

O processo de aferição da temperatura corporal foi realizado por transmissores implantados na cavidade peritoneal, como descrito anteriormente. Para a ambientação, os ratos permaneceram na sala experimental por pelo menos 12 h antes do início dos experimentos. Para os experimentos de febre, a temperatura corporal foi monitorada e registrada em intervalos de 15 min, com início da aferição 2 h antes dos experimentos, prosseguindo até 6 h após a injeção do estímulo pirogênico. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, com a sala experimental tendo sua temperatura controlada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (Gordon, 1990). A temperatura basal de cada animal foi determinada pela média das aferições 2 h antes de qualquer tratamento. O índice de febre foi calculado subtraindo-se o valor da temperatura basal das medidas individuais (registradas a cada 15 min) obtidas 30 min após a injeção do LPS até 6 h, período total de observação. Foi calculada a área sob a curva (ASC) para cada animal, usando para isto, o índice de febre expresso em unidades arbitrárias.

3.6 EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS

Experimento 1

Para determinar a dose mais apropriada do estímulo pirogênico (LPS) a ser usada nos experimentos, os ratos receberam injeções endovenosas de diferentes doses de LPS (0,5; 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou seu veículo (solução salina estéril 0,9 %, 2 mL/kg). A temperatura corporal dos ratos foi monitorada por meio de transmissores como descrito anteriormente. Seis horas após a administração do LPS os animais foram sacrificados para retirada dos transmissores.

Experimento 2

Após a escolha da dose de LPS a ser utilizada, diferentes doses de inibidores da PKA e da PKC foram avaliados quanto ao seu efeito antipirético. Os animais receberam celeritrina, um inibidor da PKC, nas doses de 1, 3 ou 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (dissolvida em 2 μL de solução salina estéril 0,9%), ou H-89, um inibidor da PKA, nas doses de 3, 10 ou 30 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (dissolvido em 2 μL de solução salina estéril 0,9%) ou veículo por via i.c.v, 30 min antes da administração de salina estéril (0,9%, 2 mL/Kg) ou LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ via endovenosa). Após a administração de LPS cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante 6 h. Em seguida, os animais foram decapitados para a dissecação do hipotálamo.

Após a seleção da dose de cada inibidor a ser usada nos experimentos seguintes, o procedimento experimental foi reproduzido. Neste grupo, os animais foram sacrificados no tempo intermediário de 3 h após a injeção de LPS, uma vez que neste período foi verificado o melhor efeito inibitório de ambas as drogas testadas.

Experimento 3

Para determinar se a administração conjunta de celeritrina e H-89 poderia potencializar o efeito antipirético observado com os resultados das administrações isoladas dos inibidores, os animais receberam uma injeção única (2 μL) de uma solução contendo celeritrina (3 $\mu\text{g}/\text{rato}$) e H-89 (10 $\mu\text{g}/\text{rato}$) ou solução salina estéril 0,9 %, 30 min antes da administração de LPS. Após a administração endovenosa de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou seu veículo (solução salina estéril 0,9 %), cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante 6 h, sendo decapitados após este período para a obtenção do hipotálamo.

3.7 DISSECAÇÃO DO HIPOTÁLAMO

Imediatamente após os experimentos farmacológicos, os animais foram decapitados e tiveram seus cérebros rapidamente retirados. Para dissecação do hipotálamo foram considerados os seguintes limites: borda anterior do quiasma óptico, borda anterior dos corpos mamilares e o sulco hipotalâmico lateral, com uma profundidade de 2 mm. Os hipotálamos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises bioquímicas.

3.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Os hipotálamos foram homogeneizados em aproximadamente 400 μL de tampão contendo HEPES 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,6 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; DTT 1 mM; Igepal 1%; 1 tablete de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e 1 tablete de inibidores de fosfatases (PhosSTOP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As amostras foram separadas em duas alíquotas, sendo acrescentado SDS 0,1 % em uma delas, para as análises de *western blotting*. A alíquota sem SDS foi utilizada nos testes de mensuração da atividade, visto que o SDS pode comprometer a atividade das quinases. As amostras foram centrifugadas a 150.000 g por 30 min a 4°C . As frações do sobrenadante contendo as proteínas totais foram coletadas e armazenadas a -80°C para posterior análise da expressão e atividade. A dosagem de proteínas das amostras foi realizada através do kit *Plus One 2D Quant Kit* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9 IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOTTING

Para a análise de imunodeteção, as amostras foram acrescidas de azul de bromofenol (5%). Alíquotas de 70 μg de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de

poliacrilamida 10% (para análise da PKC) ou 12% (para análise da PKA). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando tampão tris-glicina contendo metanol 20%, em cuba de transferência (Applied Biosystems, Foster City, CA). As membranas foram incubadas com solução de leite em pó desnatado 5% para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos por 1 h e em seguida incubadas *overnight* a 4°C com um dos seguintes anticorpos primários: rabbit anti-PKC ϵ (1:1000, Rheabiotech, SP, Brasil) ou rabbit anti-PKA (1:1000, Rheabiotech, SP, Brasil), diluídos na solução de bloqueio. Subsequentemente, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, anti-rabbit IgG, HRP-linked (1:1000, Cell Signaling Technology, USA). A imunoreatividade foi detectada pela emissão de luz por quimioluminescência (utilizando-se ECL - *enhanced luminol-based chemiluminescent substrate*). Os *blots* foram quantificados por análise de densitometria por meio do programa de análise de imagem ImageJ (National Institute of Mental Health, USA). As concentrações de proteínas foram normalizadas utilizando-se a β -actina como controle interno (1:1000, Rheabiotech, SP, Brasil).

3.10 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PKC E PKA

A atividade da PKA e PKC foi medida por meio do kit *PKA* ou *PKC kinase activity kit* (Enzo Life Sciences International Inc, Lause, Switzerland) baseado no método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), contendo microplacas pré-revestidas com substratos específicos para PKA e PKC. Neste ensaio, 30 μ L (3 μ g) de amostras foram pré-incubadas com ATP, para iniciar a reação, por 90 min, a 30°C. A reação foi interrompida pelo esvaziamento do conteúdo dos poços seguida da adição do anticorpo primário fosfoespecífico e do anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A intensidade da cor formada, medida a 450 nm, era diretamente proporcional à concentração de substrato fosforilado formado. A média da absorbância das amostras foi dividida pela quantidade total de proteína (μ g) usada e os dados foram apresentados como atividade relativa da PKA ou PKC.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). As comparações estatísticas foram efetuadas por análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida por teste de Bonferroni com a utilização do programa estatístico Prism 5.0. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LPS SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS.

Com o objetivo de padronizar a dose de LPS capaz de induzir resposta febril contínua e moderada, os animais receberam LPS por via intravenosa (iv) nas doses de 0,5; 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (**Figura 8**). Os animais do grupo controle receberam solução salina estéril (2 mL/Kg, iv). A análise de variância (ANOVA) de uma via demonstrou que a dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ não alterou significativamente a temperatura corporal dos animais. As doses de 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ promoveram aumento significativo na temperatura corporal, com perfil bifásico, iniciando-se cerca de 1,5 h após a injeção de LPS, alcançando o pico inicial de elevação por volta de 1,5 h e 2 h, respectivamente e o segundo pico, cerca de 4 h e 5 h, respectivamente, após a injeção. A febre persistiu até o final do período de observação (6 h). A administração de salina estéril no grupo controle não alterou a temperatura corporal dos animais (**Figura 8**). O índice de mortalidade dos animais foi inferior a 5 % do total de animais operados.

Após análise estatística dos dados, diferenças significativas não foram verificadas entre as respostas febris às doses de 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Por este motivo, a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ foi selecionada para os ensaios subsequentes.

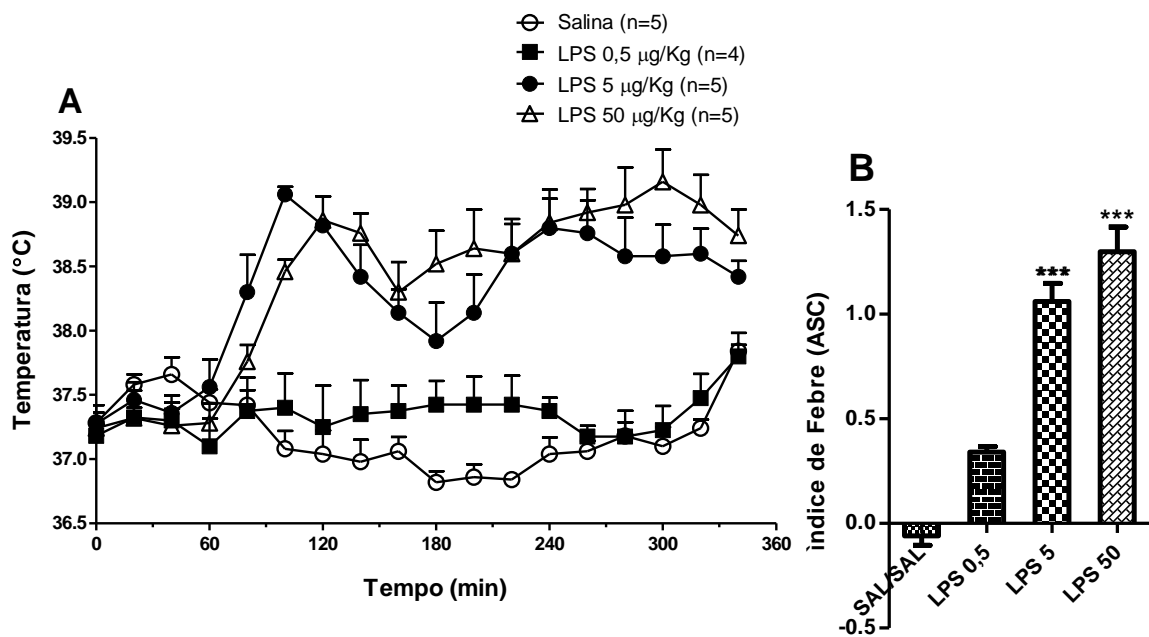


Figura 8: Efeito da injeção de diferentes doses de LPS sobre a temperatura corporal de ratos. O LPS foi administrado por via intravenosa (iv) nas doses de 0,5; 5 e 50 µg/Kg. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% (2 mL/Kg). No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de temperatura. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CELERITRINA, UM INIBIDOR DE PKC, SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE LPS EM RATOS.

Visando investigar a participação da PKC na resposta febril induzida pelo LPS (5 µg/Kg), foi administrado celeritrina, um inibidor de PKC, nas doses de 1, 3 ou 10 µg/rato (icv), 30 min antes da injeção de LPS nos animais.

Como pode ser observado na **Figura 9**, os animais pré-administrados com salina que receberam LPS desenvolveram febre prolongada com início aproximadamente 1,5 h após a injeção e com duração de 6 h, período total de observação. A administração de salina não induziu nenhuma resposta febril. Em todos os experimentos deste estudo, uma pequena elevação da temperatura corporal foi observada no início dos procedimentos, durante aproximadamente 30 min após o estímulo, devido à manipulação dos animais.

A celeritrina nas doses de 1 e 10 µg/rato não reduziu significativamente a resposta febril induzida pelo LPS (**Figuras 9 e 11**, respectivamente). Como mostrado na **Figura 10**, a

pré-administração de celeritrina (3 $\mu\text{g}/\text{rato}$) nos animais promoveu uma significativa redução (36 %) da resposta febril induzida pelo LPS. Esta redução se iniciou 1,5 h após a injeção do estímulo pirogênico e permaneceu até aproximadamente a 5^a hora do período de observação (6 h). A comparação do efeito das três doses de celeritrina sobre a febre induzida pelo LPS pode ser observada na **Figura 12**.

Visto que a dose de 3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ de celeritrina apresentou o melhor efeito antipirético, esta foi selecionada para os experimentos subsequentes de febre e de medidas de expressão e atividade enzimática no hipotálamo.

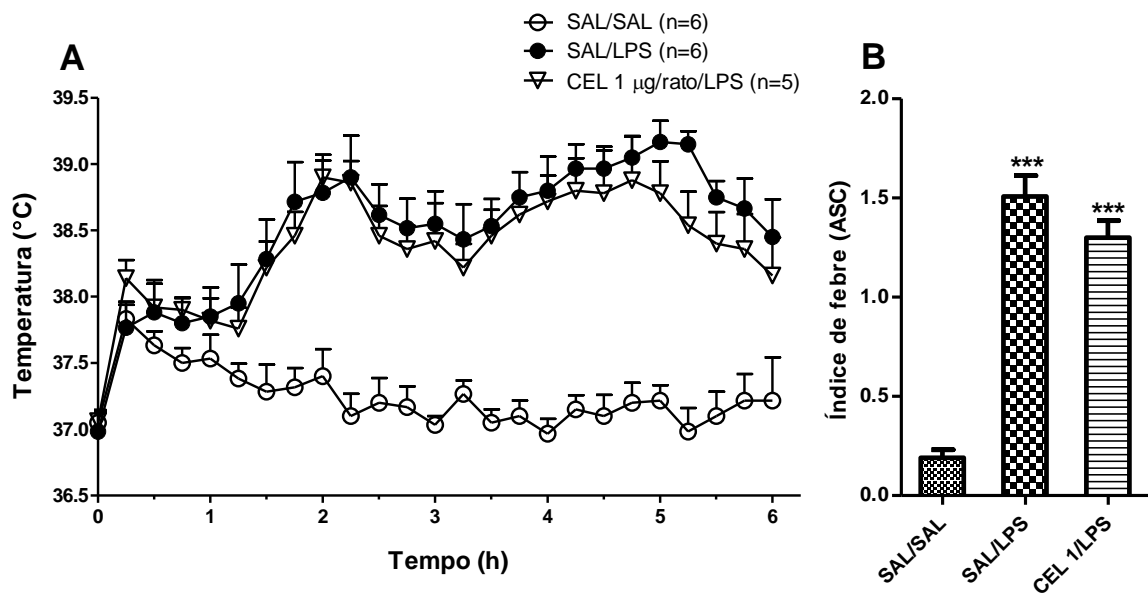


Figura 9: Efeito da injeção central de Celeritrina 1 $\mu\text{g}/\text{rato}$ sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. A celeritrina (CEL) foi administrada por via icv na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{rato}$ no volume de 2 μL , 30 min antes da injeção iv de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

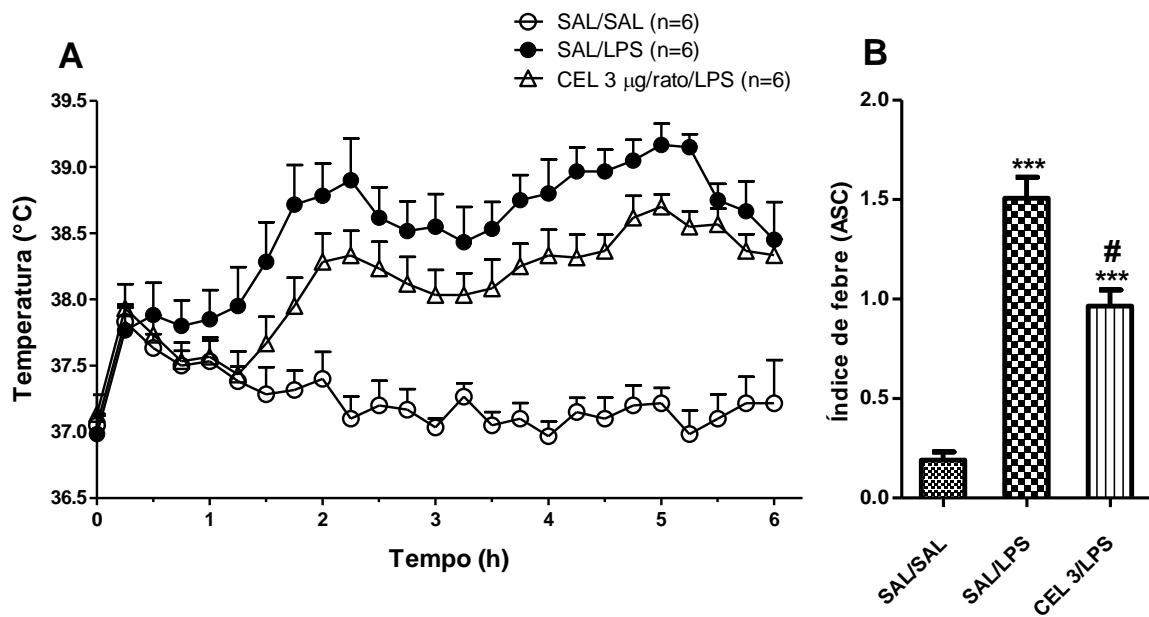


Figura 10: Efeito da injeção central de Celeritrina 3 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. A Celeritrina (CEL) foi administrada por via icv na dose de 3 µg/rato no volume de 2 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. #p<0,05 quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

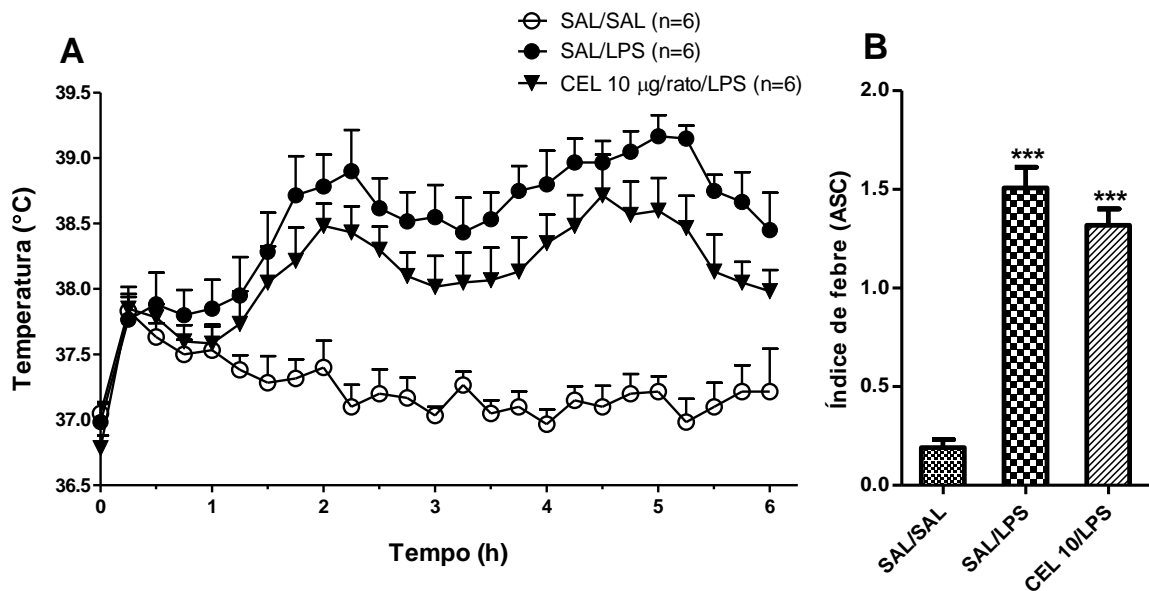


Figura 11: Efeito da injeção central de Celeritrina 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. A celeritrina (CEL) foi administrada por via icv na dose de 10 µg/rato no volume de 2 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

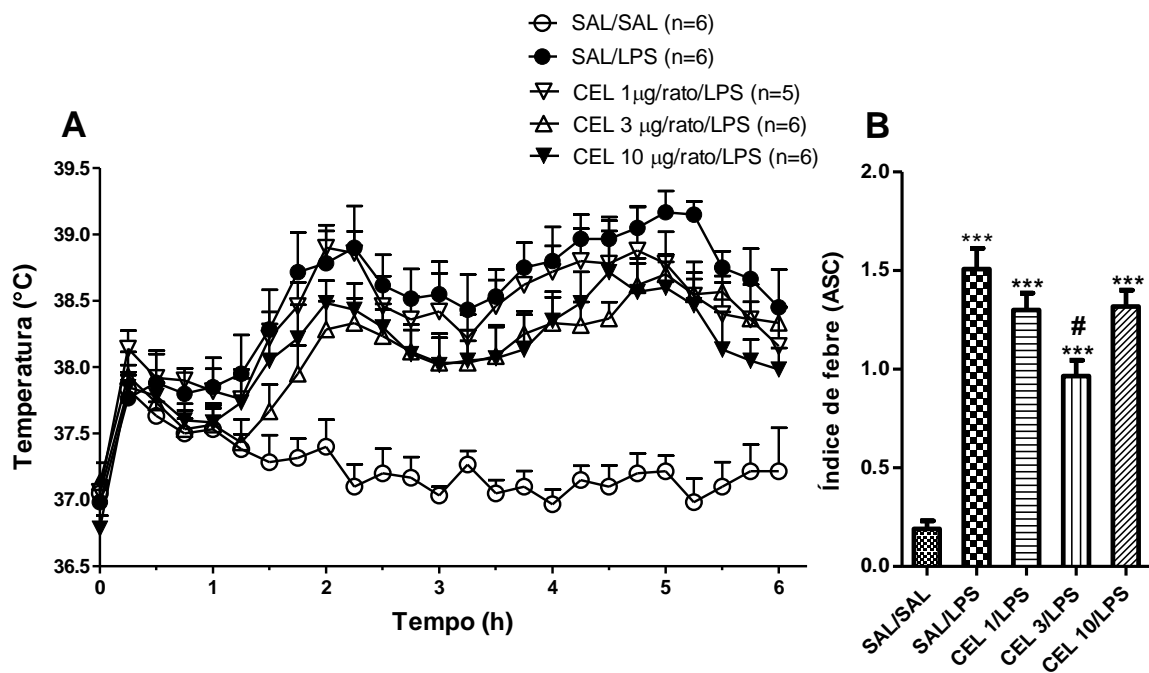


Figura 12: Efeito da injeção central de diferentes doses de Celeritina sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. A celeritina (CEL) foi administrada por via icv nas doses de 1, 3 e 10 µg/rato no volume de 2 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. #p<0,05 quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE H-89, UM INIBIDOR DE PKA, SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE LPS EM RATOS.

A participação da PKA na resposta febril induzida pelo LPS (5 µg/Kg) também foi analisada. Desta forma os animais receberam pela via icv, o H-89, um inibidor de PKA nas doses de 3, 10 ou 30 µg/rato, 30 min antes da injeção de LPS.

Na **Figura 13**, pode-se observar que os animais pré-administrados com salina que receberam LPS iv desenvolveram febre prolongada com início aproximadamente 2,5 h após a injeção e com duração total de aproximadamente 5,5 h. Os animais que receberam somente salina (iv) não desenvolveram nenhuma resposta febril.

As três doses de H-89 testadas foram capazes de reduzir de forma significativa a resposta febril induzida pelo LPS (**Figuras 13, 14 e 15**). As porcentagens de inibição foram

de 25,6 %, 33,1 % e 50,4 % para as doses de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/rato}$, respectivamente. A análise estatística da área sob a curva demonstrou que não houve diferença na intensidade da inibição entre as doses de 10 e 30 $\mu\text{g/rato}$. A comparação do efeito das três doses de H-89 sobre a febre induzida pelo LPS pode ser observada na **Figura 16**.

Desta forma, a dose de 10 $\mu\text{g/rato}$ foi escolhida para ser utilizada nos experimentos seguintes de febre e de medidas da expressão e atividade enzimática no hipotálamo.

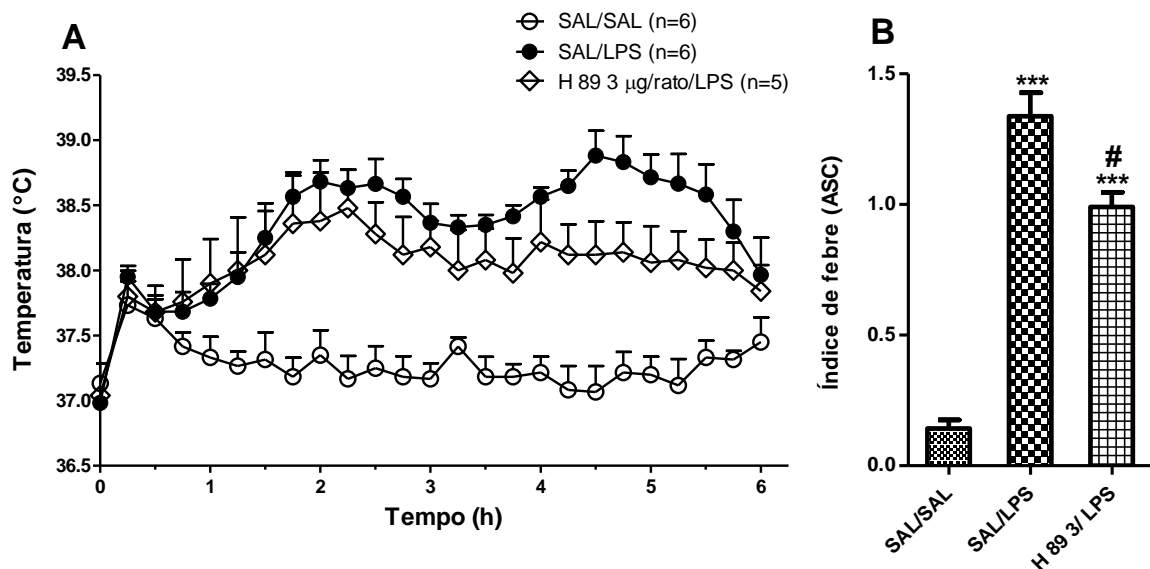


Figura 13: Efeito da injeção central de H-89 3 $\mu\text{g/rato}$ sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O H-89 foi administrado por via icv na dose de 3 $\mu\text{g/rato}$ no volume de 2 μL , 30 min antes da injeção iv de LPS (5 $\mu\text{g/Kg}$). Os Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}\text{C}$) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

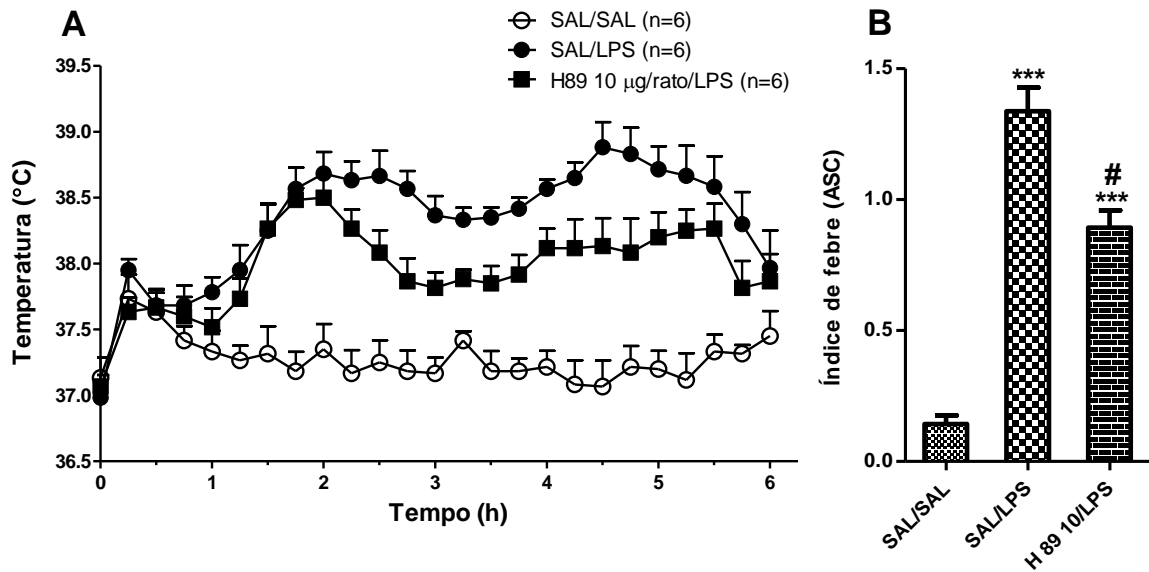


Figura 14: Efeito da injeção central de H-89 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O H-89 foi administrado por via icv na dose de 10 µg/rato no volume de 2 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

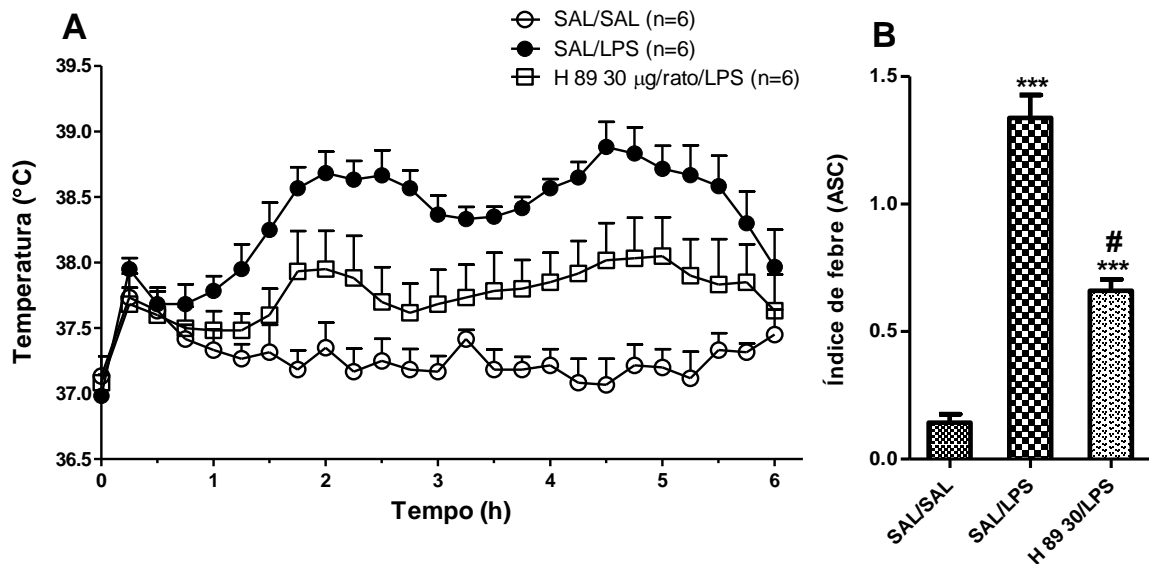


Figura 15: Efeito da injeção central de H-89 30 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O H-89 foi administrado por via icv na dose de 30 µg/rato no volume de 5 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

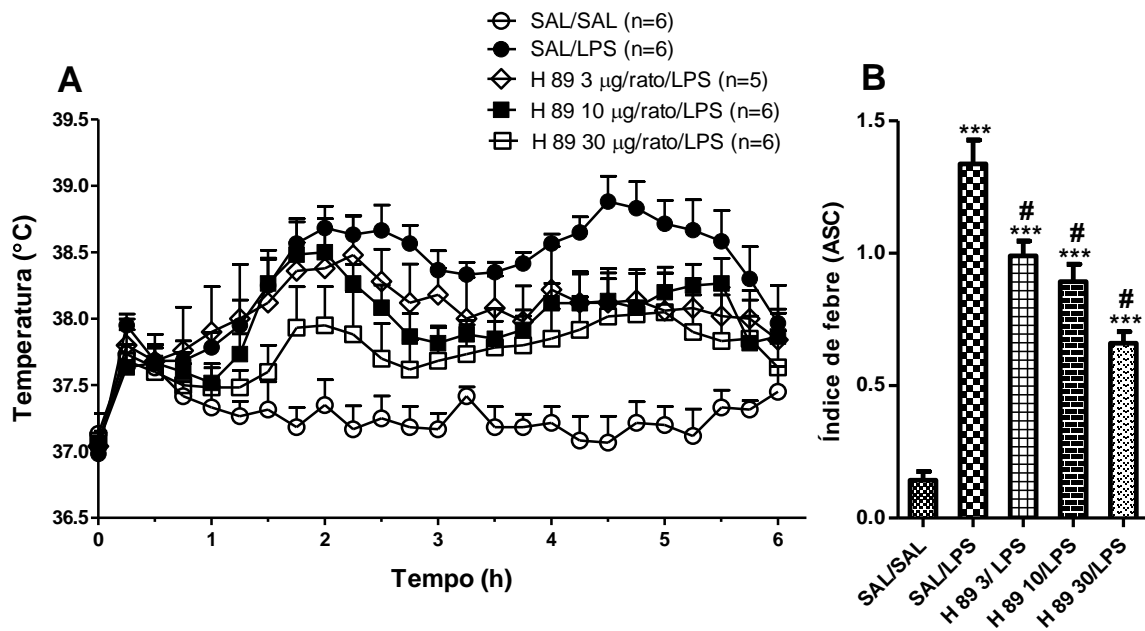


Figura 16: Efeito da injeção central de diferentes doses de H-89 sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O H-89 foi administrado por via icv nas doses de 3, 10 ou 30 µg/rato em volume de 2 a 5 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. #p<0,05 quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CONJUNTA DE CELERITRINA E H-89 SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO IV DE LPS EM RATOS

Com o objetivo de investigar o efeito da ação conjunta dos inibidores de PKC e PKA sobre a resposta febril induzida pelo LPS (5 µg/Kg), os animais receberam celeritrina na dose de 3 µg/rato juntamente com H-89 na dose de 10 µg/rato (ambos pela via icv), 30 min antes da injeção de LPS.

Como pode ser observado na **Figura 17**, a administração conjunta de celeritrina e H-89 promoveu a redução (31,2 %) da resposta febril induzida pelo LPS. Esta redução se iniciou por volta de 3 h após a injeção do estímulo pirogênico e permaneceu até o final do período de observação (6 h).

A co-administração das drogas foi capaz de inibir a resposta febril induzida pelo LPS. No entanto quando este efeito foi comparado aos alcançados com a administração das drogas individualmente, não se observou efeito somatório.

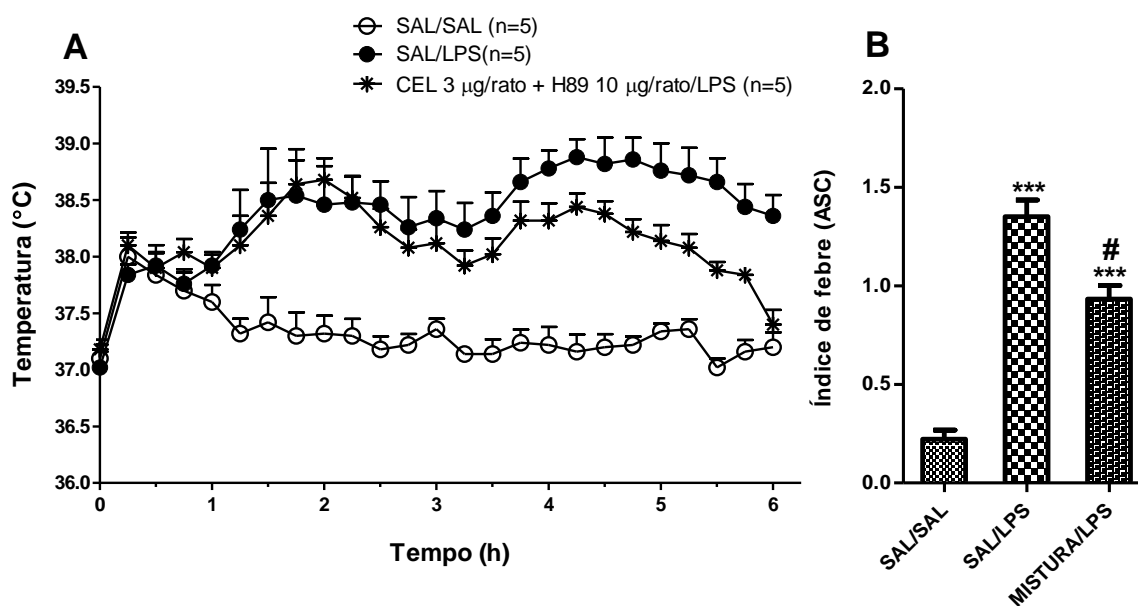


Figura 17: Efeito da administração conjunta de Celeritrina e H-89, sobre a resposta febril induzida pela injeção iv de LPS em ratos. A celeritrina (CEL) e o H-89 foram conjuntamente administradas por via icv nas doses de 3 µg/rato e 10 µg/rato respectivamente, no volume final de 2 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. #p<0,05 quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

A mensuração da expressão e da atividade enzimática da PKA e da PKC foi realizada em dois momentos distintos, 3 e 6 h após a injeção do LPS. A escolha do tempo de 3 h após a administração de LPS foi baseada na análise minuciosa dos resultados obtidos na resposta febril. Neste período, foi observada uma boa resposta febril do LPS juntamente com uma excelente resposta inibitória das drogas testadas. Sendo assim, foi realizado um novo experimento no qual os animais receberam celeritrina (3 µg/rato) ou H-89 (10 µg/rato) 30 min antes da injeção de LPS (5 µg/Kg), e foram sacrificados 3 h após o estímulo pirogênico.

Como pode ser observado na **Figura 18**, os animais pré-administrados com salina que receberam LPS iv desenvolveram febre com início aproximadamente 1,5 h após a injeção e

duração de 3 h, período total de observação. Os animais que receberam apenas solução salina (iv) não desenvolveram resposta febril.

Como esperado, a celeritrina e o H-89 nas doses de 3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$ respectivamente, inibiram a resposta febril induzida pelo LPS. A porcentagem de inibição durante o período de observação foi de 33,3 % para celeritrina e 36,7 % para H-89.

Três horas após a injeção de LPS os animais foram sacrificados e seus hipotálamos foram dissecados e congelados a -70°C para a mensuração de expressão proteica e da atividade enzimática.

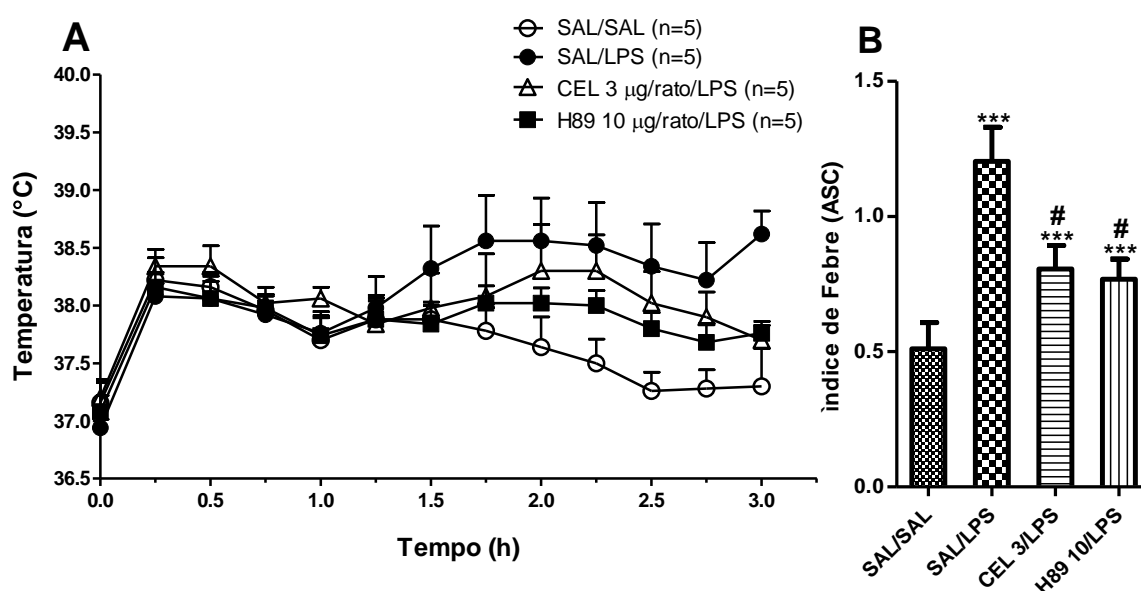


Figura 18: Efeito da injeção central de Celeritrina 3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ e H-89 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$ sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. A celeritrina (CEL) e o H-89 foram administrados por via icv. nas doses de 3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$, respectivamente no volume de 2 μL , 30 min antes da injeção iv de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}\text{C}$) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente ao grupo LPS.

4.5 PERFIL DA EXPRESSÃO DE PKA E PKC ϵ NO HIPOTÁLAMO DE RATOS CONTROLE E TRATADOS COM H-89 OU CELERITRINA

Com o objetivo de avaliar a expressão da PKA e da PKC ϵ nos animais dos grupos controles (SAL/SAL e SAL/LPS) e tratados com H-89 ou celeritrina, realizou-se análise por *Western Blotting* das proteínas específicas nos hipotálamos nos tempos de 3 e 6 h. A **Figura 19** apresenta a análise da expressão de PKC ϵ no hipotálamo dos diferentes grupos, nos dois tempos. Os dados estão expressos como densidade óptica para cada banda de PKC ϵ , calculada utilizando-se a razão entre a densidade relativa das bandas de cada PKC ϵ e a densidade relativa das suas respectivas β -actina (controle interno).

Não foi detectada nenhuma diferença significativa na expressão de PKC ϵ nos hipotálamos no tempo de 3 h. Da mesma forma, no tempo de 6 h não foi possível identificar alterações na expressão de PKC ϵ entre os grupos salina e LPS. Entretanto, no grupo que recebeu H-89, observou-se um aumento significativo da expressão de PKC ϵ em relação aos valores basais (salina) e ao grupo que recebeu celeritrina.

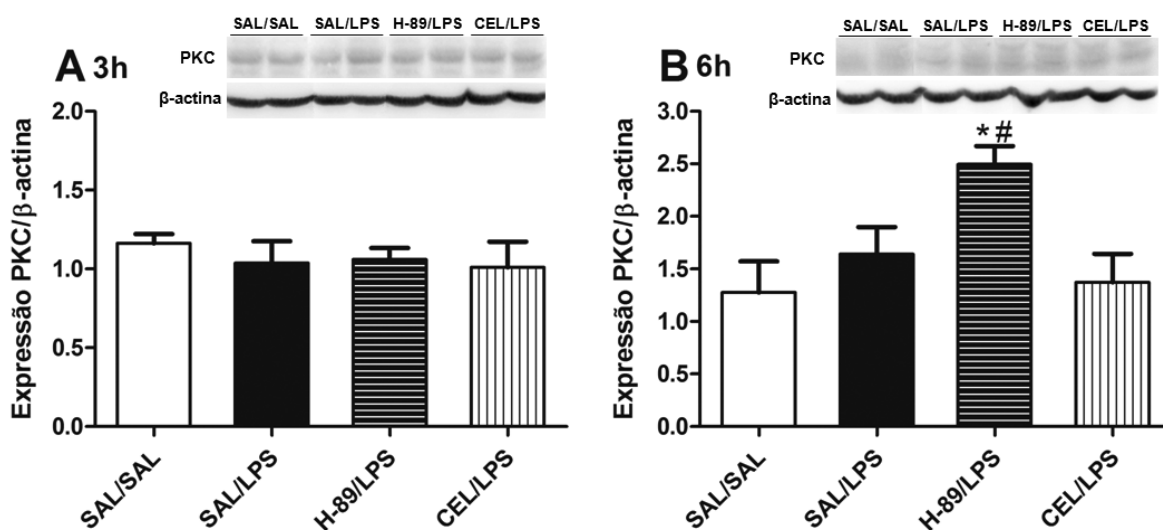


Figura 19: Análise por *western blotting* da expressão de PKC ϵ (80 KDa). Para análise foram utilizados hipotálamos de ratos coletados 3 h (painel A) e 6 h (painel B) após a injeção de LPS. Quantidades iguais de proteína (70 μ g/poço) foram aplicadas, e a β -actina foi utilizada como controle interno. A análise quantitativa dos níveis de proteína foi realizada através do software ImageJ (ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA). As barras representam média \pm EPM de 3-4 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente ao grupo CEL.

A **Figura 20** apresenta a mensuração de PKA no hipotálamo dos diferentes grupos, nos dois tempos experimentais, expressos como densidade óptica. Não foram encontradas alterações da expressão de PKA em nenhum dos grupos e tempos observados.

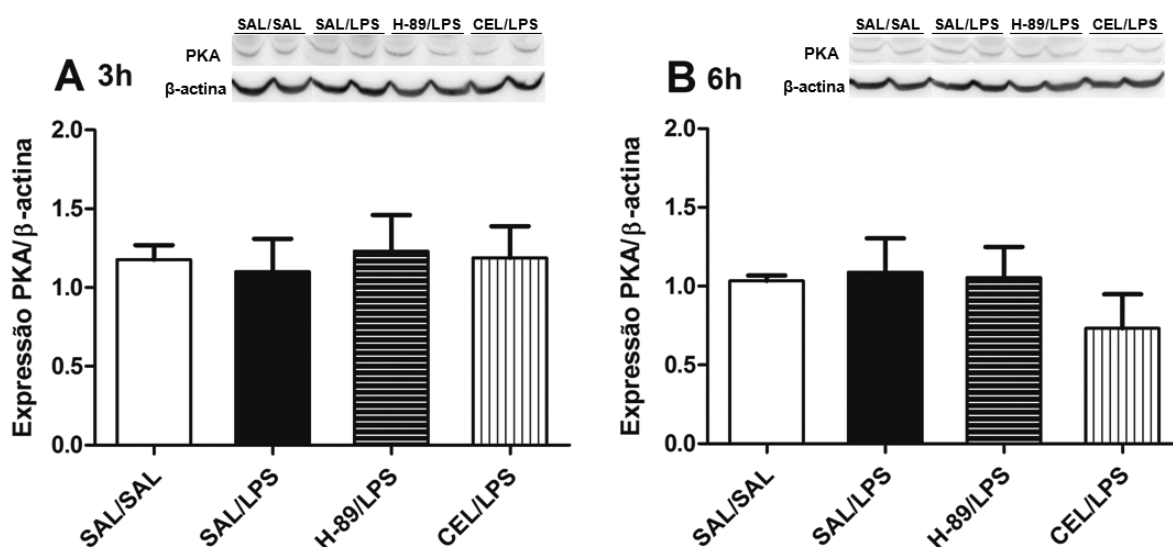


Figura 20: Análise por *western blotting* da expressão de PKA (42 KDa). Para análise foram utilizados hipotálamos de ratos coletados 3 h (painel A) e 6 h (painel B) após a injeção do estímulo pirogênico. Quantidades iguais de proteína (70 μ g/poço) foram aplicadas, e a β -actina foi utilizada como controle interno. A análise quantitativa dos níveis de proteína foi realizada através do software ImageJ (ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA). As barras representam média \pm EPM de 4 animais por grupo.

4.6 PERFIL DA ATIVIDADE DA PKA E DA PKC NO HIPOTÁLAMO DE RATOS CONTROLE E TRATADOS COM H-89 OU CELERITRINA

Analizamos a atividade de PKA e PKC nos grupos controles e tratados com H-89 e celeritrina. Esta atividade foi mensurada utilizando extrato bruto dos hipotálamos como amostra nos tempos de 3 e 6 h.

A **Figura 21** apresenta a análise da atividade de PKC hipotalâmica dos diferentes grupos, nos dois tempos experimentais. No tempo experimental de 3 h, não foram identificadas alterações de atividade entre os grupos. Por outro lado, 6 h após a injeção de LPS, pode-se observar uma tendência no aumento da atividade do grupo tratado somente com LPS em relação ao grupo controle tratado apenas com solução salina. Da mesma forma,

observou-se também uma redução da atividade da PKC no grupo celeritrina em relação ao LPS, porém não significativa.

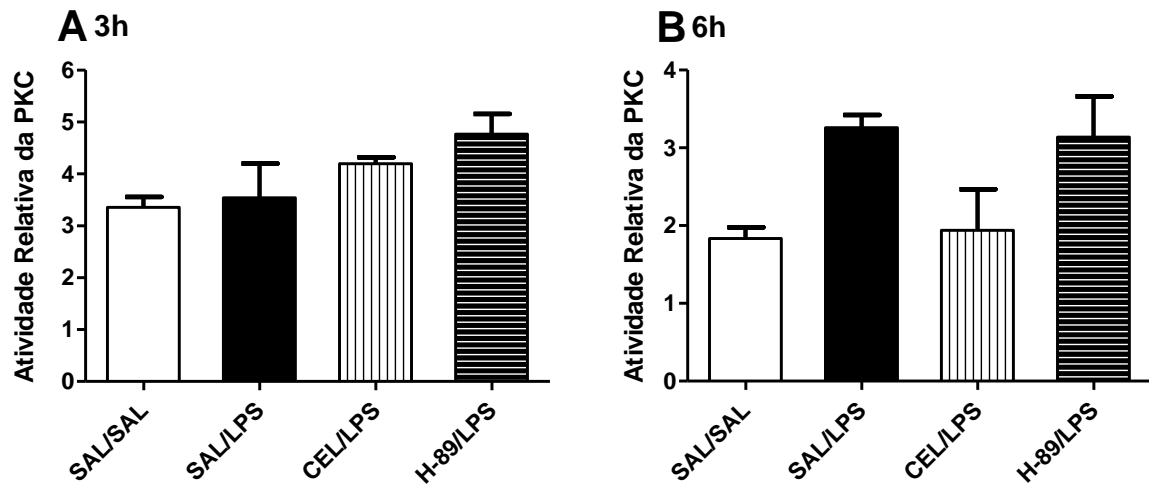


Figura 21: Atividade relativa de PKC no hipotálamo. Para análise foram utilizados hipotálamos de ratos coletados 3 h (painel A) e 6 h (painel B) após a injeção do estímulo pirogênico. A atividade relativa expressa a razão entre a média das absorbâncias e a quantidade total de proteína utilizada (3 µg/ poço). As barras representam a média ± EPM de 3 animais por grupo.

A atividade da PKA no hipotálamo dos diferentes grupos e tempos experimentais está expressa na **Figura 22**. No tempo experimental de 3 h, não houve mudanças na atividade entre os grupos avaliados. Já no tempo de 6 h, uma tendência de aumento da atividade do grupo tratado somente com LPS em relação ao grupo salina foi observada. Uma redução, não significativa, da atividade do grupo H-89 em relação ao LPS, também foi observada.

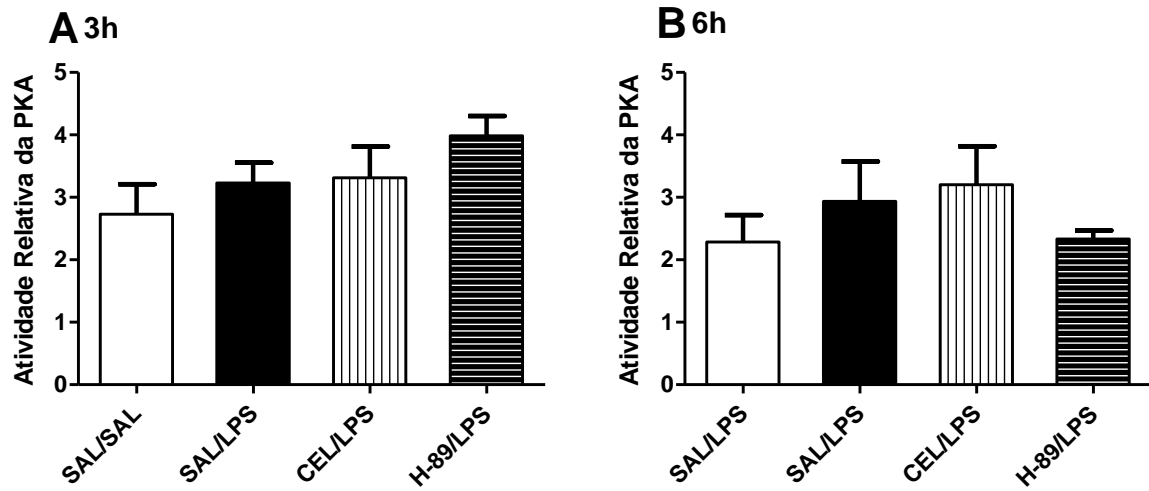


Figura 22: Atividade relativa de PKA no hipotálamo. Para análise foram utilizados hipotálamos de ratos coletados 3 h (painel A) e 6 h (painel B) após a injeção do estímulo pirogênico. A atividade relativa expressa a razão entre a média das absorbâncias e a quantidade total de proteína utilizada (3 μ g/ poço). As barras representam a média \pm EPM de 3 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram ampliar nosso entendimento sobre a participação de vias de sinalização dependentes de PKA e PKC na resposta febril induzida por LPS em ratos.

A febre é definida como o aumento da temperatura corporal que ocorre como parte da resposta de defesa do hospedeiro contra a invasão do organismo por agentes patogênicos (IUPS THERMAL COMMISSION, 2001).

Em modelos experimentais de febre, o LPS é o pirógeno exógeno frequentemente utilizado, pois sua administração promove o desencadeamento de reações do organismo que mimetizam aquelas induzidas durante uma infecção por bactérias Gram-negativas. Assim, a administração experimental de LPS, por via intravenosa, *in bolus* ou por infusão, causa rápida elevação da temperatura corporal e outras reações que, em conjunto, compõem a denominada resposta de fase aguda (MICHIE et al., 1988). Além disso, tem sido demonstrado que a resposta febril induzida pelo LPS é um processo que envolve vários mediadores, entre eles citocinas, PGs (especialmente a PGE₂) e alguns hormônios (principalmente aqueles do eixo HPA). O fator de necrose tumoral e endotoxinas induzem respostas metabólicas similares em seres humanos (MICHIE et al., 1988).

A escolha da dose de LPS utilizada foi um aspecto importante definido no início do presente estudo, visto que altas doses deste pirógeno podem ocasionar uma severa hipertermia associada ao choque séptico (ROTH et al., 2009). O LPS, administrado por via iv na dose de 5 µg/Kg, foi capaz de induzir resposta febril contínua e moderada, com perfil bifásico, apresentando o primeiro pico 2 a 3 h após a injeção, seguida por uma segunda fase de longa duração (aproximadamente 6 h). Resultados semelhantes foram demonstrados por Elmquist et al. (1996), Scammell et al. (1998), Soares et al. (2011) e Malvar et al. (2011).

Inibidores de PKC têm sido descritos como agentes anti-inflamatórios com potenciais aplicações clínicas (LANG et al., 1995). Em nosso trabalho, demonstramos que o pré-tratamento icv com celeritrina na dose de 3 µg/rato reduziu significativamente a resposta febril induzida pelo LPS. As doses de 1 e 10 µg/rato não afetaram a temperatura corporal dos animais, demonstrando um efeito característico de curva em forma de sino, no qual doses mais elevadas podem apresentar efeito reduzido por atuarem em sítios inespecíficos (ROSS & KENAKIN, 2006). Em concordância com nossos resultados, Kozak e colaboradores (1997)

havia descrito que a administração subcutânea (pré-tratamento) de celeritrina na dose de 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ reduzia significativamente a febre e inibia completamente a elevação plasmática de IL-6, induzidas pela injeção intraperitoneal (ip) de LPS. Em modelos de nocicepção, o tratamento com celeritrina inibiu a segunda fase da resposta causada pela injeção de formalina na pata de ratos (SOUZA et al., 2002).

Estudos utilizando inibidores farmacológicos específicos para PKC ϵ demonstraram que a ativação desta isoforma está envolvida na sensibilização mecânica induzida por PGE₂ (SACHS et al., 2009; VILLAREAL et al., 2009). Assim sendo, os efeitos relacionados à nocicepção induzida por PGE₂ parecem ser mediados por PKC ϵ .

Koide e colaboradores (1991) descreveram que PKC ϵ é expressa predominantemente no cérebro e Kuo e colaboradores demonstraram sua expressão no hipotálamo (2009). Pelo fato da PKC ϵ estar presente no hipotálamo, centro termorregulador responsável pelo controle da temperatura corporal, e contribuir para nocicepção que se desenvolve em resposta a ação de PGE₂, investigamos se esta seria também a isoforma relacionada à resposta febril.

A expressão de PKC ϵ foi avaliada nos hipotálamos de ratos controles e tratados com celeritrina e H-89. Conforme mencionado anteriormente, foram selecionados 2 tempos para coleta destes hipotálamos 3 e 6 h após a administração de LPS. Não foram identificadas alterações significativas da expressão de PKC ϵ entre os grupos que tiveram seus hipotálamos coletados após 3 h de experimentação. Nos hipotálamos coletados após 6 h, também não foram encontradas alterações entre os grupos controles (salina e LPS). No entanto, nos animais tratados com H-89, a expressão de PKC ϵ aumentou significativamente em relação aos valores basais e em relação ao grupo tratado com celeritrina. Estes resultados demonstram que, quando a PKA está inibida, ocorre aumento na expressão hipotalâmica de PKC ϵ , sugerindo a ativação de um mecanismo compensatório para manter a sinalização intracelular.

Durante muitos anos as ações desencadeadas pelo aumento do AMPc intracelular foram atribuídas apenas à PKA. Entretanto, estudos têm demonstrado a contribuição de um outro alvo, qual seja uma proteína de troca ativada diretamente pelo AMPc (Epac) (de ROOIJ et al., 1998).

A Epac foi identificada pela primeira vez em 1998 (de ROOIJ et al., 1998; KAWASAKI et al., 1998). Esta proteína faz parte de uma família de fatores de troca do nucleotídeo guanina, que catalisam a troca de GDP por GTP, ativando a proteína G.

São conhecidas duas isoformas, Epac 1 e Epac 2, que estão presentes na maioria dos tecidos, inclusive no sistema nervoso central, embora com diferentes níveis de expressão. Diversos trabalhos tem demonstrado a participação de Epac em inúmeras funções biológicas

como proliferação e divisão celular, secreção de insulina, migração celular, permeabilidade vascular, sinapses neuronais, inflamação, dentre muitas outras (BORLAND; SMITH; YARWOOD, 2009; GLOERICH; BOS, 2010).

Guo e colaboradores (2007) investigaram se as ações sensibilizantes de PGE₂ sobre neurônios sensoriais periféricos seria mediada pela ativação de Epacs. Para esta análise os autores utilizaram pequenos siRNA (RNAs de interferência) para diminuir a expressão de Epac 1 e 2. Através destes experimentos puderam constatar que a redução de Epac 2, mas não de Epac 1 atenuou o aumento de capsaicina (96%) e a liberação do peptídeo relacionado ao gene da imunoreatividade de calcitonina (66%), ambos induzidos pela PGE₂. Desta forma os autores concluíram que a ativação de Epac 2 é uma importante etapa da via de sinalização responsável por mediar as ações de PGE₂ sobre neurônios sensoriais. Outros dados da literatura demonstram que Epac pode estimular diretamente a ativação de PKC ϵ (OESTREICH et al., 2009; WANG et al., 2007). Desta forma, o aumento da expressão de PKC ϵ observado no hipotálamo de animais tratados com inibidor de PKA, pode ocorrer devido à ativação da via da Epac. Não existe, em nosso conhecimento, nenhum estudo que tenha investigado a participação de Epacs na resposta febril. Entretanto, aliados aos dados da literatura, nossos resultados nos permitem supor, que, durante a resposta febril induzida por LPS, verifica-se o aumento na concentração intracelular de AMPc, responsável pela ativação de dois alvos, PKA e Epac. Quando a via da PKA é inibida farmacologicamente, o AMPc promove maior ativação de Epac e, conseqüentemente, aumenta a participação da PKC ϵ , evidenciada em nosso estudo pelo aumento da expressão dessa isoforma no hipotálamo (**Figura 23**).

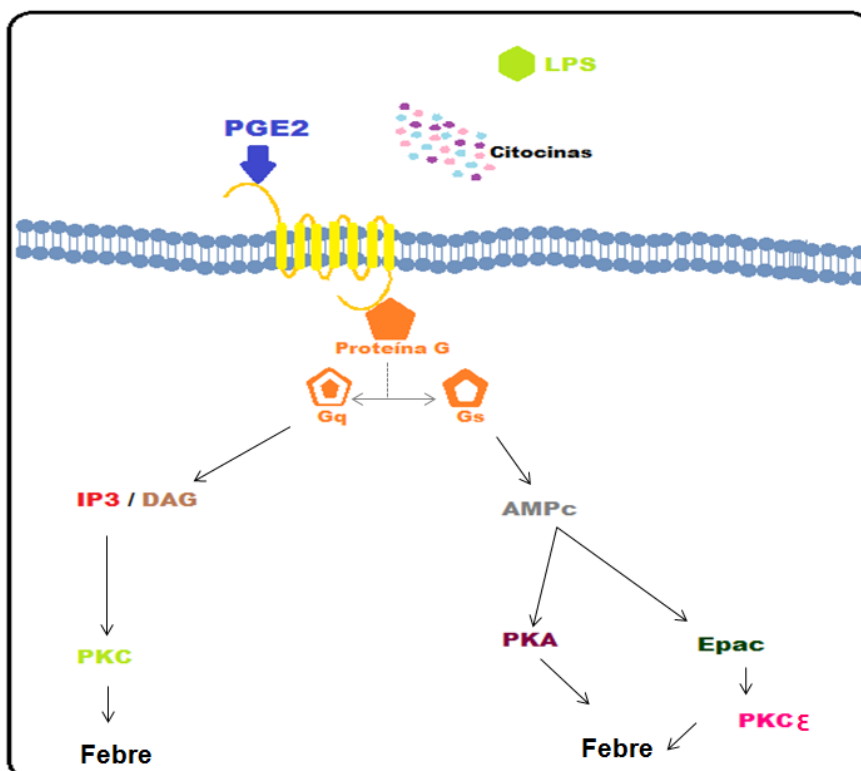


Figura 23: Modelo de sinalização intracelular proposto para o desenvolvimento da febre LPS. LPS – lipopolissacarídeo; PGE2- prostaglandina E2; IP3- inositol trifosfato; DAG – diacilglicerol; PKA- proteína quinase A; Epac – proteína de troca ativada diretamente pelo cAMP, PKCε – proteína quinase C epsilon

Em nosso trabalho, avaliamos também o efeito da co-administração de H-89 e celeritrina na febre induzida pelo LPS. Observou-se uma inibição da febre, mas o efeito inibitório não foi potencializado pela atuação conjunta das duas drogas, ou seja, não foi mais intenso do que quando utilizamos as drogas separadamente. Tal resultado corrobora a hipótese de que PKA e PKC estejam envolvidas em uma mesma via de sinalização, provavelmente uma via dependente de AMPc.

Deve-se considerar ainda que outras isoformas da PKC possam estar envolvidas na sinalização desencadeada pela injeção iv de LPS, uma vez que o inibidor utilizado não possui especificidade para nenhuma das isoformas. Nesse contexto, Thaler e colaboradores (2009) demonstraram que um inibidor específico para isoformas de PKCs atípicas foi capaz de bloquear completamente a febre induzida pela injeção ip (50 µg/Kg) de LPS em ratos.

De acordo com dados do fabricante (Sigma Audrich), celeritrina exerce seu efeito inibitório por meio da interação com o domínio catalítico da proteína e, em alguns casos, pode

inibir a translocação da PKC do citosol para a membrana. A celeritrina é considerada, portanto, um inibidor da atividade da PKC.

Dessa forma, possíveis alterações na atividade de PKC em resposta aos tratamentos utilizados também foram investigadas. Os resultados demonstraram que após 6 h de experimentação, observou-se uma tendência para o aumento da atividade de PKC nos hipotálamos dos animais tratados com LPS em relação ao grupo salina, bem como uma redução da atividade em resposta ao tratamento com celeritrina, comparada ao grupo LPS. Entretanto, essas alterações não foram estatisticamente significativas. Nesse ensaio, devido ao alto custo, foram testadas apenas 3 amostras por grupo, de forma que esse pode ter sido um dos fatores para a ausência de diferença entre os tratamentos.

Não foram detectadas alterações da atividade nos hipotálamos coletados na terceira hora. Apesar de ter sido observado um bom efeito antipirético da celeritrina na terceira hora, é possível que esse tempo não tenha sido suficiente para revelar alterações dos níveis de expressão da PKC. O kit utilizado para mensuração da atividade baseia-se no método de ELISA, no qual a medida da absorbância é diretamente proporcional a fosforilação, do substrato pela PKC presente na amostra. Uma das limitações do método pode decorrer do fato de que, apesar do substrato conter sítios de fosforilação por PKC, a fosforilação mediada pela ação de outras quinases não pode ser excluída. Dessa forma, é plausível sugerir que outras quinases presentes na amostra possam ter mascarado a fosforilação do substrato pela PKC e, conseqüentemente, interferido na mensuração da atividade.

A participação de PKA na resposta febril induzida pelo LPS também foi investigada. Para tanto, utilizou-se o inibidor enzimático H-89. Esse fármaco compete com o ATP pela ligação ao seu sítio específico, localizado na subunidade catalítica (ENGH et al., 1996). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento icv com H-89 nas doses de 3, 10 e 30 µg/rato reduziu significativamente a resposta febril induzida pelo LPS iv, o que sugere a participação da PKA nessa resposta. Não há, em nosso conhecimento, outros estudos que tenham investigado participação da PKA na febre induzida por LPS.

Wang e colaboradores (2001) investigaram alterações na concentração de AMPc e os efeitos de um inibidor de PKA na febre induzida por CRH (hormônio liberador de corticotropina) em ratos. Os dados desse estudo demonstraram que a administração central de CRF promove tanto a elevação da temperatura colônica quanto da concentração de AMPc no hipotálamo dos ratos. A febre induzida por CRH foi inibida pelo pré-tratamento com inibidor de PKA, sugerindo o envolvimento dessa quinase nas ações pirogênicas do CRH.

Em outro estudo que utilizou como estímulo pirogênico um agonista de receptor EP3 verificou-se redução da febre nos animais pré-tratados com um inibidor de PKA e também com um inibidor de PKC (Zhou et al., 2006), sugerindo a participação de ambas as quinases na febre induzida por um agonista EP3.

A expressão de PKA foi avaliada nos hipotálamos de ratos controles e tratados com celeritrina e H-89, em dois tempos experimentais, da mesma forma que para PKCε. Após a análise dos dados não foi possível identificar alterações significativas da expressão hipotalâmica de PKA, apesar do bom efeito antipirético do H-89 observado nos dois tempos analisados. Também foram investigadas possíveis alterações na atividade relativa da PKA entre os grupos estudados, nos dois tempos mencionados. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados para PKC, ou seja, não foi possível detectar alterações da atividade nos hipotálamos coletados na terceira hora. Após 6 h de experimentação, pode-se notar uma tendência para o aumento da atividade de PKA nos hipotálamos dos animais tratados com LPS em relação ao grupo salina, e uma redução da atividade em resposta ao tratamento com H-89, comparada ao grupo LPS. No entanto estas alterações não foram estatisticamente significativas. Para a mensuração da atividade de PKC e PKA, foram utilizados kits fabricados pela mesma empresa, com princípios de atuação idênticos, diferindo apenas na especificidade do substrato para cada proteína analisada. Dessa forma, acreditamos que as mesmas interferências identificadas para PKC ocorreram também para PKA, ou seja, o reduzido tamanho (n) da amostra e o fato de que outras quinases possam ter mascarado a fosforilação do substrato pela PKA.

Os resultados desse trabalho sugerem que vias de sinalização dependentes de PKA e PKC estejam envolvidas na resposta febril induzida por LPS. Estudos complementares são necessários para elucidar quais são as isoformas e os mecanismos moleculares envolvidos.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que:

- * Proteína quinase A e C (PKA; PKC) estão envolvidas na resposta febril induzida pela injeção iv de LPS;
- * Na resposta febril, PKA e PKC provavelmente estão inseridas em uma mesma via de sinalização;
- * PKC ϵ pode contribuir parcialmente para o desenvolvimento da resposta febril induzida por LPS iv;
- * É necessário o estudo de outras proteínas potencialmente envolvidas nesta via, como, por exemplo, Epac e MAPKs.
- * Métodos de análise mais específicos são necessários para identificar quais isoformas de PKA e PKC estão envolvidas na resposta febril, bem como para identificar outras proteínas potencialmente envolvidas na sinalização intracelular.

7. PERSPECTIVAS

Para o melhor entendimento das vias de sinalização é necessário, além do estudo de proteínas individuais, analisar sua interação com outras potenciais proteínas envolvidas na sinalização. Para tanto, o uso de inibidores de proteínas são indispensáveis. Progressos recentes na compreensão de redes de sinalização extremamente complexas dependem em grande parte da disponibilidade e da qualidade de agentes específicos capazes de interferir com as vias de investigação (ENGH et al., 1996).

Pretendemos expandir essa abordagem utilizando uma maior diversidade de inibidores e ativadores de diversas proteínas potencialmente envolvidas na resposta febril, de forma a ampliar o conhecimento a cerca da importância das proteínas individualmente e sua contribuição quando inseridas nas vias de sinalização.

Pretendemos utilizar a técnica de LC-MS/MS para realizar a análise de alterações proteômicas nesse contexto. A espectrometria de massa do tipo LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem) permite a caracterização de eventos de sinalização, sendo capaz de identificar modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, bem como alterações na expressão destas proteínas. Esta tecnologia fornece informações precisas sobre as variações quantitativas de milhares de proteínas e suas modificações em resposta a qualquer tipo de perturbação, permitindo uma melhor compreensão das rotas de sinalização envolvidas em condições patológicas, contribuindo, por exemplo, para a identificação de novos alvos farmacológicos para o tratamento de diversas doenças (CHOUDNARY & MANN, 2010).

Desta forma, poderemos ter uma melhor visão do conjunto total de proteínas envolvidas na resposta febril, além de poder analisar quais isoformas estão sendo ativadas em resposta à sinalização desencadeada pela ligação de PGE₂ ao seu receptor.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J Neurosci**, v. 19, n. 6, p. 2181-6, 1999.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC E. Prostaglandin E2: A putative fever mediator. In: MACKOWIAK, P. A., editor. **Fever basic mechanisms and management**. Philadelphia: Lippincott–Raven, 1997 p. 117–145.

BORLAND, G.; SMITH, B. O.; YARWOOD, S. J. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 1, p. 70-86, 2009.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p. 108-15, 1998.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin Infect Dis**, v. 31 Suppl 5, p. 157-61, 2000.

BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol**, v. 100, n. 4, p. 1347-54, 2006.

BOULANT, J. A.; DEAN, J. B. Temperature receptors in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v. 48, p. 639-54, 1986.

BREDER, C. D.; SAPER, C. B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res**, v. 713, n. 1-2, p. 64-9, 1996.

BREYER, R. M. et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 661-90, 2001.

CADD, G.; MCKNIGHT, G. S. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. **Neuron**, v. 3, n. 1, p. 71-9, 1989.

CAO, C. et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. **Am J Physiol**, v. 272, n. 6, p. 1712-25, 1997.

CAO, C. et al. Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. **Eur J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 1781-90, 2001.

CARTMELL, T.; MITCHELL, D. The molecular bases of fever. In: STECKLER, T.; KALIN, N. H.; REUL, J. M. H. M.: Ed. **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**. Elsevier, 2005. p. 193-227.

CHAN, C. C. et al. Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, n. 3, p. 1531-7, 1995.

CHOUHDARY, C.; MANN, M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 427-39, 2010.

COCEANI, F.; AKARSU, E. S. Prostaglandin E2 in the pathogenesis of fever. An update. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p. 76-82, 1998.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 205-29, 1994.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 3, p. 671-8, 1999.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 2, p. 153-60, 2007.

DE ROOIJ, J. et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 474-7, 1998.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res**, v. 10, n. 4, p. 201-22, 2004.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 1, p. 168-89, 1988.

EK, M. et al. Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 1, p. 5-20, 2000.

ELMQUIST, J. K. et al. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **J Comp Neurol**, v. 371, n. 1, p. 85-103, 1996.

ENGH, R. A. et al. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. **J Biol Chem**, v. 271, n. 42, p. 26157-64, 1996.

ERRIDGE, C. et al. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 837-851; 2002.

GLOERICH, M.; BOS, J. L. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 355-75, 2010.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol. Behav.** v. 47, p. 963-991, 1990.

GUO, C. et al. Prostaglandin E2 augments evoked release of iCGRP from sensory neurons through Epac2, an exchange protein directly activated by cAMP. Oasis, Online Abstract Submission and Invitation System - Program Planner. **Abstract...** San Diego Convention Center, 2007

HAHN, S.; MORONI, C. Modulation of cytokine expression in PB-3c mastocytes by IBMX and PMA. **Lymphokine Cytokine Res**, v. 13, n. 4, p. 247-52, 1994.

HARDEN, L. M. et al. Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Physiol Behav**, v. 89, n. 2, p. 146-55, 2006.

HOSOI, M. et al. Prostaglandin E(2) has antinociceptive effect through EP(1) receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. **Pain**, v. 83, n. 2, p. 221-7, 1999.

IRIE, A. et al. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. **Eur J Biochem**, v. 217, n. 1, p. 313-8, 1993.

KASSUYA, C. A. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br J Pharmacol**, v. 150, n. 6, p. 727-37, 2007.

KAWASAKI, H. et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2275-9, 1998.

KHASAR, S. G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J. D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J Neurophysiol**, v. 81, n. 3, p. 1104-12, 1999.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, v. 71, n. 1, p. 93-127, 1991.

KOIDE, H. et al. Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 4, p. 1149-53, 1992.

KOZAK, W. et al. Attenuation of lipopolysaccharide fever in rats by protein kinase C inhibitors. **Am J Physiol**, v. 273, n. 3, p. R873-9, 1997.

KUO, D. Y. et al. Roles of protein kinase Calpha isozyme in the regulation of oxidative stress and neuropeptide Y gene expression in phenylpropanolamine-mediated appetite suppression. **J Neurochem**, v. 108, n. 6, p. 1495-506, 2009.

LANG, F. et al. New antiinflammatory compounds that inhibit tumor necrosis factor production: probable interaction with protein kinase C activation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 275, n. 1, p. 171-6, 1995.

LEITGES, M. et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. **Mol Cell**, v. 8, n. 4, p. 771-80, 2001.

LU, Y. C.; YEH, W.C; OHASHI, P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151; 2008.

LUHESHI, G. et al. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1, p. 91-5, J1996.

LUHESHI, G.; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 109, n. 4, p. 301-7, 1996.

MACKAY, H. J.; TWELVES, C. J. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 7, p. 554-62, 2007.

MALMBERG, A. B. et al. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J Neurosci**, v. 17, n. 19, p. 7462-70, 1997.

MALVAR DDO, C. et al. The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 6, p. 1401-9, 2011.

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

MILTON, A. S.; WENDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. **J Physiol**, v. 218, n. 2, p. 325-36, 1971.

MURAKAMI, M. et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, v. 275, n. 42, p. 32783-92, 2000.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 607-14, 1992.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J**, v. 9, n. 7, p. 484-96, 1995.

NORRIS, J. G. et al. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 152, n. 2, p. 841-50, 1994.

OESTREICH, E. A. et al. Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. **J Biol Chem**, v. 284, n. 3, p. 1514-22, 2009.

OKA, T. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. **Front Biosci**, v. 9, p. 3046-57, 2004.

OKA, K.; OKA, T.; HORI, T. PGE2 receptor subtype EP1 antagonist may inhibit central interleukin-1beta-induced fever in rats. **Am J Physiol**, v. 275, n. 6 Pt 2, p. R1762-5, 1998.

- OKA, T. et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 1, p. 20-32, 2000
- PARROTT, R. F.; VELLUCCI, S. V. Effects of centrally administered prostaglandin EP receptor agonists on febrile and adrenocortical responses in the prepubertal pig. **Brain Res Bull**, v. 41, n. 2, p. 97-103, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York Academic Press**, 1986.
- RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002.
- ROBINSON-WHITE, A.; STRATAKIS, C. A. Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 968, p. 256-70, 2002.
- ROSS, E. M. & KENAKIN, T. P. Farmacodinâmica: Mecanismos de ação dos fármacos e relação entre sua concentração e seu efeito. In: GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ROTH, J.; DE SOUZA, G. E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 3, p. 301-14, 2001.
- ROTH, J. et al. Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. **J Physiol**, v. 509, p. 267-75, 1998.
- ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 229-45, 2009.
- SACHS, D. et al. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 5, p. 826-34, 2009.
- SCAMMELL, T. E. et al. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. **Am J Physiol**, v. 274, n. 3, p. 783-9, 1998.
- SEIBERT, K.; MASFERRER, J. L. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. **Receptor**, v. 4, n. 1, p. 17-23, 1994.
- SOARES, D. M. et al. Cyclooxygenase-independent mechanism of ibuprofen-induced antipyresis: the role of central vasopressin V(1) receptors. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 25, n. 6, p. 670-81, 2011.
- SOUZA, A. L. et al. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 1, p. 239-47, 2002.
- SOUZA, F. H. V. **Atividade pirogênica, purificação e caracterização parciais dos componentes do fator pirogênico pré-formado em macrófagos**. 2004. 111 f. Tese

(Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

TAYLOR, S. S.; BUECHLER, J. A.; YONEMOTO, W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 59, p. 971-1005, 1990.

TAYLOR, S. S. et al. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 646-58, 2012.

THALER, J. P. et al. Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5362-72, 2009.

The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission). Glossary of terms for thermal physiology. 3. ed. **Jpn. J. Physiol.**, v. 51, p. 245-280, 2001.

THOREN, S.; JAKOBSSON, P. J. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 21, p. 6428-34, 2000.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 281-4, 1998.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VILLARREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: the involvement of distinct signalling pathways. **Life Sci**, v. 85, n. 23-26, p. 822-9, 2009.

WANG, C. et al. A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2-induced potentiation of P2X3 receptor currents in inflamed rats. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 1, p. 191-203, 2007.

WANG, H. et al. The cAMP-mediated protein kinase signal transduction pathway is involved in the pyrogenic effect of CRH in rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 114, n. 10, p. 1064-7, 2001.


ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology**, v. 24, n. 5-6, p. 287-326, 1999.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 8, p. 2651-68, 1999.

ZHOU, Y.; LI, G. D.; ZHAO, Z. Q. State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. **J Neurochem**, v. 85, n. 3, p. 571-80, 2003.


ZHOU, J. et al. Effect of guizhi decoction on PKA and PKC activities of hypothalamus in fever rats. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 31, n. 1, p. 66-9, 2006.

9 - ANEXOS



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

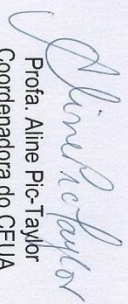
Brasília, 21 de outubro de 2011.

DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado “**EFEITOS DE INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES SOBRE A RESPOSTA FEBRIL E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM RATOS**”, UnBDOC n.º 119943/2011, sob responsabilidade da Profa. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof.ª. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA