



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA PAULA LIMA DO NASCIMENTO GOMES

EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PROTEINA QUINASE C BETA
SOBRE A FEBRE EM RATOS

BRASÍLIA

2023

Ana Paula Lima do Nascimento Gomes

EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PROTEÍNA QUINASE C BETA
SOBRE A FEBRE EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Fabiane Hiratsuka Veiga de
Souza.

Brasília

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo em pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

--

Ana Paula Lima do Nascimento Gomes

EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PROTEÍNA QUINASE C BETA SOBRE A FEBRE EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de março de 2023.

Banca Examinadora

Orientador (a) Prof^a. Dr^a. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza - Universidade de Brasília/FCE

Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner – Universidade Federal do Paraná

Prof^a. Dr^a. Carine Royer - Universidade de Brasília/FCE

Prof. Dr. Wagner Fontes - Universidade de Brasília

Dedico esta pesquisa às mulheres da minha
família.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, prof^a. Dr^a. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza por ter aceitado me orientar, acreditado no meu desenvolvimento e por permitir que minha rotina profissional externa à UnB não fosse impeditiva para a perpetuação da ciência. Obrigada por todo apoio, ensinamentos e respeito. Toda a minha admiração à essa profissional incrível;

Aos membros da banca avaliadora, prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner, prof^a. Dr^a. Carine Royer e prof. Dr. Wagner Fontes pela disponibilidade em avaliar e contribuir;

Ao prof. Paulo Souza pela contribuição no conhecimento e ensinamentos sobre RPE e nas análises realizadas no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Física (UnB) e pelas palavras de incentivo;

Ao grupo de febre: Gabriela, Ester, Sara, Dante, Débora, Mariana, Bruna, Natália e Kelvin. Em especial à Gabriela Luna e Dante Mafra que por muitas vezes se disponibilizaram a ajudar em momentos cruciais dessa pesquisa;

À minha família, por todos sempre apoiarem e respeitarem as minhas decisões, mesmo quando por muitas vezes viessem a nos afastar presencialmente. Em especial à matriarca da família, minha vó Elza Nascimento, que nos trilhou para sempre sermos pessoas melhores a cada dia, à minha mãe Sandra Nascimento e ao meu irmão Rodrigo Gomes que estão presentes em todos os momentos da minha vida e por perceberem o quanto isso faz diferença no meu desenvolver;

Ao meu companheiro de vida José Rodrigues, que dentre esses quase 13 anos juntos, sempre acreditou nas minhas escolhas e permitiu que pudessem ser alcançadas, com muito apoio, companheirismo e amor. Em especial aos momentos em que me acolheu, entendeu e ajudou a contornar minhas dificuldades e fobias durante a pesquisa;

Aos meus amigos e colegas de trabalho que permitiram que essa caminhada fosse menos pesada e por acreditarem em mim;

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e qualidade do ensino e pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos para todos os envolvidos, seja de forma direta ou indireta.

“Compreender as coisas que nos rodeiam é a melhor
preparação para compreender o que há mais além.”

Hipátia

RESUMO

GOMES, Ana Paula Lima do Nascimento. **Efeitos da inibição farmacológica da proteína quinase c beta sobre a febre em ratos**. Brasília, 2023. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

A febre é o aumento da temperatura corporal mediado pelo sistema nervoso central e participa das respostas realizadas pelo organismo para se defender de processos infecciosos e inflamatórios. O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina de bactérias gram-negativas, amplamente utilizada para indução da febre em modelos experimentais. As isoformas da proteína quinase C (PKC) desempenham atividades regulatórias em uma variedade de funções celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, secreção de hormônios, entre outros. Evidências indicam a participação da PKC na regulação da febre induzida por LPS, entretanto a isoforma envolvida ainda não foi identificada. Dados de análise proteômica obtidos por nosso grupo demonstraram aumento na abundância da proteína PKC β no hipotálamo de ratos febris. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito da inibição seletiva da PKC β sobre a resposta febril e a produção de prostaglandina (PG) E₂ hipotalâmica induzidas por LPS, assim como sobre a concentração de mediadores pirogênicos circulantes e produção de espécies reativas de oxigênio no tecido adiposo marrom (TAM). Ratos Wistar machos receberam administração intracerebroventricular do inibidor enzastaurina (ENZ) 30 minutos antes da administração intraperitoneal de LPS e tiveram suas temperaturas corporais monitoradas por até 6 h. O tratamento com ENZ resultou em diminuição da temperatura corporal, acompanhada da redução das concentrações séricas de interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral (TNF) α . Além disso, verificou-se redução na produção de espécies reativas de oxigênio no TAM dos animais. Em contrapartida, não houve diminuição da produção de PGE₂ hipotalâmica, nem de hemoglobina nitrosilada. Os resultados indicam que a PKC β participa da resposta febril induzida por LPS, entretanto a isoforma não parece estar envolvida na produção de PGE₂ hipotalâmica. A inibição da PKC β pode reduzir a sinalização decorrente da ação da PGE₂ na área pré-óptica hipotalâmica e os efluxos simpáticos para o TAM, com efeitos inibitórios sobre a termogênese. Mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: Enzastaurina, Resposta febril, Mediadores pirogênicos.

ABSTRACT

GOMES, Ana Paula Lima do Nascimento. **Efeitos da inibição farmacológica da proteína quinase c beta sobre a febre em ratos**. Brasília, 2023. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

Fever is the increase in body temperature mediated by the central nervous system and participates in the responses produced by the body to defend itself from infectious and inflammatory processes. Lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin of gram-negative bacteria, widely used for fever induction in experimental models. Protein kinase C (PKC) isoforms perform regulatory activities in a variety of cellular functions, including cell growth and differentiation, gene expression, and hormone secretion, among others. Evidence indicates the participation of PKC in the regulation of LPS-induced fever, however the isoform involved has not yet been identified. Data from proteomic analysis obtained by our group showed increased abundance of PKC β protein in the hypothalamus of febrile rats. Thus, the present study aimed to investigate the effect of selective PKC β inhibition on the febrile response and hypothalamic prostaglandin (PG) E₂ production induced by LPS, as well as on the concentration of circulating pyrogenic mediators and reactive oxygen species production in brown adipose tissue (TAM). Male Wistar rats received intracerebroventricular administration of the inhibitor enzastaurin (ENZ) 30 min before intraperitoneal administration of LPS and had their body temperatures monitored for up to 6 h. ENZ treatment resulted in decreased body temperature, accompanied by decreased serum concentrations of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF) α . In addition, there was a reduction in the production of reactive oxygen species in the TAM of the animals. In contrast, there was no decrease in hypothalamic PGE₂ production, nor in nitrosylated hemoglobin. The results indicate that PKC β participates in the LPS-induced febrile response, however the isoform does not seem to be involved in hypothalamic PGE₂ production. Inhibition of PKC β may reduce downstream signaling of PGE₂ action in the hypothalamic preoptic area and sympathetic effluxes to the TAM, with inhibitory effects on thermogenesis. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Enzastaurin, Fever response, Pyrogenic mediators.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Vias de transdução de sinal mediada por LPS/TLR-4.....	19
Figura 2: Localização e função da UCP-1 na cadeia respiratória mitocondrial (CRM).....	23
Figura 3: Formação da prostaglandina E2 a partir dos fosfolípidos.....	24
Figura 4: Estrutura e classificação das isoenzimas de PKC.....	26
Tabela 1: Inibidores de PKC.....	29
Figura 5: Estrutura química da enzastaurina, inibidor seletivo de PKC- β	30
Figura 6: O inibidor seletivo de PKC β , ENZ, reduz a resposta febril induzida por LPS.....	40
Figura 7: Efeito do pré-tratamento com enzastaurina sobre a febre induzida por LPS e a síntese de PGE ₂ no hipotálamo.....	41
Figura 8: A inibição central da PKC β reduz os níveis séricos de IL-6 e TNF α	42
Figura 9: Pré-tratamento com enzastaurina e o efeito sobre a concentração de HbNO em ratos com febre induzida por LPS.....	43
Figura 10: Concentração de CM $^{\bullet}$ (μ M) no tecido adiposo marrom (A) e no sangue (B) 5 horas após a administração de LPS em animais pré-tratados ou não com ENZ.....	44

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
δ	delta
η	eta
ε	épsilon
γ	gama
ι	iota
θ	teta
ζ	zeta
5-HT	serotonina
mL	mililitro
μ L	microlitro
mg	miligrama
μ g	micrograma
μ M	micromolar
ng	nanograma
kg	quilograma
GHz	gigahertz
kHz	quilohertz
mW	miliwatts
AA	ácido araquidônico
APO/HA	área pré-óptica do hipotálamo anterior
ASC	área sob a curva
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barreira hematoencefálica
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CMH	1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5- tetrametilpirrolidina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	ciclooxigenase
cPKC	proteína quinase c convencional ou clássica

CRM	cadeia respiratória mitocondrial
DAG	diacilglicerol
DETC	trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DF	deferoxamina
DMH	hipotálamo dorsomedial
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EIA	imunoensaio enzimático
ENZ	enzastaurina
EPM	erro padrão da média
ERO	espécie reativa de oxigênio
ERN	espécie reativa de nitrogênio
g	força g (gravidade)
GABA	ácido gama aminobutírico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HbNO	hemoglobina nitrosilada
IB	Instituto de Biologia
I.C.V.	intracerebroventricular
IL	interleucina
IL-1 β	interleucina do tipo 1 beta
IL-6R	receptor de interleucina do tipo 6
I.P.	intraperitoneal
IP3	trifosfato inositol
I.V.	intravenoso
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
KHB	tampão Krebs HEPES
LPS	lipolissacarídeo
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MD2	fator de diferenciação mieloide 2
mPGES-1	prostaglandina E2 sintase microssomal 1
NADPH	adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	fator nuclear kappa B

nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂ ^{-•}	ânion superóxido
•OH	hidroxil
OVLT	organum vasculosum da laminae terminalis
PB1	phox e bem 1
PE	éster de forbol
PG	prostaglandina
PGES	prostaglandina E2 sintase
PGHS	prostaglandina H2 sintase
PIP2	fosfatidilinositol bifosfato
PKC	proteína quinase c
PKC β	proteína quinase c beta
RACK	receptor de proteína quinase c ativada
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAL	salina
SF	soro fisiológico
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
Tc	temperatura corporal
TAM	tecido adiposo marrom
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
TRL	receptor Toll-like
UCP-1	proteína desacopladora 1
UI	unidade internacional
UnB	Universidade Brasília
VEÍ	veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. TERMORREGULAÇÃO E FEBRE.....	17
2.2. MEDIADORES RELACIONADOS À FEBRE.....	20
2.2.1. Proteína quinase C (PKC).....	25
2.2.1.1. PKC β	28
2.2.1.1.1. Inibidores de PKC β	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. GERAL.....	32
4.2. ESPECÍFICOS.....	32
5. METODOLOGIA.....	33
5.1. ANIMAIS.....	33
5.2. IMPLANTE DE CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR E MICROINJEÇÕES.....	33
5.3. IMPLANTE DE TRANSMISORES DE TEMPERATURA E AFERIÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	34
5.4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
5.5. QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂	35
5.6. QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE IL-6 E TNF α	35
5.7. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE HbNO.....	36
5.8. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ERO.....	36
5.9. MEDIDAS DE EPR.....	37
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PKC β ATENUA A FEBRE INDUZIDA POR LPS.....	39
6.2. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENZASTAURINA SOBRE A PRODUÇÃO HIPOTALÂMICA DE PGE ₂	40
6.3. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENZASTAURINA E OS NÍVEIS CIRCULANTES DE IL-6 E TNF α	41
6.4. EFEITO DA INIBIÇÃO CENTRAL DA PKC β SOBRE A PRODUÇÃO DE HbNO.....	42

6.5. A INIBIÇÃO CENTRAL DA PKC β REDUZ A PRODUÇÃO DE ERO NO TAM, MAS NÃO NO SANGUE.....	43
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÃO.....	50
9. PERSPECTIVAS.....	51
10. REFERÊNCIAS.....	52
11. ANEXO A.....	60

1. INTRODUÇÃO

A febre é uma resposta natural do corpo que ocorre principalmente como parte da resposta de defesa do organismo frente a processos infecciosos e inflamatórios, sendo benéfica ao gerar o aumento da temperatura corporal, o que resulta na elevação da atividade das células imunes e, ainda, na redução da replicação viral e na inibição do crescimento bacteriano (BLOMQVIST; ENGBLOM, 2018). Entretanto, a febre também pode resultar em malefícios, porque o aumento excessivo de temperatura, principalmente acima de 40 °C, pode ocasionar consequências como o aumento da frequência cardíaca e do metabolismo energético, desnaturação de proteínas, distúrbios da consciência e dos sentidos e convulsões, entre outros efeitos deletérios (SILBERNAGL; LANG, 2016; TANSEY; JOHNSON, 2015).

A regulação da temperatura corporal (T_c) ocorre por meio de uma complexa rede de conexões neuronais envolvendo uma hierarquia de estruturas, dentre as quais destaca-se a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA), que atua como um centro de integração da T_c, onde a temperatura periférica é comparada à temperatura central (BOULANT, 2000).

Em um estudo de análise proteômica de hipotálamo de ratos realizado com o intuito de investigar vias de sinalização e proteínas alteradas na resposta febril, demonstramos que durante febres induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) e prostaglandina (PG) E₂ ocorre uma resposta orquestrada, envolvendo alterações de várias vias e proteínas associadas a processos inflamatórios e metabólicos (FIRMINO *et al.*, 2018). Dentre os componentes da via inflamatória ativados, detectamos proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fator nuclear κ B (NF- κ B), ácido araquidônico (AA), adenilato ciclase e sinalização mediada por cálcio, com destaque para a isoforma β da proteína quinase C (PKC β), que se apresenta cerca de 2,5 vezes aumentada nos animais febris em relação aos controles (FIRMINO, 2018).

Desta forma, a proposta do presente estudo foi investigar a relevância funcional do aumento na abundância da PKC β , no modelo de febre induzida por LPS, por meio da sua inibição farmacológica. Analisamos, ainda, os efeitos decorrentes dessa inibição sobre a produção de PGE₂ hipotalâmica e dos mediadores inflamatórios circulantes interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF) α , óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ERO) tanto no sangue como no tecido adiposo marrom (TAM).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TERMORREGULAÇÃO E FEBRE

A termorregulação envolve a detecção de um estímulo sensorial pelo sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP), a integração pelo cérebro ou medula espinhal e a resposta efetora, que envolve a ativação de mecanismos de aquecimento ou resfriamento, com o intuito de manter equilíbrio térmico para permitir condições adequadas de funcionamento do organismo (ANGILLETTA *et al.*, 2018).

O processo de integração envolve uma hierarquia de estruturas, tais como o hipotálamo, o sistema límbico, o tronco cerebral, a formação reticular, a medula espinhal e os gânglios simpáticos (BOULANT, 2000). Dentre essas, a APO/HA é considerada a principal responsável pelo controle das respostas termorreguladoras aos estímulos de variação de temperatura. Nessa área estão presentes neurônios termossensíveis, cuja frequência de disparos é afetada tanto por variações da temperatura sanguínea na área adjacente, como por influência de conexões diretas com termorreceptores distribuídos na pele e nos músculos (ROMANOVSKY *et al.*, 2018).

Em resposta às variações de temperatura, os neurônios hipotalâmicos ativam mecanismos fisiológicos termoefetores. Por exemplo, as principais respostas contra o calor são a vasodilatação e sudorese e contra o frio são a vasoconstrição, a piloereção e a termogênese decorrente ou não de tremores. Além dessas, há várias respostas comportamentais, como mover-se para um ambiente mais frio ou mais quente (MORRISON; NAKAMURA, 2019; PROTSIV *et al.*, 2020; TAN; KNIGHT, 2018, TANSEY; JOHNSON, 2015).

Todos os animais, incluindo os humanos, preferem um ambiente termicamente não estressante (termoneutro). A zona termoneutra, ou de termoneutralidade, pode ser definida como o intervalo de temperatura ambiente no qual a regulação da T_c é alcançada apenas pelo controle de processos de perda de calor não evaporativos, os quais são modulados pela vasodilatação e vasoconstrição da pele. Portanto, dentro da zona termoneutra verifica-se um equilíbrio, no qual o fluxo sanguíneo da pele é continuamente ajustado para que a perda de calor seja igual ao ganho de calor e a T_c interna permaneça em níveis relativamente estáveis, ou seja, próximos a 37°C (ROMANOVSKY *et al.*, 2018).

Uma das respostas de defesa do organismo durante processos infecciosos ou inflamatórios é o aumento controlado da T_c , denominado febre. Por esse mecanismo é possível

combater patógenos sensíveis à temperatura e até mesmo facilitar a resposta imune por meio da vasodilatação e infiltração de células de defesa (HASDAY; FAIRCHILD; SHANHOLTZ, 2000). Todavia, quando a febre ultrapassa 40 °C pode resultar em respostas negativas ao hospedeiro, como danos ao DNA e a desnaturação de proteínas (TANSEY; JOHNSON, 2015).

Evidências demonstram que a geração de febre pode ocorrer tanto por mecanismos neurais (responsáveis pelo início rápido) quanto humorais (responsáveis pela manutenção da febre). Na via humoral, pirogênios exógenos estimulam a produção de citocinas ou atuam diretamente em áreas desprovidas de barreira hematoencefálica (BHE), que permitem o contato estreito entre o sangue e as células neuronais. Dentre estas regiões, pode-se destacar o *organum vasculosum da laminae terminalis* (OVLT), localizado na extremidade anteroventral do terceiro ventrículo. Os pirogênios exógenos ou endógenos circulantes ativam receptores específicos presentes no OVLT, promovendo aumento da síntese de prostanóides, incluindo a PGE₂. Essa, por sua vez, atua em receptores EP₃ presentes em neurônios da APO/HA e, em consequência, ocorre a diminuição da taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor, o que resulta no aumento da T_c (WALTER *et al.*, 2016).

A participação de nervos aferentes como meio de transporte de sinais imunológicos periféricos para o cérebro deriva principalmente de observações de que a transecção subdiafragmática do nervo vago atenua a resposta febril induzida pela administração intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.) de LPS (ROTH; DE SOUZA, 2001; WERNER *et al.*, 2003).

O LPS é uma endotoxina pirogênica componente da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas e é um dos estímulos mais usados em modelos experimentais para indução da febre (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). De acordo com Garami, Steiner e Romanovsky (2018) a administração dessa endotoxina provoca febre, cujo perfil é dependente da temperatura ambiente, da via de administração e da dose utilizada, sendo que as doses de LPS entre 10 a 1000 µg/Kg induzem respostas febris caracterizadas inicialmente por curta latência, seguida de picos de até 6 horas após sua administração.

O LPS é composto por um domínio hidrofóbico (lipídeo A ou endotoxina), um oligossacarídeo central e um polissacarídeo distal, e é reconhecido pelo sistema imune inato, por exemplo, por macrófagos e células dendríticas, que possuem um sistema de sensores compostos por uma proteína plasmática de ligação ao LPS - a LBP - uma proteína adaptadora

MD-2, um receptor de superfície Tool like - TLR-4 e um receptor de superfície CD-14 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; CARTMELL; MITCHELL, 2005; ROTH *et al.*, 2009. Por meio dessa sinalização o LPS estimula células do sistema imune a uma resposta adaptativa para produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF α e IL-6 (**Figura 1**) (SOUZA, 2004).

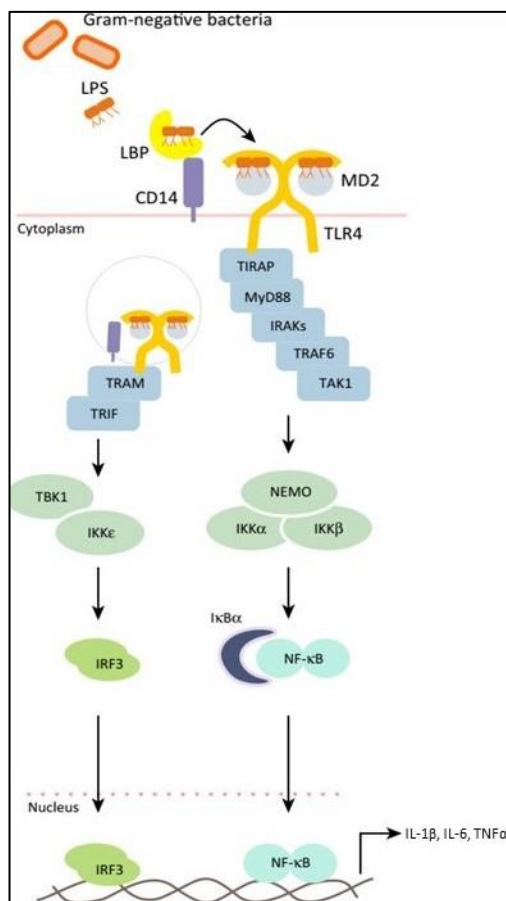


Figura 1: Vias de transdução de sinal mediada por LPS/TLR-4. A sinalização através de TLR4 pelo LPS é iniciada pela ativação coordenada da proteína de ligação de LPS (LBP) e CD14, que transferem LPS para o complexo TLR4/fator de diferenciação mielóide 2 (MD2). A ligação do LPS ao TLR4/MD2 resulta na dimerização do receptor e início de cascatas de sinalização intracelular mediadas por duas vias principais: MyD88-dependente, que resulta na ativação de NF-κB e na expressão de genes de resposta inflamatória e MyD88-independente, responsável pela ativação do fator IRF3, culminando na síntese de interferons envolvidos na resposta antiviral e antibacteriana. TIRAP: adaptador de proteína contendo domínio TIR, MyD88: fator de diferenciação mielóide 88, IRAK: receptor IL-1 kinase associada, TRAF6: fator 6 associado ao receptor do TNF; TAK1: proteína quinase 1; NEMO: modulador essencial de NF-κB, IKK: quinase de IκB, IκBα = proteína inibitória do fator nuclear κB, NF-κB: fator nuclear κB; TRAM: cadeia de translocação associada a proteína 1 de membrana, TRIF: adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon-β, TBK-1: proteína serina/treonina quinase 1; IRF3: fator 3 regulatório de interferon. Fonte: Adaptado de DEMON; WALLE; LAMKANFI, 2014.

2.2. MEDIADORES RELACIONADOS À FEBRE

Conforme apresentado anteriormente, durante uma infecção, o LPS se liga ao receptor TLR-4 presentes em células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, entre outros tipos celulares. A sinalização intracelular promove a ativação de fatores de transcrição, entre os quais destaca-se o NF- κ B, que quando ativado se transloca para o núcleo e estimula a expressão de genes envolvidos na produção de citocinas inflamatórias que, por sua vez, atuam como pirógenos endógenos capazes de desencadear a resposta febril (ROTH; DE SOUZA, 2001).

Após a administração de LPS, verifica-se que o TNF α é a primeira citocina a aparecer na circulação, seguida por vestígios de IL-1 β e altas quantidades de IL-6 (ROTH; DE SOUZA, 2001).

Em relação a IL-1 β , sabe-se que induz febre quando administrada por via i.v. ou i.c.v. em ratos (DASCOMBE *et al.*, 1989; ROTHWELL *et al.*, 1990). A administração i.p. ou i.c.v. do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) inibe a febre induzida por LPS, em ratos (SMITH; KLUGER, 1992; CARTMELL *et al.*, 2001). Por outro lado, Caldwell, Graves e Wallace (1998) demonstraram que após administração i.v. de 10 μ g/kg de LPS, a IL-1 β não foi detectada na circulação, enquanto as concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF α aumentaram significativamente.

A IL-6 é outra citocina com atividade pirogênica (DINARELLO *et al.*, 1991; ROTH; DE SOUZA, 2001). Durante a febre induzida por LPS, em ratos e cobaias, foram detectadas concentrações elevadas de IL-6 no plasma, fluido cerebrospinal e perfusatos hipotalâmicos (COELHO *et al.*, 1995; ROTH *et al.*, 1993; ZAMPRONIO *et al.*, 2000). Além disso, a infusão central de IL-6 induz febre em ratos (SOUZA *et al.*, 2002). A ativação do receptor de IL-6 (IL-6R) presente nas células endoteliais vasculares em regiões próximas a APOHA, induz a expressão da enzima responsável pela produção de PGE₂, a COX-2, levando à indução de febre (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015). Em adição, a febre induzida por LPS não ocorre na presença de anticorpo neutralizante específico para IL-6 ou em camundongos deficientes para IL-6 (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; MARTINS *et al.*, 2012).

Apesar de ainda não possuir sua ação completamente esclarecida na febre, há evidências de que o TNF α também atue como um pirogênio endógeno. A administração de TNF α , por via periférica ou central, induz febre de curta latência e duração em diferentes espécies (ROTH; DE SOUZA, 2001; STEFFERL *et al.*, 1996; YAMASHIRO; DE SOUZA; SOARES, 2019).

Estudo realizado por Jansky *et al* (1995) demonstrou que tanto as concentrações plasmáticas quanto hipotalâmicas de $\text{TNF}\alpha$ são aumentadas após a injeção de LPS. O tratamento com o receptor solúvel tipo 1 do TNF, neutraliza o TNF bioativo circulante induzido por LPS em cobaias e causa uma atenuação significativa da resposta febril (ROTH *et al.*, 1998). Entretanto, estudo realizado por Long *et al* (1992) apontou que a injeção sistêmica de $\text{TNF}\alpha$ diminui a febre causada por IL-1 e que a ação de anticorpos contra o TNF produziu aumento na temperatura, sugerindo a sua atuação como um antitérmico endógeno.

Além das citocinas, outros mediadores inflamatórios têm sido relacionados à resposta febril, dos quais cabe destacar as espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de oxigênio (ERO). As ERN são compostos contendo nitrogênio, tais como óxido nítrico (NO), óxido nitroso, peroxinitrito, ânion nitroxil e ácido peroxinitroso. A principal delas é o NO, um mediador gasoso gerado pela ação de enzimas chamadas NO sintases (NOS) em uma reação redox entre L-arginina e oxigênio, que forma L-citrulina e NO. São descritas três isoformas de NOS, codificadas por diferentes genes: uma NOS neuronal (nNOS) codificada pelo gene NOS1, uma NOS induzida (iNOS) codificada por NOS2 e outra endotelial (eNOS) codificada por NOS3. A nNOS e a eNOS são enzimas constitutivas, dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e reguladas por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais (como microRNA) ou ainda pós-traducionais (como fosforilação, acetilação, S-nitrosilação). Já a iNOS é uma enzima regulada por transcrição gênica durante a inflamação, que atua de maneira independente de Ca^{2+} e sua indução acontece essencialmente em astrócitos e micróglia em resposta a LPS ou a citocinas pró-inflamatórias (WEN; RIBEIRO; ZHANG, 2011; PRAJITHA; ATHIRA; MOHANAN, 2019).

A sinalização mediada pelo NO tem sido associada a muitos processos biológicos, incluindo a febre (REUTER *et al.*, 2010). O NO tem sua concentração aumentada durante a resposta febril (GOMES, 2022) e o tratamento com inibidores da síntese de NO atenua o aumento de temperatura induzido por LPS em ratos (PEROTTI *et al.*, 1999). Além disso, sua produção periférica permite a modulação de órgãos termofetores importantes, como o tecido adiposo marrom (TAM), cuja termogênese é dependente da produção local de NO (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014; STEINER; BRANCO, 2001).

Para garantir a proteção contra o estresse nitrosativo, o grupamento heme da hemoglobina reage com o NO, formando a hemoglobina nitrosilada (HbNO) (DIKALOV; FINK, 2005; GOMES, 2022). A quantificação desse complexo no sangue circulante pode ser feita por

espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), comparando a amplitude do sinal com a amplitude da curva de calibração já pré-estabelecida (HOGG, 2010; HALL; BUETTNER, 1996). Assim que NO adentra em eritrócitos, acontecem duas reações primordiais, que são detectadas por RPE. A primeira se efetua quando NO reage rapidamente e irreversivelmente com a oxi-hemoglobina gerando nitrato e metehemoglobina. A segunda reação acontece quando o NO se liga à desoxihemoglobina formando um espectro de HbNO estável e detectável.

As ERO incluem as espécies que são radicais livres e outras, que embora não possuam elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (RIBEIRO *et al.*, 2005). Assim, as ERO são moléculas de meia vida muito curta, na ordem de nano ou milissegundos, sendo as principais o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KIM *et al.*, 2015).

Embora as ERO possam ser mediadores de doenças, as evidências mais recentes indicam que sua formação nem sempre é deletéria, mas apresenta papel sinalizador no controle de muitos processos fisiológicos, como na resposta inflamatória aguda e na defesa contra a infecção (REUTER *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, a produção de ERO é balanceada pela presença de sistemas antioxidantes endógenos. Entretanto, quando há uma descompensação desse sistema, ocorre o estresse oxidativo, que pode causar danos à membrana celular e à estrutura do DNA, além de mudanças nas funções de proteínas, entre outros problemas (KIM *et al.*, 2015).

Riedel *et al* (2003) demonstraram que durante a febre induzida por LPS em coelhos, há um aumento da concentração de peróxidos plasmáticos, que é revertido pelo tratamento com agentes antioxidantes, como azul de metileno e ácido α -lipóico. Anteriormente esse mesmo grupo demonstrou que durante a febre, há um aumento de malonaldeído em tecidos periféricos, e como este é um produto da peroxidação lipídica, indica-se que membranas celulares sejam danificadas por ERO durante a febre (RIEDEL; MAULIK, 1999). Outro fármaco com ação antioxidante que também apresenta efeito antipirético é a n-acetilcisteína, que reduz a febre induzida por LPS ou turpentina em ratos (WROTEK *et al.*, 2011). Corroborando esses dados, nosso grupo demonstrou que durante a resposta febril ocorre aumento na produção de ERO no fígado, TAM e hipotálamo de ratos (GOMES *et al.*, 2018).

Pesquisas recentes indicam que o TAM tem importância fisiológica em adultos, pois foi verificado que existe um aumento da taxa metabólica quando esses indivíduos são expostos ao

frio, inclusive, por apresentar essa importância metabólica, o TAM vem sendo considerado alvo para tratamento da obesidade (CYPESS *et al.*, 2009; SCHEELE; NIELSEN, 2017; VAN MARKEN LICHTENBELT *et al.*, 2009). A depender da espécie do organismo, tem-se uma variação de distribuição dos pequenos depósitos de TAM, onde seus adipócitos marrons, que são formados por inúmeras gotículas lipídicas, têm bastante mitocôndrias próximas à membrana plasmática (CYPESS *et al.*, 2009).

Na **Figura 2** é possível observar o esquema da produção de calor advinda do TAM que acontece devido ao transporte de prótons pela membrana mitocondrial interna por meio da ação da proteína desacopladora-1 (UCP-1), que causa a deficiência de adenosina trifosfato (ATP) resultante do desacoplamento do gradiente de prótons entre a matriz e o espaço intermembranar (MORRISON, 2016).

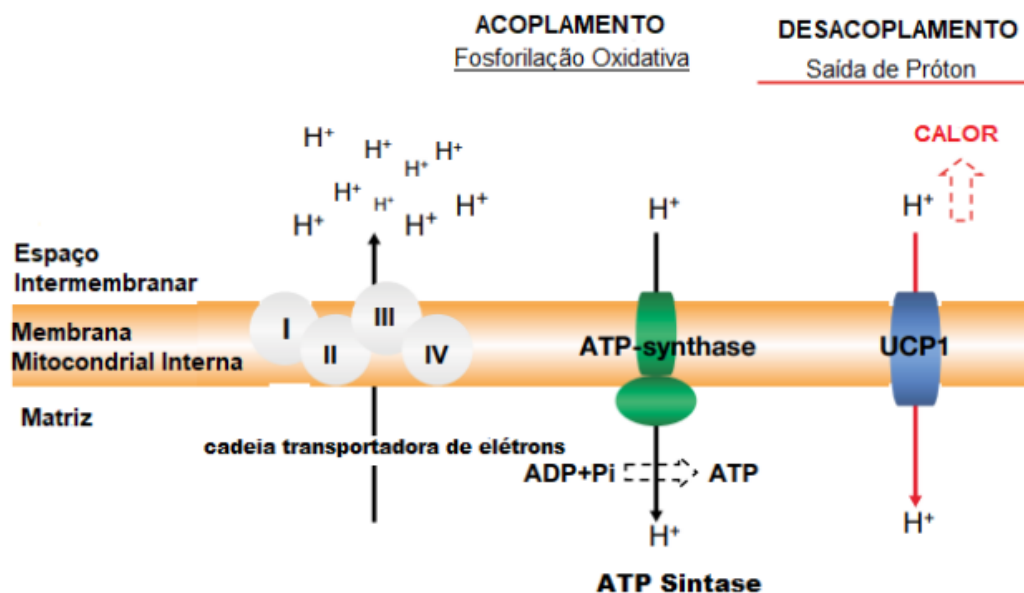


Figura 2: Localização e função da UCP-1 na cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Os números de I a IV correspondem ao complexo CRM, sendo a ATP sintase o quinto complexo. Durante a respiração, os prótons são bombeados através dos complexos CRM e um gradiente de prótons é gerado. A energia do gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP pelo quinto complexo. A UCP-1 catalisa a reentrada regulada de prótons na matriz, desacoplando o CRM e por consequência, reduzindo a produção de ATP e gerando calor. Fonte: adaptado de BRONDANI *et al* 2012.

Ainda, Morrison (2016) descreveu em sua pesquisa que a ação da PGE₂ em receptores EP₃ expressos em neurônios contidos na APO/HA modula a ativação de vias eferentes que estimulam a termogênese pelo TAM no decorrer da resposta febril.

Apesar de diversos mediadores inflamatórios terem sido descritos pelo seu envolvimento na resposta febril, evidências demonstram que a ação desses mediadores, depende da produção

central de PGE_2 , considerada o mediador final da febre (BLATTEIS; SEHIC, 1997; ESKILSSON *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2009).

A PGE_2 é sintetizada por meio da esterificação dos fosfolipídeos das membranas celulares pela via do ácido araquidônico (AA) conforme esquema representado na **Figura 3**. A fosfolipase A2 libera o AA que se encontra esterificado nos fosfolipídeos das membranas celulares. Uma vez liberado, esse ácido é metabolizado pela enzima COX-2, gerando PGG_2 , que é rapidamente peroxidada gerando PGH_2 , que é então isomerizada a PGE_2 pela ação da PGE_2 sintase microssomal-1 (mPGES-1). As isoformas COX-2 e mPGES-1 são geralmente predominantes durante processos inflamatórios (ROTH; BLATTEIS, 2014).

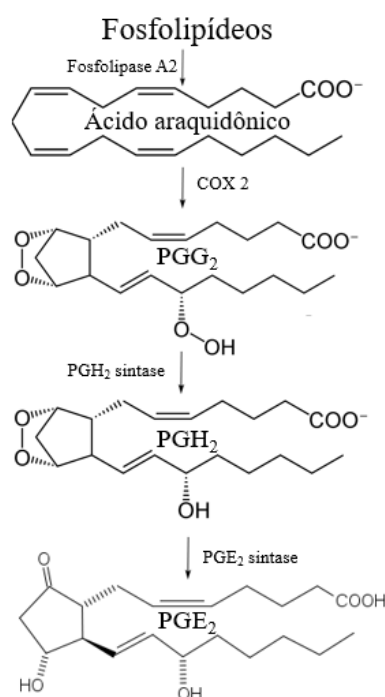


Figura 3: Formação da prostaglandina E2 a partir dos fosfolipídeos. Os fosfolipídeos de membrana sofrem ação da enzima fosfolipase A2 formando o composto lipídico ácido araquidônico (AA) que pela via dependente da ciclooxygenase (COX) sofre ação catalítica pela isoforma COX-2 sintetizando a prostaglandina G₂ (PGG_2). Esta última, por intermédio da prostaglandina H₂ sintase (PGH_2 sintase) produz a prostaglandina H₂ (PGH_2) e pela ação da prostaglandina E₂ sintase (PGE_2 sintase), origina a PGE_2 . Fonte: texto (Flower, 2003) e imagem, autoria própria.

As PG do tipo E exercem seus efeitos pela ligação a um grupo de receptores acoplados a proteína G, denominados receptores EP, sendo que foram identificados quatro subtipos de receptores EP (1-4) em diferentes espécies, incluindo camundongos, ratos e humanos (MATSUOKA; NARUMIYA, 2007).

Os receptores EP_3 , os quais são acoplados à proteína G inibitória, vêm sendo apontados como os responsáveis por mediar o desenvolvimento da resposta febril em resposta à PGE_2 . Em 1998, Ushikubi *et al* demonstraram, por meio da utilização de camundongos nocaute para os

quatro subtipos de receptores EP, que apenas os camundongos nocaute para EP₃ não eram capazes de desenvolver febre em resposta a administração de PGE₂, IL-1 β ou LPS. Outros estudos demonstram ainda que este subtipo de receptor está presente em neurônios na área pré-óptica, o que reforça a hipótese do envolvimento deste receptor no desenvolvimento da febre (LAZARUS, 2006; NAKAMURA, *et al.*, 2000)

Estudo recente sugere que os neurônios da APO/HA que expressam receptores EP₃ (POAEP₃R) controlam bidirecionalmente a temperatura corporal por meio de uma sinalização gabaérgica tônica (NAKAMURA *et al.*, 2022). Os autores verificaram que os neurônios POAEP₃R são ativados em resposta à temperatura ambiente elevada, mas inibidos pela PGE₂. A estimulação quimiogénica dos neurônios POAEP₃R expostos à temperatura ambiente reduziu a T_c por aumentar a dissipação de calor, enquanto a inibição deles pela PGE₂ provocou febre envolvendo a termogênese do TAM. Isso ocorre porque os neurônios POAEP₃R fazem sinapse inibitória tônica, por meio da liberação de ácido γ -aminobutírico (GABA), com neurônios do hipotálamo dorsomedial (DMH), que são responsáveis por regular o efluxo simpático para importantes órgãos termoeferores. Como a PGE₂ inibe esses neurônios, ocorre redução na sinalização GABAérgica, consequentemente desinibição de vias termoeferoras, levando a termogênese no TAM.

2.2.1. Proteína quinase C (PKC)

As proteínas quinases C (PKC) são isoenzimas que pertencem à família serina/treonina quinase, as quais possuem a função de regular eventos celulares após a ativação de fosfolipídeos ligados à membrana, e sua ativação depende Ca²⁺ e diacilglicerol (DAG) (KALELI *et al.*, 2020). A família da PKC compreende 12 quinases diferentes que apresentam características estruturais comuns, categorizadas em quatro subfamílias: convencionas ou clássicas (α , β e γ), atípicas (ζ e ι), novas (δ , ϵ , η e θ) e PKNs (PKN1, PKN2 e PKN3). Cada subfamília possui distintas composições de domínio (**Figura 4**) que definem respostas aos diferentes estímulos endógenos ou exógenos, sendo suas especificidades e funções individuais ainda não completamente esclarecidas.

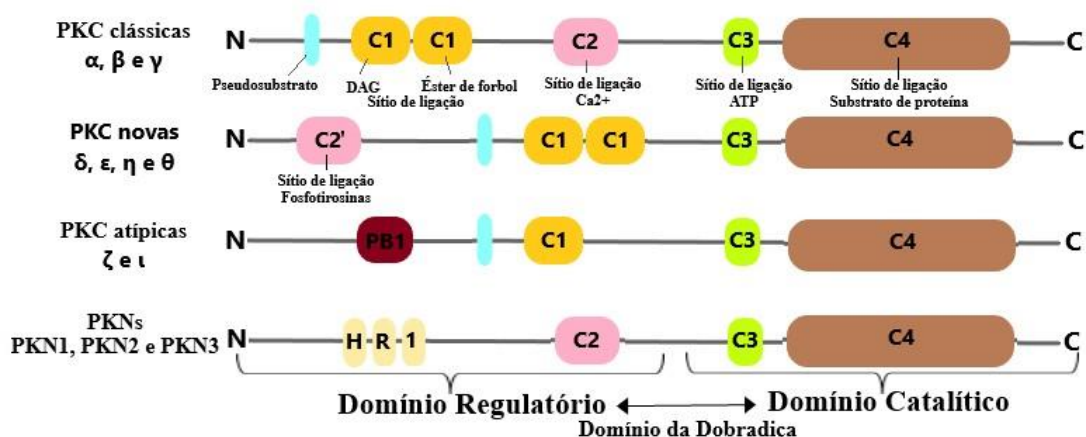


Figura 4: Estrutura e classificação das isoenzimas de PKC. A ligação de diacilglicerol (DAG) e ésteres de forbol (PE) acontece no domínio C1, ausente somente na subfamília PKN. A resposta do cálcio está relacionada ao domínio C2, inexistente nas PKC atípicas que possuem o domínio phox e bem 1 (PB1) para especificidade na sinalização intracelular, onde sua função é regulada por interações proteína-proteína. Os domínios HR1 existentes só nas PKNs servem para regulação da proteína. Fonte: adaptado de GARCIA-CONCEJO; LARHAMMAR, 2021; KALELI *et al.*, 2020; BLACK; BLACK 2013.

As PKC possuem uma região catalítica e outra regulatória com quatro domínios, sendo que esses domínios são conectados por um domínio de dobradiça. A ligação entre as regiões catalítica e reguladora ocasiona a inativação enzimática enquanto que a dissociação dessas regiões, resulta na ativação das proteínas (KALELI *et al.*, 2020).

A subfamília PKC convencional (cPKC) possui domínio C1 e C2 em sua porção amino-terminal que desenvolvem a função crucial na regulação da atividade enzimática. Para sua ativação, DAG ou PE se ligam no sítio de ligação na região C1, enquanto que o cálcio (Ca^{2+}), no sítio de ligação na região C2 (NISHIZUKA, 1995). A fosforilação das cPKC inicia com o aumento da concentração citosólica de DAG e Ca^{2+} pela estimulação dos receptores acoplados a proteína G que ativam a fosfolipase C e que resulta na hidrólise da fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP2) em trifosfato de Inositol (IP3) e DAG, assim, permitindo a passagem da proteína do citosol para a locais subcelulares, onde irão interagir com o receptor de proteína quinase C ativada (RACK) promovendo suas respostas celulares (MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES, 2012).

O estudo de Kawano *et al* (2021) aponta que a maioria dos inibidores de PKC existentes atuam no domínio C3, que está relacionado à competição da ligação de ATP (ex.: enzastaurina (LY317615). Outros inibidores também foram relatados, tais como os competitivos com DAG

(ação no domínio C1, ex.: calfofostina C), CA^{2+} (ação no domínio C2, ex.: peptídeos derivados de PKC β C2) e com substrato de proteína (ação no domínio C4, ex.: celeritrina).

A descoberta de inibidores seletivos das diferentes formas da PKC foi árdua, graças às semelhanças entre os seus sítios de ligação catalíticos, por isso, para a identificação de moléculas que pudessem apresentar uma alta afinidade em regiões específicas da proteína, houve a necessidade do envolvimento de áreas de pesquisas inerentes ao assunto, como a química medicinal, para se obter avanços que possibilitem novos alvos terapêuticos (GIOIELLO *et al.*, 2020; MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES; 2012).

Estudos realizados com essa família de proteínas indicam sua importância, devido sua presença em várias vias de sinalização, na participação de muitos processos e respostas celulares, além de doenças, tais como cognição, neurodegeneração, ciclo, adesão e diferenciação celular; cânceres, doença de Alzheimer, Parkinson, inflamatórias e autoimunes (GARCIA-CONCEJO; LARHAMMAR, 2021; ISAKOV, 2018). Por este motivo, pesquisas relacionadas às ativações e inibições de PKC podem revelar alvos terapêuticos de extrema importância tanto para diagnósticos quanto para compreensão de vias de sinalização que envolvam a PKC (KAWANO *et al.*, 2021).

Com relação a resposta febril, o envolvimento da PKC foi demonstrado pela primeira vez por Kozak *et al* (1997). Os autores realizaram o pré-tratamento dos animais, por via subcutânea, com dois inibidores não seletivos de PKC, o H-7 e a celeritrina. Os autores verificaram redução tanto da febre, quanto do aumento da concentração plasmática de IL-6 induzidos pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos. Thaler *et al* (2009) demonstraram, por imuno-histoquímica, aumento na expressão de PKC atípica no hipotálamo de ratos após a injeção sistêmica de LPS e que o tratamento dos animais com um inibidor específico de PKC atípica reduziu a febre, ativação neuronal e a produção de citocinas hipotalâmicas induzidas por LPS.

Com o propósito de avançar na identificação de vias de sinalização e de proteínas envolvidas na resposta febril, nosso grupo realizou análise proteômica do hipotálamo de animais com febres induzidas tanto pela administração i.v. de LPS quanto pela administração i.c.v. de PGE₂. Os resultados demonstraram ativação de vias inflamatórias clássicas como a do AA, de NF- κ B e de MAP quinases, assim como de vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e glicerofosfolipídios. Cabe destacar a ativação da via de sinalização do cálcio, em que se verificou que o LPS promoveu um aumento na abundância das isoformas β e γ de PKC em cerca de 2,5 e 1,2 vezes, respectivamente. Quando

o estímulo utilizado foi a PGE₂, verificou-se aumento na abundância de PKC β em 1,9 vezes em relação aos animais controles (FIRMINO *et al.*, 2018).

Assim, apesar das evidências indicarem a participação de vias de sinalização que dependem da PKC na resposta febril, o aumento na abundância hipotalâmica da isoforma β tanto depois do estímulo LPS quanto PGE₂ gerou questionamento a respeito da isoforma envolvida na febre e nos motivou a investigar melhor o papel da PKC β nessa resposta.

2.2.1.1. PKC β

A PKC β apresenta duas variantes sintetizadas por *splicing* diferentes de um único gene, em que as diferenças ocorrem no domínio C terminal, sendo C50 para β I e C52, β II (KAWAKAMI; KAWAKAMI; KITAURA, 2002) e quando comparado às outras isoformas da PKC, verificou-se que a β exerce um papel importante na expressão da atividade da NADPH oxidase (principal fonte de ERO) (KADIR; ALWJWAJ; BAYRAKTUTAN, 2022).

Destaca-se o papel da PKC β na neuroplasticidade da amígdala, na memória dirigida pelo sistema límbico e no processo de cognição. Além disso, verifica-se aumento na expressão da PKC β após acidente vascular encefálico isquêmico, que pode corroborar para ruptura da BHE e para a lesão de reperfusão (LANZ *et al.*, 2013). Ainda, o aumento da PKC β na aterosclerose e na diabetes, resulta na lesão às células endoteliais e na criação de produtos glicosilados, respectivamente (LUCKE-WOLD *et al.*, 2015).

Um estudo genético envolvendo 195 indivíduos foi realizado para verificar o papel da PKC β na patogênese da doença de Alzheimer. Interessantemente, os resultados demonstraram que a baixa expressão de PKC β foi um potencial fator causador da doença de Alzheimer, possivelmente associado a alterações em junções comunicantes, processo de fagocitose e vias de sinalização mediadas por MAP quinases (ZHOU *et al.*, 2020).

2.2.1.1.1. Inibidores de PKC β

Os inibidores de PKC incluem compostos que podem interagir diretamente com a molécula da PKC, interferir na ligação da enzima aos seus substratos, diminuir a síntese de PKC ou neutralizar seus efeitos (RINGVOLDI; KHALIL, 2017). Vários inibidores de PKC interagem diretamente com a PKC em diferentes locais da molécula (**Tabela 1**).

Os inibidores de primeira geração, como H-7 e estaurosporina, são inibidores não seletivos de PKC, que bloqueiam todas as isoformas da enzima e são tóxicos para uso clínico (CLARKE; DODSON, 2007). Alguns inibidores de PKC direcionados ao local de ligação do ATP, como indolcarbazol e bisindoilmaleimida, mostram seletividade para isoformas específicas de PKC. A ruboxistaurina e a enzastaurina (ENZ) pertencem à classe das bisindoilmaleimidadas, sendo consideradas inibidores seletivos de PKC β e têm sido as moléculas de escolha para os testes em ensaios clínicos (GERALDES; KING, 2010; RINGVOLDI; KHALIL, 2017).

Tabela 1: Inibidores de PKC.

INIBIDOR	SÍTIO DE AÇÃO	SELETIVIDADE	KD OU IC50
H-7	Sítio de ligação do ATP	Não há	PKC β I 3.5 μ M PKC ζ 6 μ M
Celeritrina	Sítio de ligação do ATP	Pan-PKC	0.66 μ M
Indolcarbazol	Domínio catalítico	PKC α , β I	PKC α 2.3 nM PKC β I 6.2 nM
Enzastaurina	Sítio de ligação do ATP	Mais potente para PKC β . PKC α , γ , ϵ	PKC α 39 nM PKC β 6 nM, PKC γ 83 nM PKC ϵ 110 nM
Ruboxistaurina	Sítio de ligação do ATP	PKC β I, β II	PKC β I 4.7 nM PKC β II: 5.9 nM

Fonte: Adaptado de RINGVOLDI; KHALIL, 2017.

A ENZ (**Figura 5**) é um composto de bisindolilmaleimida (análogo sintético da estaurosporina + maleimida) que possui IC₅₀ de 6 nM para a PKC β (KAWANO *et al.*, 2021). A ativação da PKC β acontece a partir do seu deslocamento pela membrana seguida da ligação à ATP. A potente e seletiva inibição que a molécula ENZ realiza, ocorre pela competição com a ATP pelos sítios catalíticos, e em razão disso, há a inativação da PKC β (STRANAHAN *et al.*, 2016).

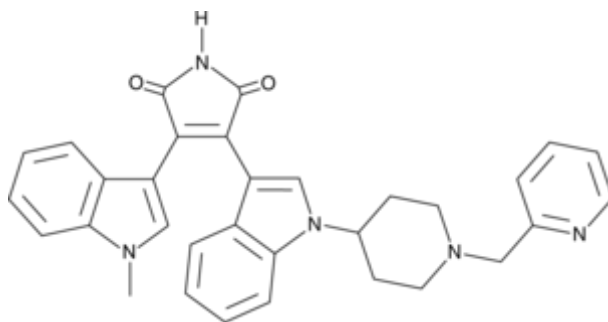


Figura 5: Estrutura química da enzastaurina, inibidor seletivo de PKC- β . Fonte: Cayman Chemical, acesso em: 23 jan. 2023.

Os efeitos do tratamento com ENZ em humanos estão sendo investigados em mais de 50 ensaios clínicos, principalmente para o tratamento de diferentes tipos de câncer (WILLEMAN *et al.*, 2018). Com esses ensaios clínicos pode-se verificar que a ENZ tem sido razoavelmente bem tolerada, apresentando baixa toxicidade, além de fadiga e alteração coloração da urina e fezes como as reações adversas mais comuns (KILBURN *et al.*, 2015).

A ENZ é metabolizada por enzimas do citocromo P450 3A (CYP3A4), gerando os metabólitos ativos desmetilenopirimidilo (LY326020) e desmetil (LY485912), que também são inibidores da PKC β (CARDUCCI *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

Os inibidores seletivos para as diferentes isoformas de PKC apresentam papel significativo como moduladores do câncer e da resposta inflamatória. Desta forma, pesquisas pré-clínicas e clínicas estão sendo realizadas para aprofundar o conhecimento nesse tema e dispor de possíveis aplicações clínicas e novos alvos terapêuticos (WILLEMAN *et al.*, 2018).

Em especial, a PKC β tem sido descrita por ter sua expressão aumentada em processos patológicos, como acidente vascular cerebral, diabetes, aterosclerose e diferentes tipos de câncer. Outras evidências revelaram o envolvimento dessa quinase em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla e doença de Alzheimer. Por outro lado, o uso de inibidores de PKC β resultou em diminuição da neuroinflamação e do processo de desmielinização, além de assegurar a memória dependente do hipocampo, assim como a neuroplasticidade a partir da conservação da barreira hematoencefálica (LANZ *et al.*, 2013; STRANAHAN *et al.*, 2016).

Dados anteriores obtidos por nosso grupo demonstraram aumento na abundância da PKC β no hipotálamo de ratos durante a febre. Nesse contexto, percebeu-se a necessidade de investigar, de forma sistemática, o papel funcional dessa quinase na gênese e manutenção da resposta febril induzida por LPS. Ainda não há, em nosso conhecimento, trabalhos na literatura que investiguem o papel da isoforma β da PKC nessas condições e, além disso, existe inibidor seletivo (ENZ) comercialmente disponível, o que nos permite fazer a validação farmacológica. Busca-se, com isso, compreender melhor os mecanismos envolvidos na regulação da resposta febril.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Investigar o papel da PKC β na resposta febril induzida por LPS em ratos e os mecanismos envolvidos.

4.2. ESPECÍFICOS

Analisar o efeito do pré-tratamento com o inibidor de PKC β (ENZ) sobre a resposta febril;

Examinar o efeito do pré-tratamento com ENZ sobre a produção hipotalâmica de PGE₂;

Analisar o efeito do pré-tratamento com ENZ sobre a produção de mediadores inflamatórios circulantes no sangue (IL-6, TNF α , ERO e NO) e no tecido adiposo marrom (TAM).

5. METODOLOGIA

5.1. ANIMAIS

Nesta pesquisa foram usados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, com pesos variando entre 180 a 200 g, procedentes do Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB), onde foram mantidos em ambiente com temperatura de 24 °C, com variação de ± 1 °C e luminosidade com ciclo claro-escuro de 12h (7-19 h), com acesso livre à comida e água.

O estudo foi realizado em consonância com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Pesquisa Animal (2011), sendo seus experimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB sob efeitos do SEI nº 23106.080030/2022-22 (**Anexo A**).

5.2. IMPLANTE DE CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR E MICROINJEÇÕES

Para esta etapa, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Cloridrato de Cetamina 10 %, Ketamina Agener®, Agener União, São Paulo, Brasil) e xilazina 2 % (Calmiun®, Agener União, São Paulo, Brasil), nas doses de 60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via i.p. Confirmado o efeito da anestesia, os ratos foram posicionados em um estereotático, foi feita antissepsia e anestesia local na região da cabeça, seguida por incisão e exposição da calota craniana. Para o implante da cânula intracerebroventricular (i.c.v.) foram utilizadas as seguintes coordenadas: - 1,6 mm transversal, -1,5 mm anteroposterior e - 2,5 mm dorsoventral partindo do bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm. Após a implantação da cânula, previamente esterilizada por meio de calor úmido sob pressão, no ventrículo lateral direito, procedeu-se sua fixação com acrílico autopolimerizável. Finalizado o processo, os ratos foram submetidos ao procedimento de implante de transmissores de temperatura (descrito no item a seguir). Os experimentos farmacológicos ocorreram após uma semana.

A ENZ (Cayman Chemical Company) foi dissolvida em Dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em salina. A concentração final de DMSO foi de 1,5%. As microinjeções i.c.v. de ENZ nas doses de 0.3, 1 e 3 ng/rato, em volume de 2 μ L ou o mesmo volume de veículo foram

realizadas 30 minutos antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou LPS (*E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

5.3. IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA E AFERIÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

Todos os ratos tiveram os transmissores de temperatura (SubCue Data Loggers, Calgary, Canadá) implantados na cavidade peritoneal, através de laporotomia mediana, sete dias antes dos experimentos farmacológicos. Cada transmissor foi desinfetado em álcool 70% líquido por 12 horas e lavado com soro fisiológico 0,9% (SF 0,9%), imediatamente antes de ser inserido na cavidade peritoneal em animais anestesiados ainda pelo processo descrito no item 5.2. Após implantação, fez-se sutura separada no músculo e na pele no local da incisão e então os animais receberam tratamento com antibiótico (Oxitetraciclina di-hidratada, Terramicina®, Zoetis, São Paulo, Brasil) via intramuscular e anti-inflamatório (Meloxicam, Maxicam®, MSD, São Paulo, Brasil) via subcutânea, 10 mg/kg e 1 mg/kg por rato, respectivamente.

No dia do experimento, a temperatura corporal foi aferida em intervalos de 15 minutos, iniciada sempre às 6 horas da manhã e antes de qualquer injeção até o final dos experimentos farmacológicos. Todos os experimentos farmacológicos foram conduzidos na zona termoneutra dos ratos (27 ± 1 °C), com temperatura ambiente controlada, depois dos animais terem se adaptado por pelo menos 12h.

5.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Para investigar os efeitos decorrentes da inibição seletiva de PKC β no hipotálamo sobre a resposta febril, os animais receberam a administração de ENZ (0.3, 1 e 3 ng) ou do veículo (DMSO 1,5% em salina) por via i.c.v. 30 minutos antes da administração i.p. de LPS ou salina. A temperatura corporal foi monitorada durante 6 horas após a aplicação do LPS.

Para avaliar o efeito da inibição seletiva de PKC β sobre a síntese de PGE₂ hipotalâmica e de mediadores inflamatórios periféricos, os animais foram pré-tratados com ENZ (3 ng, i.c.v.) e eutanasiados 5 horas após a administração de LPS. Os hipotálamos foram dissecados e colocados em tubos contendo indometacina 1 mg/mL, pH = 7,4, depois imersos em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer a -80 °C até a utilização.

Os TAM foram dissecados na área interescapular e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Coletou-se, ainda, sangue total para análise de ERO e HbNO, além de soro para quantificação dos níveis de IL-6 e TNF α . Os tecidos foram armazenados a -80 °C até o momento das análises posteriores.

5.5. QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂

A quantificação seguiu protocolo descrito por Figueiredo e colaboradores (2012). Cada hipotálamo (~34 mg) foi homogeneizado em 1 mL de meio RPMI contendo indometacina em Tris-HCl 0,2 M (2 mg/mL, pH 8,2) usando o Sonicador Q125 (Qsonica sonicators, Newtown, CT, USA) e acidificado com solução de HCl (1 mol/L 35%) para pH = 3,5–4,0. As amostras foram mantidas em gelo, em ambiente escuro até a centrifugação a 20.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aplicado na minicoluna (Sep-Pak® Classic C18 cartridge 360 mg, Waters Corporation, Milford, MA, USA) e PGE₂ foi eluída em 2 mL de etanol. As amostras foram secas em speed vacuum (Hetovac® model CT110, Birkerød, Denmark) por 18 h. No dia seguinte, o pellet foi ressuscitado no tampão do imunoensaio enzimático (EIA).

A concentração de PGE₂ nas amostras de hipotálamos foi determinada pelo kit Prostaglandin E2 ELISA Kit Monoclonal da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) seguindo os procedimentos das instruções, com limite de detecção de 7,8 pg/mL.

5.6. QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE IL-6 E TNF α

As amostras de sangue foram coletadas por punção do ventrículo direito e centrifugadas a 4700 g por 10 min a 4°C (GABUZA *et al.*, 2020). O sobrenadante (soro) foi coletado em novos tubos e armazenado a -80 °C até análise posterior.

A produção das citocinas foi avaliada por ELISA, realizada seguindo as instruções do fabricante de cada kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Primeiramente, antes da manipulação do experimento - feito em dias diferentes para cada citocina - uma curva padrão foi estabelecida usando reagentes fornecidos em cada kit. E então, os níveis séricos das citocinas foram determinados de acordo com a curva padrão.

5.7. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE HbNO

A coleta do sangue ocorreu após 5 horas da aplicação do LPS. As amostras de sangue foram cuidadosamente aspiradas com auxílio de uma seringa de 3 mL heparinizada e, para a quantificação de HbNO, 1 mL de sangue foi transferido para uma seringa de 1 mL heparinizada, a qual foi vedada com Parafilm M® e, em seguida, centrifugada a 2000 g por 5 minutos. As seringas foram então congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80° C.

5.8. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ERO

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

Para a quantificação de ERO no sangue foi preparada uma solução de CMH a 400 µM e heparina sódica (100 UI/ml) (Hepamax-S ®, Blausiegel Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil). Foi adicionado sangue a essa solução na proporção 1:1, e incubado sob agitação por 30 min a 37 °C. Após esse tempo, utilizou-se uma seringa de 1 mL como recipiente, onde foram colocados 200 µL de água, congelados em nitrogênio líquido, em seguida adicionou-se 50 µL da amostra de sangue, que também foi congelada e, então, mais 200 µL de água, congelando então todo o conteúdo da seringa (450 µL) em nitrogênio líquido e armazenando-o em freezer -80° C até o momento das análises de RPE.

Para o preparo das amostras para quantificação de ERO no TAM, os tecidos congelados foram lavados três vezes com KHB. Após essa lavagem, adicionou-se a cada amostra 500 µL de uma solução de CMH (200 µM) com heparina sódica (50 UI/mL), e deixou-se incubando sob agitação a 37° C por 1 hora. Terminada a incubação, 450 µL do sobrenadante foram colocados em uma seringa e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados

em freezer -80° C até o momento das análises de RPE. Os tecidos remanescentes nos microtubos foram secos em *speed vac* e então pesados.

5.9. MEDIDAS DE RPE

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

As amostras congeladas foram transferidas das seringas para um Dewar repleto com nitrogênio líquido. Todas as medidas de RPE foram realizadas à temperatura de nitrogênio líquido (77 K, equivalente a - 196 °C).

Para a quantificação de HbNO, as medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX plus de onda contínua utilizando a banda X (9 GHz), em cavidade de alta resolução (ER 4119HS) com os seguintes parâmetros: potência 10 mW, amplitude de modulação de 5G, frequência de modulação 100 kHz, tempo de varredura de 12 segundos, o espectro da média de 4 varreduras com 240 G de largura de varredura adicionados em conjunto para cada medição. A quantidade detectada de NO foi determinada a partir da curva de calibração para a intensidade do sinal de RPE de eritrócitos tratados com concentrações conhecidas de nitrito (1, 10 e 100 µM) e Na₂S₂O₄ (20 mg).

Para detectar e quantificar as ERO, os tecidos foram incubados com *spin probe* CMH que reagem por oxidação com as ERO, formado então o CM[•] que contém um elétron desemparelhado que será detectado por RPE. Os parâmetros utilizados nas medidas de RPE foram os seguintes: realizadas em um espectrômetro Bruker EMX500, utilizando a banda X (9,35 GHz), potência 2 mW, e campo de modulação de 200 Gauss, constante de tempo de 10 ms, tempo de varredura de 600 G e 5 varreduras adicionados em conjunto para cada medição. Para a curva de calibração, foram preparadas amostras a partir de uma solução mãe de 10 mM do padrão: 3-carboxi-proxilo (CP[•]) (Noxygen, Alemanha) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50, e 100 µM. Exatamente 450 µL das amostras de calibração foram transferidas seringas de 1 mL e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido.

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

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com Saramago *et al* (2019) o método que utiliza o índice térmico é bem considerado para ressaltar e analisar a amplitude das respostas térmicas, calculadas por meio da área sob a curva (ASC), onde considerou-se 36 °C como linha base, com cálculo no intervalo de 1 a 5 horas, representado no gráfico graus Celsius no eixo y e horas no eixo x. Para a análise do índice térmico usou-se *one-way* ANOVA e para as demais análises, *two-way* ANOVA, ambas seguidas pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Os outros resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. O software GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) foi usado para fazer as análises estatísticas, as quais estão descritas nas legendas de cada figura. Os valores de foram considerados estatisticamente significantes quando o resultado da probabilidade foi menor ou igual a 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PKC β ATENUA A FEBRE INDUZIDA POR LPS.

Para investigar a participação da PKC β na resposta febril induzida pelo LPS, realizou-se a administração i.c.v. de seu inibidor seletivo, a ENZ, nas doses de 0,3, 1, 3 ng/rato, 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de LPS (50 μ g/Kg) nos animais.

Na **Figura 6A** é possível observar que os animais pré-administrados com o veículo 30 minutos antes do LPS evoluíram com aumento da temperatura com início próximo às 2 horas após a aplicação do pirógeno exógeno, aumentando progressivamente até às 6 horas totais da observação. Conforme esperado, os animais dos grupos controles negativos (VEI/SAL e ENZ 3 ng/SAL), mantiveram suas temperaturas constantes, exceto nos tempos próximos às injeções, no qual se observou aumento na temperatura corporal em todos os grupos, devido ao estresse de manuseio. Esse aumento também foi observado em outros estudos (ESKILSSON *et al.*, 2017; MIRRASEKHIAN *et al.*, 2018; ROTH; BLATTEIS, 2014).

O pré-tratamento dos animais com ENZ diminuiu a febre de maneira dose-dependente, sendo que a dose de 3 ng/rato reduziu significativamente o índice térmico em 38,1%, quando comparado ao grupo VEÍ/LPS e avaliado no período de 2 a 6 h (**Figura 6B**).

Em virtude do melhor resultado antipirético na dose de 3 ng de ENZ, essa dose foi a selecionada para os experimentos subsequentes de febre. A análise de comparações múltiplas de duas vias da ANOVA revelou um efeito inibitório consistente dessa dose de ENZ no período de 4,75 até 6 h, tendo sido selecionado o tempo de 5 h para a coleta dos tecidos.

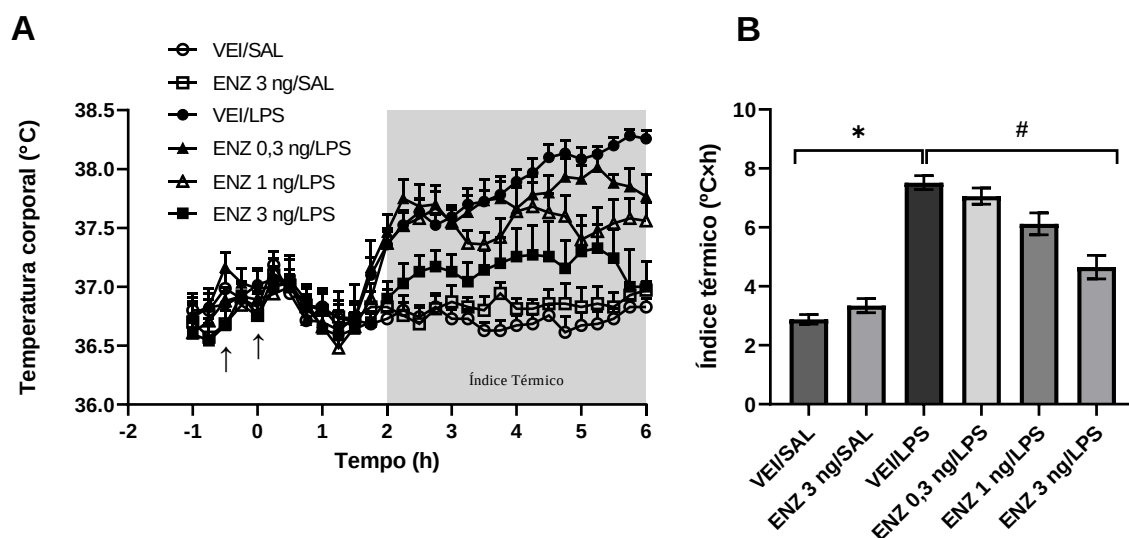


Figura 6: O inibidor seletivo de PKC β , ENZ, reduz a resposta febril induzida por LPS. Os ratos foram tratados com enzastaurina (ENZ) via i.c.v. nas doses de 0,3, 1 e 3 ng/rato ou com veículo (DMSO 1,5% em salina) no volume de 2 μ L, 30 min antes da injeção i.p. de LPS (50 μ g/Kg) ou de salina estéril 0,9%. **(A)** Curva dose-resposta da ENZ, na qual os dados são expressos como média $\pm$ EPM da temperatura corporal (°C) de n = 7 animais por grupo. As setas cinza e preta representam o tempo das microinjeções i.c.v. e injeções i.p., respectivamente. **(B)** Índice térmico calculado a partir da área sob a curva de 2 a 6 h (conforme indicado no painel A), no qual as barras representam média $\pm$ EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo VEÍ/SAL. # p<0,05 quando comparado ao valor correspondente ao grupo VEÍ/LPS. No painel A, os dados foram analisados por two-way ANOVA, e no painel B, por one-way ANOVA, ambos seguidos pelo teste de comparação múltipla Tukey.

6.2. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENZ SOBRE A PRODUÇÃO HIPOTALÂMICA DE PGE₂

A administração de LPS (50 μ g/kg, i.p.) promoveu aumento da temperatura corporal a partir de 2 h e permaneceu elevada até a quinta hora (**Figura 7A**). O pré-tratamento com ENZ (3 ng/2 μ L, i.c.v.) 30 minutos antes do LPS, foi efetivo em reduzir a temperatura, o que pode ser melhor observado na análise da variação de temperatura na quinta hora (ΔT), no qual percebe-se uma redução de aproximadamente 70% em relação ao valor do grupo VEÍ/LPS (**Figura 7B**).

Para avaliar se a inibição da febre nos animais que receberam ENZ era decorrente da inibição central da COX, a concentração hipotalâmica de PGE₂ foi avaliada. Na **Figura 7C**, pode-se verificar que os grupos que receberam LPS apresentaram aumento na concentração de PGE₂ em comparação com os grupos controles e que o pré-tratamento com ENZ não causou alteração significativa nesse aumento de PGE₂ induzido por LPS.

Esses dados indicam que o efeito antipirético da ENZ não envolve o bloqueio da produção central de PGE₂.

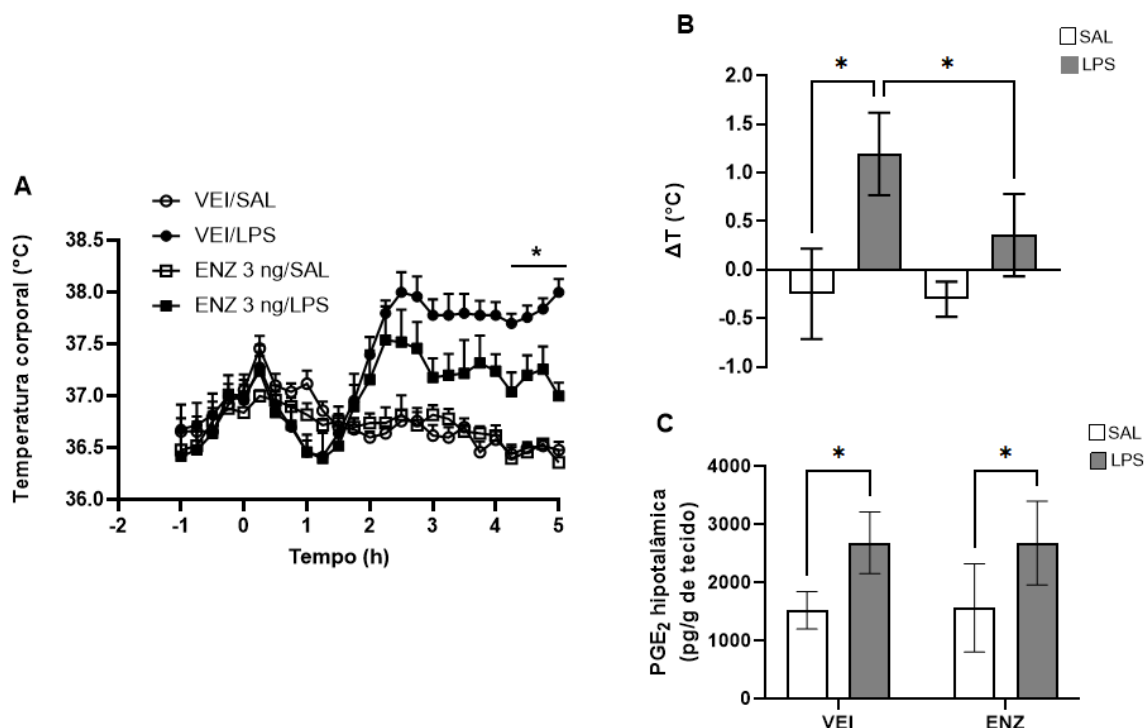


Figura 7: Efeito do pré-tratamento com ENZ sobre a febre induzida por LPS e a síntese de PGE₂ no hipotálamo. A ENZ (3 ng/2 μ L, i.c.v.) ou o veículo (VEÍ, 2 μ L, i.c.v.) foram aplicados 30 minutos antes da injeção de LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina (SAL, 1mL/Kg). **(A)** Mudanças na temperatura corporal dos ratos no transcorrer do tempo em horas. O tempo 0 (zero) indica a aplicação de LPS i.p. Os dados são mostrados como a média $\pm$ EPM da temperatura corporal (°C) de 5 animais e analisado por *two-way* ANOVA. * $p < 0,05$ VEI/LPS quando comparado ao grupo ENZ 3 ng/LPS **(B)** Diferença entre a temperatura na quinta hora e a temperatura basal (ΔT). * $p < 0,05$. **(C)** Quantidade de PGE₂ por grama de tecido hipotalâmico, coletados 5 horas após a administração de LPS. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey. * $p < 0,05$.

6.3. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENZASTAURINA E OS NÍVEIS CIRCULANTES DE IL-6 E TNF α

Para investigar os efeitos da inibição central da PKC β sobre a resposta inflamatória sistêmica induzida por LPS, as concentrações séricas de IL-6 e TNF α foram medidas em animais tratados ou não com ENZ. Conforme esperado, observou-se aumento na concentração de ambas as citocinas após a administração de LPS, sendo que para a IL-6 o aumento foi de 49% ($p < 0,05$, **Figura 8A**) e para o TNF α foi de 47% ($p = 0,0974$, **Figura 8B**) quando comparados ao grupo VEI/SAL. Este efeito pró-inflamatório do LPS foi reduzido pelo pré-tratamento i.c.v. com ENZ, uma vez que a concentração sérica de IL-6 foi diminuída em cerca de 47% ($p < 0,05$) (**Figura 8A**) e a de TNF α apresentou redução de 55% ($p < 0,05$, **Figura 8B**).

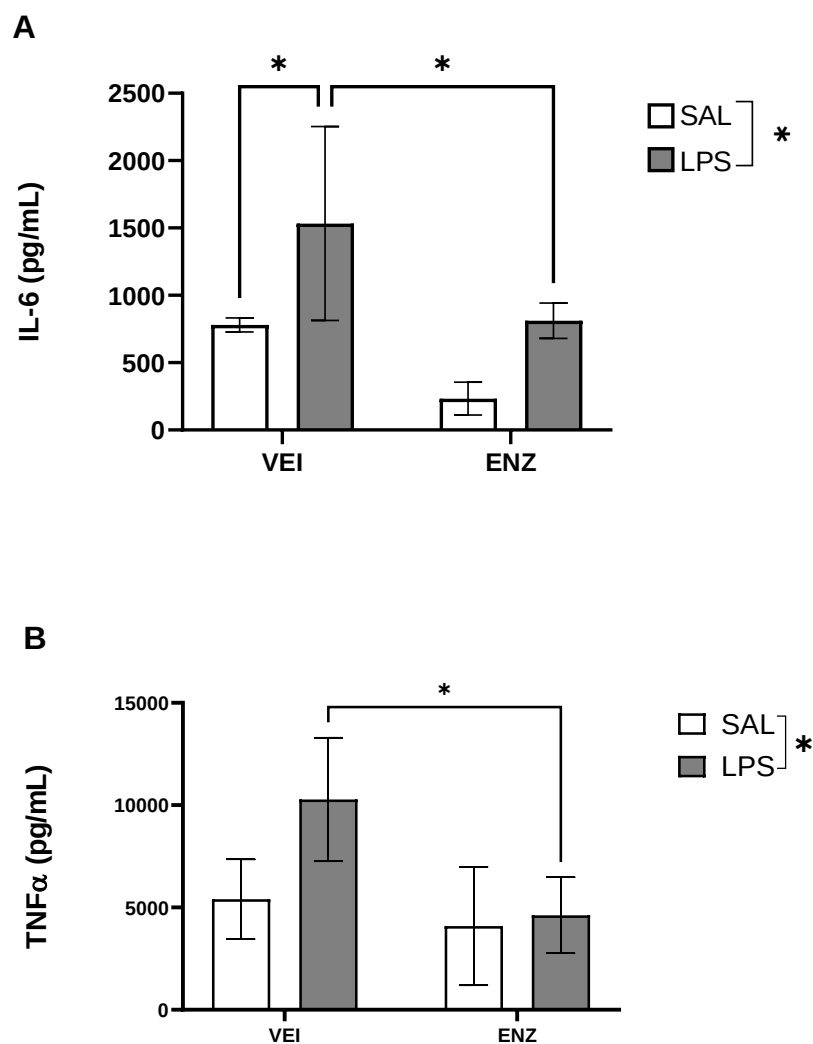


Figura 8: A inibição central da PKC β reduz os níveis séricos de IL-6 e TNF α . (A) Níveis séricos de IL-6 no soro em pg/mL. (B) Níveis séricos de TNF α no soro em pg/mL. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de 4-5 animais. * $p < 0,05$. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

6.4. EFEITO DA INIBIÇÃO CENTRAL DA PKC β SOBRE A PRODUÇÃO DE HbNO

A quantificação da formação de HbNO em amostras de sangue foi realizada para estimar a produção de NO periférico durante a febre em animais tratados ou não com ENZ. Na **Figura 9** pode-se verificar um aumento na formação de HbNO de cerca de quatro vezes nos animais que receberam LPS em relação ao grupo VEÍ/SAL. O pré-tratamento i.c.v. com ENZ não alterou a formação de HbNO induzida por LPS. Esses dados indicam que a diminuição da febre

exercida pela ENZ em animais estimulados com LPS não está associada a uma redução na biodisponibilidade do NO.

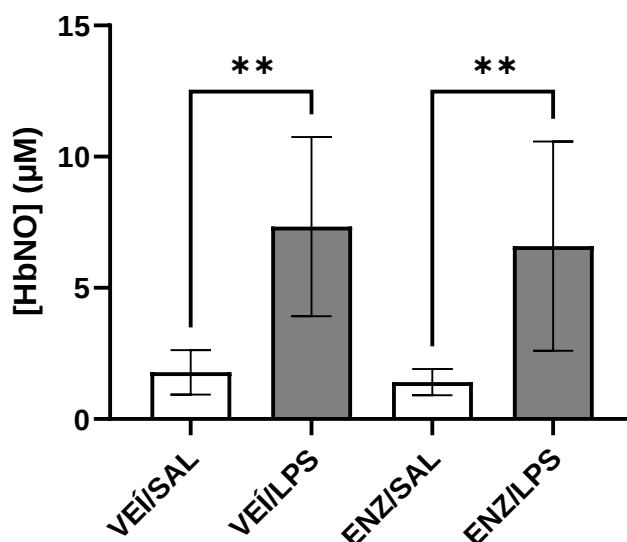


Figura 9. Pré-tratamento com enzastaurina e o efeito sobre a concentração de HbNO em ratos com febre induzida por LPS. Concentração de HbNO no sangue total (μM) de ratos. Os valores obtidos por média ± EPM (n= 6 a 8 ratos). **p < 0,01. Os dados foram analisados por *one-way* ANOVA.

6.5. A INIBIÇÃO CENTRAL DA PKCβ REDUZ A PRODUÇÃO DE ERO NO TAM, MAS NÃO NO SANGUE

Nós também investigamos o efeito da inibição central de PKCβ sobre a produção de ERO no TAM e no sangue durante a resposta febril. Os animais foram pré-tratados com ENZ, por via i.c.v., 30 min antes da injeção de LPS e a concentração de CM* foi avaliada 5 horas após a injeção de LPS.

Verificou-se que os animais que receberam LPS apresentaram aumento na formação de ERO no TAM, porém não no sangue (**Figura 10A e 10B**). O pré-tratamento com ENZ reduziu a formação de ERO no TAM em 53% (p < 0,05, **Figura 10A**), porém não se observou nenhum efeito decorrente desse fármaco no sangue (**Figura 10B**).

É importante frisar que os valores basais obtidos de CM* (μM) diferem nos tecidos coletados, uma vez que no TAM são maiores quando comparados com os do sangue tanto nos

grupos controles quanto nos grupos que receberam LPS, o que indica a maior produção de ERO no TAM que no sangue.

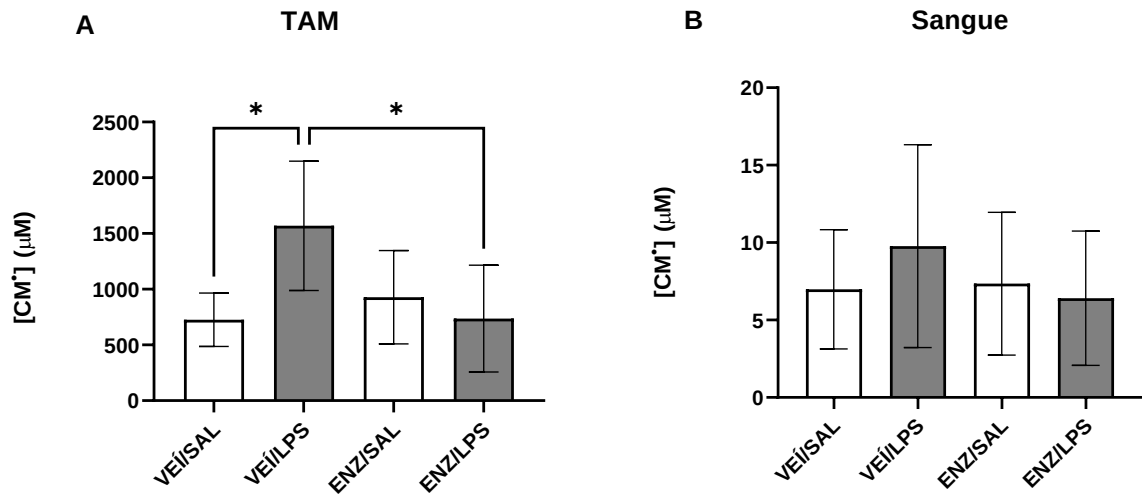


Figura 10. Concentração de CM* (μM) no tecido adiposo marrom (A) e no sangue (B) 5 horas após a administração de LPS em animais pré-tratados ou não com ENZ. As colunas brancas representam os grupos controles, enquanto as pretas, grupos que receberam estímulo com LPS (n= 5-8). Os dados apresentam uma média $\pm$ EPM. *p < 0,05 por análise *one-way* ANOVA.

7. DISCUSSÃO

Este estudo confirma evidências do envolvimento da PKC na febre e revela um papel importante da isoforma β nessa resposta. Dados anteriores obtidos a partir de análise proteômica quantitativa do hipotálamo de ratos com febre induzida tanto pela administração sistêmica de LPS, quanto pela administração central de PGE_2 , demonstraram aumento substancial na abundância da PKC β após os dois estímulos pirogênicos. Assim, investigamos se o aumento da PKC β poderia desempenhar um papel funcional no modelo de febre induzida por LPS em ratos. Os resultados demonstraram que a inibição farmacológica dessa enzima, pelo inibidor seletivo ENZ, atenuou a febre induzida por LPS, o que nos motivou a investigar os possíveis mecanismos que contribuem para esse efeito.

A febre é uma resposta complexa do organismo, que envolve interações entre diversos mediadores, células e órgãos. Seu início geralmente acontece por reconhecimento, por células do sistema imune, de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) liberados sob condições de injúria a estresse celular. O LPS é um PAMP, que após sua ligação ao TLR4, desencadeia uma cascata de eventos, que culmina na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (ROTH; DE SOUZA, 2001). Essas citocinas atuam como pirogênicos endógenos, ativando receptores presentes no OVLT, o que leva ao aumento na expressão de COX-2 e à produção de PGE_2 , que é considerada o mediador final da febre, por atuar diretamente em receptores EP₃ de neurônios da APO/HA e ativar vias eferentes responsáveis pelo aumento da Tc (ROTH; BLATTEIS, 2014; NAKAMURA *et al.*, 2022).

O LPS é o pirógeno exógeno usualmente utilizado para a indução da febre em modelos experimentais. A administração de LPS pode promover febre de diferentes perfis, como monofásica, bifásica ou multifásica dependendo da espécie, dose, via de administração e temperatura ambiente. Na dose i.p. utilizada neste estudo (50 $\mu\text{g/kg}$), o LPS induziu uma febre moderada e contínua, com início cerca de 2 h e aumento progressivo da Tc até 6 h pós-injeção, o que é semelhante ao relatado na literatura (SORIANO *et al.*, 2011; BRITO, 2016).

Em seguida, investigamos se o aumento da abundância hipotalâmica da PKC β , verificado em estudo anterior, seria importante para o desenvolvimento da resposta febril. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento i.c.v. com ENZ, um inibidor seletivo de PKC β , reduziu a febre induzida pelo LPS de maneira dose-dependente, sendo que a dose de 3 ng/rato causou inibição significativa da Tc dos animais e por essa razão, foi a dose selecionada para os demais

experimentos. Em nosso conhecimento, essa é a primeira descrição que associa a isoforma β da PKC à resposta febril. Os estudos anteriores que avaliaram a participação da PKC na febre utilizaram inibidores não seletivos, como a celeritrina (KOZAK *et al.*, 1997; FIRMINO, 2013) ou seletivos para a PKC atípica (THALER *et al.*, 2009).

Para compreender os mecanismos envolvidos no efeito antipirético da ENZ, investigamos a hipótese de que a inibição da PKC β poderia atenuar a febre por reduzir a produção de PGE₂ hipotalâmica induzida por LPS. Conforme esperado, os animais febris apresentaram aumento da concentração de PGE₂ hipotalâmica 5 h após a administração de LPS, entretanto esse efeito não foi alterado nos animais pré-tratados com ENZ, o que indica que a redução da Tc exercida pela ENZ não depende da inibição da síntese de PGE₂. Em seu trabalho, Firmino (2013) demonstrou que o tratamento com o inibidor não seletivo de PKC, celeritrina, foi capaz de inibir tanto a febre induzida por LPS, como também pela administração central de PGE₂. Além disso, os dados da análise proteômica demonstraram que a PKC β foi a única isoforma regulada positivamente após a indução de febre pelos dois estímulos.

Evidências indicam que o receptor EP₃ seja o subtipo envolvido no desenvolvimento da resposta febril (USHIKUBI *et al.*, 1998). A principal via de sinalização atribuída a este receptor envolve a inibição de adenilato ciclase por meio da sinalização por uma proteína G inibitória (Gi). No entanto, sabe-se que o receptor EP₃ possui muitas isoformas, podendo assim, acoplar-se a múltiplas proteínas G e desencadear diferentes vias de sinalização. Liu *et al.* (2000) demonstraram, por exemplo, que o receptor EP₃ quando ativado por um agonista pode promover a morte de neutrófilos por uma via dependente da ativação de PKC. Corroborando esses dados, a resposta febril induzida pela administração i.c.v. de um agonista EP₃ foi inibida pelo tratamento com calfofina C, um inibidor de PKC (ZHOU *et al.*, 2006). Em conjunto, esses dados nos permitem sugerir que a PKC β não atue inibindo a liberação de PGE₂, mas reduzindo a sinalização decorrente de sua ação na APO/HA. Mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

As PKC β estão envolvidas em vários importantes processos celulares e, em um estudo recente, em que vários inibidores de PKCs foram testados, inclusive a ENZ, demonstrou-se que esses inibidores reduziram a replicação do SARS-CoV-2 em culturas de células. Os autores concluem que os inibidores específicos de PKC podem ser potenciais agentes terapêuticos contra a infecção por SARS-CoV-2 (HUANG *et al.*, 2022). As PKC também estão envolvidas em diversas outras doenças como câncer, doenças neurológicas, imunológicas,

cardiovasculares e infecções (KAWANO *et al*, 2021). A PKC desempenha um papel fundamental no controle do equilíbrio entre sobrevivência e morte celular. Sua perda de função é geralmente associada ao câncer, enquanto sua atividade aumentada está associada com neurodegeneração. Isso ocorre porque a PKC fosforila uma grande variedade de substratos e desempenha um papel em muitas cascatas de sinalização diferentes (CALLENDER; NEWTON, 2017). Por este motivo, avaliar a ação da PKC nas atividades celulares em que participa, usando substratos e inibidores específicos para atuarem precisamente em suas características estruturais e de ativação é inovador para tratamentos dessas doenças (KAWANO *et al*, 2021; KANG, 2014).

Além de depender do aumento na concentração hipotalâmica de PGE₂, está bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias geradas periféricamente também desempenham um papel crucial na resposta febril, uma vez que diferentes estratégias utilizadas para bloquear sua ação, como tratamentos com anticorpos neutralizantes para IL-1 β , IL-6 ou TNF α , são capazes de diminuir a febre induzida pela injeção periférica de LPS (MARTINS *et al*, 2012; BLOMQVIST *et al.*, 2018; ROTH *et al.*, 1998; RUMMEL *et al.*, 2006). Em razão disso, investigamos a ação da ENZ sobre as concentrações séricas de IL-6, TNF α em animais febris.

Conforme esperado, verificou-se o aumento na concentração sérica de IL-6 e TNF α nos animais que receberam LPS em relação ao grupo controle. O pré-tratamento i.c.v. com ENZ reduziu a concentração de ambas as citocinas, quando avaliado 5 h após a administração de LPS, enquanto o tratamento com ENZ/SAL não alterou as concentrações séricas das citocinas. Uma hipótese para explicar a redução de IL-6 e de TNF α séricas após o tratamento i.c.v. com ENZ é que sinalização decorrente da ação da PGE₂ em receptores EP₃ da APO/HA seja dependente de PKC β e sua inibição atenua respostas eferentes, com consequente diminuição dos níveis circulantes de IL-6 e de TNF α . Mota *et al* (2017) verificaram que a administração i.c.v. de serotonina (5-HT) reduz a febre, a produção hipotalâmica de PGE₂ e o aumento na concentração plasmática de IL-6 induzidas por LPS. Os autores sugerem que a 5-HT atue centralmente como uma molécula antipirética endógena capaz de regular a produção periférica de citocinas, e afetar a função termofetora.

Os efeitos da inibição da PKC β sobre a produção de ERN e ERO induzidas por LPS também foram investigados. Verificou-se que os animais com febre induzida por LPS tiveram um aumento de cerca de 4 vezes na concentração de HbNO 5 h após a administração de LPS, o que indica aumento na biodisponibilidade de NO durante a febre. Este dado está de acordo

com o estudo realizado por Gomes (2017), que demonstrou aumento significativo na concentração de HbNO nos ratos que receberam injeção i.v. de LPS em relação aos grupos controles. Entretanto, observamos que o pré-tratamento com ENZ não alterou os níveis de HbNO nos animais durante a febre.

Embora diversos estudos tenham descrito um efeito dual do NO em diversas condições patofisiológicas, evidências demonstram que a ação periférica do NO na febre seja pró-pirética, já que aumenta a termogênese e, conseqüentemente, aumenta a temperatura corporal (GERSTBERGER, 1999; STEINER; BRANCO, 2001). Em adição, camundongos C57BL/6J tratados com o inibidor farmacológico da NOS, L-NAME, apresentaram redução da febre induzida por LPS (KOZAK; KOZAK, 2003). A inibição da formação de NO endógeno atenua a febre induzida por LPS em cobaias e ratos (SCAMMELL; ELMQUIST; SAPER, 1996; SOSZYNSKI, 2001), sugerindo que o NO atue como um mediador endógeno da febre induzida por LPS e até mesmo por citocinas (ROTH *et al.*, 1998). Entretanto, os dados obtidos em nosso estudo, sugerem que o efeito antipirético efetuado pela ENZ não está associado com a diminuição da biodisponibilidade de NO.

O aumento na produção de ERO foi demonstrado em modelos de choque séptico, inflamação, dor, asma, doenças neurodegenerativas, entre outros (CLOSA; FOLCH-PUY, 2004; KIM *et al.*, 2015; MITTAL *et al.*, 2014; PRAUCHNER, 2017). Está bem estabelecido que as ERO formadas na resposta inflamatória atuam como moléculas sinalizadoras que desempenham um papel importante na progressão da inflamação.

Alguns estudos mostraram que o estresse oxidativo está presente durante a febre. Riedel e Maulik (1999) demonstraram a formação de produtos da peroxidação lipídica no plasma, cérebro, fígado e coração de ratos durante a resposta febril. De acordo com o mesmo grupo de pesquisa, o desequilíbrio entre produção de ERO e mecanismos antioxidantes endógenos no hipotálamo podem contribuir para a ocorrência da febre, principalmente em função da redução da atividade da glutathione peroxidase, considerada um dos mais eficazes sistemas antioxidantes (RIEDEL *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que 5 h após a administração de LPS não se verificou aumento na produção de ERO no sangue, porém houve aumento significativo na produção de ERO no TAM. Esses dados estão de acordo com estudo anterior realizado por nosso grupo, no qual a análise dos diferentes tecidos revelou maior produção de ERO no TAM

em comparação com o fígado e hipotálamo, durante a febre. Sabe-se que o TAM é a principal fonte de produção de calor, independente de tremores, contribuindo para a termogênese especialmente em roedores e outros pequenos mamíferos (SHABALINA *et al.*, 2017; MORRISON, 2016).

Para investigar melhor o papel exercido pela PKC β na febre resposta febril induzida por LPS, analisamos se sua inibição no hipotálamo poderia ter consequências sobre a produção periférica de ERO. Verificamos que, embora o tratamento com ENZ não tenha alterado a produção de ERO no sangue, reduziu significativamente a concentração de ERO no TAM. A diminuição de ERO no TAM reduz a possibilidade de resposta inflamatória sistêmica e de morte celular, mecanismos que podem alterar o funcionamento do TAM e a homeostase da Tc (KIM *et al.*, 2015; GOUVEIA; LIMA, 2017). Estudo recente demonstrou que neurônios da POA que expressam receptores EP₃ (POAEP₃R) fazem sinapse inibitória tônica GABAérgica com neurônios do DMH, controlando o efluxo simpático para importantes órgãos termofetores. Como a PGE₂ inibe esses neurônios, ocorre redução na sinalização GABAérgica, diminuindo a inibição de vias termofetoras, o que estimula a termogênese no TAM. Esses dados estão de acordo com o descrito anteriormente por Morrison (2016), que destaca que neurônios presentes na APO/HA influenciam o processo termogênico que ocorre no TAM durante a resposta febril. O mecanismo envolve a ação da noradrenalina como indutora da termogênese no TAM, por meio da atividade da UCP-1, que desacopla a cadeia de prótons da membrana mitocondrial, gerando desta forma, energia em forma de calor (SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012 e MORRISON, 2016)

Em resumo, nossos resultados mostram que o pré-tratamento com ENZ atenua a febre e a produção sérica de IL-6 e TNF α induzida pela administração de LPS, além de diminuir a produção de ERO no TAM. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para investigar os mecanismos moleculares envolvidos.

8. CONCLUSÃO

A investigação sobre a ação da ENZ realizada por esse estudo sugere a participação da PKC β na regulação da febre induzida por LPS em ratos, por atuar em vias de sinalização decorrentes da ação da PGE₂ em receptores EP₃ da APO/HA, o que pode reduzir a resposta termofetora e, conseqüentemente, diminuir a produção periférica de citocinas pró-inflamatórias e de ERO no TAM, tendo possíveis impactos na diminuição da sua atividade termogênica e na temperatura corporal.

Nossos dados contribuem para entender melhor como os efeitos decorrentes da modulação da PKC β no hipotálamo podem regular a resposta febril e a sinalização eferente que ocorrem em resposta a estímulos, como o LPS.

O estudo apresenta limitações em relação à análise pontual da produção de mediadores inflamatórios, não sendo verificada uma cinética de produção, nem do efeito da ENZ.

9. PERSPECTIVAS

Para desenvolvimento de trabalhos futuros, o presente estudo propõe:

Investigar se a inibição da PKC β diminui a febre induzida pela administração central de PGE₂.

Realizar estudo de co-localização para confirmar que a PKC β está presente em neurônios da APO/HÁ que expressam receptores EP3.

Analisar o efeito da administração i.c.v. de ENZ sobre a atividade termogênica do TAM, por meio da análise do consumo de oxigênio e da expressão da proteína UCP-1.

10. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- ANGILLETTA JR, M.J. *et al.* The neuroscience of adaptive thermoregulation. **Neurosci Lett**, v. 692, p. 127-136, 2019. DOI:10.1016/j.neulet.2018.10.046.
- BLACK, A. R.; BLACK, J. D. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 423, 2013. DOI:10.3389/fimmu.2012.00423.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC E. Prostaglandin E2: A putative fever mediator. In: MACKOWIAK, P. A., editor. **Fever basic mechanisms and management**. Philadelphia: Lippincott–Raven, p. 117–145, 1997.
- BLOMQVIST, A.; ENGBLOM, D. Neural mechanisms of inflammation-induced fever. **Neuroscientist**, v. 24, n. 4, p.381-399, 2018. DOI:10.1177/1073858418760481.
- BOULANT, J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin. Infect. Dis.**, v.31, p.S157-S161, 2000. DOI:10.1086/317521.
- BRANCO, L. G. S.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous Mediators in Temperature Regulation. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, p. 1301–1338, 2014.
- BRITO, M. **Redução catalítica seletiva de óxido nítrico por amônia sobre catalisadores de ferro e titânio**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.
- BRONDANI, L. A. *et al.* The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 215-225, 2012.
- CALDWELL, F.T.; GRAVES, D.B.; WALLACE, B.H. Studies on the mechanism of fever after intravenous administration of endotoxin. **J Trauma**, v. 44, n. 2, p. 304-312, 1998. DOI:10.1097/00005373-199802000-00012.
- CALLENDER, J. A.; NEWTON, A. C. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. **Neuronal Signal**, v.1, n. 2, p. NS20160005, 2017. DOI:10.1042/NS20160005.
- CARDUCCI, M. A. *et al.* Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of enzastaurin, an oral protein kinase C beta inhibitor, in patients with advanced cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 25, p. 4092-4099, 2006. DOI:10.1200/JCO.2005.05.3447.
- CARTMELL, T. *et al.* Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. **J Physiol**, v. 53, n. 1, p. 171-180, 2001. DOI:10.1111/j.1469-7793.2001.0171j.x
- 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.

CAYMAN CHEMICAL. **Enzastaurin**. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/product/11601/enzastaurin>. Acesso em 23 jan. 2023.

CLARKE, M.; DODSON, P. M. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 21, n. 4, p.573-586, 2007. DOI:10.1016/j.beem.2007.09.007.

CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**, v. 56, n. 4, p. 185-191, 2004. DOI:10.1080/15216540410001701642.

CYPESS, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009. DOI:10.1056/NEJMoa0810780.

DASCOMBE, M.J. *et al.* Pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. E7-E11, 1989.

DEMON, D.; VANDE WALLE, L.; LAMKANFI, M. Sensing the enemy within: how macrophages detect intracellular Gram-negative bacteria. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 12, p. 574-576, 2014. DOI:10.1016/j.tibs.2014.10.006.

DIKALOV, S.; FINK, B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. In: **Methods in Enzymology**, v. 396, p. 597–610, 2005.

DINARELLO, C.A. *et al.* Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Res.**, v. 562, p. 199-206, 1991.

ESKILSSON, A. *et al.* Immune-induced fever is dependent on local but not generalized prostaglandin e2 synthesis in the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 19, p. 5035-5044, 2017. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3846-16.2017.

EVANS, S. S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 335–349, 2015. DOI: 10.1038/nri3843.

FIRMINO, M. **Efeito de inibidores de proteínas quinases sobre a resposta febril e a expressão e proteínas em ratos**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

FIRMINO, M. *et al.* Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. **Journal of Proteomics**, v. 187, p. 182–199, 2018. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.07.018.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2003.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Fever and hypothermia in systemic inflammation. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 157, p. 565–597, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3.

GARCIA-CONCEJO, A.; LARHAMMAR, D. Protein kinase C family evolution in jawed vertebrates. **Developmental Biology**, v. 479, p. 77-90, 2021.

GERALDES, P., KING, G.L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circ. Res.**, v. 106, n. 8, p. 1319-1331, 2010. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.

GERSTBERGER, R. Nitric oxide and body temperature control. **News Physiol. Sci**, v. 14, p. 30–36, 1999. DOI: 10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30.

GIOIELLO, A. *et al.* The Medicinal Chemistry in the era of machines and automation: recent advances in continuous flow technology. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 13, p. 6624–6647, 2020. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01956.

GOMES, B. R. B. *et al.* Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. **Free Radic Res**, v. 2, n. 3, p. 351-361, 2018. DOI:10.1080/10715762.2018.1425549.

GOMES, B. R. B. **Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a antipirese**. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

GOUVEIA, S.S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 3, p. 174-179, 2017.

HALL, D.M., BUETTNER, G.R. In vivo spin trapping of nitric oxide by heme: Electron paramagnetic resonance detection ex vivo. **Methods in enzymology**, v. 268, p. 188–192, 1996. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)68020-3.

HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1891–1904, 2000. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01337-x.

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

HOGG, N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Free Radic. Biol. Med**, v. 49, n. 2, p. 122–129, 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.009.

HUANG, C. *et al.* (2022). Protein Kinase C Inhibitors Reduce SARS-CoV-2 Replication in Cultured Cells. **Microbiology spectrum**, 10(5), e0105622, 2022. doi: 10.1128/spectrum.01056-22.

ISAKOV, N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. **Seminars in Cancer Biology**, n. 48, p. 36–52, 2018. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012.10.1016/j.semcancer.2017.04.012.

JANSKÝ, L. *et al.* Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. **Neuroendocrinology**, v. 62, p. 55-61, 1995. DOI: 10.1159/000126988.

KADIR, R. R. A.; ALWJWAJ, M.; BAYRAKTUTAN, U. Protein kinase C- β distinctly regulates blood-brain barrier-forming capacity of Brain Microvascular endothelial cells and outgrowth endothelial cells. **Metabolic brain disease**, v. 37, n. 6, p. 1815–1827, 2022. DOI: 10.1007/s11011-022-01041-1.

KALELI, H. N. *et al.* Protein kinase C isozymes and autophagy during neurodegenerative disease progression. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 553, 2020. DOI: 10.3390/cells9030553.

KANG, J. H. Protein kinase C (PKC) isozymes and cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/231418.

KAWAKAMI, T.; KAWAKAMI, Y.; KITAURA, J. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. **Journal of biochemistry**, v. 132, n. 5, p. 677–682, 2002. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003273.

KAWANO, T. *et al.* Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1748, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111748.

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.

KOZAK, W., KOZAK, A. Differential role of nitric oxide synthase isoforms in fever of different etiologies: studies using Nos gene-deficient mice. **J. Appl. Physiol.** v. 94, p. 2534–2544, 2003. DOI: 10.1152/japplphysiol.01042.2002.

KILBURN, L. B. *et al.* A phase 1 and pharmacokinetic study of enzastaurin in pediatric patients with refractory primary central nervous system tumors: a pediatric brain tumor consortium study. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 2, p. 303-311, 2015. DOI: 10.1093/neuonc/nou114.

KIM, G. H. *et al.* The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015. DOI: 10.5607/en.2015.24.4.325.

LANZ, T. V. *et al.* Protein kinase C β as a therapeutic target stabilizing blood-brain barrier disruption in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 110, n. 36, p. 14735–14740, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1302569110.

LAZARUS, M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. **Mol Nutr Food Res**, v. 50, p. 451-455, 2006.

LIU, J. *et al.* Induction of neutrophil death resembling neither apoptosis nor necrosis by ONO-AE-248, a selective agonist for PGE2 receptor subtype 3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 187-193, 2000.

LONG, N. C. *et al.* Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 5, p. R987–R991, 1992.

LUCKE-WOLD, B. P. *et al.* Common mechanisms of Alzheimer's disease and ischemic stroke: The role of protein kinase C in the progression of age-related neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 711–724, 2015. DOI: 10.3233/JAD-141422.

MARTINS, J. M. *et al.* Involvement of PGE 2 and RANTES in Staphylococcus aureus- induced fever in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 9, p. 1456–1465, 2012.

MATSUOKA, T; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **Scientific World Journal**, v.7, p. 1329-1347, 2007. DOI:10.1100/tsw.2007.182.

MIRRASEKHIAN, E. *et al.* The antipyretic effect of paracetamol occurs independent of transient receptor potential ankyrin 1-mediated hypothermia and is associated with prostaglandin inhibition in the brain. **FASEB J.** 32, 5751–5759, 2018.

MITTAL, M. *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014. DOI:10.1089/ars.2012.5149.

MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K.V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nat Rev Drug Discov**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 937-57, 2012. DOI: 10.1038/nrd3871.

MORRISON, S.F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Auton Neurosci**, n.196, p. 14-24, 2016. DOI:10.1016/j.autneu.2016.02.010.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central mechanisms for thermoregulation. **Annual Review of Physiology**, v. 81, n. 1, p. 285–308, 2019.

MOTA, C. M. D. *et al.* Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 66, p. 372–381, 2017. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.07.010.

NAKAMURA, K. *et al.* Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. **J Comp Neurol**, v. 421, n. 4, p. 543-569, 2000. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(20000612)421:4<543::aid-cne6>3.0.co;2-3.

NAKAMURA, Y. *et al.* Prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons bidirectionally control body temperature via tonic GABAergic signaling. **Sci Adv**, v. 8, n. 51, p. eadd5463, 2022. DOI:10.1126/sciadv.add5463.

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

PEROTTI, C. A. A. *et al.* Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 11, 1999.

PRAJITHA, N.; ATHIRA, S. S.; MOHANAN, P. V. Comprehensive biology of antipyretic pathways. **Cytokine**, v. 116, p. 120-127, 2019.

PRAUCHNER, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, v. 43, n. 3, p. 471-485, 2017. DOI:10.1016/j.burns.2016.09.023.

PROTSIV, M. *et al.* Decreasing human body temperature in the United States since the Industrial Revolution. **eLife**, v. 9, 2020.

REUTER, S. *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic. Biol. Med**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

RIBEIRO, S.M.R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149. 2005.

RIEDEL, W.; MAULIK, G. Fever: An integrated response of the central nervous system to oxidative stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 196, n. 1-2, p. 125–132, 1999.

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

RINGVOLD, H.C.; KHALIL, R.A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 203-301, 2017. DOI: 10.1016/bs.apha.2016.06.002.

ROMANOVSKY, A. A. The thermoregulation system and how it works. **Handb Clin Neurol**, v. 156, p. 3-43, 2018. DOI:10.1016/B978-0-444-63912-7.00001-1.

ROTH J. *et al.* Neutralization of bacterial pyrogen induced circulating tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea pigs: effects on fever and endogenous formation of interleukin-6. **Journal of Physiology**, v. 509, n. 1, p. 267-275, 1998.

ROTH, J.; DE SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, 2001.

ROTH, J. *et al.* Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 229–245, 2009. DOI: 10.1016/j.iac.2009.02.005.

ROTH, J; BLATTEIS, C. M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Compr Physiol**, v. 4, n. 4, p. 1563-1604, 2014. DOI: 10.1002/cphy.c130033.

ROTHWELL, N.J. *et al.* Central action of interleukin-1 β on fever and thermogenesis. In: Physiological and Pathological Effects Cytokines. **Wiley-Liss, Inc.**, p.307-311, 1990.

RUMMEL, C. *et al.* Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 5, p.R1316-R1326, 2006. DOI:10.1152/ajpregu.00301.2006.

SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neuroscience*, v. 15, n. 8, p. 1088-1095, 2012. DOI: 10.1038/nn.3159.

SCAMMELL, T. E.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. **Am J Physiol**, v. 271, n. 2 Pt 2, p. R333-R338, 1996. DOI:10.1152/ajpregu.1996.271.2.R333.

SCHEELE, C.; NIELSEN, S. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. **Redox Biology**, v. 12, p. 770–775, 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2017.04.011.

SILBERNAGL, S; LANG, F. **Fisiopatologia**: texto e atlas. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SMITH, B.K.; KLUGER, M.J. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. R653-R655, 1992.

SORIANO, R.N. *et al.* Exogenous ghrelin attenuates endotoxin fever in rats. **Peptides**, v. 32, n. 11, p. 2372-2376, 2011. DOI:10.1016/j.peptides.2011.02.019.

SOSZYNSKI, D. The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS-and psychological-stress-induced fever in rats. **Physiol. Behav**, v. 72, p. 65–72, 2001. DOI: 10.1016/s0031-9384(00)00375-9.

SOUZA, G. E. P. DE *et al.* A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. **Inflammation Research**, v. 51, n. 1, p. 24–32, 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.

STEFFERL, A. *et al.* The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 8, p. 1919-1924, 1996. DOI:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15625.x

STEINER, A.A., BRANCO, L.G.S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **J. Therm. Biol.**, v.26, n. 4-5, p. 325–330, 2001.

STRANAHAN, A. M. *et al.* Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 2108–2121, 2016. DOI: 10.1177/0271678X16642233.

TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of body temperature by the nervous system. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 31–48, 2018. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.02.022.

TANSEY E. A.; JOHSON, C. D. Recent advances in thermoregulation. **Adv Physiol Educ**, v. 39, n. 3, p. 139-146, 2015. DOI: 10.1152/advan.00126.2014.

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. DOI: 10.1210/en.2009-0509.

USHIKUBI, F. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Letters to nature**, v. 395, p. 281-284, 1998. DOI: 10.1038/26233.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0808718.

WALTER, E.J. *et al.* The pathophysiological basis and consequences of fever. **Crit Care**, v. 20, n.1, p. 200, 2016. DOI: 10.1186/s13054-016-1375-5.

WEN, J.; RIBEIRO, R.; ZHANG, Y. Specific PKC isoforms regulate LPSstimulated iNOS induction in murine microglial cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2011.

WERNER, M. *et al.* Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflamm. res.**, n. 52, p. 291–296, 2003.

WILLEMAN, M. N. *et al.* The PKC β selective inhibitor, enzastaurin, impairs memory in middle-aged rats. **Plo ONE**, [s.l.], v.13, n.6, p.1-11, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0198256.

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

YAMASHIRO, L. H.; SOUZA, G. E. P. DE; SOARES, D. M. Role of CINC-1 and CXCR2 receptors on LPS-induced fever in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 471, n. 2, p. 301–311, 2019.

ZAMPRONIO, A. R. *et al.* Interleukin (IL)-6 release and fever induced by a pre-formed pyrogenic factor (PFPF) derived from LPS-stimulated macrophages. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 4, p. 589-596, 2000.

ZAMPRONIO, A. R.; SOARES, D. M.; SOUZA, G. E. P. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 506–521, 2015. DOI: 10.1080/23328940.2015.1102802.

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. 66-69, 2006.

ZHOU, Z. *et al.* Molecular identification of protein kinase C beta in Alzheimer's disease. **Aging**, [s. l.], v. 12, n. 21, p. 21798–21808, 2020. DOI: 10.18632/aging.103994.

11. ANEXO A



Universidade de Brasília

Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de setembro de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA PROTEÍNA CINASE C β SOBRE A FEBRE EM RATOS**", SEI n. 23106.080030/2022-22, sob responsabilidade da Professora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 180ª reunião ordinária, realizada em 9/9/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* (70 machos), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 20/9/2022 a 31/7/2024.



Carina Krewer
Dra. Carina da Costa Krewer
Coordenadora da CEUA – UnB



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