



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ESTER KAROLINE MARTINS DA CRUZ**

**EFEITO DA ENZASTAURINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM  
ANIMAIS FEBRIS**

**BRASÍLIA, 2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ESTER KAROLLINE MARTINS DA CRUZ**

**EFEITO DA ENZASTAURINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM  
ANIMAIS FEBRIS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientadora: Prof. Dr. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**

**Co-orientadora: Dra. Natália Carvalho Guimarães**

**BRASÍLIA, 2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Me Martins da Cruz, Ester Karolline  
EFEITO DA ENZASTAURINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO  
EM ANIMAIS FEBRIS / Ester Karolline Martins da Cruz;  
orientador Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza; co-orientador  
Natália Carvalho Guimarães. -- Brasília, 2023.  
43 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2023.

1. Febre. 2. LPS. 3. Enzastaurina. 4. Óxido nítrico. I.  
Hiratsuka Veiga de Souza, Fabiane , orient. II. Carvalho  
Guimarães, Natália , co-orient. III. Título.

ESTER KAROLLINE MARTINS DA CRUZ

**EFEITO DA ENZASTAURINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM  
ANIMAIS FEBRIS**

**BANCA EXAMINADORA**

*Fabiane R. V. de Souza*

---

Orientador(a): Prof. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza  
(Universidade de Brasília/ FCE)

*Carine Royer*

---

Prof(a). Prof. Carine Royer  
(Universidade de Brasília/ FCE)

*Bruna Rafaela B. Gomes*

---

Dra. Bruna Rafaela Bezerra Gomes  
(Universidade de Brasília/UnB)

BRASÍLIA, 2023

Dedico a realização desse sonho à Deus e aos meus pais Edmilson e Viviane, a quem devo tudo que sou.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, determinação e perseverança, me permitindo finalizar minha graduação e realizar meu sonho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Edmilson e Viviane, por jamais medirem esforços para que mais essa fase fosse concluída na minha vida, aos meus irmãos Karlla, Kelly, Lucas e Gabriel, pelo companheirismo e por sempre acreditarem na minha capacidade, aos meus sobrinhos Heithor, Alphonso, Lavínnia e Maitê, às minhas primas Crislene e Cristina e às minhas tias Eura e Elizabeth por todo amor, apoio e carinho. Amo vocês!

Agradeço imensamente à minha orientadora, prof<sup>a</sup>. Fabiane Souza, principal responsável por eu me apaixonar pela Farmacologia e pelo mundo da pesquisa científica. Obrigada pela oportunidade para participar do grupo de pesquisa, pelo ensino, carinho, confiança, paciência e orientação a todo o momento, além do comum. E por me permitir viver uma experiência que me fez amadurecer e me tornar uma discente e pesquisadora melhor.

À minha co-orientadora, Natália Guimarães, que tanto se disponibilizou para me ajudar e dar suporte. Não poderia ter feito uma escolha melhor.

Aos meus amigos de graduação e da vida, especialmente à Sarah, Giovana, Alicia, Mariana Martins, Mariana Oliveira e Letícia, pela amizade e por cada momento vivido, além de todo apoio, compreensão e carinho.

Ao grupo de febre, por toda ajuda nos experimentos e no desenvolvimento da escrita, além de todo companheirismo. Foi um prazer imenso conhecer vocês.

À Universidade de Brasília, sou grata por me proporcionar momentos inesquecíveis, amizades para toda a vida, ensinamentos além do âmbito acadêmico e por fazer parte desse sonho.

Aos professores que participaram dessa jornada, em especial, à Graziella que me inseriu na pesquisa científica e me inspirou imensamente, à Carine que me auxiliou

na Liga Acadêmica de Imunologia da UnB e ao Paulo do Instituto de Física, que me ajudou na análise das minhas amostras.

Ao programa CNPq pela bolsa concedida.

## RESUMO

A febre é uma resposta natural do organismo caracterizada pela elevação da temperatura corporal em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos. A termorregulação ocorre principalmente por neurônios localizados na área pré-óptica do hipotálamo (APOHA), os quais têm suas taxas de disparos alteradas por mediadores da febre, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal pirógeno exógeno utilizado em modelos de febre experimentais, fundamental para esclarecer mecanismos moleculares envolvidos na resposta febril. As proteínas quinases C (PKC) são uma família de enzimas, categorizada como serina/treonina quinases, que quando ativadas por diacilglicerol (DAG) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>) exercem funções em inúmeras vias de transdução de sinal. Estudo recente realizado pelo nosso grupo identificou um aumento na abundância de sua isoenzima, PKCβ, após indução da febre por LPS, indicando sua participação na resposta febril. Esta isoenzima possui inibidores com alto potencial terapêutico, entre eles a enzastaurina (ENZ). O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa abundante no organismo e atua como molécula sinalizadora em diversos processos biológicos. Em outro estudo feito em nosso laboratório foi observado que ocorre a alta da produção de NO periférico durante a febre após injeção por LPS. No presente trabalho, investigou-se o efeito da inibição farmacológica de PKCβ pela ENZ na febre induzida por LPS e as mudanças causadas por esse estímulo na produção de NO, por meio da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Os resultados adquiridos sugerem que, a ENZ inibe a febre induzida por LPS, porém não diminui a produção de NO circulante. Portanto, o efeito antipirético da ENZ possivelmente não está relacionado com a inibição da síntese de NO. Estudos complementares estão em andamento para esclarecer por qual mecanismo a ENZ inibe a febre.

**Palavras-chave:** febre, LPS, enzastaurina, óxido nítrico.



## ABSTRACT

Fever is a natural response of the body characterized by elevated body temperature in response to inflammatory or infectious stimuli. Thermoregulation occurs mainly by neurons located in the preoptic area of the hypothalamus (POA), which have their firing rates altered by fever mediators such as prostaglandins (PGE<sub>2</sub>). Lipopolysaccharide (LPS) is the main exogenous pyrogen used in experimental fever models, fundamental to clarify molecular mechanisms involved in febrile response. Protein kinases C (PKC) are a family of enzymes, categorized as serine / threonine kinases, that when activated by diacylglycerol (DAG) and calcium (Ca<sup>2+</sup>) perform functions in numerous signal transduction pathways. A recent study conducted by our group identified an increase in the abundance of its isoenzyme, PKCβ, after induction of fever by LPS, indicating its participation in the febrile response. This isoenzyme has inhibitors with high therapeutic potential, among them enzastaurin (ENZ). Nitric oxide (NO) is a reactive species abundant in the body and acts as a signaling molecule in several biological processes. In another study conducted in our laboratory, it was observed that there is a high production of peripheral NO during fever after injection by LPS. In the present work, we investigated the effect of pharmacological inhibition of PKCβ by ENZ on LPS-induced fever and the changes caused by this stimulus in NO production, using electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). The acquired results suggest that ENZ inhibits LPS-induced fever, but does not decrease the production of circulating NO. Therefore, the antipyretic effect of ENZ is possibly not related to the inhibition of NO synthesis. Further studies are underway to clarify by what mechanism ENZ inhibits fever.

**Keywords:** fever, LPS, enzastaurine, nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo da febre.....	17
<b>Figura 2:</b> Estruturas de domínio das isoenzimas de PKC.....	19
<b>Figura 3:</b> Experimento farmacológico.....	28
<b>Figura 4:</b> Efeito da ENZ 3 ng/rato sobre a febre induzida por LPS.....	30
<b>Figura 5:</b> Concentração de HbNO no sangue de ratos 5 h após o experimento farmacológico.....	31

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-AA	4-aminoantipirina
4-MAA	4-metilaminoantipirina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AKT	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
APOHA	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
ATP	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CEUA	Comitê de ética no uso animal
COX	Ciclooxigenase
CYP3A	Citocromo P450 3A
DAG	Diacilglicerol
ENZ	Enzastaurina
EPM	Erro padrão da média
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica
h	horas
HbNO	Hemoglobina nitrosilada
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IB	Instituto de Biologia
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1α	Interleucina-1 alfa
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
ip	Intraperitoneal
icv	Intracerebroventricular
LBQP	Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
LPS	Lipopolissacarídeo
ms	milissegundos

ng	nanogramas
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ditionito de sódio
NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase edotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
TLR4	Receptor <i>toll like 4</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
PE	Ésteres de forbol
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína Quinase C
PS	Fosfatidilserina
Sal	Salina
SNC	Sistema nervoso central
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Veí	Veículo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. FEBRE E INDUÇÃO POR LPS.....	15
1.2. ANTIPIRESE.....	18
1.3. INIBIÇÃO DE PKC $\beta$ .....	19
1.4. ÓXIDO NÍTRICO E EPR.....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1. GERAL.....	24
3.2. ESPECÍFICOS.....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1. ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	25
4.2. CIRURGIA PARA MENSURAÇÃO DE TEMPERATURA.....	25
4.3. INSERÇÃO DE CÂNULAS NO CÉREBRO.....	26
4.4. ACOMPANHAMENTO DA TEMPERATURA.....	26
4.5. ADMINISTRAÇÃO DA ENZASTAURINA E INDUÇÃO DE FEBRE POR LPS.....	27
4.6. COLETA DA AMOSTRA DE SANGUE.....	27
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	28
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
<b>5. RESULTADOS</b> .....	30
5.1. EFEITO DA ENZ SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LPS.....	30
5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO SANGUE DE RATOS APÓS PRÉ- TRATAMENTO COM ENZ E INDUÇÃO DA FEBRE POR LPS.....	31
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>ANEXOS</b> .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

A febre é o aumento da temperatura corporal que ocorre sobretudo em resposta a processos inflamatórios ou infecciosos (KNUT, 2013). Sabe-se que a febre pode trazer benefícios por induzir a resposta imune no organismo, porém quando exacerbada pode resultar em consequências graves (PRAJITHA *et al.*, 2018). Os fármacos comumente utilizados para tratar a febre, denominados de antipiréticos, são a dipirona e o paracetamol, além dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como o ibuprofeno (PEREIRA *et al.*, 2013).

A regulação da temperatura corporal é exercida por um grupo de neurônios presentes na área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA), principal responsável pelas alterações ocorridas durante a resposta febril (ZAMPRONIO, 2015). A termorregulação tem como objetivo manter a temperatura do corpo em um nível pré-estabelecido de cerca de 36,5 °C, com variações diurnas e sob a influência de muitos fatores, como a temperatura do ambiente e alterações hormonais (SILBERNAGL; LANG, 2016; PROTSIV *et al.*, 2020).

As substâncias que induzem a febre são chamadas de pirógenos, que quando reconhecidos pelo sistema imune inato, estimulam respostas inflamatórias (OLIVEIRA, 2019). Os pirógenos são classificados como exógenos, que se originam fora do organismo, e endógenos, que são produzidos pelo próprio corpo em resposta ao estímulo pelos exógenos (PRAJITHA *et al.*, 2018).

O lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina localizada na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas, é o pirógeno mais utilizado como indutor da febre em estudos experimentais. Ao se ligar e ativar o receptor *toll-like* 4 (TLR4) existente em células do sistema imune inato, o LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo predominante a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas alcançam a circulação sistêmica e ativam receptores expressos em células endoteliais encefálicas, o que resulta no aumento da síntese da enzima ciclooxigenase (COX)-2 e, em sequência, de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que é responsável por mediar a febre no hipotálamo (ROTH; BLATTEIS, 2014).

A proteína quinase C (PKC) é uma família de enzimas quinases, que fosforilam proteínas em resíduos serina e treonina. Sua ativação acontece durante a

translocação do citosol para a membrana plasmática em reação à elevação de diacilglicerol (DAG), produto da ação da enzima fosfolipase C. As PKCs ativadas agem catalisando a transferência de um grupo adenosina trifosfato (ATP) a inúmeras proteínas substrato. A enzastaurina (ENZ) é um inibidor de PKC $\beta$ , isoenzima de PKC, em decorrência da competição com o ATP pelos sítios catalíticos dessa isoenzima (SCHAAN, 2003; STRANAHAN *et al.*, 2016).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa presente no organismo e atua como importante molécula sinalizadora em vários processos, como neurotransmissão e relaxamento da musculatura lisa. É produzido pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) que utilizam L-arginina e O<sub>2</sub> como substrato. A NOS induzível (iNOS) tem sua expressão induzida por várias causas, como a inflamação, que está relacionada com a resposta febril (MARTINS, 2016).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) detecta elétrons desemparelhados, e assim, possibilita a quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, incluindo a hemoglobina nitrosilada (HbNO), devido sua habilidade de medir o campo magnético em que uma espécie paramagnética entra em ressonância com uma radiação micro-ondas monocromática (BRITO, 2015).

A baixa compreensão da farmacodinâmica dos antipiréticos habitualmente utilizados e de mecanismos envolvidos na febre traz a necessidade da descoberta de novos fármacos antitérmicos e de estudos para elucidar esses mecanismos. Experimentos *in vivo* são fundamentais para identificar os mecanismos funcionais envolvidos na regulação da febre pela PKC $\beta$ .

### 1.1. FEBRE E INDUÇÃO POR LPS

A febre se dá pela integração de circuitos neuronais e fisiológicos que conferem vantagens de sobrevivência durante quadros infecciosos, como: redução da replicação viral, crescimento bacteriano prejudicado, resposta do hospedeiro aumentada pela infiltração de leucócitos, ativação de célula natural killer e células T e a produção de citocinas. (PEREIRA; BATALHÃO; CÁRNIO, 2014).

Porém, a febre não controlada e por períodos prolongados pode ocasionar danos, sendo: aumento da frequência cardíaca e do metabolismo energético,

resultando em fadiga, cefaleias e dores articulares; aumento do sono de onda lenta; como também, por vezes, distúrbios da consciência e dos sentidos e convulsões (SILBERNAGL; LANG, 2016) (**Figura 1**). Desta forma, tornou-se inevitável o avanço de terapias antipiréticas para o controle da febre.

A APOHA possui neurônios que são sensíveis ao calor ou ao frio e os insensíveis à variação da temperatura. Mediadores da febre, especialmente a  $PGE_2$ , ativam mecanismos de produção e conservação de calor, por inibição da atividade da população que é sensível ao calor, ativando os mecanismos termogênicos (MARTINS, 2016) (**Figura 1**).

Para aumentar a temperatura, o corpo humano fisiologicamente conserva calor, diminuindo a perda do calor devido à vasoconstrição e piloereção e aumentando a produção de calor mediante ou não de calafrios (tremores). A febre possui três fases principais, sendo: aumento da temperatura (fase de sintomas característicos, como fadiga, mal-estar e sensação de frio); estabilização de temperatura (fase de equilíbrio entre produção e perda de calor); defervescência (fase de desaparecimento da febre com uma descida abrupta, em horas, com sensação de calor, ou ocorre gradualmente ao longo dos dias) (SANJUANELO, 2013) (**Figura 1**).

Estudos realizados com injeção de LPS em roedores têm sido indispensáveis para a compreensão e caracterização dos mecanismos moleculares subjacentes à febre. A ativação rápida do sistema imune inato pelo LPS estimula a cascata do complemento e gera o componente C5a, responsável pela imediata produção de  $PGE_2$ . A produção aditiva de  $PGE_2$  se dá, após um tempo, pela ativação dos receptores TLR4 em macrófagos, adipócitos, células de Kupffer no fígado e micróglia, induzindo a liberação de citocinas, entre elas:  $IL-1\beta$ , interleucina- $1\alpha$  ( $IL-1\alpha$ ),  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ , interferon  $\beta$  ( $IFN-\beta$ ) e interferon  $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ), que enviam sinais para a APOHA, que induz a febre (ROTH, BLATTEIS, 2014; ZAMPRONIO, 2015) (**Figura 1**).

A  $PGE_2$  produzida mediante injeção de LPS, resultante da atuação de citocinas em receptores responsáveis pelo aumento da síntese de (COX)-2 é considerada a principal mediadora pirogênica da febre no hipotálamo, ao integrar sinais de entrada de citocinas pirogênicas decorrentes de estímulos patogênicos, com sinais de saída abrangendo neurotransmissores que aumentam a temperatura corporal central, ativando os mecanismos termogênicos (EVANS *et al.*, 2015).



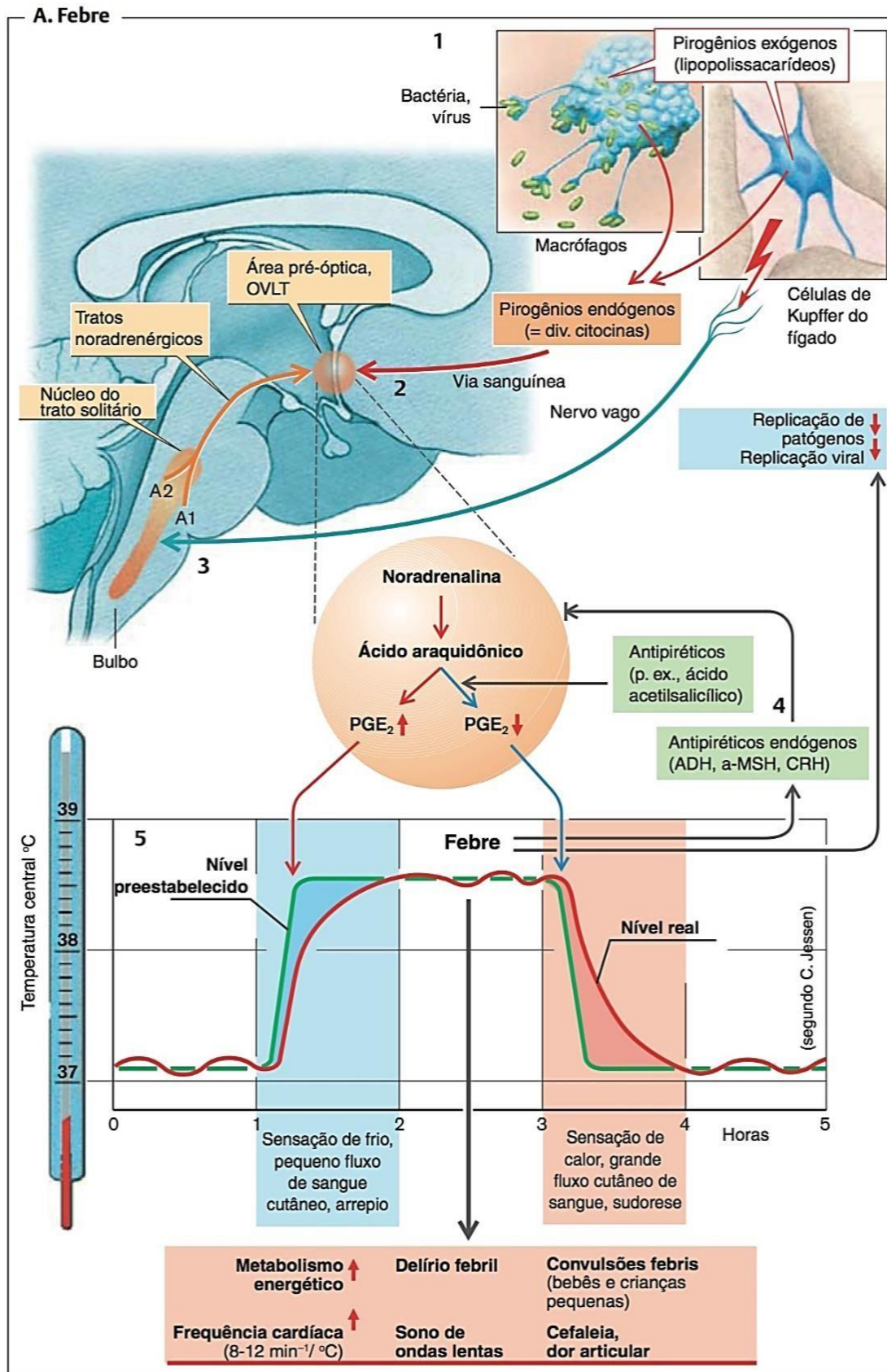


Figura 1. Mecanismo da febre. Fonte: SILBERNAGL (2016).

## 1.2. ANTIPIRESE

A antipirese endógena ocorre por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), uma alteração neuroendócrina que acompanha a resposta febril, é uma reação de feedback com capacidade de neutralizar a exacerbação da resposta imune e atenuar a febre (ROTH, BLATTEIS, 2014). Esta reação permanece no corpo com a intenção de conter a duração e intensidade da febre. E, estudos indicam que quando um indivíduo tem uma exposição constante a pirógenos exógenos na infância, ocorre a prolongação dessa ação pelo eixo HPA, que defende contra agravos da resposta febril (MOUIHATE, 2013). A antipirese endógena periférica é exercida por glicocorticóides, citocinas antipiréticas, fatores lipídicos anti-hiperpiréticos advindos do baço e demais hormônios. Já os centralmente ativos abrangem neuropeptídeos, eicosanóides, óxido nítrico (NO) e demais neurotransmissores gasosos (PRAJITHA; ATHIRA; MOHANAN, 2019).

O ponto de ajuste de temperatura do centro regulador do hipotálamo a ocorrer da resposta febril é restaurado se as concentrações de PGE<sub>2</sub> diminuírem ou se forem administrados antipiréticos, que podem inibir a síntese e liberação de PGE<sub>2</sub>, levando a respostas fisiológicas, incluindo aumento do fluxo sanguíneo para a pele, que culmina na perda de calor (SANJUANELO, 2013).

A dipirona é uma pró-droga cuja biotransformação gera os metabólitos 4-MAA (4-metilaminoantipirina) e 4-AA (4-aminoantipirina) responsáveis pela potente atividade antipirética e analgésica, mas carente de atividade anti-inflamatória significativa (QUEIROZ, 2016). Seu mecanismo de ação ainda não é bem estabelecido, mas estudos têm mostrado que esse fármaco inibe a febre independente de LPS (MALVAR *et al.*, 2014) e não atua na febre induzida por ácido araquidônico (DE SOUZA *et al.*, 2002).

O paracetamol, é um dos antipiréticos e analgésicos habitualmente empregados por possuir uma janela terapêutica larga e baixa toxicidade, portanto é considerado seguro quando seu uso é racional. Acredita-se que possui pouca atividade anti-inflamatória e seus efeitos no tratamento da febre ocorrem por meio do bloqueio da síntese de prostaglandinas (PGs) no sistema nervoso central (SNC) e da inibição da ação de pirógenos endógenos nos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA)

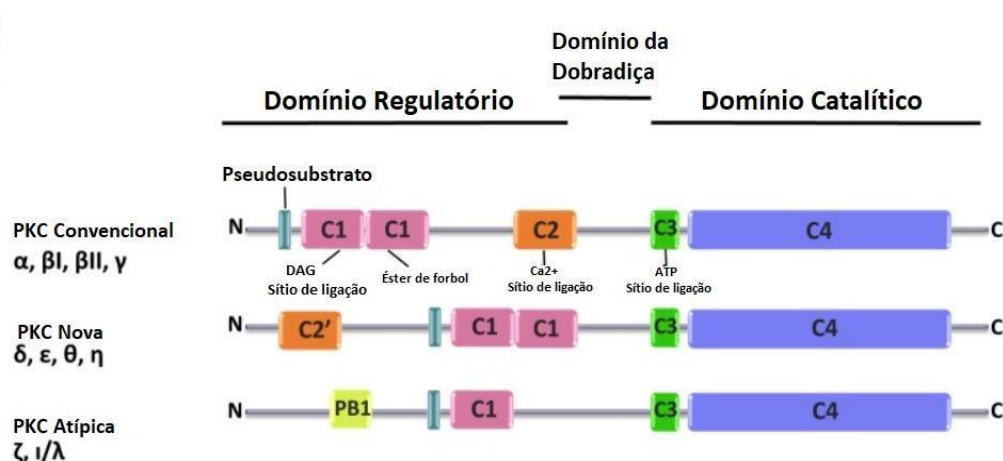
do hipotálamo, precedendo a dissipação do calor, sudorese e vasodilatação periférica (CASTRO, 2014).

Os AINEs impedem ou atenuam sintomas comuns da inflamação, como calor, rubor e dor. Isto posto, possuem ação antipirética ao inibir PGs, por meio da competição com as enzimas COX-1 e COX-2 (SEABRA, 2015).

### 1.3. INIBIÇÃO DE PKC $\beta$

As PKCs fosforilam múltiplos alvos proteicos e são categorizadas como serina/treonina quinases. De acordo com sua estrutura e sensibilidade aos ativadores são classificadas em três grupos, designados de: clássicos (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ ), ativados por fosfatidilserina (PS) e pelo DAG ou PE e dependentes de Ca<sup>2+</sup>, novos (PKC $\delta$ , PKC $\eta$ , PKC $\theta$  e PKC $\epsilon$ ), regulados por PS, DAG ou PE e independentes de Ca<sup>2+</sup> e atípicos (PKC $\zeta$  e PKC $\iota/\lambda$ ), que não dependem de Ca<sup>2+</sup> e são regulados apenas por PE (SANCHEZ-BAUTISTA; NICOLAS, 2013) (**Figura 2**).

As PKCs têm uma região reguladora e uma região catalítica, com quatro domínios, sendo C1 de ligação a DAG e PE e C2 de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, localizados no domínio regulatório N-terminal, enquanto C3 de ligação ao ATP e C4 a sítios de ligação de substrato de proteína residem no domínio catalítico C-terminal, esses domínios estão conectados através de um domínio dobradiça. A ligação entre a região catalítica e a regulatória resulta na inativação enzimática, por outro lado a ativação é ocasionada pela dissociação entre as regiões (KALELI *et al.*, 2020; MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMAS, 2012) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estruturas de domínio das isoenzimas de PKC. Adaptado de KALELI, *et al.* (2020).

As PKCs são lipídio-dependentes multifuncionais, que regulam diversos processos celulares, como apoptose, diferenciação, proliferação, transformação, motilidade e adesão das células, devido a sua aparição em diversas vias de sinalização. Além disso, as PKCs exercem diferentes funções, incluindo formação da memória, proteção contra a hipóxia e resposta imune (BLAZQUEZ *et al.* 2018; GARCIA-CONCEJO; LARHAMMAR, 2021).

Na literatura, estudos salientaram a relação da PKC com diversas doenças como câncer (p.ex, câncer de cólon, hepatocelular e de próstata), doenças neurológicas (p.ex, alzheimer), doenças cardiovasculares (p.ex, aterosclerose e hipertensão), doenças imunes e inflamatórias (p.ex, asma e hepatite) e distúrbios metabólicos (p.ex, hiperglicemia, obesidade e resistência à insulina) (CARDUCCI *et al.*, 2006; KANG, 2014). Deste modo, inibidores e ativadores de PKC (p.ex, estaurosporina e 12-miristato-13-acetato de forbol, respectivamente) são amplamente utilizados no diagnóstico e como alvo terapêutico dessas doenças, além de auxiliar na compreensão de vias de sinalização intracelular mediadas por PKC (KAWANO *et al.*, 2021). A angiogênese induzida por tumor requer ativação de PKCs, particularmente PKC $\beta$ , que está na cascata de sinal do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator angiogênico mais potente nos tumores elevadamente vascularizados, promovendo assim, o crescimento e proliferação de tumores (KILBURN *et al.*, 2015; YOSHIJI *et al.*, 1999).

A PKC $\beta$  é ativada por Ca<sup>2+</sup> e DAG por ser uma PKC convencional (KALELI *et al.*, 2020). A ENZ (LY317615.HCL) é um inibidor potente e seletivo de PKC $\beta$ , responsável por competir com o ATP pelos sítios catalíticos (STRANAHAN *et al.*, 2016). A ENZ também inibe a fosforilação de proteínas ribossomais, como AKT/ Proteína quinase B, que está em vias associadas a PKC. Esse inibidor e seus metabólitos apresentam atividade antiangiogênica em diversos modelos tumorais, além de suprimir a proliferação tumoral e as respostas ao VEGF e induzir apoptose (KILBURN *et al.*, 2015).

Um estudo que avaliou a toxicidade da ENZ revelou que este fármaco possui baixa toxicidade, tendo como sinais e sintomas mais comuns: alteração da cor da urina, anemia, fadiga, trombocitopenia, diarreia e náuseas (KILBURN *et al.*, 2015).

#### 1.4. ÓXIDO NÍTRICO E EPR

Segundo Pereira e colaboradores (2014), a capacidade de NO produzir vasodilatação é descrita como sua principal função, mas não é a única. A síntese de NO sucede a atuação de uma molécula sinalizadora em diversos processos biológicos, como neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa e alterações termorregulatórias fisiológicas e patológicas, sendo considerado mediador pirético na febre induzida por LPS ao atuar na APOHA em humanos. A enzima responsável pela síntese de NO são as NOS sintases (NOS), que possui três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). A isoforma iNOS, mais expressa durante a inflamação, atua de maneira independente de  $Ca^{2+}$  e sua indução acontece em astrócitos e micróglia no SNC em resposta a LPS ou a citocinas pró-inflamatórias, como  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou interferon-gama (IFN $\gamma$ ) (WEN; RIBEIRO; ZHANG, 2011; PRAJITHA; ATHIRA; MOHANAN, 2019).

Nos eritrócitos, o NO é altamente reativo e reage com a hemoglobina desoxigenada formando complexos ferro-nitrosil, conhecido também como hemoglobina nitrosilada (HbNO), relativamente estável com heme-Fe (II). A quantificação deste complexo no sangue circulante pode ser feita por EPR, porém é dificultada pela meia-vida de NO (DEI ZOTTI *et al.*, 2017). O limite de detecção de HbNO no sangue humano foi mencionado como sendo de aproximadamente 200 nM e apesar disso, os níveis basais parecem estar abaixo desse limite. A meia-vida de HbNO *in vivo* é de aproximadamente 40 min (HAWKINS; DAVIES, 2014; PIKNOVA *et al.*, 2005).

A espectroscopia EPR (também conhecida como ressonância de *spin* eletrônico, ESR, espectroscopia) revela sinais positivos apenas quando os radicais livres estão presentes nas amostras e é o “padrão ouro” na caracterização e detecção de radicais em sistemas biológicos, porque a absorção de radiação eletromagnética surge unicamente em frequências e combinações de campos magnéticos bem traçados. Portanto, essa ferramenta mede apenas espécies paramagnéticas e se apresenta com menos espécies inespecíficas do que as métodos de fluorescência ou quimioluminescência (HAWKINS; DAVIES, 2014; GOTHAM *et al.*, 2020).

Assim que NO adentra em eritrócitos, acontecem duas reações primordiais, que são rastreadas pelo EPR. A primeira efetua-se quando NO reage rapidamente e

irreversivelmente com a oxi-hemoglobina gerando nitrato e metehemoglobina, que possuem sinal EPR específico. A segunda reação acontece quando NO com uma rapidez quase equivalente a primeira reação, se liga à desoxihemoglobina formando um EPR de HbNO estável e detectável. Além do mais, na síntese de HbNO, existem espécies espectrais, denominadas de  $\alpha$ -heme-NO e  $\beta$ -heme. Em ratos foi visualizado que HbNO produziu um sinal EPR misto, porém o sinal  $\alpha$ -heme foi o único que se manteve (KLESCHYOV; WENZEL; MUNZEL, 2007).

Quando desempenhada com cuidado, a técnica de EPR fornece dados definitivos sobre a identidade, concentração, estrutura exata, mobilidade e interações de espécies paramagnéticas, como o HbNO. Contudo, possui limitações e o pesquisador precisa compreender as manobras do método para evitar equívocos (HAWKINS; DAVIES, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os inibidores seletivos de PKC apresentam relevância na modulação da resposta inflamatória. Além disso, dados alcançados em estudos realizados em nosso laboratório revelam o aumento de PKC $\beta$  no hipotálamo de ratos durante a febre (FIRMINO, 2018). Logo, é essencial investigar o papel da ENZ na febre induzida por LPS, para descoberta de possível ação farmacológica antipirética por meio da inibição da PKC $\beta$ . Segundo Gomes (2017), ao longo da febre ocorre o aumento de óxido nítrico periférico, dessa forma, sua quantificação poderá trazer respostas sobre o efeito da ENZ.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Investigar os efeitos do pré-tratamento com ENZ sobre a produção de óxido nítrico em ratos durante a febre induzida por LPS.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Verificar e retratar os efeitos do pré-tratamento com ENZ sobre a resposta febril.
- Examinar o efeito do pré-tratamento com ENZ sobre a produção de óxido nítrico no sangue de animais febris, por meio da detecção de HbNO.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ENSAIO *IN VIVO*

Os testes farmacológicos foram executados *in vivo* em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, com peso entre 180 e 200 g. Os ratos foram obtidos do Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília, onde permaneceram em meio com umidade e temperatura controladas, sob  $24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro-escuro de 12 h, alimentados e hidratados *ad libitum* até o momento dos experimentos. Os animais foram levados para o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) do IB para a realização dos ensaios, entre 08:00 e 18:00. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do IB (SEI n.23106.080030/2022-22) (**Anexo 1**).

### 4.2. CIRURGIA PARA MENSURAÇÃO DE TEMPERATURA

Foi realizada uma cirurgia na cavidade peritoneal para implante de transmissores (*Data Loggers Subcue*, Calgary Canadá) com 1,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de espessura, que mensuram a temperatura corporal dos animais. Previamente, os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) com combinação de cetamina (Cloridrato de cetamina 10%, Ketamina Agener<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (Calmiun<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo, Brasil) nas doses de 60 mg/kg e 10 mg/kg, nesta ordem.

Foram feitas a tricotomia e antissepsia na pele do animal para proceder a laparotomia, incisão de aproximadamente 2 cm, necessária para inserção do transmissor limpo com solução salina estéril na cavidade peritoneal, após sua desinfecção em solução de álcool 70% por 30 min. Os animais foram suturados no músculo e na pele isoladamente, por meio de sutura contínua simples. Logo após, receberam antibioticoterapia mediante injeção intramuscular de cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina<sup>®</sup>, Pfizer, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/kg. Ademais,

foi administrado o anti-inflamatório meloxicam (Maxicam<sup>®</sup>, Ouro fino, Minas Gerais, Brasil).

#### 4.3. INSERÇÃO DE CÂNULAS NO CÉREBRO

Ainda anestesiados, os animais foram submetidos a uma segunda cirurgia para inserção de cânulas no ventrículo lateral cerebral. Previamente, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico e foi efetuada a assepsia da região superior da cabeça, em seguida, receberam anestesia por meio da injeção local subcutânea de lidocaína 2% e fenilefrina 0,04% (0,2 mL de cada) para dar início a cirurgia. Realizou-se uma incisão na pele da região dorsal do crânio com exposição da calota craniana e visualização do bregma, anterior a inserção da cânula. Os seguintes parâmetros estereotáxicos foram utilizados para a inserção da cânula intracerebroventricular: -1,5 mm ântero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm (PAXINOS; WATSON, 2006).

As cânulas com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, compostas de um segmento de agulha hipodérmica BD-7 foram inseridas no tecido cerebral dos animais, com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. A prótese de acrílico autopolimerizável foi usada para a fixação das cânulas com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana. Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos estiveram por um intervalo de 48 horas em observação. O tempo de recuperação era de uma semana.

#### 4.4. ACOMPANHAMENTO DA TEMPERATURA

Os ratos tiveram sua temperatura medida a partir dos transmissores implantados. O ambiente de experimento teve a temperatura controlada a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , por no mínimo 12 h antes do início da indução de febre e antipirese. A aferição de temperatura teve o início 2 h antes dos experimentos até o final do procedimento, com intervalos de 15 min, que estendeu por mais 5 h depois da injeção do LPS (Sigma-Aldrich, EUA).

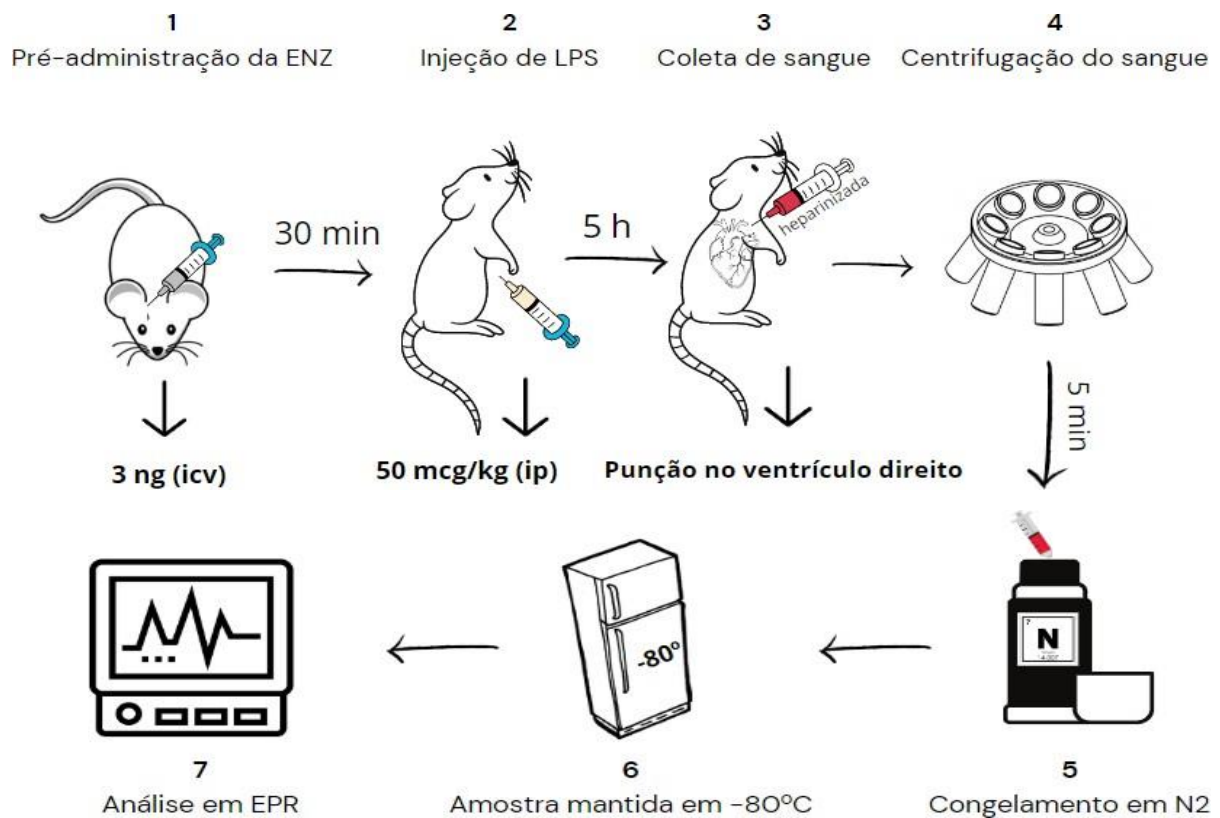
#### 4.5. ADMINISTRAÇÃO DA ENZASTAURINA E INDUÇÃO DE FEBRE POR LPS

Os ratos foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais (veículo/salina, ENZ 3 ng/salina, veículo/LPS, ENZ 3 ng/LPS) com n de 6-8 animais para obtenção dos resultados.

Nos ensaios de indução de febre e antipirese, os animais receberam pré-tratamento com ENZ 3 ng/rato (Cayman Chemical Company, USA) ou veículo dimetilsulfóxido (DMSO, Grupo Química, Rio de Janeiro) a 0,15% por via intracerebroventricular (icv). Após 30 minutos, foi feita injeção ip de LPS (50 µg/kg, dose padronizada pelo laboratório) para induzir a febre ou salina 0,9%, 2 mL/kg (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP). Esses procedimentos foram conduzidos em uma sala de experimentação, com temperatura termoneutra para os animais sendo  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (**Figura 3**).

#### 4.6. COLETA DA AMOSTRA DE SANGUE

Depois de 5 horas da indução da febre com LPS, os animais foram anestesiados antes da coleta do sangue, que foi utilizado para quantificação de HbNO. Para coleta foi realizada um corte no tórax do rato para expor o coração, assim foi possível realizar uma punção no ventrículo direito com uma seringa heparinizada de 3 mL. O volume de 1 mL de sangue foi transferido para uma seringa de 1 mL heparinizada com 10 microlitros, que em seguida, foi centrifugado a 2000 g por 5 min e então congelado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). As amostras permaneceram em geladeira -80°C até o momento da análise por EPR (**Figura 3**).



**Figura 3.** Experimento farmacológico. Fonte: Elaboração própria

#### 4.7. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

As amostras de sangue congeladas foram movidas da seringa para um *Dewer* com nitrogênio líquido. A quantidade de NO foi estabelecida por meio da curva de calibração para a intensidade do sinal EPR de eritrócitos preparados com concentrações convencionais de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Ditionito de sódio, 20 mg), que reduz oxihemoglobina em hemoglobina e de NaNO<sub>2</sub> (Nitrito de sódio, 1, 10 e 100 μM), um doador de NO.

A quantificação de NO foi feita por mensuração de HbNO com o uso de EPR, operando um espectrômetro Bruker E500, banda X de 9,35 GHz, potência 2mW, campo de modulação de 200 Gauss, constante de tempo de 10 ms e de varredura de 600 G, além de 5 varreduras acrescentadas para todas as mensurações. As medidas ocorreram em temperatura de -196 °C utilizando N<sub>2</sub>. Os experimentos foram operados no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

#### 4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas por análise de variância de duas vias, tratamento e tempo, utilizando a *two-way ANOVA* para avaliar a variação de tratamento e tempo, e *de uma via, one-way ANOVA* para quantificação de HbNO, juntos ao teste de Tukey para comparações múltiplas com a aplicação do programa estatístico Prism 9.5.0. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ). A análise dos dados e os parâmetros escolhidos foram fundamentados em metodologia adequada e passaram por adequações conforme exigências do estudo. Os dados foram emitidos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

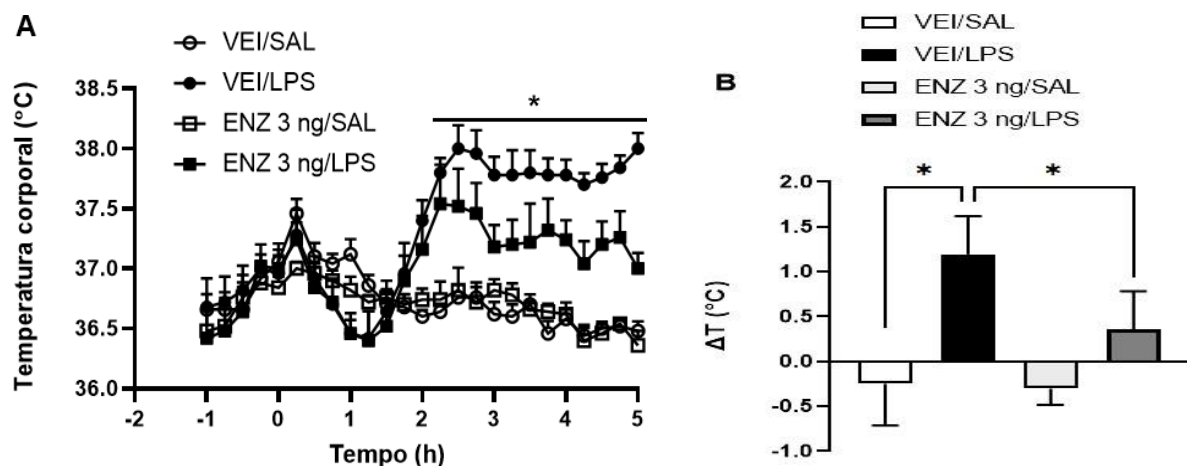
A temperatura basal do animal foi estabelecida de acordo com a média de quatro medições executadas previamente a toda intervenção. Foi realizado o cálculo de  $\Delta T$  com a diferença entre a temperatura na quinta hora e a temperatura basal para comparação da temperatura corporal dos ratos antes e após a administração do fármaco e LPS.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EFEITO DA ENZ SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LPS

Com a finalidade de investigar o efeito da ENZ sobre a resposta febril, foi administrada a dose de 3 ng/rato (icv), 30 minutos antes da injeção de LPS (ip). Na **Figura 4A**, é possível observar que os animais dos grupos Veí/Sal e ENZ 3ng/Sal mantiveram sua temperatura estável, portanto, a febre não foi induzida nos animais desses grupos. Ocorreu um pequeno aumento de temperatura nos primeiros 30 min após o estímulo em todos os grupos, devido ao estresse no momento de manuseio dos animais.

Nessa figura, também se observa que o grupo Veí/LPS teve um aumento significativo da temperatura corporal em relação ao grupo Veí/Sal ( $p < 0,05$ ), o que indica que houve febre após indução por LPS, com perfil bifásico, sendo uma febre duradoura com dois picos vistos em cerca de 2,5 h e 5 h. Já o grupo ENZ 3 ng/LPS demonstrou que a pré-administração do fármaco promoveu uma significativa inibição da febre induzida por LPS ao ser comparado ao grupo Veí/LPS, que iniciou em 2,5 h e manteve até a quinta hora após a injeção do LPS. Isto posto, a ENZ apresentou um efeito antitérmico durante a febre induzida por LPS.



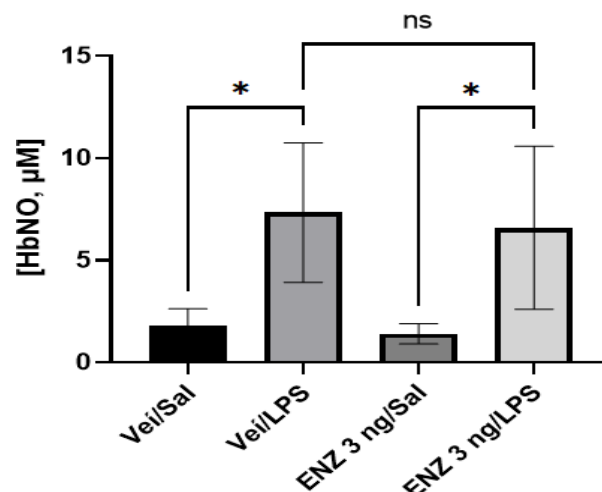
**Figura 4: Efeito da ENZ 3 ng/rato sobre a febre induzida por LPS.** A ENZ foi administrada por via icv na dose de 3 ng/rato, após 30 min foi administrado o LPS ( $n=5$ ). Os animais receberam salina e/ou veículo proporcionalmente a dose do fármaco. No gráfico **A**, está demonstrada a mudança na temperatura corporal no transcorrer do tempo em horas. O tempo 0 (zero) indica a aplicação de LPS i.p. Os pontos indicam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal dos animais. No gráfico **B**, as barras indicam a diferença entre a temperatura na 5ª hora e a temperatura basal. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos valores dos grupos Veí/Sal e Veí/LPS, nesta ordem; *two-way* (gráfico **A**) e *one-way* (gráfico **B**) ANOVA, junto ao teste de Tukey.

No painel B, está demonstrada a variação de temperatura ( $\Delta T$ ) dos animais, que é a diferença entre temperatura aferida 5 h após a indução de febre e a temperatura basal (média das 4 medidas antes do início das administrações). Verifica-se que o tratamento com ENZ reduziu o  $\Delta T$  em 70% na 5ª hora.

## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO SANGUE DE RATOS APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM ENZ E INDUÇÃO DA FEBRE POR LPS

Visando verificar a produção de NO no sangue durante a febre induzida por LPS e possível antipirese efetivada pela ENZ, foi quantificada a concentração de HbNO em amostras do sangue após centrifugação. O HbNO foi avaliado a partir da amplitude de sinal, que foi comparada com a amplitude da curva de calibração produzida com eritrócitos lavados com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  e incubados com  $\text{NaNO}_2$ .

Inicialmente, observou-se que houve um aumento significativo na [HbNO] entre os grupos Veí/Sal e Veí/LPS, isto significa, que o LPS ao induzir a febre aumentou a concentração de NO no sangue. Ao comparar os grupos ENZ 3 ng/sal e ENZ 3 ng/LPS também se observa a atividade de LPS no aumento da [HbNO] na presença de ENZ. Já entre os grupos Veí/LPS e ENZ 3 ng/LPS não houve diferença significativa na [HbNO], logo, a administração icv da ENZ anterior à indução da febre não exerceu diminuição expressiva na produção de NO periférico (**Figura 5**).



**Figura 5: Concentração de HbNO periférico de ratos 5 h após o experimento farmacológico.** As colunas correspondem a [HbNO] em  $\mu\text{M}$  nos 4 grupos, 5 h após a administração icv de ENZ ou veículo (DMSO) e injeção ip de LPS ou salina ( $n=6-8$ ). Os dados correspondem a média  $\pm$  EPM. \* $p<0,05$  quando comparados aos valores dos grupos Veí/Sal e ENZ 3 ng/Sal, nesta ordem. ns (não significativo) quando comparado ao valor do grupo Veí/LPS; *one-way ANOVA*, junto ao teste de Tukey.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados anteriormente descritos forneceram uma perspectiva sobre os efeitos da inibição de ENZ em PKC $\beta$  na resposta febril e na produção de NO periférico.

A febre é proveniente de respostas do hospedeiro a estímulos de pirógenos. Os neurônios hipotalâmicos da APOHA realizam o controle da temperatura corporal ao detectar alterações na temperatura periférica e, com base nisso promovem a termorregulação para manutenção da homeostase. O LPS é o principal agente indutor experimental da febre, logo, em diferentes estudos exerce o papel de indicar e caracterizar mecanismos fisiológicos, neuroendócrinos e imunológicos envolvidos na resposta febril (BARTFAI;CONTI, 2010; ROTH;BLATTEIS, 2014).

O LPS atua sobretudo em receptores TLR4, mais especificamente em seu sítio de ligação situado no componente extramembranar, que contém diversas repetições de leucina. A ativação desse receptor em macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas aciona uma cascata de inflamação, que desencadeia na produção de citocinas em sua maioria IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , responsáveis por estimular a síntese de COX-2, uma enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em PGE<sub>2</sub>. Por fim, a PGE<sub>2</sub> ativa receptores EP3, o que induz a síntese de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), elevação do limiar térmico hipotalâmico e assim, respostas efetoras como, vasoconstrição e contração muscular, que aumentam a temperatura corporal (SPENCER, 2015). Ao estimular TLR4, o LPS inicia outras vias de sinalização intracelular, onde estão envolvidos segundos mensageiros além do AMPC, como DAG e Ca<sup>2+</sup>, responsáveis por ativar PKC (YAN *et al.*, 2016).

Em ensaios experimentais, a febre induzida por LPS pode ser de perfil monofásica ou bifásica de acordo com a dose, via de administração, espécie animal e temperatura ambiente no momento do experimento. A dose utilizada em nosso estudo (50  $\mu$ g/kg, via i.p) induziu uma febre bifásica com o primeiro pico em 2,5 h e um segundo pico (fase tardia) 5 h após a injeção, resposta comum a doses moderadas de LPS, que além de ser contínua, diminui as chances da ocorrência de choque endotóxico (ROMANOVSKY *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2012; ROTH *et al.*, 2009). Este resultado corrobora os achados de estudos semelhantes, desenvolvidos por Thaler e colaboradores (2009); Queiroz (2016); Brito (2016), em que constataram que



ratos também da espécie *Wistar* tratados tanto com doses de 50, quanto 100 µg/kg ip de LPS promoveram uma febre bifásica.

Estudos com fármacos extensamente utilizados em função de seus efeitos antipiréticos revelam que seus mecanismos envolvidos na resposta febril ainda não estão bem estabelecidos e que existem desvantagens em relação ao uso no decorrer da febre. Queiroz (2016) comparou o efeito antitérmico da dipirona com os de seus metabólitos ativos e certificaram que na febre induzida por LPS, apenas o 4-MAA aboliu a resposta febril enquanto a dipirona e o 4-AA reduziram somente a fase inicial da febre. Ao ser testado por Gomes e colaboradores (2018), o paracetamol na posologia de 180 mg/kg diminuiu apenas a primeira fase da febre induzida por LPS, e em doses superiores, a duração de efeito do fármaco não sofreu alteração. Em 2014, HAR-EVEN e colaboradores retrataram que o ibuprofeno tende a diminuir a febre, contudo foi observado o aumento da temperatura em muitos pacientes, o que constatou que o efeito do fármaco na temperatura corporal basal varia entre os pacientes com o tempo. Portanto, é necessária a descoberta de novos fármacos antipiréticos mais eficazes e que agem por outros mecanismos.

A PKC, uma quinase Ser/Thr dependente de fosfolipídios, é formada por isoenzimas conhecidas pela sua atuação direta e/ou indireta em sistemas de transdução de sinal em vários tipos celulares, ao responderem a estímulos, como hormônios e fatores de crescimento. Para caracterizar as vias de sinalização intracelular reguladas pelas isoformas de PKC são usados seus substratos ou inibidores específicos (KANG, 2014). Sendo assim, associaram a PKC a diversas doenças.

A partir de estudos de caracterização, têm surgido inúmeras aplicações clínicas com bom perfil de segurança ligadas a inibidores de PKC. Estes inibidores possuem papel relevante na regulação da resposta inflamatória *in vitro* e *in vivo* (LEPPANEN; TUOMINEN; MOILANEN, 2014). Em nosso trabalho, foi constatado que o pré-tratamento com ENZ icv, inibidor de PKC $\beta$ , na dose de 50 ng/rato inibiu significativamente (70%) a febre induzida pelo LPS. Em estudos que avaliaram alterações proteômicas envolvidas nas respostas febris induzidas por LPS em ratos, concluíram que PKC $\beta$  aumenta durante a febre (FIRMINO, 2018), portanto, como foi atestado em nosso estudo, seu inibidor exerce efeito na cessação da febre. Firmino (2018) utilizou um inibidor não seletivo de PKC, a celeritrina, que também inibiu (33%)

a febre induzida por LPS. Porém, a ENZ inibiu melhor a febre, provavelmente por ser um inibidor mais seletivo de PKC, especificamente da isoforma PKC $\beta$ , que está abundante na febre.

A ENZ (LY317615) é amplamente estudada, por ser o inibidor mais seletivo de PKC $\beta$  (PARK *et al.*, 2020). Essa seletividade se dá devido a sua metabolização pelo citocromo P450 3A (CYP3A), que forma metabólitos (desmetilenopirimidilo e desmetil) igualmente potentes na inibição de PKC $\beta$ , com IC<sub>50</sub> de aproximadamente 5 nmol/L. Ainda, em ensaios pré-clínicos *in vitro*, a ENZ se ligou 95% às proteínas plasmáticas, o que influencia na sua distribuição e meia-vida, e apresentou uma concentração inibitória de 90% de 70 nmol/L para PKC $\beta$  (CARDUCCI *et al.*, 2006).

Em um estudo que avaliou a segurança, a tolerabilidade e a farmacocinética da ENZ, notou-se que os eventos adversos mais comuns desse fármaco em doses únicas (2-400 mg) foram diarreia, náusea, sonolência e cefaleia, assim a ENZ foi bemtolerada em indivíduos sadios (WELCH, *et al.*, 2007). Já em outros dois estudos clínicos de fase 1 em pacientes com câncer, foi observada cromatúria de grau 1 após a administração da ENZ em doses de 500-700 mg, possivelmente devido à cor laranja-avermelhada do seu princípio ativo. Além disso, toxicidades de graus 3/4 não foram observadas (MUKOHARA *et al.*, 2010; CARDUCCI *et al.*, 2006).

Entretanto, a ENZ pode causar trombose, o que limita a sua utilização (QIE *et al.*, 2023). A partir disso, Qie e colaboradores (2023) desenvolveram uma estratégia terapêutica eficaz para diminuir a toxicidade da ENZ e evitar a formação de trombos, utilizando uma nanopartícula de polímero funcional modificada com octreotida e um aptâmero de ligação à trombina, que proporcionou o retardamento da incidência de irregularidades de coagulação tanto *in vitro* como *in vivo*.

A ENZ é conhecida pela sua potência em suprimir a proliferação de células estimuladas por VEGF, dado isso, foi inicialmente desenvolvida como uma terapia antiangiogênica para o câncer, porém estudos recentes apresentaram novas atribuições clínicas a ENZ. Em 2022, um estudo *in vitro* realizado por Huang e colaboradores, revelou que a ENZ possui atividade protetora contra a infecção por SARS-CoV-2 ao bloquear sua replicação viral. Em 2020, Park e colaboradores, a partir de estudos pré-clínicos com camundongos, concluíram que a ENZ aumenta a eficácia de vários tratamentos quimioterápicos ao conter a resistência a drogas mediada pelo ambiente. Em 2019, um conjunto de resultados de Altshuler e

colaboradores, revelaram que a ENZ pode ser utilizada no tratamento do abuso de anfetaminas ao diminuir os níveis de dopamina no cérebro, que sofre aumento durante o uso dessas drogas. Em 2013, Lanz e colaboradores, utilizaram a ENZ para investigar a atuação de PKC $\beta$  na neuroinflamação e foi expressa a diminuição dos infiltrados inflamatórios. Isso indica que a ENZ exerce diversas funções terapêuticas envolvidas com o câncer, doenças inflamatórias e infecciosas, sendo a antipirese possivelmente uma delas, como foi exposto nesse trabalho.

O NO é uma molécula sinalizadora gasosa expressiva no corpo humano com atuação em numerosos processos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo, entre eles está sua atuação na imunidade inata e como modulador regulador e pró-inflamatório em várias condições pró-inflamatórias, que incluem regulação de cascatas de sinalização e fatores de transcrição, produção de citocinas e controle da infecção. Ademais, inibidores da síntese de NO, apresentaram respostas anti-inflamatórias em modelos de indução de inflamação, como artrite e colite. Em resposta a bactérias e citocinas pró-inflamatórias, ocorre um aumento de NOS induzível (iNOS), dessa maneira NO é imensamente sintetizado por um longo período (KORHONEN *et al.*, 2005; LEPPANEN; TUOMINEM; MOILANEN, 2014).

O NO reage com a hemoglobina e forma um complexo (HbNO) que pode ser medido por EPR, metodologia sensível escolhida para quantificar espécies de nitrosila em amostras de sangue. O nível de HbNO varia com a biodisponibilidade de NO na circulação sistêmica, e em experimentos com sangue de camundongos feitos por Dikalov e Fink (2005) foi observado que a maior parte de NO disponível é oxidado em nitrito e somente 10% reage para formar HbNO, que é altamente reativo.

Steiner e Branco (2001) ao pesquisarem o envolvimento de NO com a termorregulação e a febre notaram que a elevação de temperatura na febre aumenta a produção de NO. Pritchard (2005) visualizou esse aumento pelos macrófagos peritoneais. Outro estudo além de comprovar a relação de NO com a resposta febril, certificou que NO exerce ações termorreguladoras opostas na periferia e no SNC, atuando como molécula pirética na periferia, mas inibindo a febre no SNC, ou seja, atua como uma molécula antipirética no cérebro (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2011). Em humanos, NO atua em APOHA para realizar antipirese, já em coelhos e cobaias o NO efetua atividade antitérmica por meio da inibição da liberação de COX-2 e PGE<sub>2</sub> da APOHA (PRAJITHA; ATHIRA; MONAHAN, 2019).

Em estudo realizado por Gomes (2017), utilizando ratos *Wistar*, a concentração de HbNO determinada por EPR foi 15 vezes maior nos animais com administração de LPS em relação aos grupos controles, quando a coleta ocorreu 5 h após o estímulo, que insinua maior quantidade de NO produzido nos tecidos periféricos durante a febre. Em nossos resultados, os níveis de HbNO também aumentaram após indução da resposta febril por LPS, em concordância com os estudos anteriormente citados, porém no grupo em que foi administrada a ENZ icv não houve diminuição significativa de HbNO durante a febre.

Estudos feitos por meio da indução de iNOS em resposta ao LPS, indicaram que a ativação de PKC pode levar à indução de iNOS, sendo PKC $\beta$  uma das principais isoformas que regulam a expressão de iNOS em micróglia ativa. As vias que a PKC atua englobam a fosforilação de diferentes proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e a ativação de fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Também foi visto que todos os inibidores de PKC utilizados reduziram a indução de iNOS por LPS em micróglia reativa (WEN; RIBEIRO; ZHANG, 2011). Em outro estudo realizado por Leppanen e colaboradores (2014), outro inibidor de PKC $\beta$ , a ruboxistaurina, reduziu tanto a produção de NO quanto a expressão de iNOS durante a produção de NO induzida por LPS em macrófagos J774. Apesar de não estudarem a febre induzida por LPS nesses experimentos, nota-se a relação de PKC $\beta$  com a produção de NO. Dikalov e Fink (2005) ao avaliarem o HbNO circulante revelaram que iNOS não contribui para a formação de HbNO em condições normais, diferente de eNOS que empenha um importante papel na formação de HbNO. Isto pode ter afetado o resultado, porque como foi visto, o iNOS é a isoforma de NO relacionada com a febre.

Ao analisar o efeito da dipirona, ibuprofeno, paracetamol e celecoxibe na produção de HbNO durante a febre em EPR, somente a dipirona reduziu significativamente a formação de HbNO, o que pode indicar que seu efeito antitérmico seja dependente da produção de NO (GOMES, 2018). Já o nosso estudo, sugere que o efeito antipirético efetuado pela ENZ não está associado com a diminuição da biodisponibilidade de NO, assim como os AINEs testados no estudo anterior.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos resultados encontrados, que a isoenzima PKC $\beta$  está associada à resposta febril induzida pelo LPS, devido à inibição significativa da febre com o pré-tratamento icv de um potente inibidor dessa isoenzima. Também confirma o que estudos anteriores haviam relatado sobre o aumento da produção de óxido nítrico no sangue durante a resposta febril. Entretanto, a ENZ na dose de 3 ng/rato no período de 5 h não diminuiu significativamente a produção de NO. Isto sugere que o mecanismo pelo qual a ENZ exerce seu efeito antipirético não está relacionado com a síntese de NO.

A ENZ é um inibidor de PKC $\beta$  com potencial terapêutico em função de sua alta seletividade em uma via de sinalização envolvida em diversos processos celulares. Por causa de seu efeito antipirético pode ser uma nova opção de tratamento para a febre, pois age por uma via de sinalização diferente dos fármacos já utilizados, que geralmente estão envolvidos com a PGE<sub>2</sub>. Sendo assim, em nosso laboratório estão sendo realizados outros estudos com a ENZ para determinar como este fármaco atua na resposta febril, mediante análise de tecidos e de mediadores inflamatórios que estão envolvidos na febre.

Estudos complementares com a administração da ENZ pela via oral são necessários para entender como a ENZ atua na febre após sua metabolização pelo CYP450 3A. Além disso, um estudo de quantificação de NO no hipotálamo após tratamento com ENZ e indução da febre por LPS pode indicar se há uma relação do NO no SNC com a antipirese exercida pela ENZ, pois o NO exerce funções diferentes no SNC e na periferia durante a febre.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSHULER, Rachel D. et al. The protein kinase C $\beta$ -selective inhibitor, enzastaurin, attenuates amphetamine-stimulated locomotor activity and self-administration behaviors in rats. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 11, p. 3231-3242, 2019.
- BARTFAI, T.; CONTI, B. Fever. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 490503, 2010.
- BLÁZQUEZ, Ana B. et al. Pharmacological inhibition of protein kinase C reduces West Nile virus replication. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 91, 2018.
- BRANCO, Luiz GS; SORIANO, Renato N.; STEINER, Alexandre A. Gaseous mediators in temperature regulation. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1301-1338, 2011.
- BRITO, Marina. **Redução catalítica seletiva de óxido nítrico por amônia sobre catalisadores de ferro e titânio**. 2015. Dissertação. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
- BRITO, Haissa Oliveira. **Resposta febril induzida por endotoxina bacteriana em ratos: influência dos hormônios sexuais**. 2016. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- BONATTO, José M. **Caracterização da proteína quinase C Beta I nuclear em células tronco embrionárias**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CARDUCCI, Michael, 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.
- CASTRO, Pedro Luís Pereira de. **Farmacocinética do paracetamol**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.
- DE SOUZA, G. E. P. et al. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrrone in rats. **Inflammation Research**, v. 51, p. 24-32, 2002.
- DEI ZOTTI, F, et al. EPR spectroscopy quantification of HbNO as an index of vascular nitric oxide bioavailability in vivo. **Archives of Cardiovascular Diseases Supplements**, v. 9, n. 2, p. 191, 2017.
- DIKALOV, Sergey; FINK, Bruno. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. **Methods in enzymology**, v. 396, p. 597-610, 2005.
- EVANS, Sharon S.; REPASKY, Elizabeth A.; FISHER, Daniel 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.

FIRMINO, Marina et al. Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE<sub>2</sub>. **Journal of proteomics**, v. 187, p. 182-199, 2018.

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

GOMES, Bruna Rafaela Bezerra. **Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos**. 2017. 74 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GOMES, Bruna et al. Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. **Free radical research**, v. 52, n. 3, p. 351-361, 2018.

GOTHAM, John P. et al. Quantitation of spin probe-detectable oxidants in cells using electron paramagnetic resonance spectroscopy: To probe or to trap?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 154, p. 84-94, 2020.

HAR-EVEN, Ronly et al. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of ibuprofen in pediatric patients and antipyretic effect: Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling analysis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 1023-1030, 2014.

HAWKINS, Clare L.; DAVIES, Michael 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.

HUANG, Changbai et al. Protein kinase C inhibitors reduce SARS-CoV-2 replication in cultured cells. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 5, p. e01056-22, 2022.

KALELI, Humeyra Nur et al. Protein kinase C isozymes and autophagy during neurodegenerative disease progression. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 553, 2020.

KANG, Jeong-Hun. Protein kinase C (PKC) isozymes and cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

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

KILBURN, Lindsay 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.

KLESCHYOV, Andrei L.; WENZEL, Philip; MUNZEL, Thomas. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 12-20, 2007.

KNUT, Schmidt-Nielsen. **Fisiologia animal: Adaptação e meio ambiente**. 5 ed. Rio de Janeiro: Livraria Santos, 2013.

KORHONEN, Riku et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

LANZ, T. V. et al. Protein kinase C $\beta$  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.

LEPPANEN, Tiina; TUOMINEN, Raimo K.; MOILANEN, Eeva. Protein kinase C and its inhibitors in the regulation of inflammation: inducible nitric oxide synthase as an example. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 114, n. 1, p. 37-43, 2014.

MALVAR, David do C. et al. Dipyrrone metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE 2-dependent and-independent fever while 4-AA only blocks PGE 2-dependent fever. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3666-3679, 2014.

MARTINS, Victor. **Participação do óxido nítrico da substância cinzenta periaqueductal dorsolateral na febre induzida por estresse de contenção física em ratos**. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, 2016.

MOCHLY-ROSEN, Daria; DAS, Kanad; GRIMES, Kevin V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 12, p. 937-957, 2012.

MOUIHATE, Abdeslam. Long-lasting impact of early life immune stress on neuroimmune functions. **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. Suppl. 1, p. 3-7, 2013.

MUKOHARA, Toru et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of oral enzastaurin (LY317615) in advanced solid tumors. **Cancer science**, v. 101, n. 10, p. 2193-2199, 2010.

OLIVEIRA, Raquel. **Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) para a detecção de pirógenos em Vacina Zika Inativada experimental**. BUTANTAN, 2019.

PARK, Eugene et al. Stromal cell protein kinase C- $\beta$  inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance. **Science translational medicine**, v. 12, n. 526, p. eaax9340, 2020.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. Elsevier, 2006.

PEREIRA, Flávia; BATALHÃO, Marcelo; CÁRNIO, Evelin. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 22, p. 123-128, 2014.

PEREIRA, Gracian Li et al. Conduas terapêuticas e uso alternado de antipiréticos no manejo da febre em crianças. **Jornal de Pediatria**, v. 89, p. 25-32, 2013.



PIKNOVA, Barbora et al. Electron paramagnetic resonance analysis of nitrosylhemoglobin in humans during NO inhalation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40583-40588, 2005.

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

PRAJITHA, N.; ATHIRA, S. S.; MOHANAN, P. V. Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections. **Immunology letters**, v. 204, p. 38-46, 2018.

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

PROTSIV, Myroslava et al. Decreasing human body temperature in the United States since the industrial revolution. **Elife**, v. 9, p. e49555, 2020.

QIE, Yunkai et al. Identification of protein kinase C beta as a therapeutic target for neuroendocrine prostate cancer and development of a nanoparticle-based therapeutic strategy. **Nano Today**, v. 48, p. 101705, 2023.

QUEIROZ, Marina. **Efeito da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores em ratos**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

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

ROTH, Joachim; BLATTEIS, Clark M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Compr Physiol**, v. 4, n. 4, p. 1563-1604, 2014.

SANCHEZ-BAUTISTA, Sonia; E NICOLAS, Francisco. Recent patents concerning modulators of protein kinase C. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)**, v. 7, n. 1, p. 74-81, 2013.

SANJUANELO, Alexander. Fiebre: actualización en el uso de antipiréticos. **Precop**, v. 11, n. 4, p. 26-35, 2013.

SEABRA, Carolina. **Farmacocinética do ibuprofeno**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2015.

SCHAAN, Beatriz D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 654-662, 2003.

SILBERNAGL, Stefan; LANG, Florian. **Fisiopatologia: texto e atlas**. 2ª ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

SOARES, D. M. et al. **A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live E. coli**. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 201, n. 1, p. 47–60, 5 fev. 2012.

SPENCER, Inês Mateus. **Febre: padrões de febre e o seu impacto na patologia**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.

STEINER, Alexandre A.; BRANCO, Luiz GS. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **Journal of Thermal Biology**, 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.

THALER, Joshua P. et al. Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5362-5372, 2009.

WELCH, Pamela A. et al. Safety, Tolerability, QTc Evaluation, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Doses of Enzastaurin HCl (LY317615), a Protein Kinase C-β Inhibitor, in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1138-1151, 2007.

WEN, Jie; RIBEIRO, Rachel; ZHANG, Yumin. Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2011.

YAN, K. et al. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 5, p. 3715–23, 2016.

YOSHIJI, H et al. **Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis**. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59 (17):4413-8. PMID: 10485491.

ZAMPRONIO, Aleksander R.; SOARES, Denis M.; SOUZA, Glória EP. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 506-521, 2015.



**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 $\beta$  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 Kremer*

Dra. Carina da Costa Kremer

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.

**ANEXOS**