



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

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**ENVOLVIMENTO DE p38 MAP QUINASE NA FEBRE INDUZIDA POR
LPS EM RATOS**

BRASÍLIA, DF

2013

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

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**ENVOLVIMENTO DE p38 MAP QUINASE NA FEBRE INDUZIDA POR
LPS EM RATOS**

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

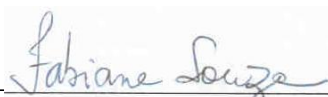
Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

BRASÍLIA, DF
Novembro de 2013

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**ENVOLVIMENTO DE p38 MAP QUINASE NA FEBRE INDUZIDA POR
LPS EM RATOS**

BANCA EXAMINADORA



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

Prof. Dra. Mani Indiana Funez
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Djane Braz Duarte
(FS/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e sustento para continuar sempre perseverante.

À minha orientadora, Fabiane, que durante todos esses anos de iniciação científica me ensinou muito sobre o que é pesquisar. Agradeço por essa oportunidade única de desenvolvimento acadêmico e pessoal, pelos ensinamentos, paciência e por me motivar a sempre procurar soluções e trabalhar com prazer. Serei para sempre grata por tudo.

Aos colegas e professores do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço pela convivência e ajuda quando as dúvidas surgiam.

À Marina pela companhia nos experimentos e por ter me repassados seus conhecimentos, o que foi de grande valia, o meu muito obrigado. Ao Jaques, que sempre me ajudou prontamente quando precisava, desde o início do PIBIC.

O agradecimento mais que especial para a dupla, meu companheiro de todos os experimentos, Guilherme, pela amizade, conversas, diversão, companhia nos experimentos de fim de semana e cumplicidade. Foi muito mais fácil trabalhar muito, pesquisar e aprender com a sua companhia.

A Grazielle e Wlyana pela ajuda e companhia nessa reta final, meu muito obrigado.

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

Ao Ígor, por toda a ajuda nesse processo de construção, pelas caronas nos dias de experimento, pelo apoio e compreensão nos momentos de cansaço. Você foi fundamental para que eu conseguisse concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Aroldo e Zélia por serem minha base, e pelo esforço, apesar de todas as dificuldades, para que eu chegasse até aqui, sem vocês eu nunca teria conseguido. Aos meus irmãos, Bruno e Raphael, por todo o apoio. Obrigada por tudo que fizeram e pela confiança de que eu serei a melhor profissional possível. Amo vocês família.

À Universidade de Brasília, por ter me proporcionado essa experiência única, de verdadeiramente estar inserida no mundo acadêmico.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu eterno obrigado.

RESUMO

A febre é um fenômeno envolvido na reação inflamatória de fase aguda, mediada por diferentes vias. Estudos têm sugerido o envolvimento da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) na resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais. No entanto, a contribuição desta quinase nas vias ativadas durante a febre é desconhecida. Neste estudo foram investigados os efeitos de um inibidor seletivo de p38 MAPK, SB203580, na resposta febril induzida por LPS em ratos. Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia de implante de transmissores de temperatura na cavidade intraperitoneal e implante de cânula no ventrículo lateral. Os animais receberam o inibidor de p38 MAPK (SB203580) trinta minutos antes da administração de LPS (5µg/kg, i.v.) ou seu veículo, nas doses de 0.3, 1, 3, 10 ou 30 µg/animal ou seu veículo. Os animais tiveram a temperatura corporal aferida a cada 30 minutos, durante 6h. Os animais que receberam SB203580 (3 µg/animal i.c.v) seguida por injeção de salina (2mL i.v.) não apresentaram alterações na temperatura basal. Nossos resultados mostram que a injeção intracerebroventricular de SB 203580 produziu um aumento da febre induzida por LPS, nas doses de 0.3, 3 e 30 µg. Esses dados sugerem que p38 MAPK pode estar envolvida na resposta febril induzida por LPS, provavelmente pela inibição de NF-κB. Porém novos experimentos devem ser realizados para auxiliar a elucidar a participação de p38 MAPK na resposta febril induzida por LPS e confirmar o envolvimento de NF-κB.

Palavras chave: febre; LPS; p38 MAPK; NF-κB.

ABSTRACT

Fever is a phenomenon involved in the acute phase of the inflammatory reaction, mediated by different pathways. Researches have suggested the evolvement of p38 MAPK in the inflammatory response of different experimental models. Although, this kinase's contribution for the pathways activated during the fever is unknown. This study investigated the effects of a selective inhibitor p38 MAPK, SB203580, in the LPS-induced fever in rats. Male Wistar rats were submitted to temperature transmitter implant in peritoneum and a cannula implant in the lateral ventricle. The animals received the p38 MAPK inhibitor, SB203580 (0.3, 1, 3, 10 or 30 µg/animal or vehicle) 30 minutes before the LPS (5 µg/kg, IV) injection or vehicle. The animals had the body temperature measured in intervals of 15 minutes from 2h before any injection until 6h after the injection of the pyrogenic stimulus. The animals that received SB203580 (3 µg/animal, i.c.v.) followed by sterile saline injection (0.2mL i.v.) did not presented change on the basal temperature. Our results shows that the i.c.v. injection of SB 203580 increased the fever induced by LPS, in 0.3, 3 and 30 µg. These data suggest that p38 MAPK can be involved in the febrile response LPS-induced, probably by the NF-κB inhibition. Although more tests must be accomplished to help the elucidating of the collaboration of p38 MAPK in LPS-induced fever and corroborate the involvement of NF-κB.

Keywords: fever; LPS; p38 MAPK; NF-κB

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. RESPOSTA FEBRIL E O HIPOTÁLAMO	11
1.2. PIRÓGENOS	14
1.3. FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)	18
1.4. PGE ₂ E VIAS DE SINALIZAÇÃO	20
1.5. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITÓGENOS (MAPK)	23
1.5.1. p38 MAPK	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL	29
4.3. IMPLANTE DA CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR	30
4.4. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS	31
4.6. DISSECAÇÃO DO HIPOTÁLAMO	32
4.7. DROGAS	32
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SB203580, UM INIBIDOR DE p38 MAPK SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS	34
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS	45

ANEXO	55
-------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos na APOHA...	13
Figura 2: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).....	15
Figura 3: Visão esquemática das vias de sinalização de TLR4 na ligação com LPS.	16
Figura 4: Via de sinalização clássica de NF-κB (via canônica).....	19
Figura 5: Produção de prostaglandinas e tromboxanos e principais tecidos onde são produzidos..	21
Figura 6: Cascata das MAPK.....	24
Figura 7: Estrutura molecular do SB203580.....	26
Figura 8: Efeito da injeção central de diferentes concentrações de DMSO e da injeção intravenosa de LPS sobre a temperatura corporal de ratos..	34
Figura 9: Efeito da injeção central de SB203580 0.3 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	35
Figura 10: Efeito da injeção central de SB203580 1µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	36
Figura 11: Efeito da injeção central de SB203580 3µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	37
Figura 12: Efeito da injeção central de SB203580 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	37
Figura 13: Efeito da injeção central de SB203580 30 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	38
Figura 14: Efeito da injeção central de diferentes doses de SB203580 sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS.....	38
Figura 15: Modelo proposto para a inibição de NF-κB mediada por p38 MAPK.....	42

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINE- antiinflamatório não esteroidal
ANOVA – análise de variância de uma via
AP-1 – *activatorprotein1*
APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior
ASC – área sob a curva
ATP – trifosfato de adenosina
AMPc – *3'- 5'- cyclic adenosine monophosphate*
CD14 – *CD14 monocytedifferentiationantigen*
cm – centímetros
COX – ciclooxigenases
cPGES – prostaglandina E sintasecitossólica
CSF – *Cerebrospinal Fluid*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DP – receptor da prostaglandina D₂
EP – receptor de prostaglandina
EPM – erro padrão da média
ERKs –Quinasesreguladas por sinais extracelulares
h – hora
FP – receptor da prostaglandina F₂
icv – intracerebroventricular
IL – interleucina
IL-1 β – interleucina 1beta
IL-1ra – antagonista do receptor de IL-1
IKK – *InibitorykappaBalphakinase*
iNOS – sintetase induzida por oxido nítrico
IP – receptorda prostaciclina
ip – intraperitoneal
IRF – *Interferonregulatoryfactor*
iv – intravenosa
JNKs – Quinasesc-Jun amino-terminais
kDa – quilodalton

Kg - quilogramas
LBP – *LPS binding protein*, proteína ligadora de LPS
LPS – lipopolissacarídeo
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKKK – proteína quinasequinasequinaseativada por mitógeno
MAPKKK – proteínaquinasequinaseativada por mitógeno
MD-2 – *MD-2 protein lymphocyte antigen 96*
MDP – muramil-dipeptídeo
mg – miligramas
min – minutos
mL – mililitros
mm – milímetros
mPGES – prostaglandina E sintasemicrossomal
MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NF-κB – fator nuclear kappa B
PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*
PG – prostaglandina
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGE – prostaglandina E
PGF₂ – prostaglandina F₂ alfa
PGES – prostaglandina E sintase
PLA₂ – fosfolipase A₂
rs – receptor solúvel
SB203580 – *4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulphonylphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazole*
SNC – sistema nervoso central
TLR-4 – *toll-like receptor 4*
TNF-bp – *TNF bindingprotein*
TNF-α – fator de necrose tumoral α
TP – receptor de tromboxano
v/v – volume/volume
μl – microlitros
μg – microgramas

1. INTRODUÇÃO

1.1. RESPOSTA FEBRIL E O HIPOTÁLAMO

Pode-se definir como febre o aumento da temperatura corporal, que acontece por resposta do corpo à invasão do organismo por patógenos (IUPS THERMAL COMMISSION, 2001).

A resposta febril é um fenômeno chave da reação inflamatória de fase aguda (REIS *et al.*, 2011). Devido ao aumento da temperatura corporal, mecanismos de defesa são estimulados, tornando a resposta febril relevante para a proteção da integridade do corpo contra microrganismos invasores ou qualquer outra substância reconhecida como estranha pelas células imunes (BLATTEIS; SEHIC, 1998).

Não há uma resposta concreta a respeito de a febre ser considerada como benéfica ou prejudicial ao organismo (BARTFAI; CONTI, 2010). Dentre as funções da febre na resposta imune, pode ser enumerada a aceleração da quimiotaxia de neutrófilos e da secreção de substâncias antibacterianas, o aumento da produção dos interferons, a estimulação das fases de reconhecimento e sensibilização da resposta imunológica resultando em uma interação mais eficiente entre macrófago e linfócito T e a diminuição da disponibilidade de ferro, a qual limita a proliferação bacteriana e de alguns tumores (VOLTARELI, 1994). Apesar disso, em algumas situações, quando a temperatura atinge níveis muito elevados, como acima de 41°C, podem haver seqüelas neuronais, delírios, malformações fetais e mesmo coma, sendo que nessas situações é indicada a terapia antipirética (HASDAY; FAIRCHILD; SHANHOLTZ, 2000; BRITO, 2011). Blatteis (2003) reforça que a terapia antipirética só deve ser usada quando estritamente necessária, levando em conta a relação temporal das expressões dos mediadores e moduladores pró e antiinflamatórios, tais como citocinas, eicosanóides, glicocorticóides, etc.

De acordo com Boulan (2000), o aumento da temperatura corporal é decorrente da elevação do ponto de regulação, chamado *set point*, localizado na área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA). Essa área é considerada o termostato central, por ser a região mais importante para a homeostase da temperatura, já que a região pode identificar mudanças de temperatura local pela

temperatura do fluxo sanguíneo e então ativar as respostas termorreguladoras para que se tenha a manutenção da temperatura corporal constante (BARTFAI; CONTI, 2010).

Vários autores, usando diferentes metodologias que envolvem a estimulação térmica direta na APOHA, demonstraram que uma variedade de respostas termorreguladoras pode ser provocada pela mudança da temperatura local em uma área cerebral específica (BOULAN, 2000).

Estudos eletrofisiológicos permitiram identificar as propriedades termossensíveis dos neurônios da APOHA, caracterizando-os pela frequência de potenciais de ação durante as alterações de temperatura local. Com isso, os neurônios foram classificados em três tipos básicos: sensíveis ao calor, que correspondem a 30% dos neurônios, sensíveis ao frio, 5%, e insensíveis as mudanças de temperatura, que são cerca de 60% (BOULAN, 2000).

Há evidências que os neurônios da APOHA fazem sinapses com os neurônios do trato espinotalâmico lateral, que é uma importante via ascendente responsável por transmitir informações a partir de termorreceptores na pele e medula espinhal para vários núcleos na formação reticular do tronco cerebral (BOULANT, 2000). Desta forma a área pré-óptica se comunica com áreas efetoras, desencadeando os procedimentos termorregulatórios apropriados para diminuir ou aumentar a temperatura corporal. É visto que o arrefecimento da APOHA inicia mecanismos de retenção de calor, incluindo vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais de conservação de calor. Em contrapartida, o aquecimento da área provoca vasodilatação cutânea, sudorese, respiração ofegante e várias respostas comportamentais que favorecem a perda de calor (BOULANT, 2000).

A **Figura 1** ilustra o controle que os neurônios sensíveis ao calor exercem sobre aqueles sensíveis ao frio, já que os primeiros inibem os segundos quando não são necessárias respostas de conservação do calor, favorecendo assim, a perda do calor. Já os neurônios insensíveis às variações de temperatura podem estimular os neurônios sensíveis ao frio levando ao aumento da temperatura corporal. A sincronia desses mecanismos tem como objetivo manter a temperatura corporal humana em aproximadamente 37°C (BOULANT, 2000). Em síntese, podemos observar na **Figura 1** que os pirógenos e seus mediadores produzem febre por meio da inibição da taxa de aquecimento dos neurônios sensíveis ao calor da APOHA. Pirógenos também são mostrados na figura, pois eles modulam a taxa de disparo dos

neurônios da APOHA, o que altera o ponto de regulação da temperatura corporal, aumentando sua temperatura e assim impedindo os mecanismos de perda de calor (BOULANT, 2000).

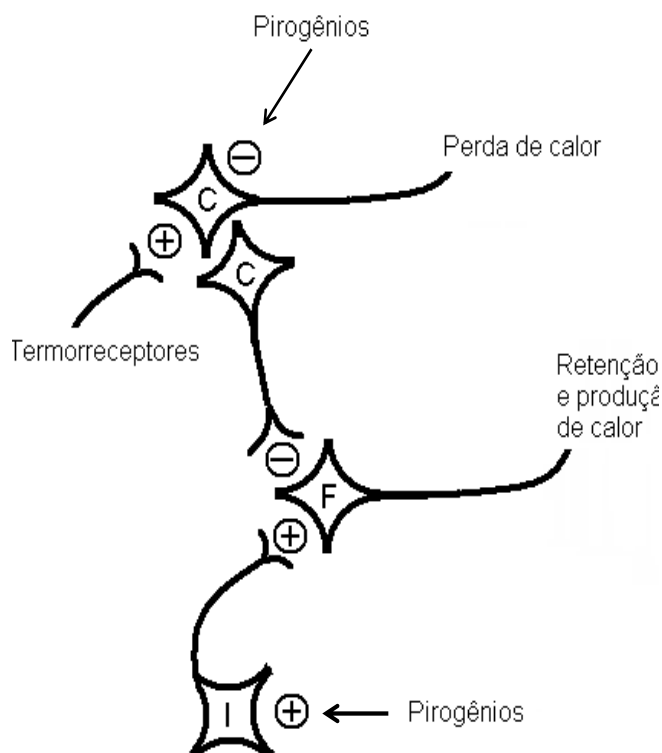


Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por pirógenos na APOHA. C – neurônios sensíveis ao calor; F – neurônios sensíveis ao frio; I – neurônios insensíveis às variações de temperatura. (+) estimulação; (-) inibição. Adaptado de: BOULANT, 2000.

A hipertermia se difere da febre porque nela não há a ação dos pirógenos, e assim o *set point* não é alterado. O aumento da temperatura nessa situação se deve ao comprometimento dos mecanismos de dissipação de calor ou de situações em que a dissipação não é suficiente para a manutenção da temperatura dentro da normalidade, devido à produção excessiva de calor (por doenças metabólicas ou agentes farmacológicos) ou a temperaturas externas muito elevadas (BLATTEIS, 2006). Também é notada uma diferença no comportamento do indivíduo, que na febre tende a preferir ambientes quentes para facilitar a conservação do calor e na hipertermia, procura por ambientes frios para perder calor (BLATTEIS, 2006).

Além do exposto, a febre depende do equilíbrio entre a liberação e a atividade de mediadores pirogênicos e de mediadores que controlam a resposta febril, os denominados criogênicos (MELO-SOARES, 2008).

1.2. PIRÓGENOS

Dá-se o nome pirógeno às substâncias que podem induzir febre. Eles são classificados como endógenos ou exógenos (BARTFAI; CONTI, 2010). Os pirógenos endógenos são produzidos pelo organismo e liberados na corrente sanguínea em resposta a um estímulo proveniente de pirógenos exógenos (ROTH *et al.*, 2009). Os principais pirógenos endógenos são as citocinas e os eicosanóides (DINARELLO, 2004). Já os pirógenos exógenos são os estímulos que induzem a resposta febril, incluindo microorganismos e seus subprodutos (DINARELLO, 2004, ROTH; DE SOUZA, 2001).

Vários componentes, provenientes tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas podem causar febre, como, por exemplo, peptidoglicanos, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), muramíl-dipeptídeo (MDP), além de parasitas, micoplasmas, vírus e fungos. Não só os microorganismos podem desencadear um processo febril, mas também alguns produtos sintéticos (agentes antitumorais, polinucleotídeos), substâncias derivadas do hospedeiro (tecido destruído, sobrenadante de macrófagos, metabólitos, produtos de linfócitos) e compostos secundários de plantas (BRITO, 2011).

Nos ensaios farmacológicos, um dos modelos experimentais amplamente utilizados para a indução de febre em ratos é a injeção intravenosa de LPS, que produz aumento de temperatura de início que permanece por horas, reproduzindo o que ocorre nos processos infecciosos (FABRÍCIO *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2011).

O LPS é um componente da membrana externa de bactéria gram-negativa, sendo exclusivo desse grupo de bactérias e fundamental para a estabilidade da membrana. Ele é o componente que confere maior patogenicidade às bactérias e dificulta a ação de neutralização pelos anticorpos, a ação dos antibióticos e outros estresses ambientais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O lipopolissacarídeo é composto por três domínios distintos, a cadeia de O-polissacarídeo, uma porção central de oligossacarídeo e o lipídeo A (**Figura 2**) (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002, LEON *et al.*, 2008). A região mais externa é a região de O-polissacarídeo que consiste em um a oito resíduos de glicosídeo, sendo uma estrutura altamente variável. É o principal alvo antigênico das respostas imunes, já que é a porção mais distal da molécula. A porção de

oligossacarídeo, diferentemente da anterior, é altamente conservada entre as diferentes estirpes e espécies (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002).

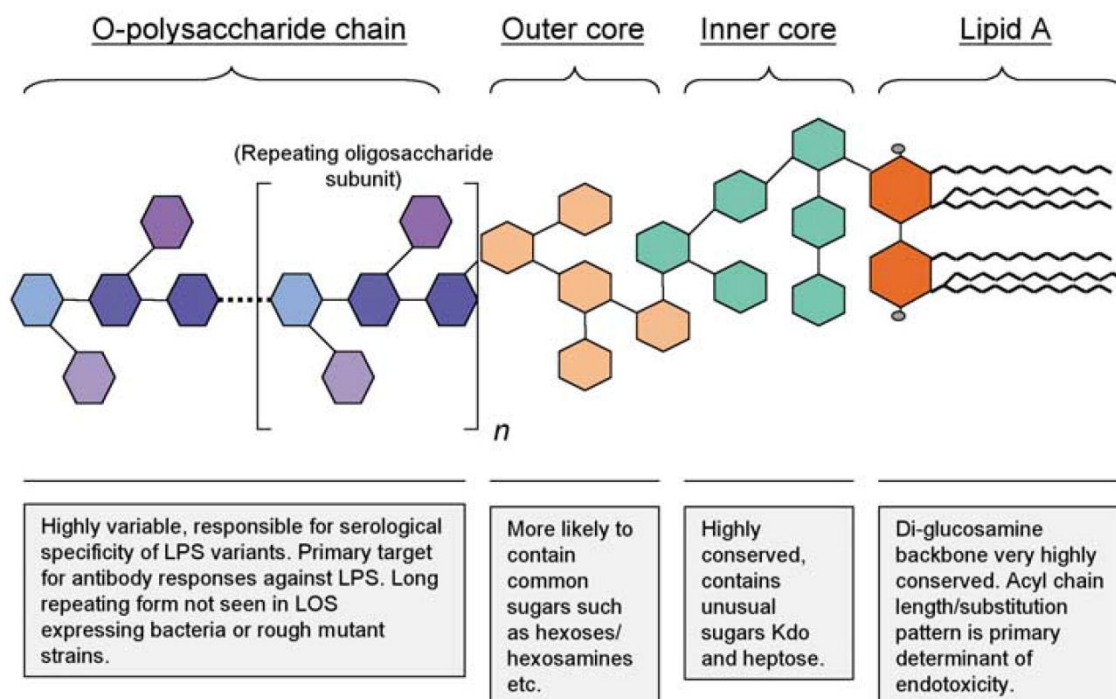


Figura 2: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Fonte: ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002.

O lipídeo A, também denominado endotoxina, é a porção altamente hidrofóbica da molécula, que se ancora na bicamada lipídica. É ele o responsável pela pirogenicidade da substância (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O LPS é uma substância que estimula a imunidade natural, por isso pode ser considerado um padrão molecular associado à patógenos (PAMP) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Sua ação se inicia quando o LPS se liga a proteína plasmática de ligação com o LPS (LBP) e esse complexo se liga ao receptor de superfície CD14 nos macrófagos e células dendríticas. A porção de LPS é reconhecida por um receptor transmembranar, o Receptor Semelhante à *Toll* 4 (TLR4) quando há uma ligação física entre os dois, combinado com a presença de CD14 e da proteína acessória extracelular MD2 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A ativação dos receptores pode desencadear diversas vias de sinalização, como a via de proteína ativada por mitógeno (MAPK), IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*), via do fator de

transcrição fator nuclear *kappa*-B (NF- κ B) e AP-1 (*activatorprotein1*), dentre outras (Figura 3) (CRUZ-MACHADO, 2010). Com essa sinalização intracelular, inicia-se a transcrição de genes que codificam proteínas solúveis, entre elas as citocinas pirogênicas, tais como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6), considerados importantes mediadores endógenos na febre induzida por LPS (ROTH *et al.*, 2009; BLATTEIS *et al.*, 2005).

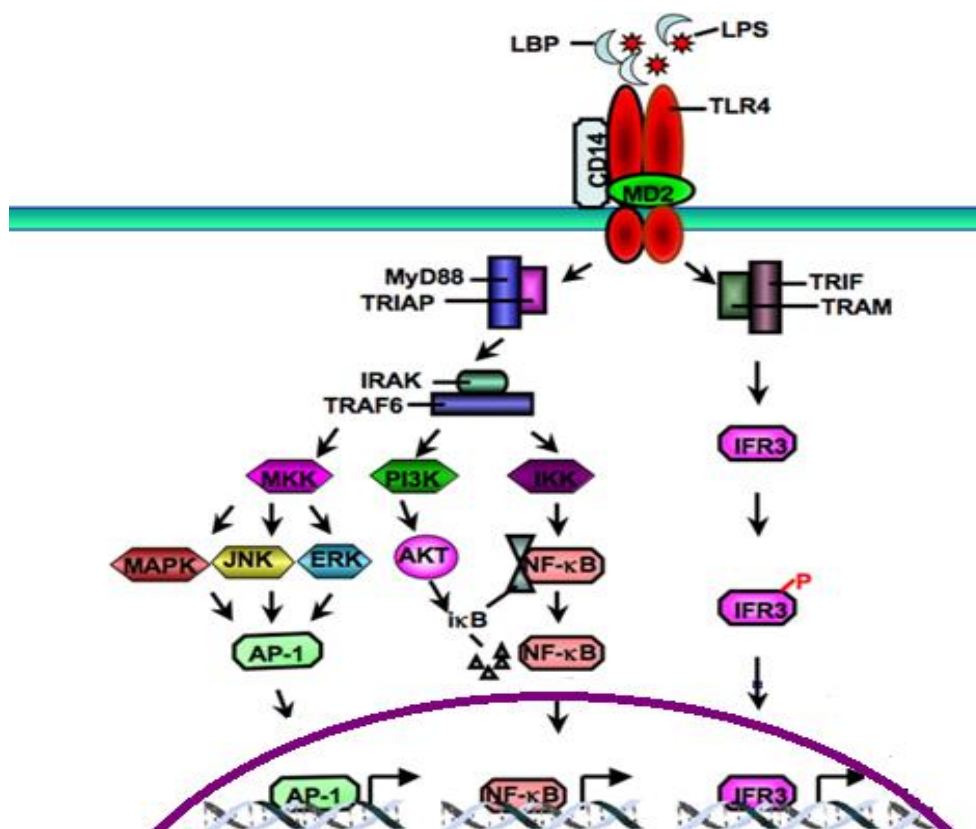


Figura 3: Visão esquemática das vias de sinalização de TLR4 na ligação com LPS. LPS interage com a proteína de ligação de LPS (LBP) e liga-se ao receptor Toll like 4 (TLR4) na membrana celular com dois co-receptores (CD14 e MD 2), ativando a sinalização dependente ou independente do fator de diferenciação mielóide (MyD) 88, através de diferentes proteínas adaptadoras. Os sinais via MyD88-dependentes ativam as vias I κ Bquinase (IKK) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que por sua vez levam à ativação de fatores de transcrição fator nuclear (NF)- κ B e proteína ativadora (AP) -1, respectivamente, e controla a expressão de citocinas pró-inflamatórias e outros genes relacionados com a imunidade. Adaptado de: GUO; FRIEDMAN, 2010.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por células que geralmente atuam localmente de maneira autócrina e parácrina ou então podem cair na corrente sanguínea atingindo outros órgãos mais distantes (BILATE, 2007; POON *et al.*, 2013). Estudos demonstram que após injeções central ou sistêmica de LPS, há um aumento de citocinas no cérebro e sistemicamente, tais como interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e TNF- α , o que mostra que as citocinas podem ser

produzidas a partir da estimulação por um pirógeno exógeno (HENRY *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008). O efeito das citocinas se dá pela interação com um receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, que pode ser de diferentes tipos, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula (BILATE, 2007).

A IL-1 foi uma das primeiras citocinas descobertas, sendo um potente mediador da febre, dor e inflamação (CONTASSOT; BEER; FRENCH, 2012). Seu papel na febre é comprovado já que a administração central de IL-1 β provoca o aumento da temperatura em ratos (HARDEN *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2002), assim como a administração de antagonista natural do receptor da IL-1 (IL-1ra) inibe a febre induzida por LPS em ratos (HARDEN *et al.*, 2006; ROTH *et al.*, 1998). O tratamento com IL-1ra é capaz de reduzir as concentrações de IL-6 no plasma e no fluido cerebrospinal (CSF) induzidas pela administração intraperitoneal (i.p.) de LPS, sugerindo que o efeito pirogênico da IL-1 possa ser mediado pela IL-6 (LUHESHI; ROTHWELL, 1996). A interleucina-6 é outro exemplo de citocina com atividade pirogênica. A administração central de anticorpo anti IL-6 reduz a febre induzida por *Escherichia coli* e LPS em ratos (HARDEN *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2012). É demonstrado que IL-6 induz febre apenas após injeção central, e que seu anticorpo inibe a febre provocada por LPS e também por IL-1 β , o que sugere que o efeito pirogênico da IL-1 β seja mediado por IL-6 (ROTHWELL *et al.*, 1991).

Outro importante pirógeno endógeno é o TNF- α , já que o pré-tratamento de animais com o receptor solúvel (rs) do TNF reduz significativamente a febre induzida pelo TNF- α (TAKAHASHI; KAPAS; KRUEGER, 1996). Corroborando o estudo, a administração de proteína de ligação do TNF (TNF-bp), substância que neutraliza o TNF ativo, reduziu a temperatura corporal de cobaias estimuladas com LPS, assim como os níveis de TNF no plasma (ROSS *et al.*, 2003).

Apesar do importante papel das citocinas na gênese da febre, vários estudos demonstram que as respostas febris dependem da ação central de prostaglandinas (PGs), principalmente a PGE₂, considerada o mediador final da febre (ROTH *et al.*, 2009).

Com o exposto, infere-se que a resposta febril é um processo multifatorial, e seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente elucidados. A regulação deste fenômeno é feita pelas ações de imunoreguladores endógenos, as citocinas, que podem atuar como pirógenos ou antipiréticos (DALAL e ZHUKOVSKY, 2006). Neste contexto, vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a forma

como o pirogênios endógenos produzidos periféricamente exercem os seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), produzindo assim a febre (BANKS *et al.*, 1991, BANKS, KASTIN, e GUTIERREZ, 1994, CAO *et al.*, 1996, KONSMAN *et al.*, 2004).

1.3. FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)

O fator nuclear *kappa*B corresponde a uma família de fatores de transcrição composta por homodímeros ou heterodímeros de proteínas homólogas a proteína c-Rel. Elas são importantes nas respostas imunes inata e adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HACKER; KARIN, 2006), através da regulação dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, enzimas e outras moléculas que participam da resposta imune (LEE *et al.*, 2003). Eles são encontrados no citoplasma da maioria das células, complexados com as proteínas inibitórias da família kappaBs - *Inhibitorykappa B*: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B-R, I κ B γ (p105), I κ B δ (p100) e Bcl-3 (XIAO, 2004).

A ativação de NF- κ B pode ser feita por duas vias descritas: a clássica (via canônica) e a alternativa (via não-canônica). A via clássica é aquela que está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à antiapoptose e à sobrevivência celular. A via alternativa é relacionada ao desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (XIAO, 2004).

A via clássica é ativada por vários sinais pró-inflamatórios, como citocinas e endotoxinas, que levam a ativação do complexo IKK e então à degradação de I κ B- α de forma IKK β -dependente. O complexo de NF- κ B liberado por essa via é principalmente o heterodímero p65-p50 que resulta na expressão coordenada de conjuntos de genes de substâncias envolvidos nas respostas inflamatórias e imune inata, tais como IL-6, TNF- α , IL-1- β , IL-8, RANTES, sintatase induzida por óxido nítrico (iNOS) e ainda cicloxigenase 2 (COX-2) (XIAO, 2004), enzima essencial para a produção de PGE₂.

Como é apresentado na **Figura 4**, a ativação de NF- κ B pela via clássica acontece quando o I κ B é fosforilado no resíduo de serina pelo complexo de proteína quinase IKK, o que leva a degradação do I κ B pelo proteassoma. No citoplasma um

conjunto de proteínas adaptadoras e ancoradoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um complexo que facilita o recrutamento da IKK. Após a degradação do I κ B os dímeros do NF- κ B são liberados e migram para o núcleo onde atuam na regulação da transcrição de genes específicos (KALTSCHMIDT; WIDERA; KALTSCHMIDT, 2005, XIAO, 2004).

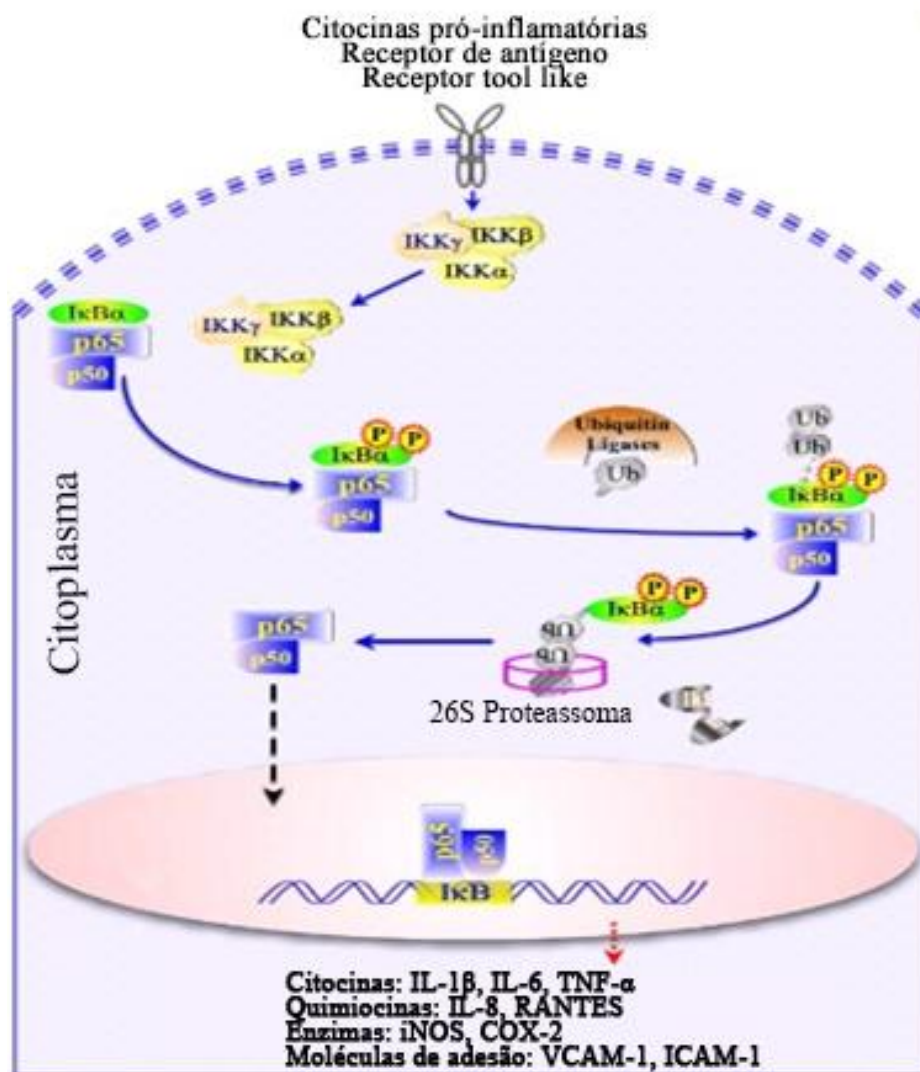


Figura 4: Via de sinalização clássica de NF- κ B (via canônica). Adaptado de XIAO, 2004.

Apesar de não ser dada muita atenção para o envolvimento de NF- κ B na patogênese da febre, alguns estudos vêm demonstrando o papel de NF- κ B na resposta febril (LEE *et al.*, 2003). O pré-tratamento com inibidores de NF- κ B inibe a febre induzida por enterotoxina A de estafilococos, suprimindo a translocação de NF- κ B do citosol para o núcleo, e por consequência, diminuindo os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (SHAO, *et al.*, 2004). Estudo usando camundongos com genes de NF- κ B nocauteados, demonstrou que a ausência desses genes preveniu a febre induzida

por LPS, em comparação com os camundongos selvagens (KOZAK; WROEK; KOZAK, 2006).

Lee *et al.* (2003) sugeriram que a inibição de NF- κ B pode ser um alvo na terapia para a febre, já que o uso de inibidores reduz significativamente a febre induzida por LPS em coelhos, diminuindo os níveis de IL-6, TNF- α , IL-1, o que mostra um papel importante do fator nuclear *kappa* B na gênese da febre.

1.4. PGE₂ E VIAS DE SINALIZAÇÃO

A PGE₂ é considerada o mediador final da febre, já que a sua injeção central causa febre, que não é bloqueada por antipiréticos, e ainda, que as drogas antiinflamatórias não-esteroidais tem sua ação por inibir a síntese de prostanóides. A PGE₂ que estimula os neurônios termossensíveis, aparece na APOHA em resposta a estímulos pirogênicos periféricos, e pode ser sintetizada localmente, ou chegar ao hipotálamo a partir do sangue (BLATTEIS *et al.*, 2005).

A PGE₂ é produzida em decorrência da ação de várias citocinas pirogênicas, que promovem a síntese de ciclooxigenases (COXs), enzimas essenciais para a produção de PGE₂ (BLATTEIS; SEHIC, 1998; DAVIDSON *et al.*, 2001). A cascata de síntese das prostaglandinas se inicia com a ação de enzimas, como a fosfolipase A₂ (PLA₂), que libera o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica. Então, as isoenzimas ciclooxigenases (COX) 1 e 2, convertem o ácido araquidônico em prostaglandina G₂ e em sequência, prostaglandina H₂. A partir de então, a depender do tecido e dos tipos celulares e das isomerases específicas, poderá haver a formação de diferentes eicosanóides tais como PGE₂, Tromboxana A₂, PGD₂ e PGF_{2 α} (**Figura 5**) (FITZGERALD, PATRONO, 2001).

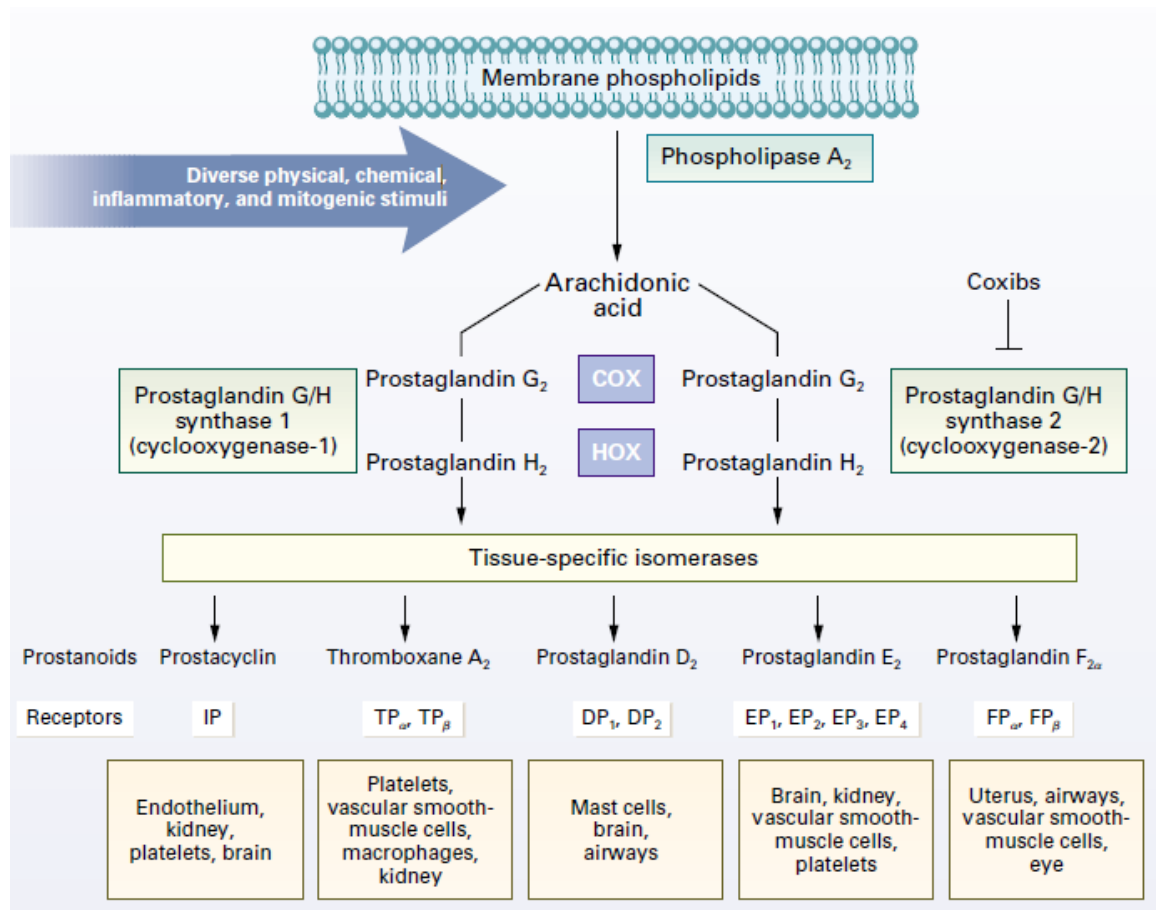


Figura 5: Produção de prostaglandinas e tromboxanos e principais tecidos onde são produzidos. IP: receptor da prostaciclina, TP: receptor de tromboxano, DP: receptor da prostaglandina D2, EP: receptor de prostaglandina E2, FP: receptor da prostaglandina F2. Adaptado de: FITZGERALD; PATRONO, 2001.

As COXs são conhecidas por catalisar a síntese de prostaglandinas, e são o principal alvo das drogas antiinflamatórias não esteroidais (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

São bem descritas duas isoformas de COX, a COX-1 que é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos e tem características de uma enzima, abastecendo os tecidos com as prostaglandinas necessárias para manter a função fisiológica do órgão, tais como citoproteção das mucosas e a regulação do fluxo sanguíneo gástrico. A COX-2 está sujeita a regulação rápida ao nível da transcrição, tendo sua expressão aumentada em tecidos periféricos e na medula espinal, em resposta à inflamação e à lesão de tecidos. Acredita-se que nessas situações elas produzem quantidades excessivas de prostaglandinas para sensibilizar nociceptores e estimular a liberação de outros mediadores inflamatórios (TEGEDER, PFEILSCHFTER; GEISSLINGER, 2002; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Diferentes estudos demonstram que a COX-2 é a isoforma envolvida na febre (GAETANO *et al.*, 2010; HAMZIC; BLOMQUIST; NILSBERTH, 2013; STEINER *et al.*, 2009).

As PGE sintase (PGES) são enzimas envolvidas no final do processo da biossíntese da PGE₂. Foram identificadas duas isoformas, uma associada à membrana (mPGES) e outra citosólica (cPGES). A PGES microssomal é induzida em resposta à estimulação por IL-1 β e possui ligação funcional com COX-2 (MURAKAMI *et al.*, 2000 ; THOREN & JAKOBSSON, 2000). Gaetano *et al.* (2010) demonstraram que a supra-regulação de COX-2 e mPGES na APOHA está diretamente envolvida na febre induzida por LPS endovenoso.

As PGEs produzidas exercem a maioria das suas funções por meio da ligação com os seus receptores específicos, denominados EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. Esses receptores são todos receptores de membrana, acoplados a proteína G. Cada um dos subtipos dos receptores EP são acoplados a um tipo proteína G distinta, mediando inúmeras respostas celulares (BREYER *et al.*, 2001; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007).

Os receptores EP₁, EP₃ e EP₄ foram identificados na APOHA (OKA *et al.*, 2000; LAZARUS *et al.*, 2007), entretanto, acredita-se o que receptor envolvido na resposta febril seja o EP₃, já que agonistas de EP₃ são capazes de mimetizar a resposta febril (PARROTT & VELLUCCI, 1996). Foi demonstrado também que camundongos deficientes do receptor EP₃ não desenvolveram a resposta febril induzida por IL-1 β ou LPS, o que não aconteceu nos camundongos deficientes dos outros subtipos de receptores EP, o que corrobora os dados de que EP₃ seja o receptor envolvido na resposta febril (USHIKUBI *et al.*, 1998).

O receptor EP₃ tem pelo menos 3 isoformas, os receptores EP_{3 α} e EP_{3 β} são acoplados a proteína Gi diminuindo a atividade da adenilatociclase e a concentração de AMPc; e os receptores EP_{3 γ} são acoplados tanto à proteína Gs aumentando a atividade da adenilatociclase e a concentração de AMPc, quanto à proteína Gi, reduzindo a concentração de AMPc (SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007). Assim, com a redução dos níveis intracelulares de AMPc, há uma diminuição da atividade neuronal e conseqüentemente, ocorre a inibição dos neurônios sensíveis ao calor, excitação dos neurônios insensíveis a temperatura, o que promove mecanismos de conservação do calor, resultando no aumento da temperatura corporal (IVANOV; ROMANOVSKY, 2004).

1.5. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITÓGENOS (MAPK)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são um grupo de proteínas serina-treonina quinases envolvidas em vias de sinalização importantes para a regulação da célula eucariótica (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; JOHNSON; LAPADAT, 2002). Elas controlam diretamente a expressão gênica pela fosforilação de fatores de transcrição (YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2003). As MAPKs estão envolvidas na regulação da proliferação celular, diferenciação, motilidade e sobrevivência da célula (ROUX; BLENIS, 2004).

As vias de sinalização por MAPK desempenham um papel importante na transmissão de informações provenientes do meio extracelular para o citoplasma e então para o núcleo (ROBINSON; COBB, 1997).

Grupos distintos de MAPKs foram caracterizados em mamíferos, sendo elas: Quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) 1 e 2 (ERK1 / 2), Quinases c-Jun amino-terminais (JNKs) 1, 2, e 3, as isoformas de p38 α , β , γ e δ , ERKs 3 e 4 e também ERK5 (ROUX; BLENIS, 2004).

A via de sinalização das MAPKs compõe-se de uma cascata de três quinases (**Figura 6**), com a primeira, chamada MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), que ativa uma segunda quinase, a MAPKK através da fosforilação de resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr). A ativação da MAPKK é responsável então pela subsequente fosforilação das MAPK nos resíduos de treonina e tirosina (Tyr) (KUMAR; BOEHM; LEE, 2003; ROUX; BLENIS, 2004; YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2003). Essa seqüência de fosforilação é importante para a amplificação do sinal externo (MARTIN-BLANCO, 2000).

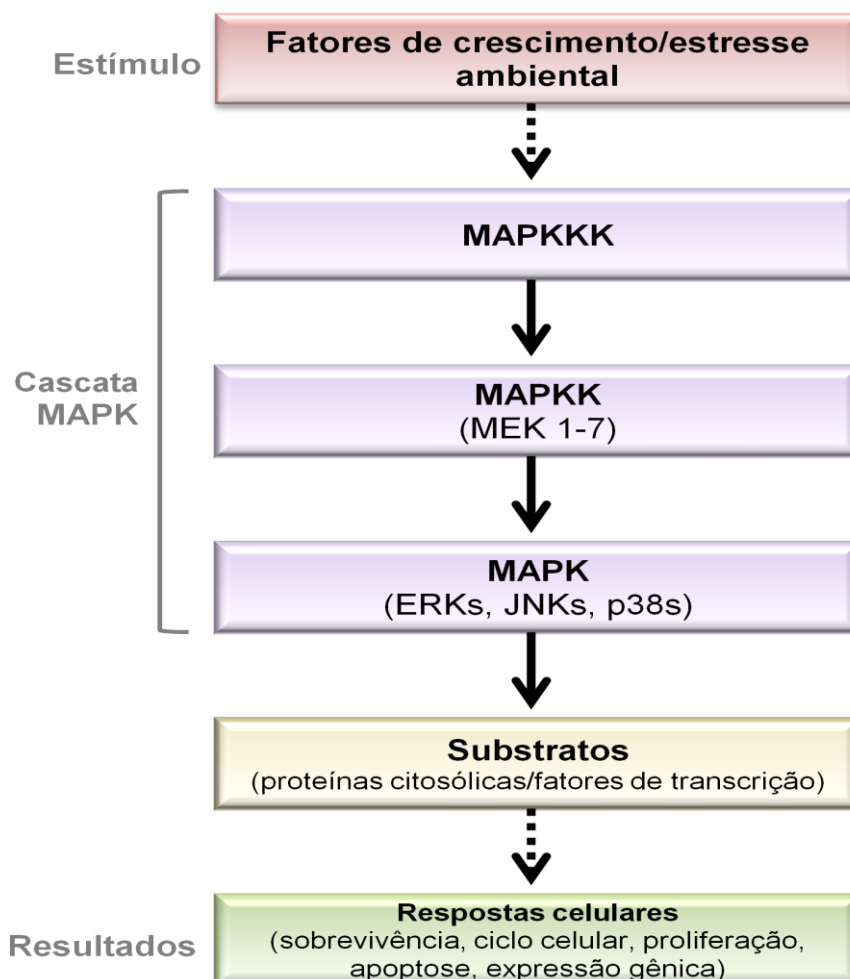


Figura 6: Cascata das MAPK. Adaptado de KUMAR; BOEHM; LEE, 2003

As MAPKs podem ser ativadas por uma grande variedade de diferentes estímulos, mas em geral, a ERK1 e ERK2 são preferencialmente ativadas em resposta a fatores de crescimento e ésteres de forbol, enquanto que as quinases JNK e p38 são mais sensíveis a estímulos de estresse que vão de choque osmótico e radiação ionizante até a estimulação por citocinas (ROUX; BLENIS, 2004).

1.5.1. p38 MAPK

As p38 MAPKs são uma das famílias de quinases ativadas por estresse (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001). Inicialmente, foi descrita como um polipeptídeo de 38 kDa, que sofre uma fosforilação em tirosina em resposta ao choque osmótico e no tratamento com endotoxinas (HAN *et al.*, 1994; MARTÍN-BLANCO, 2000). Pode-se

encontrar p38 MAPK amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos, inclusive no cérebro (MIELKE; HERDEGEN, 2000). A ativação desta proteína dá-se através da fosforilação de resíduos de treonina (Thr) 180 e tirosina (Tyr) 182 (MARTÍN-BLANCO, 2000).

São conhecidas 4 isoformas de p38 MAPK que são muito semelhantes na seqüência de aminoácidos, mas diferem em seu padrão de expressão (UDDIN *et al*, 2004; RISCO; CUENDA, 2012).

A isoforma α é atualmente a melhor caracterizada da família, e pode ser a mais relevante quinase envolvida nas respostas inflamatórias (KUMAR, BOEHN, LEE, 2003).

Vários grupos vêm sugerindo a participação de p38 MAPK em diversos modelos experimentais. A via de sinalização p38 MAPK tem sido relatada por desempenhar um papel central na expressão e atividade de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α , IL-1, IL-6, IL-7 e IL-8 em muitos tipos de células e *in vivo* (ELSEA *et al*, 2008; KUMAR, BOEHN, LEE, 2003). A quinase também está envolvida na indução de outras moléculas inflamatórias, como COX-2 e iNOS. GUAN *et al* (1998) demonstraram que a IL-1 β induz a ativação de p38 MAPK, juntamente com a supra regulação da expressão de COX-2 e em consequência, a síntese de PGE₂, a principal citocina envolvida na gênese da febre.

É caracterizado o envolvimento dessa família de MAPK em isquemia, respostas autoimunes (MAVROPOULOS *et al*, 2013), dor da osteoartrite (BROWN *et al*, 2008), doença de Alzheimer (MEHAN *et al*, 2011), estresse oxidativo (LEE *et al*, 2000), nocicepção (YANG *et al*, 2013; LI *et al*, 2010), asma (CHUNG, 2011), além dos vários modelos de inflamação.

O notório envolvimento de p38 MAPK em diversos processos patológicos, principalmente inflamatórios, fez com que fossem sintetizadas novas drogas que atuam como inibidores da quinase. Dessa forma, vários inibidores de p38 MAPK estão disponíveis, entre eles SB203580 (*4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulphinyphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazole*) (**Figura 7**), um composto piridinilimidazol que inibe a atividade catalítica de p38 por ligação competitiva no sítio de ATP (WARD *et al*, 2001; PELAIA *et al*, 2005). Cuenda *et al* (1995) mostraram em seus estudos que SB203580 é um potente inibidor da síntese de citocinas induzida por LPS numa linhagem de monócitos humanos.

SB-203580 tem boa seletividade para p38 MAPK, mais especificamente nas isoformas α e β (BROWN et al, 2008).

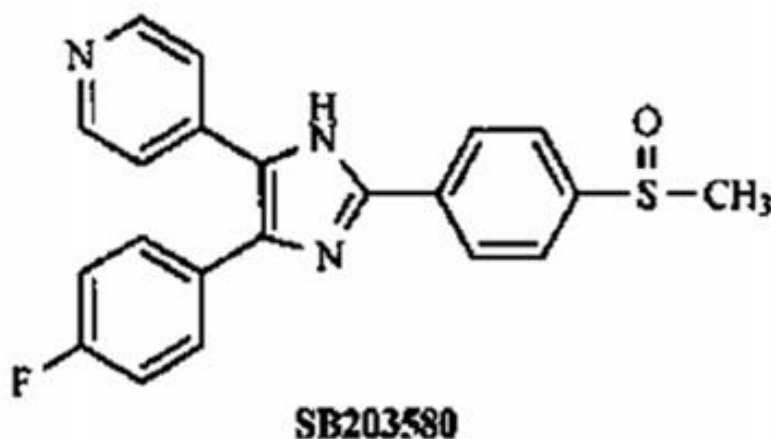


Figura 7: Estrutura molecular do SB203580. (PELAIA *et al.*, 2005)

Com o exposto, podemos inferir que os efeitos dos inibidores de proteínas quinase sobre a febre em modelos animais podem demonstrar vias de sinalização envolvidas no processo da febre, e a partir daí, gerar um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta febril.

2. JUSTIFICATIVA

A febre é uma parte importante dentro da complexa estratégia de defesa do organismo contra microorganismos ou qualquer substância reconhecida como estranha pelas células imunes, sendo assim, considerada um elemento chave da resposta inflamatória de fase aguda (BLATTEIS & SEHIC, 1998).

Tendo em vista que a resposta febril é um processo multifatorial e seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente elucidados, vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a forma como os pirogênios exercem seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), para que se produza a febre (BANKS *et al*, 1991, BANKS, KASTIN, e GUTIERREZ, 1994, CAO *et al*, 1996, KONSMAN *et al*, 2004).

A investigação dos efeitos dos inibidores de proteínas quinases sobre a febre induzida pela administração de LPS pode revelar vias de sinalização relevantes e/ou essenciais para este processo e que poderão ser úteis para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos, bem como para o desenvolvimento de terapias farmacológicas mais específicas e que sejam capazes de controlar a resposta febril com menor incidência de efeitos indesejáveis.

Com os resultados deste trabalho pretende-se contribuir para o entendimento das vias de sinalização envolvidas na resposta febril induzida pelo LPS, por meio da investigação do efeito de um inibidor de p38 MAP quinase sobre a febre induzida por LPS.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de p38 MAP quinase na resposta febril induzida pela injeção endovenosa de LPS em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes doses do inibidor de p38 MAPK, SB203580, sobre a resposta febril induzida por LPS;
- Identificar prováveis vias de sinalização envolvidas nessa resposta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos (*Rattus norvegicus*), variedade *Wistar*, machos, pesando entre 180 e 200g. Os animais foram alojados no Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em ambiente de temperatura de $24^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentos fornecidos *ad libitum*. Os ratos foram provenientes do Biotério do Laboratório de Processos Básicos em Psicologia da Universidade Católica de Brasília. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério do Instituto de Biologia e os experimentos farmacológicos no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do IB/UnB, sempre no período das 08 às 18 h. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnBDoc n. 119943/2011) (**Anexo 1**).

4.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL

Para a mensuração da temperatura dos animais foram implantados transmissores de temperatura (*Data LoggersSubcue*, Calgary Canadá) na cavidade peritoneal dos ratos. Antes das cirurgias, os transmissores foram desinfetados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min). Os animais foram anestesiados com uso de uma mistura de ketamina e xilazina (60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após tricotomia e anti-sepsia da pele, foi feita uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos peritoniais. O transmissor foi lavado com solução salina estéril e então inserido na cavidade peritoneal e, em seguida, o músculo e a pele foram suturados separadamente. Esse procedimento foi realizado uma semana antes dos experimentos.

4.3. IMPLANTE DA CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR

Imediatamente após a cirurgia de implante de transmissores, procedeu-se a cirurgia para o implante de cânulas no ventrículo lateral. Após tricotomia e anti-sepsia do local, os animais foram imobilizados em aparelho estereotáxico. Os animais receberam uma injeção local subcutânea de lidocaína 2% e fenilefrina 0.04% (aproximadamente 0,2 mL), e então foi feita uma incisão para expor a calota craniana. Assumindo o bregma como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos para a perfuração do crânio e posterior implantação da cânula icv foram -1,5 mm antero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm, conforme coordenadas descritas no Atlas de Paxinos e Watson (1986). As cânulas guias esterilizadas, constituídas de um segmento de agulha hipodérmica BD-7, com calibre 22G (0,7 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento) de aço inoxidável, foram aprofundadas no tecido cerebral, com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As cânulas foram fixadas por meio de prótese de acrílico auto-polimerizável com o auxílio de dois parafusos rosqueados na calota craniana.

Os animais receberam injeção intramuscular de terramicina para uso veterinário (400mg/kg), como antibiótico. Os animais recém-operados foram mantidos nas caixas, sem restrição de água ou ração, em sala com temperatura controlada a 24°C, com ciclos claro/escuro (intervalos de 12 h), por no mínimo sete dias, para recuperação pós-cirúrgica, até que se realizassem os experimentos de febre.

Para verificar o correto posicionamento das cânulas, 20% dos ratos utilizados nos experimentos foram selecionados aleatoriamente e anestesiados com ketamina e xilazina (60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.). Foram injetados 5 µL de corante azul de Evans (25 mg/mL) no local correspondente à microinjeção. Após obtenção dos encéfalos, efetuou-se um corte frontal na região correspondente à localização da cânula e o local da microinjeção foi verificado macroscopicamente. Observamos que os ventrículos laterais, o terceiro ventrículo, e o centro do hipotálamo apresentavam-se corados, indicando que a cânula estava posicionada corretamente.

4.4. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS

A mensuração da temperatura corporal dos ratos durante os experimentos foi realizada por transmissores implantados na cavidade abdominal, descritos anteriormente. Os animais permaneceram na sala de experimentação por pelo menos 12 h antes do início dos experimentos, para a ambientação dos mesmos. Para o processo de leitura da temperatura corporal por telemetria, os transmissores implantados na cavidade peritoneal foram programados para serem acionados no dia anterior ao experimento. A temperatura corporal foi continuamente monitorada e gravada em intervalos de 15 minutos, iniciadas 2 horas antes de qualquer injeção, até 6 horas após a injeção do estímulo pirogênico. Para o índice de febre, a temperatura corporal abdominal basal (4 medições anteriores a qualquer tratamento) foi determinada para cada animal. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, com a sala experimental tendo sua temperatura controlada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (GORDON, 1990).

O índice de febre foi calculado subtraindo-se o valor da temperatura basal das medidas individuais obtidas entre 30 min e 6 horas após a injeção do LPS, período total de observação. Foi calculada a área sob a curva (ASC) para cada animal usando para isto o índice de febre expresso em unidades arbitrárias.

4.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A cada experimento foi utilizado em grupo diferente de animais, ou seja, cada animal foi utilizado apenas uma vez. Após o transporte dos animais para a sala de experimentação, os mesmos permaneceram em repouso por 12 horas e só então suas temperaturas basais foram determinadas por 4 medidas, a intervalos de 15 minutos.

Para investigar o efeito da injeção central do inibidor de p38 MAPK, SB203580, sobre a temperatura de ratos, esta droga foi administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.) nas doses de 3 ou 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$, diluídas em 3 μL ou 5

μL , respectivamente, de solução DMSO 10% em salina estéril. Após 30 min os animais receberam injeção endovenosa de solução salina 0,9% (2mL/Kg).

Para a investigação do efeito do inibidor de p38 MAPK na febre induzida por LPS, o SB203580 foi administrado, por via i.c.v., nas doses de 0,3, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (em volume de em 3 ou 5 μL de solução salina estéril). A solução estoque de SB203580 foi diluída em 10% de DMSO. Os animais controle receberam solução 3 ou 10% DMSO por via i.c.v, concentrações usadas na diluição da droga nas diferentes doses.

Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam injeção endovenosa de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/Kg). A dose de LPS usada foi padronizada para os experimentos em nosso laboratório (DA SILVA, 2013). A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 minutos, durante 6 h. Em seguida, cada animal foi anestesiado e então decapitado para a dissecação do hipotálamo e retirada dos transmissores.

4.6. DISSECAÇÃO DO HIPOTÁLAMO

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

4.7. DROGAS

As seguintes drogas foram usadas nos experimentos:

- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, São Paulo, Brasil);
- Dexametasona (Azium[®], Mantecorp Ind. Quím. e Farm. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil);

- Cloridrato de S (+) cetamina (Ketamin[®], Cristália, São Paulo, Brasil);
- Xilazina 2% (Calmiun[®], Agener União, São Paulo, Brasil);
- Cloridratos de lidocaína e fenilefrina (Novocol 100[®], S. S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil);
- LPS (endotoxina de *E. coli*/0111:B4, Sigma ChemCo., St. Louis, EUA);
- SB203580 (Sigma Chem Co., St. Louis, EUA)

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm EPM. As comparações estatísticas foram efetuadas por análise de variância a um fator (ANOVA one-way) seguida por teste de Bonferroni com a utilização do programa estatístico GraphPadPrism 5.0. O nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SB203580, UM INIBIDOR DE p38 MAPK SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS

Inicialmente investigou-se se a administração i.c.v. do veículo utilizado para solubilizar o SB203580 apresentava algum efeito sobre a temperatura corporal dos animais. Foram testadas duas concentrações de DMSO (3 e 10%), devido as diferentes concentrações de veículo usadas nas doses testadas nos experimentos. Não foram observadas alterações significativas na temperatura corporal dos animais (**Figura 8**), em relação à temperatura de animais que receberam apenas solução salina em outros experimentos realizados em nosso laboratório. A elevação de temperatura verificada na primeira hora após as injeções é observada em todos os grupos e em todos os experimentos, e ocorre devido à manipulação dos animais. Os ratos que receberam LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iv) apresentaram um aumento significativo na temperatura corporal, com perfil bifásico após 1,5 h, atingindo um pico em cerca de 2 h e outro em cerca de 4,5 h após a injeção, persistindo elevado durante o restante do período de observação de 6 h (**Figura 8**).

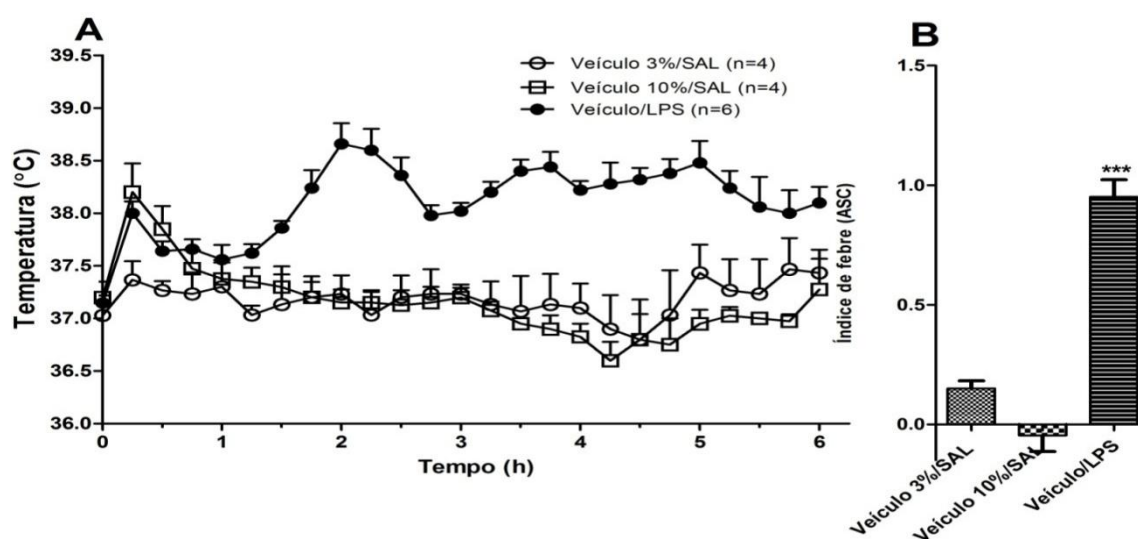


Figura 8: Efeito da injeção central de diferentes concentrações de DMSO e da injeção intravenosa de LPS sobre a temperatura corporal de ratos. Os animais receberam administração i.c.v. de veículo, DMSO nas concentrações de 3 ou 10%, diluídos em solução salina 0,9%, nos volumes de 3 μL e 5 μL , respectivamente. Após 30 minutos foi administrado LPS por via intravenosa (iv) na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ou solução salina 0,9% (2 mL/Kg). No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}\text{C}$) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de temperatura. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

Com o objetivo de investigar a participação de p38 MAPK na febre induzida por LPS, o SB203580 foi administrado nas doses de 0,3, 1, 3, 10 ou 30 $\mu\text{g}/\text{rato}$, i.c.v., 30 minutos antes da injeção iv de LPS nos animais.

Como pode ser observado nas **Figuras 10 e 12**, o pré-tratamento com SB203580 nas doses de 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{rato}$ não alterou significativamente a resposta febril induzida pelo LPS. Já o pré-tratamento dos animais com SB203580 potencializou a resposta febril induzida por LPS nas doses de 0,3, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (**Figuras 9, 11 e 13**, respectivamente). Verificou-se que o aumento da temperatura ocorreu predominantemente entre 4-6 h após a administração de LPS (**Figuras 9A, 11A, 13A**).

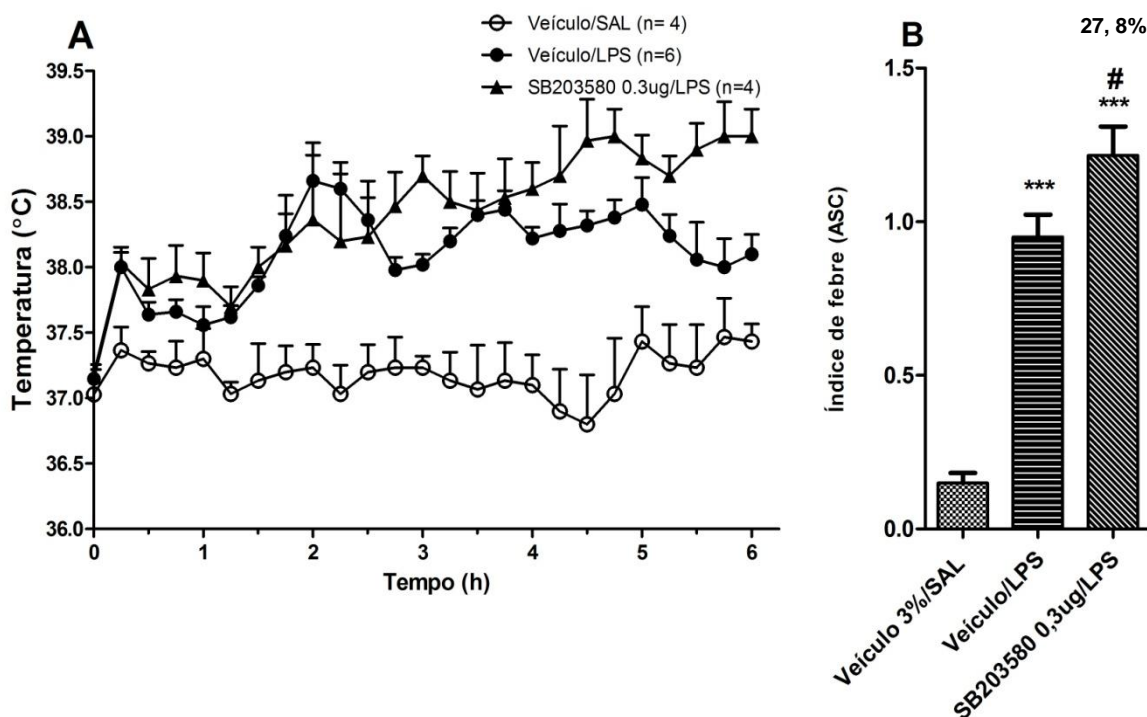


Figura 9: Efeito da injeção central de SB203580 na dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv na dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{rato}$ no volume de 3 μL , 30 min antes da injeção iv de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e DMSO 3% icv. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}\text{C}$) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo/salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo DMSO/LPS.

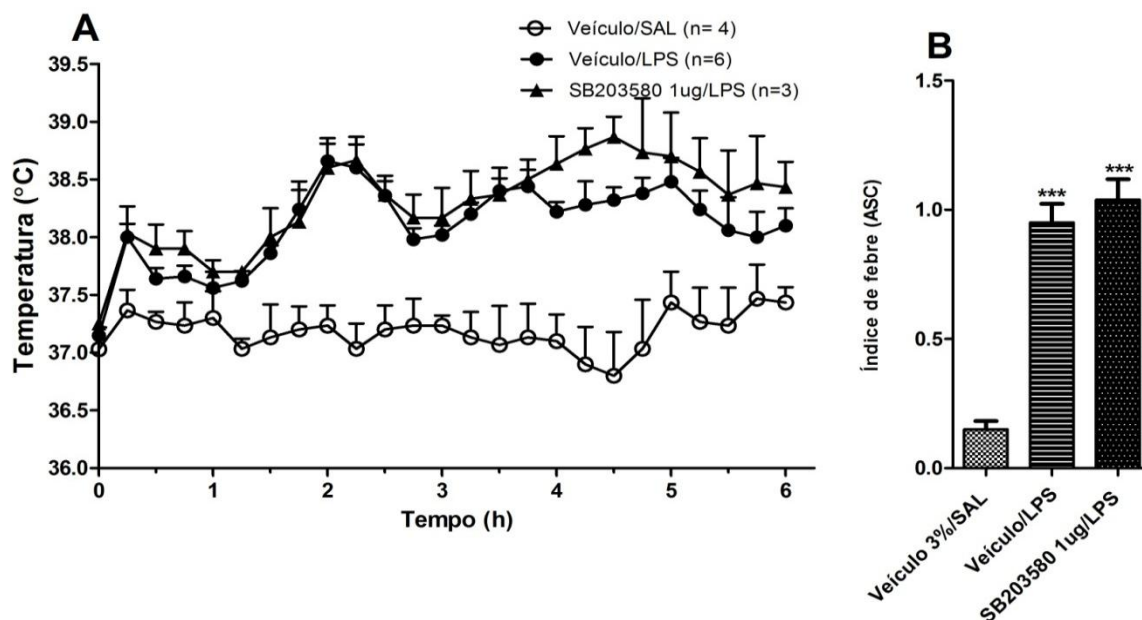


Figura 10: Efeito da injeção central de SB203580 na dose de 1 μg /rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv na dose de 1 μg /rato no volume de 3 μL , 30 min antes da injeção iv de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e DMSO 3% icv. . No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}\text{C}$) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

Para avaliar se a administração i.c.v. de SB203580 teria algum efeito sobre a temperatura, foram escolhidas duas doses do inibidor para serem testadas (3 e 10 μg). A dose de 3 μg provocou um aumento significativo na temperatura dos animais, e foi escolhida pois era uma dose que poderia ser preparada a partir da solução estoque disponível. Já a dose de 10 μg também foi selecionada, pois não alterou a temperatura dos animais diferentemente da dose anterior.

Não foram observadas diferenças significativas em relação aos animais tratados apenas com o veículo em nenhuma das doses testadas (**Figuras 11 e 12**).

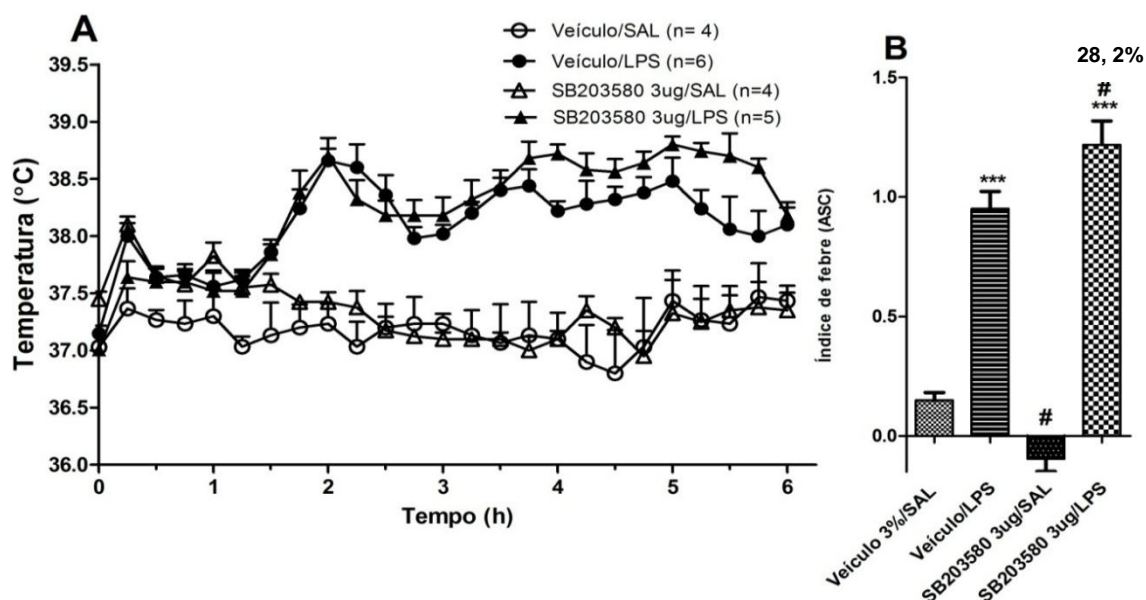


Figura 11: Efeito da injeção central de SB203580 na dose de 3 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv na dose de 3 µg/rato no volume de 3 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg) ou solução salina estéril. Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e DMSO 3% icv. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo/salina. #p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo/LPS.

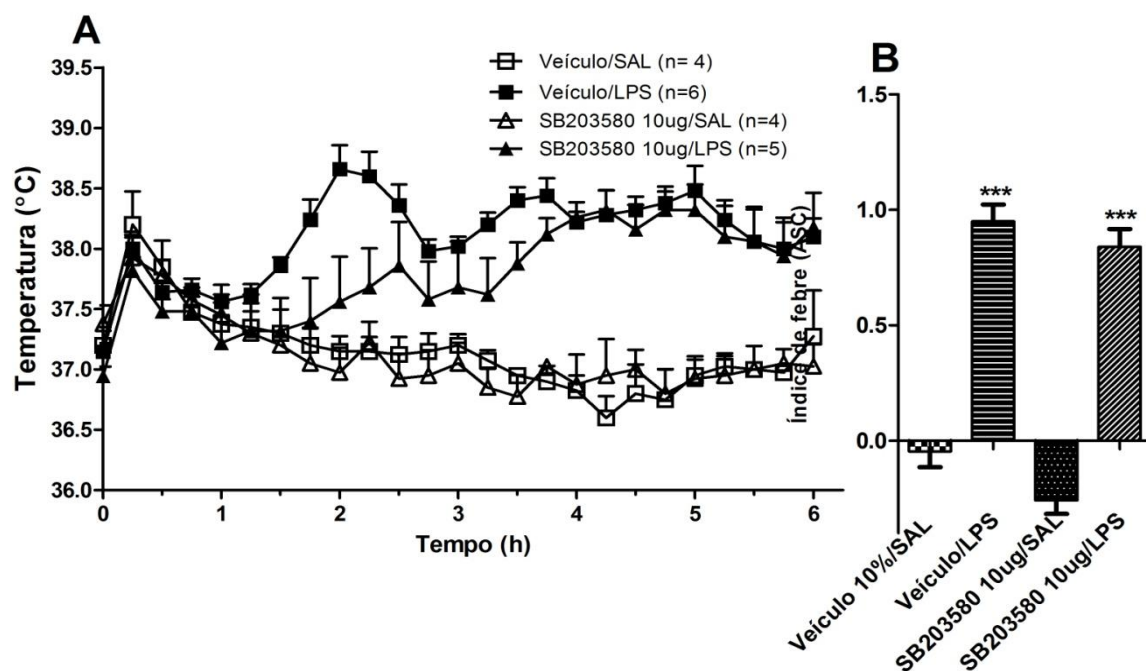


Figura 12: Efeito da injeção central de SB203580 na dose de 10 µg/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv na dose de 10 µg/rato no volume de 5 µL, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 µg/Kg) ou solução salina estéril. Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e DMSO 10% icv. No painel A, os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média ± EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. ***p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

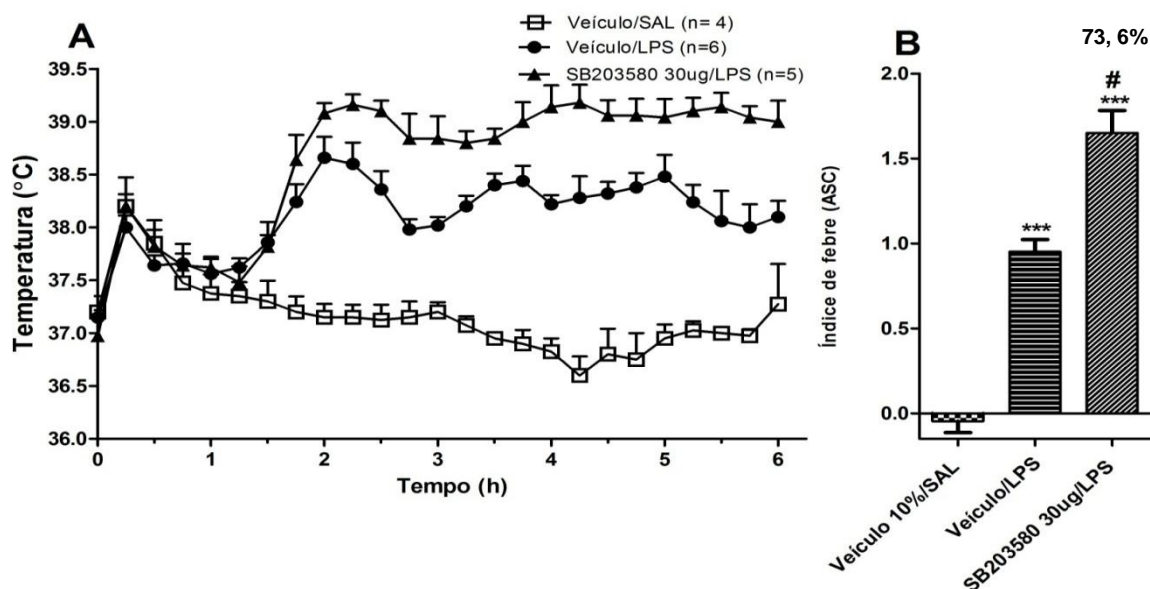


Figura 13: Efeito da injeção central de SB203580 na dose de 30 μ g/rato sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv na dose de 30 μ g/rato no volume de 5 μ L, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 μ g/Kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% iv, e DMSO 10% icv. No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** p <0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

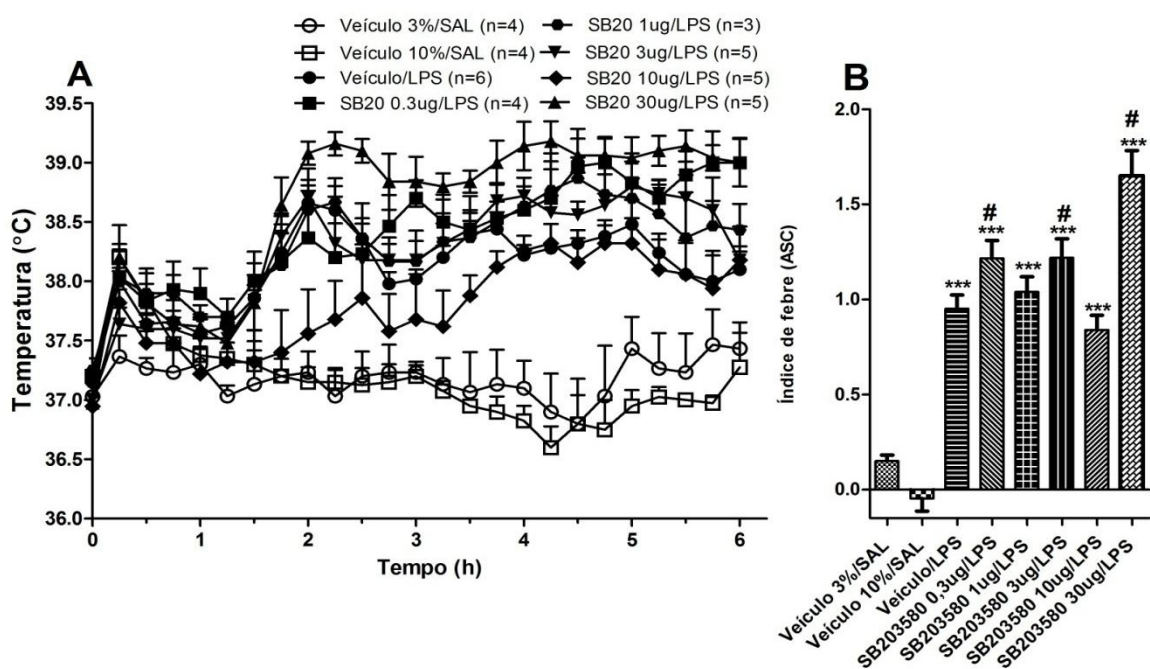


Figura 14: Efeito da injeção central de diferentes doses de SB203580 sobre a resposta febril induzida pela injeção de LPS. O SB203580 foi administrado por via icv nas doses de 0.3, 1, 3, 10 ou 30 μ g/rato no volume de 3 μ L ou 5 μ L, 30 min antes da injeção iv de LPS (5 μ g/Kg). Animais controles receberam o mesmo volume de solução salina 0,9% (iv), e DMSO 3 ou 10% (icv). No painel A, os pontos representam a média \pm EPM da temperatura corporal (em °C) dos animais, medida por telemetria. No painel B, as barras representam média \pm EPM da área sob a curva (em unidades arbitrárias) de cada grupo. (n) = número de animais. *** p <0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo salina.

A comparação do efeito das cinco doses de SB203580 sobre a febre induzida pelo LPS pode ser observada na **Figura 14**.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um efeito inesperado de elevação da temperatura corporal exercido pelo inibidor de p38 MAPK, SB203580, sobre a resposta febril induzida por LPS. Até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura do uso de inibidores de p38 MAPK em modelos farmacológicos de febre.

O LPS é um pirógeno exógeno freqüentemente usado nos estudos experimentais de febre, já que sua administração promove respostas que mimetizam as reações que acontecem durante a infecção do organismo por bactérias Gram-negativas (MICHIE *et al.*, 1988; REIS *et al.*, 2011). O aumento da temperatura ocorre com o decorrer do tempo, pois o LPS desencadeia uma reação inflamatória caracterizada pela liberação de um grande número de mediadores inflamatórios que permitem que o hospedeiro responda ao patógeno invasor (IANARO; TERSIGNI; D'ACQUISITO, 2009). Dentre os mediadores envolvidos na resposta febril induzida por LPS temos as citocinas, as PGs (especialmente a PGE₂) e alguns hormônios (principalmente aqueles do eixo HPA) (ROMANOVSKY *et al.*, 2005), além da participação de fatores de transcrição relacionados a resposta imune, como o NF-κB (LEE *et al.*, 2003). A dose de LPS utilizada nesse estudo (5 µg/Kg, iv) induziu resposta febril moderada e contínua nos animais controles, apresentando um padrão de febre bifásica semelhante ao relatado na literatura para a resposta típica a doses moderadas de LPS, tal como a utilizada neste estudo. A administração sistêmica de LPS pode induzir ainda febre monofásica, multifásica, ou hipertermia, dependendo da dose, via de administração e temperatura ambiente (ROMANOVSKY *et al.*, 1998).

A p38 MAPK vem sendo descrita como uma proteína que participa dos processos inflamatórios, visto que as vias de sinalização dependentes de p38 MAPK têm sido envolvidas no processo de ativação de genes de citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IL-6, IL-7 e IL-8 durante a resposta inflamatória aguda (ELSEA *et al.*, 2008). Com isso, vários modelos experimentais têm demonstrado o efeito de p38 MAPK como uma proteína pró-inflamatória (ELSEA *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, foi observado que a administração de SB203580 nas doses de 3 e 10 µg/rato não provocou alterações na temperatura basal dos animais, o que

sugere a ausência de uma regulação constitutiva exercida pela p38 MAPK sobre a temperatura corporal. Por outro lado, quando o SB203580 foi administrado nas doses de 0.3, 3 e 30 µg/rato 30 min antes do LPS verificou-se aumento significativo da resposta febril induzida pelo LPS, sugerindo um possível efeito modulador negativo dessa quinase na temperatura corporal. Este resultado foi considerado inesperado, visto que a maioria dos estudos relaciona a p38 MAPK com ações pró-inflamatórias.

Alguns estudos sugerem que p38 MAPK pode exercer uma influência na regulação negativa no processo de ativação de NF-κB, e em consequência disso, um controle na resposta inflamatória em mamíferos (MARTIN-BLANCO, 2000).

Schwenger *et al.* (1998) demonstraram que o salicilato de sódio, uma droga com atividade anti-inflamatória, exerce seu efeito por meio da inibição de NF-κB. Essa inibição seria mediada pela ativação de p38 MAPK. O composto SB203580 usado em cultura de células renais de macaco e de adenocarcinoma humano inibe a capacidade do salicilato de sódio em suprimir a fosforilação e degradação de IκB induzida por TNF. Com esse resultado, infere-se que a p38 MAPK é necessária para a ação inibitória promovida pelo salicilato sobre o processo de ativação de NF-κB induzida por TNF (SCHWENGER *et al.*, 1998).

TNF e IL-1 são considerados pirógenos endógenos que ativam a expressão gênica de muitas citocinas. Essa ativação é decorrente da capacidade de ativar o fator de transcrição NF-κB. O TNF induz a fosforilação de IκB, o que faz com que este seja degradada pelo proteassoma, ativando o NF-κB e fazendo com que ele seja translocado para o núcleo, iniciando sua atividade (XIAO, 2004). É sabido que o LPS, o estímulo pirogênico usado no presente estudo, promove a secreção de TNF-α em diversos tipos celulares (COMSTOCK *et al.* 1998), logo, a ativação de NF-κB pode ter um papel importante no desenvolvimento da resposta febril.

Na **Figura 15** é esquematizada a cascata que leva à inibição de NF-κB mediada por p38 MAPK, segundo o modelo proposto para o mecanismo do salicilato de sódio. Esse mesmo modelo poderia também explicar como p38 MAPK estaria envolvido na resposta febril induzida pelo LPS.

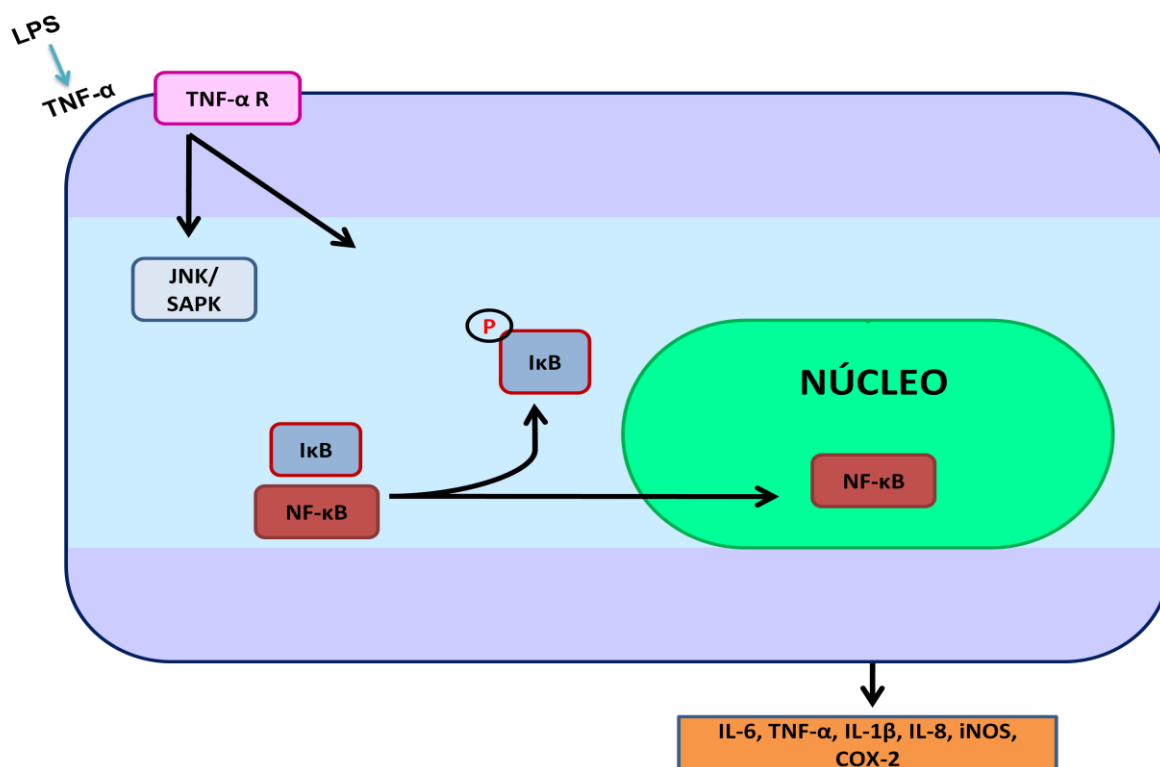


Figura 15: Modelo proposto para a inibição de NF-κB mediada por p38 MAPK. Adaptado de MARTIN-BLANCO, 2000.

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento dos animais com SB203580 elevou a resposta febril induzida por LPS, o que sugere um papel de antipirético endógeno para a p38 MAPK. Porém, não é conhecido se a ativação de p38 é suficiente para o estabelecimento da inibição ou se existe outro mecanismo envolvido, já que muitos estímulos que levam a ativação de p38 também podem levar a ativação de outras subfamílias de MAPKS, como JNK/SAPK. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que a ativação de JNK / SAPK também pode ser necessária no processo (SCHWENGER *et al.*, 1998).

É demonstrado que a aspirina, um antiinflamatório não esteroideal (AINE), inibe a ativação de NF-κB, sendo possivelmente esse um mecanismo de importância para a ação dos AINEs (BITKO *et al.*, 1997; KOPP; GHOSH, 1994).

NF-κB regula genes que codificam proteínas de sinalização importantes na resposta imune, e também citocinas como IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-β e TNF-α. NF-κB também se liga a promotores da NO sintase induzível e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), levando expressão de NO sintase induzível, COX-2 e assim, induzindo a síntese de NO e PGs, entre elas a PGE₂, (GOMEZ *et al.*, 2005) conhecida por ser o mediador final da febre.

Gomez *et al.* (2005) sugeriram ainda um mecanismo de *feedback*, envolvendo NF- κ B e PGE₂, onde NF- κ B regula a expressão de COX-2 e esta, por sua vez, levará a produção de PGE₂. A prostaglandina pode estar relacionada a regulação da atividade de NF- κ B. Assim, o aumento da expressão da COX-2 em resposta a inflamação pode ser posteriormente regulada pela PGE₂, podendo ter importância na fase de resolução da inflamação. Assim, é provável que a atividade de NF- κ B seja essencial para modular a extensão de uma resposta inflamatória (POLIGONE; BALDWIN, 2001).

Nossos resultados demonstraram um efeito diferente entre as doses de SB203580 testadas, já que as doses de 0.3, 3 e 30 μ g promoveram um aumento da temperatura corporal, enquanto as doses intermediárias de 1 e 10 μ g não provocaram alterações significativas na temperatura corporal dos ratos. Não foram encontrados na literatura resultados semelhantes.

A partir do exposto, os resultados desse trabalho sugerem que p38 MAPK esteja envolvida no controle da resposta febril induzida por LPS. Existe a possibilidade de que essa modulação se dê através da inibição de NF- κ B, porém estudos complementares são necessários para elucidar se a ativação de NF- κ B é mesmo inibida por p38 MAPK na resposta febril, e ainda a análise de como os níveis de PGE₂ são influenciados por essa via.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo demonstraram que SB203580, um inibidor específico da proteína p38 MAPK, provoca potencialização da resposta febril induzida pelo LPS, mas não altera a temperatura basal dos ratos.

Os dados sugerem ainda que p38 MAPK exerça um papel antipirético sobre a resposta febril induzida pelo LPS, entretanto são necessários outros experimentos para confirmar essa hipótese e identificar os mecanismos envolvidos.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

BANKS, W.A., KASTIN, A.J., GUTIERREZ, E.G. Penetration of interleukin-6 across the murine blood–brain barrier. **Neurosci.Lett.**, v. 179, p. 53–56. 1994.

BANKS, W.A., et al. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 259, p. 988–996. 1991.

BARTFAI, T., CONTI, B. Fever. **ScientificWorldJournal**, v.16, n.10, p. 290-503, mar. 2010.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de ReumatologiaClínica**, v. 8, n. 2, p. 47 – 51, jun. 2007.

BLATTEIS, C.M. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? **Journal of Thermal Biology**, v.28, p.1-13. 2003.

BITKO V., et al. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF- κ B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. **Virology**, v. 232, p. 369–378, 1997.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p.194-223. 2006.

BLATTEIS, C.M., SEHIC, E. Cytokines and fever. **Ann. NY Acad. Sci**, v. 840, p. 608–618. 1998.

BLATTEIS, C.M. et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: are-assessment. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 76, p. 1–18. 2005.

BOULAN, J.A. Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in the Thermoregulation and Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. S157-S161. 2000.

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

BROW, K. K. et al. P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. **Journal of Inflammation**, v. 5, n. 22. 2008.

BRITO, H. O. **Participação taquicininérgica via receptores nk1 na resposta febril induzida por pirogênicos endógenos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

CAO, C., et al. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. **Brain Res.**, vol. 733, p. 263–272. 1996.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, out. 2002.

CHUNG, K.F. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Asthma and COPD. **Chest**, v. 139, p. 1470-1479. 2011.

COMSTOCK, K. L. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. **J Mol Cell Cardiol**, vol. 30, n. 12, p. 2761-2775, dez. 1998.

CONTASSOT, E., BEER, H. D., FRENCH, L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. **Swiss Med Wkly.** v.142, p.w13590. 2012.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista Da Biologia**, v. 4, p. 40-43, jun. 2010.

CUENDA, A. et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homolog which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. **FEBS Letters**, v. 364 p. 229-233. 1995.

DALAL, S. ZHUKOVSKY, D. S. Pathophysiology and Management of Fever. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 4, n. 1, p. 9-16, jan. 2006.

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

DAVIDSON, J. et al. Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. **Physiological Reviews**, v. 44, n.4, p. 526-533. 2001.

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

ELSEA, C. R. et al. Inhibition of p38 MAPK Suppresses Inflammatory Cytokine Induction by Etoposide, 5-Fluorouracil, and Doxorubicin without Affecting Tumorcidal Activity. **Plos One**, v. 3, n. 6, p. 2355, jun. 2008.

ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 8, p. 837-851, jul. 2002.

FITZGERALD, G. A; PATRONO, C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 6, p. 433-442, ago. 2001.

GAETANO, L. et al. Cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 complex in the preoptic-anterior hypothalamus of the mouse: involvement through fever to intravenous lipopolysaccharide. **Acta Physiologica**, v. 200, n. 4, p. 315-324, dez, 2010.

GOMEZ, P.F. et al. Resolution of Inflammation: Prostaglandin E₂ Dissociates Nuclear Trafficking of Individual NF-κB Subunits (p65, p50) in Stimulated Rheumatoid Synovial Fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 10, p. 6924-6930, nov. 2005.

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

GUAN, Z. et al. Induction of Cyclooxygenase-2 by the Activated MEK₁→SEK₁/MKK₄→p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 12901–12908, mai. 1998.

GUO, J.; FRIEDMAN, S.L. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 3, p. 21- 39. 2010.

HAMZIC, N., BLOMQUIST, A, NILSBERTH, C. Immune-induced expression of lipocalin-2 in brain endothelial cells: relationship with interleukin-6, cyclooxygenase-2 and the febrile response. **J Neuroendocrinol.**, v. 25, n. 3, p.271-280, mar. 2013.

HAN J, et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v.265, p. 808–811. 1994.

HARDEN, L. M, et al. Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Physiology & Behavior**, n. 89, p. 146–155. 2006.

HARDEN, L. M, et al. Interleukin (IL)-6 and IL-1β act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 6, p. 838–849, ago. 2008.

HASDAY, J.D., FAIRCHILD, K.D., SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and infection**, v.2, p.1891-1904. 2000.

IANARO, A., TERSIGNI, M., D'ACQUISITO, F. New insight in LPS Antagonist. **Mini Rev Med Chem.**, v. 9, p. 306-317. 2009.

JOHNSON, G. L., LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v.298, p.1911-1912. 2002.

KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D. E KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1745, p. 287–299. 2005.

KONSMAN, J.P., et al. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. **J. Comp. Neurol.**, v. 472, p. 113–129, 2004.

KOPP E., GHOSH S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, v. 265, p. 956–959, 1994.

KOZAK, W., WROTEK, S., KOZAK, A. Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor- κ B. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 290, p. R871-R880. 2006.

KUMAR, S., BOEHM, J., LEE, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 717-726, set. 2003.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 807-869, abr. 2001.

LI, K. et al. Peripheral Formalin Injury Induces 2 Stages of Microglial Activation in the Spinal Cord. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1056-1065, nov. 2010.

LEE, J. J. et al. Blocking NF- κ B Activation May Be an Effective Strategy in the Fever Therapy. **Japanese Journal of Physiology**, v. 53, p. 367–375. 2003.

LEE, S. A., et al. Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 75, p. 16-24. 2000.

LEON, C.G. et al. Discovery and Development of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists: A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1751-1761, ago. 2008.

LUHESHI, G.; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.109, p.301-307. 1996.

MARTIN-BLANCO, E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. **Bioessays**, v.22, p. 637-645. 2000.

MAVROPOULOS, A. et al. p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)-mediated autoimmunity: Lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris. **Autoimmunity Reviews**, v.12, p. 580–590. 2013.

MEHAN, S. et al. Effect of mitogen activated protein kinase inhibitor in animal model of Alzheimer's diseases. **International Journal of Pharma Professional's Research**, v. 2, n. 1, p. 212-223, jan. 2011.

MELO SOARES, D. et al. CCL3/Macrophage inflammatory protein-1 α induces fever and increases prostaglandin E(2) in cerebrospinal fluid of rats: Effect of antipyretic drugs. **Brain Res.**, v.1109, p.83-92. 2006.

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

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Prog Neurobiol.**, v.61, p.45-60, 2000.

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

OKA, T. et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol.**, v. 428, n. 1, p. 20-32. 2000.

PARROTT, R. F.; VELLUCCI, S. V. Effects of centrally administered prostaglandin EP receptor agonists on febrile and adrenocortical responses in the prepubertal pig. **Brain Res Bull**, v. 41, n. 2, p. 97-103. 1996.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York Academic Press**. 1986.

POLIGONE, B., BALDWIN, A. S. Positive and Negative Regulation of NF- κ B by COX-2: Roles of different prostaglandins **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 42, p. 38658–38664, 2001.

PELAIA, G. et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Asthma. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 202, p. 642–653. 2005.

POON, D. C. H. et al. Cytokines: How important are they in mediating sickness? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, p. 1–10. 2013.

RAETZ C. R; WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700. 2002.

RISCO, A.; CUENDA, A. New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, article ID 520289. 2012.

REIS, R. C. et al. Central substance P NK₁ receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain Res.**, v.12, p.161-169. 2011.

ROBINSON M.J., COBB M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 9, n. 2, p. 180-186. 1997.

ROMANOVSKY A.A., et al. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **Am J Physiol.**, vol. 275, p. R332-R338. 1998.

ROMANOVSKY A.A., et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci.**, v.1 , n. 10, p. 2193-2216, set. 2005.

ROSS, E. M.; KENAKIN, T. P. Farmacodinâmica: Mecanismos de ação dos fármacos e relação entre sua concentração e seu efeito. In: GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapeùtica. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROSS G. et al. Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. **J Appl Physiol.**, v. 94, p. 1395-1402. 2003.

ROTH J.; DE SOUZA G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 3, p. 301-314. 2001.

ROTH et al. Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin₆ release. **Journal of Physiology**, v. 509, n. 1, p. 267-275. 1998.

ROTH, J. et al. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. **Immunol Allergy Clin N Am**, v. 29, p. 229-245. 2009.

ROTHWELL, N.J. et al. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.69, p.1465-1470. 1991.

ROUX, P.P., BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiol.Mol. Biol. Rev**, v. 68 n. 2, p. 320-344, jun. 2004.

SHAO, D.Z. et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever. **Mol Cell Biochem**, v. 262, n. 1-2, p. 177-185, jul. 2004.

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*. **Med MicrobiolImmunol.**,v.201, p.47–60. 2012.

STEINER, A. A. et al. Cyclooxygenase-1 or -2—which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia?**Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.**, v. 297, n. 2, p. R485–R494, ago. 2009.

TAKAHASHI, S.; KAPAS, L.; KRUEGER, J.M. A tumor necrosis factor (TNF) receptor fragment attenuates TNF-alpha- and muramyl dipeptide-induced sleep and fever in rabbits. **J. Sleep Res.**, v.5, p.106-114. 1996.

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors.**The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2057-2072, out. 2002.

THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES (IUPS THERMAL COMMISSION).Glossary of terms for thermal physiology. 3. ed. **J. Physiol.**, v.51, p. 245-280. 2001.

THOREN, S.; JAKOBSSON, P. J. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells.Inhibition by NS-398 and leukotriene C4.**Eur J Biochem**, v. 267, n. 21, p. 6428-6434.2000.

UDDIN, S. et al. Differentiation stage-specific activation of p38mitogen-activated protein kinase isoforms in primaryhuman erythroid cells.**PNAS**, v. 101, n. 1, p. 147–152, jan. 2004.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2.**AnnuRevPharmacolToxicol**, v. 38, p. 97-120.1998.

VOLTARELLI J.C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**. vol. 27, n.1/2, p. 7-48, jan./jun. 1994.

WARD, K. W. et al. Preclinical pharmacokinetics of SB-203580, apotent inhibitor of p38 mitogen-activated proteinkinase.**Xenobiotica**, v. 31, n. 11, p. 783-797. 2001.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription.**Cellular & Molecular Immunology**, v. 1, p. 425–433. 2004.

YANG, S. H., SHARROCKS, A. D., WHITMARSH, A. J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades.**Gene**, v.320,p.3-21. 2003.

YANG, K. Y. et al. Participation of the central p38 and ERK1/2 pathways in IL-1 β -induced sensitization of nociception in rats.**Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 46, p. 98–104. 2013.



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

Brasília, 21 de outubro de 2011.



DECLARAÇÃO

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



Aline Pic-Taylor
Profa. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA