

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

LUCAS SECCHIM RIBEIRO

**MECANISMOS INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO
DE FEBRE POR LIPOPOLISSACARÍDEO:**

PARTICIPAÇÃO DA MICROBIOTA COMENSAL, DA ENZIMA
FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE GAMA E DO RECEPTOR DO FATOR
ATIVADOR DE PLAQUETAS



BELO HORIZONTE – MG

2015

LUCAS SECCHIM RIBEIRO

**MECANISMOS INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO
DE FEBRE POR LIPOPOLISSACARÍDEO:
PARTICIPAÇÃO DA MICROBIOTA COMENSAL, DA ENZIMA
FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE GAMA E DO RECEPTOR DO FATOR
ATIVADOR DE PLAQUETAS**

Tese entregue ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de doutor em Imunologia, sob a orientação do Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e da Prof. Dra. Danielle da Glória de Souza.

BELO HORIZONTE – MG

2015

Ribeiro, Lucas Secchim.

043

Mecanismos inflamatórios envolvidos na indução de febre por lipopolissacarídeo: participação da microbiota comensal, da enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama e do receptor do fator ativador de plaquetas [manuscrito] / Lucas Secchim Ribeiro. - 2015.

126 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Mauro Martins Teixeira. Co-orientador: Danielle da Glória de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Febre - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Microbiota. 4. Fosfatidilinositol 3-quinase gama. 5. Fator ativador de plaquetas - Teses. 6. Bioquímica - Teses. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Souza, Danielle da Glória de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.




Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

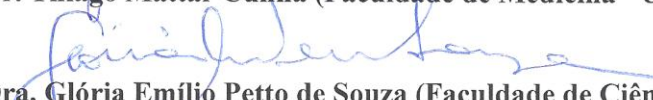


ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LUCAS SECCHIM RIBEIRO. Aos trinta e um dias do mês de julho de 2015 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Mecanismos inflamatórios associados à indução de febre por lipopolissacarídeo : papel da microbiota comensal, da enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama e do receptor do fator ativador de plaquetas", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Samuel Penna Wanner (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Thiago Mattar Cunha (Faculdade de Medicina - USP - RP), aprovado; Dra. Glória Emílio Petto de Souza (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - RP), aprovado; Dra. Danielle da Glória de Souza - Co-Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 31 de julho de 2015.


 Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

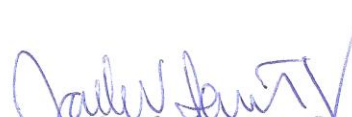

 Dr. Samuel Penna Wanner (UFMG)


 Dr. Thiago Mattar Cunha (Faculdade de Medicina - USP - RP)


 Dra. Glória Emílio Petto de Souza (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - RP)


 Dra. Danielle da Glória de Souza - Co-Orientadora (UFMG)


 Dra. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

“It must be a strange world not being a scientist, going through life not knowing - or maybe not caring - about where the air came from, and where the stars at night came from, or how far they are from us. I want to know”.

Michio Kaku, físico

“For me, I am driven by two main philosophies: know more today about the world than I knew yesterday and lessen the suffering of others. You'd be surprised how far that gets you”.

Neil deGrasse Tyson

“Mar tranquilo nunca fez um bom pescador”.

Provérbio britânico, tradução livre

O conceito de família sempre permanece forte em minha mente e define meus objetivos e planos. Dedico este trabalho aos meus pais e irmã, minha família de ontem, hoje e sempre. Também o dedico à Patrícia, minha família de amanhã.

AGRADECIMENTOS

Tenho a honra e orgulho de ter sido orientado por duas pessoas tão competentes. Além da excelência profissional, têm muitas qualidades em comum e naquilo que divergem, são complementares. Obrigado pelo incentivo constante, que vem em todas as formas possíveis. Sou grato por nunca terem desistido, sempre acreditando no meu potencial. Há alguns anos fui acolhido em um grupo de pesquisa que é uma verdadeira família e desde cedo, sinto-me parte dela. Mauro e Dani, minha eterna gratidão!

Meus agradecimentos à família Imunofarmacologia/LIMHO, composta por pessoas tão diferentes e que sempre fazem das adversidades um impulso para as novas conquistas. Em especial, aos amigos Caio Fagundes, Daniel Cisalpino, Rafael "Elisão" Elias, Vivian Costa, por serem os primeiros a me ensinar tudo sobre um mundo novo aos meus olhos. Aos professores Flávio Amaral, Gustavo Menezes, Remo Russo e Vanessa Pinho, obrigado pelas prolíficas discussões e ensinamentos. A todos os colaboradores que me dão o prazer de fazer parte de seus trabalhos, deixo meu reconhecimento e apoio.

Um agradecimento especial ao Prof. Renes de Resende Machado, que com muita paciência e cuidado me apresentou o "mundo" da febre, suas metodologias e meandros. Seus conselhos e dicas foram imprescindíveis para o andamento deste trabalho, do qual ainda serão colhidos muitos frutos. Espero manter essa parceria por muito tempo!

Essa tese não teria sido realizada sem o profissionalismo e amizade de pessoas idôneas e qualificadas que estão nos bastidores do laboratório. Muito obrigado às meninas de ouro: Gilvânia, Ilma, Ilda e Frank por ajudar a manter tudo em dia no laboratório! Aos amigos Pedro, Hermes, Valner e Marcelo, agradeço por cuidar dos nossos animais, seu trabalho é fundamental para todos nós! Um agradecimento especial para Giuliana e Ieda, de Ribeirão Preto/SP, pelo ensinamento e ajuda com meus experimentos!

Aos funcionários do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia: Celise, Erika, Ubirajara, Thiara, Orlando e Alexandre, agradeço pela destreza e prontidão! O trabalho de vocês é imprescindível!

Os companheiros de batalha das turmas de Bases 1 e 2 são o grupo de amigos com os quais quero manter contato para sempre! Foram turmas competentes, sem deixar as boas risadas de lado. Apesar do tempo curtíssimo dentro de sala de aula, os laços formados são muito fortes! Obrigado pela companhia e pela amizade!

Dentre tantos amigos, deixo um abraço apertado para o casal Marcela Segatto e Vinícius Nunes, que no meu momento mais crítico, estenderam suas mãos e através da Ação entre Amigos, reergueram minha auto-estima e me mostraram que amizades como esse não tem preço. E meus dois queridos mosqueteiros, Paula e João Pedro, que têm grande responsabilidade neste trabalho, desde antes mesmo de seu início. Obrigado pelos momentos de desabafo, pela alegria das conversas e por fundarem o Garaginha Scotch Bar & Lounge, espaço que respira conhecimento acadêmico e local de nascimento das melhores ideias! Sempre vai ter um espaço no sofá e uma cerveja gelada esperando por vocês!

À todos da família Campi, especialmente a sogrinha Eliane e o sogrão Camilo, por me acolherem em seu lar e por permitir que eu participe de um convívio tão próximo e aconchegante. Agradeço por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, fazendo com que eu me sentisse menos sozinho na caminhada!

Agradeço aos meus pais, Sérgio e Rozângela, que fizeram o possível e o impossível para que minha educação fosse sua prioridade. Vou valorizar esse esforço para sempre! Tenho muito orgulho de ser seu filho e vocês são o exemplo de família que eu quero para mim. Também agradeço a minha irmã, por me lembrar continuamente de que a vida é curta e devemos aproveitar cada momento. Amo vocês!

O meu agradecimento mais especial para aquela que conquistou meu coração. Paty, você é um modelo de competência, carisma e dedicação, tanto profissional quanto pessoal. Obrigado pela paciência, pelo apoio, pelo carinho e amor incondicionais que você me dá a cada dia. Que eu possa estar ao seu lado por cada dia da minha vida! Te amo!

A todos os amigos e familiares que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIações E ABREVIATURAS	12
LISTA DE TABELA E FIGURAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 A regulação da temperatura corporal	19
1.1.1 <i>Termorregulação em animais endotérmicos</i>	20
1.2 A febre e seus mecanismos	23
1.2.1 <i>A importância da febre</i>	24
1.2.2 <i>Indução de febre por lipopolissacarídeo</i>	25
1.2.3 <i>Vias neurais para o estabelecimento da febre</i>	27
1.2 A microbiota comensal e a homeostase do hospedeiro	31
1.2.1 <i>Funções da microbiota comensal</i>	33
1.2.2 <i>A relação entre a microbiota e processo inflamatório</i>	36
1.3 Enzimas do grupo das fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K)	38
1.3.1 <i>Papel da fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3Kγ) na inflamação</i>	41
1.4 O fator ativador de plaquetas (PAF)	44
1.4.1 <i>O receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) e sua ação</i>	45
2. JUSTIFICATIVA	48
3. OBJETIVOS	49
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Animais.....	50
4.2 Aferição de temperatura abdominal e coleta de dados	51
4.3 Protocolo experimental.....	52
4.4 Intervenções farmacológicas	53
4.5 Convencionalização de animais isentos de microbiota	53
4.6 Redução de microbiota comensal com antibióticos.....	54

4.7	Quantificação de citocinas plasmáticas.....	54
4.8	Avaliação da expressão de genes envolvidos na resposta febril.....	55
4.8.1	<i>Extração e dosagem de RNA.....</i>	55
4.8.2	<i>Transcrição reversa</i>	56
4.8.3	<i>PCR quantitativa (qPCR)</i>	57
4.9	Análise estatística.....	58
5.	RESULTADOS	60
5.1	Estabelecimento da técnica.....	60
5.2	Efeito da microbiota comensal na febre provocada por lipopolissacarídeo	62
5.2.1	<i>Animais isentos de microbiota não têm febre após injeção de LPS.....</i>	62
5.2.2	<i>Concentração de pirógenos endógenos é menor em animais germ-free após indução de febre por LPS.....</i>	64
5.2.3	<i>Expressão de TNF-α no hipotálamo de animais isentos de microbiota é menor após estímulo pirogênico.....</i>	65
5.2.4	<i>A reposição da microbiota comensal em animais germ-free também restaura a resposta febril.....</i>	65
5.2.5	<i>A redução da microbiota pelo uso de antibióticos inibe a indução de febre em camundongos convencionais</i>	67
5.3	Papel da via da fosfatidilinositol 3-quinase gama na indução de febre	69
5.3.1	<i>A enzima PI3Kγ é essencial para a indução de febre em camundongos.....</i>	69
5.3.2	<i>A ausência de febre nos animais PI3Kγ^{-/-} está relacionada com menor concentração de citocinas pirogênicas no plasma</i>	71
5.3.3	<i>Após o estímulo com LPS, a resposta hipotalâmica de animais PI3Kγ KO é menor em relação ao grupo WT</i>	73
5.3.4	<i>A inibição farmacológica da enzima reproduz os resultados encontrados para os camundongos com deleção gênica.....</i>	75
5.4	Participação do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) na febre induzida por LPS	77
5.4.1	<i>Camundongos deficientes para PAFR tem febre atrasada, porém mais longa.....</i>	77
5.4.2	<i>Altas concentrações de IL-1β são responsáveis pela manutenção da febre.....</i>	77
5.4.3	<i>Ausência de PAFR não altera a transcritos de COX-2, mas a expressão de citocinas é alterada.....</i>	80

5.4.4 Antagonismo específico do receptor de PAF pode reproduzir os efeitos do animal geneticamente modificado	82
6. DISCUSSÃO	83
6.1 A indução de febre por LPS e o papel da microbiota comensal	83
6.2 Ação da enzima PI3Ky na febre induzida por LPS	88
6.3 Participação de PAF e seu receptor na indução de febre por LPS.....	91
6.4 Considerações finais	94
7. CONCLUSÕES	98
8. REFERÊNCIAS	100
8.1 Referências dos iniciadores utilizados para qPCR	121
ANEXO 1: Certificações para utilização de animais para experimentação	123
ANEXO 2: Acompanhamento da temperatura de animais Swiss/NIH e GF por 24 horas, após indução de febre por LPS	125

LISTA DE ABREVIações E ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
ADP/ATP – di/trifosfato de adenosina
ANOVA – análise de variância
BAT – tecido adiposo marrom
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA – albumina séria bovina
cDNA – DNA complementar; produto da transcrição reversa
CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais
CMC - carboximetilcelulose
COX-2 - cicloxigenase-2
 C_T – *threshold cycle*
CRF/CRH: fator/hormônio liberador de corticotrofina
DNA – ácido desoxirribonucleico
ELISA – do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*
EP₁₋₄R - receptores 1 a 4 de *prostaglandina E*
ET-1 – endotelina-1
 $x g$ – fator multiplicador da força da gravidade, unidade de centrifugação
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM-CSF – fator estimulador de colônias para granulócitos e monócitos
GPCR – receptor acoplado à proteína G
HPA – eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal
HPRT - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HRP- do inglês, *horse radish peroxidase*
Ig – imunoglobulina (e seus subtipos)
IL-1 β - interleucina 1-beta
IL-6 - interleucina 6
IL-10 - interleucina 10
iNOS – sintase induzível de óxido nítrico
KO – do inglês *knock-out*, indica deleção gênica somática.
LPS – lipopolissacarídeo

µg – microgramas
µL – microlitros
mg - miligramas
mL – mililitros
mM - milimolar
M – molar; unidade de concentração
mRNA – RNA mensageiro
mTOR – alvo de rapamicina em mamíferos
NaCl – cloreto de sódio
ng – nanogramas
nm – nanômetros
OPD – dicloridrato de ortofenilenodiamina
PAF – fator ativador de plaquetas
PAF-AH – acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas
PAFR – receptor do fator ativador de plaquetas
PAMP – padrão molecular associado a patógenos
pb – pares de bases nitrogenadas
PBS – salina tamponada por fosfato
PD(P)K – quinase dependente de fosfatidilinositol 3-fosfato
PFPF – fator pirogênico pré-formado
pg – picogramas
PGC-1 α - coativador 1- α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGF₂ α - prostaglandina F_{2-alfa}
PH – domínio de homologia à pleckstrina
p.i. – pós-injeção
PI3K – fosfatidilinositol 3-fosfato quinase
PI3K γ - fosfatidilinositol 3-fosfato quinase gama
PIP_x – fosfatidilinositol-(x)-fosfato (sendo x o número de fosfatos na molécula)
PKB – proteína quinase B
PRR – receptor de reconhecimento de padrões
PTEN – fosfatase homóloga à tensina

PTGES - prostaglandina sintase endossomal
qPCR – reação quantitativa em cadeia da polimerase; (comumente: *Real time PCR*)
q.s.p. – termo farmacêutico que designa *quantidade suficiente para* o volume final
RNA – ácido ribonucleico
RNase – ribonuclease
RPL4 - proteína ribossomal L4
RTK – receptores tirosina-quinase
SPF – animal livre de patógenos específicos
TLR – receptor do tipo Toll
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TXA₂ - tromboxano A₂
UCP-1 - proteína desacopladora 1 (termogenina)
WT – *wild type*; animais de linhagem selvagem, não deficientes.
°C – graus Celsius
18S - subunidade ribossomal

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de controle da temperatura corporal em diferentes situações	22
Figura 2: Estimulação de células de K�pffer por LPS via TLR4 e via ativa�o do complemento	26
Figura 3: A indu�o de febre durante a inflama�o	28
Figura 4: Vias neuronais responsáveis pela febre durante inflama�o sistêmica em resposta � prostaglandina E ₂	30
Figura 5. A composi�o da microbiota bacteriana, fúngica e viral em locais distintos do corpo humano	32
Figura 6: A dieta e outros fatores ambientais e do hospedeiro têm um grande efeito na composi�o da microbiota	37
Figura 7: A família de enzimas PI3K, suas classes e isoformas	39
Figura 8: Sinaliza�o pelas isoformas de PI3K da classe I	41
Figura 9: Compila�o de processos bioquímicos que dependem da atividade da PI3K�	43
Figura 10: Síntese de PAF por remodelamento e síntese <i>de novo</i>	45
Figura 11: Sinaliza�o intracelular pelo receptor do fator ativador de plaquetas	47
Figura 12: Animais da linhagem Swiss têm aumento de temperatura quando injetados com LPS e a resposta pela via intravenosa � mais pronunciada que a intraperitoneal	61
Figura 13: Animais isentos de microbiota não desenvolvem febre após a inje�o intravenosa de LPS	63
Figura 14: Animais germ-free têm menores níveis de citocinas responsáveis pela indu�o periférica da resposta febril	64
Figura 15: A ausência da microbiota comensal culmina em hiporresponsividade hipotalâmica, através da menor expressão de TNF-�	65
Figura 16: Animais convencionalizados repetem a resposta dos animais colonizados após indu�o febril.	66
Figura 17: A deple�o de microbiota através da administra�o de antibióticos impede a indu�o de febre em camundongos convencionais	68
Figura 18: Animais deficientes para a enzima PI3K� não manifestam resposta febril após indu�o por LPS	70

Figura 19: Animais deficientes para PI3K γ têm menor concentração das citocinas IL-1 β e TNF- α no plasma, apesar das concentrações similares de IL-6	72
Figura 20: A ausência da enzima PI3K γ impede a expressão de transcritos de COX-2, IL-6 e TNF- α no hipotálamo	74
Figura 21: Animais tratados com inibidor seletivo da PI3K γ mimetizam o fenótipo do camundongo KO, com ausência de febre	76
Figura 22: Animais deficientes para o receptor de PAF têm febre após injeção de LPS, mas o processo é tardio e mais prolongado	78
Figura 23: Animais com deleção do gene que codifica PAFR mantêm alta concentração plasmática de IL-1 β após estímulo com LPS	79
Figura 24: A deleção do gene para PAFR não modifica a expressão de COX-2 no hipotálamo, mas há alterações na expressão local de citocinas	81
Figura 25: Intervenção farmacológica com antagonista específico de PAFR pode gerar resposta semelhante àquela observada em camundongos geneticamente modificados	82
Figura 26: Mecanismos inflamatórios que participam da indução de febre por LPS, conforme os dados apresentados neste trabalho	99
Tabela 1: Lista de iniciadores utilizados para avaliação de expressão de transcritos por PCR quantitativa	59

RESUMO

O controle da temperatura corporal contribui para a atividade do sistema imune. Em animais endotérmicos, essa modulação é finamente controlada pelo hipotálamo, com produção local de citocinas e mediadores lipídicos. A febre é a resposta do termostato hipotalâmico à detecção de pirógenos oriundos tanto de micro-organismos infecciosos quanto aqueles produzidos pelo próprio organismo durante uma reação inflamatória. Contudo, a febre é um sinal clínico frequentemente negligenciado, devido ao seu caráter agudo e inespecífico. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi verificar a participação de importantes mediadores inflamatórios para o desenvolvimento da febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, foram utilizadas ferramentas de estudo com reconhecida importância para a inflamação: a) a enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3K γ), de aspecto pleiotrópico e importante em diversas funções, como desenvolvimento celular e ativação gênica; b) o fator ativador de plaquetas (PAF) e seu receptor (PAFR), cuja cascata de sinalização promove ativação leucocitária e liberação de citocinas e c) a microbiota comensal, que atua primando o sistema imunológico e oferecendo diversas vantagens simbióticas ao seu hospedeiro. Nossos resultados indicam que tanto a microbiota comensal quanto a enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama são fundamentais para a indução de febre por LPS. A ausência de ambas em camundongos levou à redução da geração de importantes citocinas pró-inflamatórias de caráter pirogênico, como IL-1 β e TNF- α . No sistema nervoso central, essa menor resposta periférica leva à hiporresponsividade do hipotálamo, com menor expressão da cicloxigenase 2 (COX-2), enzima-chave na produção da prostaglandina E₂, mediador final da febre no cérebro. Já os animais deficientes para o receptor do fator ativador de plaquetas tiveram um processo febril atrasado e prolongado em relação ao grupo selvagem. Isso se deve à manutenção de alta concentração de IL-1 β no plasma em períodos mais tardios após a injeção de LPS, em um mecanismo independente da expressão central de COX-2 e TNF- α . Em conjunto, os dados gerados sugerem que a geração de moléculas pró-inflamatórias na periferia é necessária para a resposta central hipotalâmica e conseqüente aumento de temperatura, conforme demonstrado nos modelos utilizando animais isentos de microbiota ou deficientes para a enzima PI3K γ , nos quais intervenções biológicas e farmacológicas suportam tal hipótese. Por outro lado, a deleção ou antagonismo do receptor de PAF gerou um fenótipo distinto e igualmente interessante. O atraso e prolongamento da febre pode indicar a participação desse mediador lipídico na resolução do processo febril. Estudos mais detalhados se fazem necessários para o aprofundamento no assunto, a fim de que deles sejam extraídas conclusões mais robustas.

Palavras-chave: febre, inflamação, microbiota, fosfatidilinositol 3-quinase gama, receptor do fator ativador de plaquetas

ABSTRACT

The control of body temperature is thought to contribute to the immune system. In endothermic animals, this modulation is finely tuned by the hypothalamus, with local production of cytokines and lipid mediators. Fever is the hypothalamic response towards the detection of pyrogens either from infectious microorganism or produced by own body during an inflammatory reaction. Nevertheless, fever is a frequently neglected clinical sign, due to its acute and unspecific features. Therefore, the aim of this work is to verify the role of important inflammatory mediators in the development of fever induced by lipopolysaccharide (LPS). To achieve it, we used tools well recognized as important pieces for the inflammation puzzle: a) phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ), whose activity is pleiotropic and important for several function, like cell development and gene activation; b) the platelet-activating factor (PAF) and its receptor (PAFR), whose signaling cascade leads to leukocyte activation and cytokine release and c) the commensal microbiota, responsible for priming and maturing the immune system, offering a variety of symbiotic advantages to its host. Our results point that both commensal microbiota as phosphatidylinositol 3-kinase gamma are fundamental for the LPS-induced fever. Their privation leads to the reduction of proinflammatory, pyrogenic cytokines like IL-1 β and TNF- α . In the central nervous system, this minor peripheral response makes hypothalamus less responsive, with lower expression of cyclooxygenase-2, an important enzyme to the production of prostaglandin E₂, final mediator of fever in the brain. In other hand, the mice knocked out for the receptor of the platelet-activating factor had a delayed but prolonged fever, in comparison to the wild type mice. This interesting response may be due to higher levels of IL-1 β in late times after LPS injection, in a mechanism independent of COX-2 and TNF- α expression in the hypothalamus. Taken together, the results suggest that the production of proinflammatory molecules in the periphery is needed for the central hypothalamic response and consequently, the increase in the temperature, as shown in the murine models using germ-free or PI3K γ KO mice, in which the biological and pharmacological approaches support such hypothesis. On the other hand, the deletion or antagonism of PAF receptor led to a unique and equally interesting phenotype. The delay and extension of fever may indicate the role of the lipid mediator in the resolution of febrile process. More detailed studies are required to further explaining the subject, in order to get robust and reliable answers.

Keywords: fever, inflammation, microbiota, phosphoinositide 3-kinase gamma, platelet-activating factor receptor

1. INTRODUÇÃO

1.1 A regulação da temperatura corporal

A temperatura é uma medida da quantidade de energia presente em um sistema e, conforme a temperatura aumenta, também cresce a energia cinética presente na mistura de moléculas que compõem o sistema. Essas considerações termodinâmicas são relevantes e, em sistemas biológicos, têm impacto profundo na função de macromoléculas, reações bioquímicas e no funcionamento apropriado da célula (Akin, 2011). A manutenção da função em face à mudança de temperatura pode ser alcançada de duas formas: adotando e evoluindo uma maquinaria molecular e celular que confere tolerância a uma grande amplitude térmica ou promovendo mecanismos (tipicamente fisiológicos) que permitem aos animais povoar diversos *habitats* térmicos enquanto mantêm suas temperaturas internas substancialmente diferentes daquelas do ambiente externo. De fato, a biologia térmica dos animais é definida primariamente pelos efeitos da temperatura nas funções bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, bem como pelas estratégias que os animais empregam para lidar com flutuações de temperatura, a fim de manter sua própria temperatura em níveis constantes (Tattersall *et al.*, 2012).

Há dois tipos primários de respostas às variações externas de temperatura exibidos por animais: pecilotermia (ectotermia) ou homeotermia. Como a maioria* dos pecilotérmicos não possuem os meios fisiológicos para gerar calor, o calor corporal é derivado exclusivamente de fontes do ambiente externo. Essa dependência térmica exógena define a termorregulação comportamental, seja por movimentação entre áreas de baixas e altas temperaturas ou ainda por mudança da posição corporal para ajustar a troca de calor por condução e radiação. Exemplos de pecilotérmicos incluem os animais “de sangue frio”, como a maioria dos peixes, anfíbios e répteis (Kearney *et al.*, 2009).

* Os peixes eram classicamente ordenados como animais ectotérmicos ou pecilotérmicos. No entanto, um elegante estudo de Wegner e colaboradores em maio de 2015 apresentou evidências que o peixe-lua (*Lampris guttatus*) consegue manter a temperatura de seu corpo mais elevada do que as frias águas que habita. O peixe consegue gerar calor através da constante movimentação das nadadeiras peitorais e minimiza a perda de calor através de complexos mecanismos nos vasos sanguíneos das guelras, distribuindo sangue aquecido por todo corpo e aumentando o desempenho fisiológico e metabólico.

Por outro lado, homeotérmicos têm adaptações fisiológicas específicas para a regulação de sua temperatura central, mantendo-a entre 36 e 42 °C (Ivanov, 2006). Quando submetidos a baixas temperaturas, diversos mecanismos fisiológicos são iniciados para suplementar e conservar o calor. Nesse grupo se encaixam os animais “de sangue quente” como aves e mamíferos (Grigg *et al.*, 2004; Robertshaw, 2006).

1.1.1 Termorregulação em animais endotérmicos

O calor é derivado de reações bioquímicas que ocorrem em todas as células. Em nível mitocondrial, a energia derivada do catabolismo de metabólitos como a glicose é usada na fosforilação oxidativa para converter adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP). Em repouso, mais da metade do calor do corpo é gerado como resultado da ineficiência de processos bioquímicos que convertem a energia dos alimentos em energia livre. Mesmo que nenhum trabalho externo esteja sendo realizado, o calor é gerado como resultado de trabalho interno (por exemplo, peristalse, contrações cardíacas e circulação sanguínea) e reações bioquímicas envolvidas na manutenção da integridade funcional e estrutural de vários sistemas. Quando há trabalho externo, é gerado calor adicional como subproduto de contrações de músculos esqueléticos (Mackowiak, 2010).

Em humanos adultos e mamíferos de grande porte, o tremor é a via primária para o aumento da produção de calor. A termogênese sem tremor é mais importante em mamíferos de menor porte, recém-nascidos (incluindo humanos) e animais de clima frio. Embora diversos tecidos (por exemplo, coração, músculos respiratórios e tecido adiposo) contribuam para o processo, o tecido adiposo marrom tem sido claramente associado à termogênese sem tremor. Essa forma altamente especializada de tecido adiposo está localizada próxima às escápulas, pescoço, adrenais e vasos sanguíneos profundos (adjacente a órgãos vitais) e é caracterizada pela cor marrom, sistema vascular profuso e abundância de mitocôndrias (Klingenspor, 2003).

O calor gerado primariamente em órgãos vitais internos é distribuído pelo corpo pelo sistema circulatório. Em resposta ao sistema nervoso autônomo, o sistema circulatório determina tanto a temperatura de diversas partes do corpo quanto a taxa de troca de calor

entre superfícies corporais e o ambiente – por condução, convecção, radiação e evaporação. Em um ambiente aquecido ou em resposta a uma elevação na temperatura central devido a exercício, o fluxo sanguíneo cutâneo aumenta para que o calor seja transportado do centro para ser dissipado na superfície da pele. A ativação simultânea da sudorese aumenta a perda de calor por evaporação, processo que não acontece em roedores. Em um ambiente resfriado ou em resposta à redução central de temperatura, o fluxo sanguíneo da pele normalmente é reduzido para preservar o calor interno (McCafferty *et al.*, 2010).

A termorregulação é um processo que envolve uma sequência de estruturas e conexões neurais que se estendem ao hipotálamo e também a partir dele, através do tronco cerebral inferior para a medula espinhal e gânglios simpáticos. No entanto, a área do cérebro localizada na zona rostral do hipotálamo tem importância especial para o processo de termorregulação. Embora geralmente referida como área pré-óptica, também inclui as partes medial e lateral, hipotálamo anterior e septo. Vários estudos nas últimas décadas estabeleceram que uma rede sináptica de neurônios localizados nesta área controla as respostas termorregulatórias de caráter autonômico e comportamental (Scammell *et al.*, 1996; Székely *et al.*, 1997; Boulant, 2006). A rede engloba quatro diferentes tipos de neurônios – sensíveis ao calor, insensíveis à temperatura, e neurônios efetores à produção ou perda de calor – que regulam a temperatura central. Os neurônios sensíveis ao calor integram os dados centrais e periféricos, orientado seus dendritos a receber informações dos termorreceptores cutâneos. Os neurônios insensíveis à temperatura têm orientação diferente e parecem prover constantes sinais de referência para determinar o ponto de ajuste termorregulatório. Os neurônios sensíveis e insensíveis enviam sinais mutuamente antagônicos para neurônios efetores que controlam as respostas termorregulatórias. Neurônios sensíveis ao calor induzem a perda de calor através da sinalização de neurônios efetores, inibindo os neurônios que ativam a produção de calor (Boulant, 2006).

Acredita-se que a área pré-óptica regula a temperatura central por integrar informações de termossensores na pele e na região interna, incluindo o sistema nervoso central. Uma das teorias mais aceitas postula que tal integração envolve um ponto de ajuste térmico

para a área pré-óptica que é mantido por um sistema de *feedback* negativo. De acordo com essa teoria, se a temperatura da área pré-óptica aumenta além do seu ponto de ajuste, por qualquer razão, as respostas de perda de calor são ativadas para reduzir a temperatura central, fazendo com que volte ao ajuste inicial (por exemplo, 37° C). Se, por outro lado, a temperatura pré-óptica reduz abaixo do ponto de ajuste (por exemplo, exposição ao frio), várias respostas de retenção e produção de calor são ativadas para aumentar a temperatura até o ponto dito normal (**Figura 1**).

As necessidades básicas do animal homeotérmico são satisfeitas através de metabolismo basal, uma forma de metabolismo que não envolve a termorregulação fisiológica porque as temperaturas externas não excedem limites confortáveis (Ivanov, 2006). A extensão de temperaturas associadas com o metabolismo basal constitui a zona termoneutra. Quando as temperaturas do ambiente ultrapassam os limites inferior e superior da zona termoneutra, estratégias fisiológicas como as descritas acima são implantadas para prevenir alterações drásticas na temperatura central. Entretanto, sempre que um animal está termorregulando para prevenir aquecimento ou resfriamento excessivo, a taxa metabólica não-basal aumenta. Este aumento na taxa metabólica restringe os limites de quais temperaturas podem ser toleradas além da zona termoneutra. Em geral, animais homeotérmicos lançam mão de meios comportamentais para se manter em sua zona termoneutra (Cannon e Nedergard, 2011).

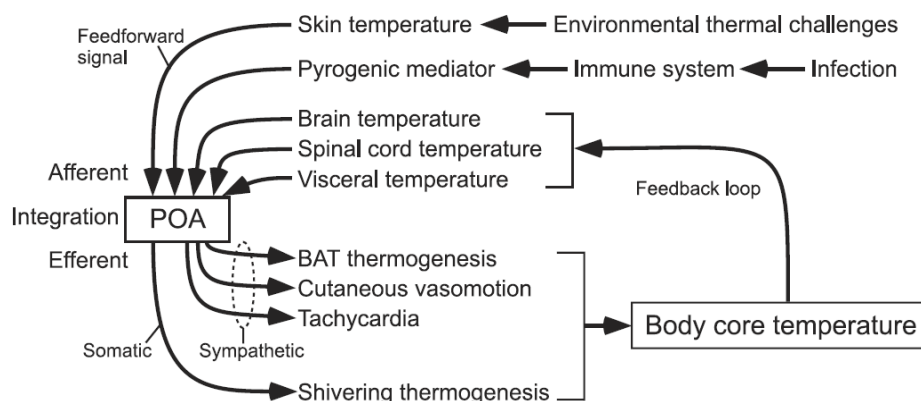


Figura 1: Mecanismos de controle da temperatura corporal em diferentes situações. Diversos estímulos participam de possíveis vias aferentes na termorregulação e o mecanismo central que controla o sistema está localizado na área pré-óptica do hipotálamo (POA). A partir daí, vários sinais eferentes dão início aos mecanismos de perda e ganho de calor, que geram um sistema de retroalimentação que regula todo a termorregulação (Extraído de Nakamura, 2011).

1.2 A febre e seus mecanismos

A referência à febre mais antiga existe em inscrições cuneiformes acadianas do século VI a.C., provavelmente derivados de um antigo pictograma sumério de um braseiro em chamas utilizado para simbolizar a febre e o aquecimento local da inflamação. Antigas teorias da patogênese da febre só surgiram séculos depois, quando médicos hipocráticos propuseram que a temperatura envolvia um delicado equilíbrio entre os quatro humores corporais – sangue, flegma, bile negra e bile amarela. A febre seria o resultado de um excesso da bile amarela, um conceito condizente com o fato de que muitas infecções naquela época causavam tanto febre quanto icterícia. Durante a Idade Média, adicionaram-se até mesmo possessões demoníacas como um dos mecanismos responsáveis pela febre. A origem e a prática do monitoramento da temperatura corporal remontam os primeiros séculos e só teve relevância clara e assimilação médica quando Carl Reinhold August Wunderlich publicou, em 1868, um estudo com mais de 25 mil pacientes ao longo de 16 anos, com mais de 1 milhão de registros de temperatura, no qual indicou a temperatura média basal do homem e suas variações diárias (Mackowiak, 2010; Sajadi *et al.*, 2012).

A febre é um estado fisiológico caracterizado por uma elevação da temperatura central acima de seus limites circadianos normais (IUPS, 2001). É um componente de uma série de respostas de defesa que ocorre quando agentes vivos ou inanimados entram no corpo e são reconhecidos como estranhos ou patogênicos pelo hospedeiro (Kluger, 1991). Muitas substâncias, de origem microbiana ou não, podem provocar estas respostas. Como a maioria delas se origina fora do corpo, são conhecidas como pirógenos exógenos e podem ser infecciosos ou não. No entanto, não são esses agentes os responsáveis diretos pela febre ou pelos demais fenômenos decorrentes. Depois de serem reconhecidas pelas células do sistema imune do hospedeiro, elas estimulam tais células a produzir e liberar certos fatores que, de fato, são os mediadores da resposta febril. Estes fatores são conhecidos com pirógenos endógenos (Roth e Blatteis, 2014).

1.2.1 A importância da febre

Do ponto de vista evolutivo, a febre surgiu como uma resposta adicional do hospedeiro à infecção na configuração de uma resposta a estresse térmico já estabelecida em animais superiores. Classicamente, considera-se que a febre é limitada aos animais homeotérmicos. No entanto, se a definição de febre for expandida a qualquer aumento na temperatura central estimulada por infecção ou lesão e alcançada somente por busca de fontes de calor externa, o conceito também inclui vertebrados poiquilotérmicos, artrópodes e anelídeos. Algumas drogas com ação antipirética em mamíferos também se mostram efetivas em bloquear a resposta de busca por calor em peixes infectados, répteis e alguns invertebrados, sugerindo que os mecanismos de febre em animais homeotérmicos e ectotérmicos podem estar relacionados. A persistência evolutiva da febre é ainda mais marcante quando considerado seu custo metabólico. Em humanos, o aumento da temperatura por tremor resulta na elevação da taxa metabólica em até 6 vezes e para cada 1°C a mais, o organismo necessita de 12% a mais de trabalho das atividades celulares (Hasday *et al.*, 2014).

A resposta febril é uma importante característica de infecções e processos inflamatórios, sendo moldada há muito tempo através da seleção natural. Muito se discute a respeito das vantagens e desvantagens da febre para o indivíduo. Acredita-se que o aumento de 1 a 4 graus na temperatura durante o processo febril estejam associados com melhora na sobrevivência do hospedeiro e na resolução de diversas infecções. Além disso, a resposta imune acontece de forma mais efetiva, com maior mobilidade de células polimorfonucleares, fagocitose mais eficiente e com prevenção da redução do *pool* de linfócitos (Launey *et al.*, 2011). O estresse térmico também induz a rápida expressão de proteínas de choque térmico (do inglês, HSP). Em adição ao seu efeito citoprotetor, as HSPs regulam negativamente o fator de transcrição nuclear NF-κB, consequentemente diminuindo a liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias (Schortgen, 2012). Entretanto, a febre não é completamente benéfica. O aumento da demanda metabólica e do consumo de oxigênio podem levar danos cardíacos e neurológicos, bem como danos colaterais em outros tecidos. Temperaturas extremas estão vinculadas a episódios de

convulsões em crianças. Nestas situações, as altas temperaturas levam a um pior prognóstico e a hipotermia é vista como um fator protetor (Romanovsky, 2007).

1.2.2 Indução de febre por lipopolissacarídeo

Muito do conhecimento atual a respeito dos mecanismos moleculares que controlam a febre vem de estudos nos quais roedores receberam LPS, componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, a fim de modular a termorregulação induzida pela resposta imune (Blatteis *et al.*, 2005). Na pesquisa experimental de febre, a utilização de roedores como animais experimentais e LPS como agente pirogênico refletem a preferência da maior parte dos estudos na área e de fato, a maioria do conhecimento atual sobre a fisiologia da febre é derivada deste modelo. As características da febre dependem da dose de LPS, sua via de administração, a temperatura ambiente, a idade, tamanho, período circadiano (e estral, para fêmeas) do hospedeiro desafiado e a sensibilidade pirogênica dos animais (Romanovsky *et al.*, 2005; Rudaya *et al.*, 2005). Quando essas condições são constantes, o LPS - em doses baixas ou moderadas – provoca uma febre prototípica e reprodutível que consiste em fases sequenciais, comumente com uma duração total de 5 a 8 horas. Em camundongos e ratos, independentemente da via de administração, o LPS induz três elevações sucessivas na temperatura dos animais, a primeira delas por volta de uma hora após a injeção do pirógeno. No entanto, essa fase primária pode não ser uma febre verdadeira, pois pode estar relacionada à alta sensibilidade dessas espécies ao manuseio físico que causa um aumento transitório da temperatura provocado por estresse (hipertermia emocional), consequência das manipulações inevitáveis associadas à instrumentação relativa à técnica (Roth e Blatteis, 2014).

A indução e manutenção da febre envolve uma relação coordenada entre a imunidade inata e os circuitos neuronais no sistema nervoso central e periférico. Tudo tem início com a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – por exemplo, LPS, RNA viral e carboidratos de origem fúngica – por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs), que são expressos por diversas populações de células imunes inatas, incluindo macrófagos, neutrófilos e células

dendríticas. Ao se ligar ao TLR4, o LPS induz a síntese de diversas citocinas pirogênicas endógenas, como IL-1, IL-6, TNF- α e quimiocinas, principalmente em células hematopoiéticas (Steiner *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007), que circulam por todo o corpo e atingem diversos tipos celulares no cérebro (astrócitos e células da glia), onde promovem o aumento da expressão da cicloxigenase-2, enzima responsável pela oxidação do ácido araquidônico que culmina na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂). Além da ativação clássica da via de TLR4, o LPS sofre *clearance* pelas células de Kúpffer, que constituem a maior população simples de macrófagos no corpo. A ativação desse grupo celular leva à produção primária de PGE₂ na periferia por um mecanismo dependente do sistema complemento. (Perlik *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006)(Figura 2).

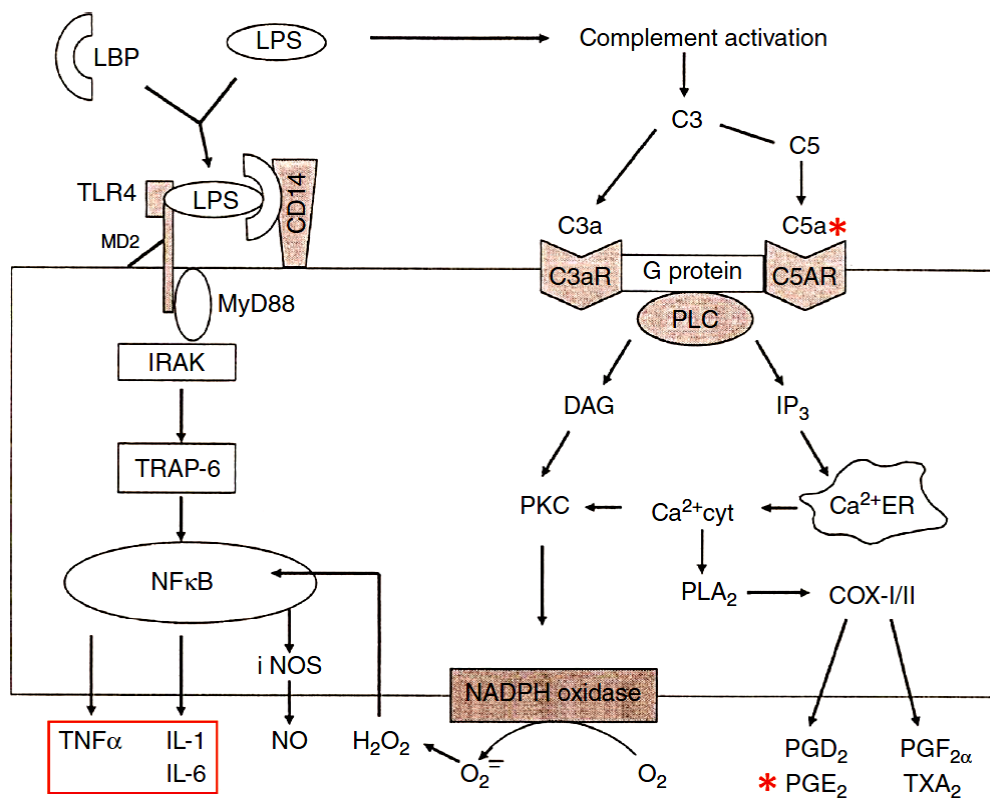


Figura 2: Estimulação de células de Kúpffer por LPS via TLR4 (esquerda) e via ativação do complemento (direita). A via mediada pelo complemento resulta na formação imediata de PGE₂. Isto ocorre pela hidrólise pela fosfolipase C (PLC), que é ativada por C5a, mas não por LPS ou citocinas. A liberação de ácido araquidônico (AA) pela PLC é 10 vezes mais rápida que aquela mediada pela fosfolipase A₂, a enzima ativada por LPS via TLR4. A subsequente conversão de AA em PGE₂ é catalisada por COX-1 e COX-2, ambas constitutivamente expressas nas células de Kúpffer. A via mediada por TLR4 induz a síntese *de novo* de citocinas pirogênicas, COX-2, iNOS e outras moléculas. Este processo leva pelo menos 30 minutos (Extraído de Roth e Blatteis, 2014).

Neste modelo, a PGE₂ produzida por células do endotélio vascular é considerada o principal mediador da febre. Este mediador lipídico responde aos sinais aferentes vindos de citocinas pirogênicas produzidas em resposta ao estímulo inflamatório, gerando sinais que envolvem neurotransmissores que aumentam a temperatura central. PGE₂ também é sintetizada precocemente na periferia por células hematopoiéticas ativadas pela ligação do LPS ao TLR4, atravessando a barreira hematoencefálica em seguida para dar início à resposta febril (Steiner *et al.*, 2006). A febre induzida por LPS ocorre por mecanismos autonômicos dirigidos pela ligação da PGE₂ ao receptor EP₃ (PTGER3, receptor 3 de prostaglandina tipo E), que é expresso por neurônios termorreguladores no núcleo pré-óptico mediano do hipotálamo (**Figura 3**). Animais endotérmicos aumentam sua temperatura através da liberação de noradrenalina, que aumenta a termogênese no tecido adiposo marrom e induz a vasoconstrição nas extremidades do corpo para evitar a perda passiva de calor (Lazarus *et al.*, 2007). Além disso, a sinalização central através da acetilcolina estimula a musculatura a converter a energia química em energia térmica, aumentando também as taxas metabólicas do organismo. Assim como animais ectotérmicos, os endotérmicos também manifestam comportamento de procura por calor que não requer a ação dos neurônios pré-ópticos, embora as vias neurais responsáveis pelo controle dos mecanismos comportamentais não estejam completamente esclarecidos (Almeida *et al.*, 2006).

1.2.3 Vias neurais para o estabelecimento da febre

A febre é a elevação da temperatura corporal regulada pelo cérebro que ocorre durante uma resposta inflamatória. Depois da administração periférica de LPS, a febre ocorre em diversas fases, cada uma representando a atividade de diferentes efetores termorregulatórios e um aumento distinto na temperatura central (Romanovsky *et al.*, 1998). As respostas febris são bloqueadas pela administração sistêmica de inibidores da COX e são ausentes em animais nos quais o gene *Ptges* – que codifica a enzima prostaglandina E sintase microssomal – foi deletado (Engblom *et al.*, 2003), indicando que estas respostas são mediadas pela prostaglandina E₂ (PGE₂). No entanto, a PGE₂ que medeia as diferentes fases da febre pode vir de diferentes fontes. A primeira fase da febre

por LPS é iniciada pela PGE₂ de origem periférica, visto que a neutralização da PGE₂ circulante por um anticorpo anti-PGE₂ bloqueia essa resposta (Steiner *et al.*, 2006b). O LPS age nos receptores TLR4 nas células de K upffer hepáticas e em macrófagos pulmonares, nos quais há o aumento da expressão de mRNA e proteínas para a fosfolipase A₂ (que produz ácido araquidônico), COX-2 e mPGES1, que resulta no aumento de PGE₂ tanto no sangue arterial quanto no venoso. A PGE₂ se liga   albumina, que a transporta e protege da inativa o enzimática. A PGE₂ pode se dissociar da albumina e ser transportada através da barreira hematoencefálica para seu local de a o por transportadores especializados que são expressos no hipotálamo (Ivanov e Romanovsky, 2004).

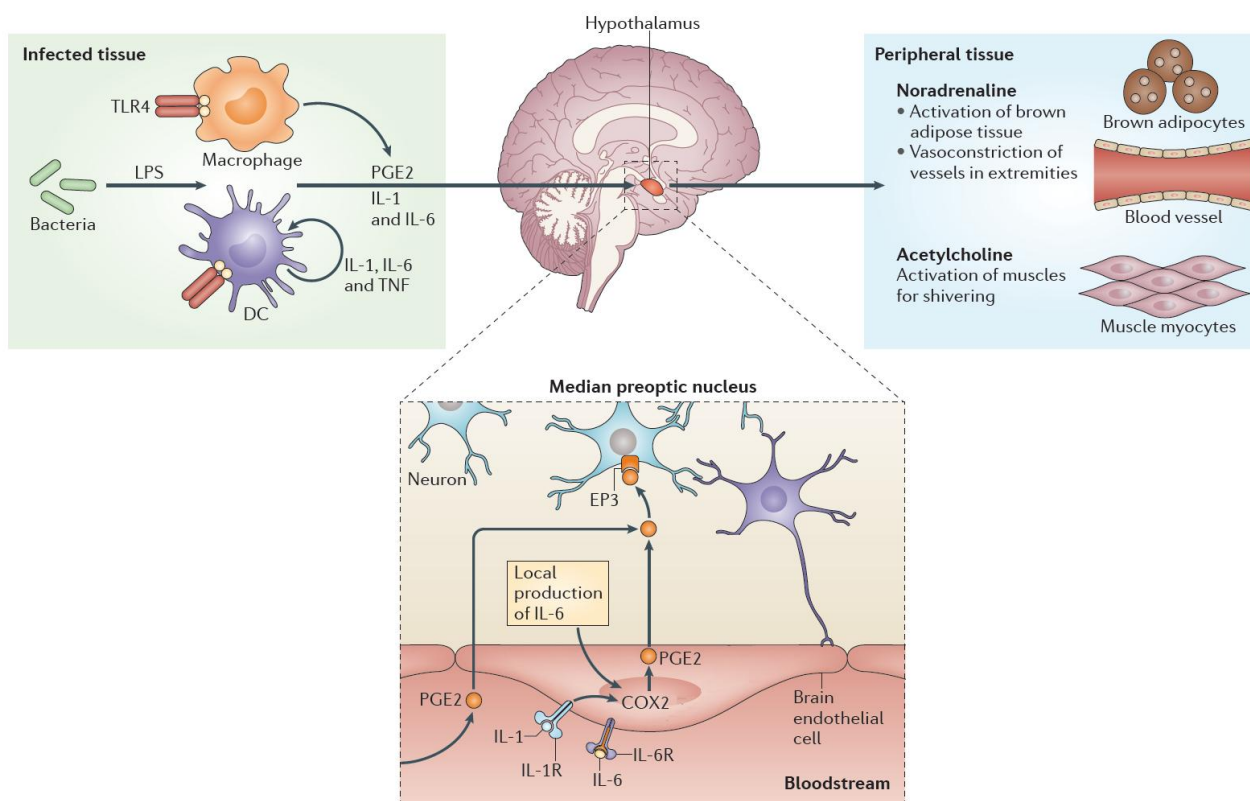


Figura 3: A indu o de febre durante a inflama o. O reconhecimento de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ou patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeo (LPS), por receptores do tipo Toll (TLRs) e outros receptores de reconhecimento de padrão levam   ativa o de células dendríticas e macrófagos. Essas células do sistema imune inato liberam prostaglandina E₂ (PGE₂) e citocinas pirogênicas (IL-1, IL-6 e TNF- ) que agem sistemicamente para induzir a febre. IL-6 opera com IL-1 no núcleo pr -optico mediano do hipotálamo para induzir a síntese de cicloxigenase-2 (COX-2), a enzima responsável pela produ o de PGE₂ adicional. Considera-se que PGE₂   o principal mediador da febre. Neurônios que expressam o receptor 3 da PGE₂ (EP3) ativam o sistema nervoso simpático para liberar noradrenalina, que eleva a temperatura corporal através da termogênese no tecido adiposo marrom e induzindo a vasoconstri o para prevenir a perda passiva de calor. Além disso, a acetilcolina contribui para a febre pelo estímulo de miócitos na gera o de tremor (Adaptado de Evans *et al.*, 2015).

As fases tardias mais proeminentes da febre – que começam cerca de uma hora após a administração de LPS e duram várias horas (Romanovsky *et al.*, 1998) – são mediadas pela PGE₂ produzida pela COX-2 nas células perivasculares e endoteliais (Matsumura *et al.*, 1998; Schiltz e Sawchenko, 2002). IL-1 β e baixas doses de LPS podem aumentar a expressão de COX-2 em células perivasculares, enquanto altas doses de LPS também aumentam a expressão de COX-2 em células endoteliais, principalmente em vênulas (Serrats *et al.*, 2010). A indução de COX-2 e mPGES1 no cérebro coincide com as fases tardias da febre. Embora estudos com camundongos deficientes tenham demonstrado os papéis indispensáveis de COX-2 e mPGES1 na febre induzida por LPS, a modulação célula-específica da expressão dessas enzimas é necessária para determinar a fonte celular da PGE₂. O efeito recíproco dos sistemas de transporte e degradação da PGE₂ também podem regular os níveis cerebrais de PGE₂ durante a febre (Ivanov e Romanovsky, 2004; Steiner *et al.*, 2005).

A PGE₂ atua em receptores neuronais da família EP no circuito termorregulatório para iniciar a febre (**Figura 4**). O receptor EP₃ é tido como o principal tipo responsável pela febre, mas os receptores EP₁ também contribuem em algumas condições. O receptor EP₃ ocorre em diversas isoformas e em roedores as isoformas α e γ são fortemente expressas no núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e acredita-se que participem da mediação do processo febril (Oka *et al.*, 2003; Vasilache *et al.*, 2007). A eliminação focal de receptores EP₃ no MnPO mostrou que sua presença é necessária para a febre após injeção sistêmica de LPS ou administração intracerebroventricular de PGE₂. Os neurônios que expressam os receptores EP₃ produzem GABA e acredita-se que eles inibam neurônios que acionam o aumento da temperatura central. Tipicamente, os receptores EP₃ α e γ inibem a função neuronal através da inibição da adenilato ciclase dependente da proteína G_i. Consequentemente, é provável que a ligação de PGE₂ aos receptores EP₃ reduz a atividade dos neurônios do MnPO, resultando em desinibição dos alvos responsáveis por elevar a temperatura central (Nakamura *et al.*, 2002; 2011).

A contribuição autonômica para a febre após a injeção sistema de LPS ou administração intracerebroventricular de PGE₂ conta primariamente com duas respostas: a

vasoconstrição cutânea (particularmente na pele da cauda, o principal meio que os roedores usam para induzir febre em um ambiente aquecido) e a ativação da termogênese no tecido adiposo marrom (utilizada pelos roedores em ambientes frios). Estas respostas são controladas por duas populações de neurônios pré-ópticos GABAérgicos que são sensíveis ao calor (isto é, disparam mais rápido quando aquecidos). Uma população neuronal, localizada principalmente no MnPO, regula a vasoconstrição da pele da cauda através de projeções para a rafe medular rostral (RMR), que por sua vez inerva neurônios pré-ganglionares simpáticos. Esses neurônios do MnPO que expressam receptor EP3 provavelmente estão envolvidos com a termorregulação basal. O outro grupo está localizado na área pré-óptica dorsolateral e regula a termogênese do tecido adiposo marrom através de projeções na região dorsomedial do hipotálamo (DMH), que também projeta para a rafe medular rostral (Tanaka *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009). Logo, em roedores, a PGE₂ inicia a conservação autônômica de calor e a produção de calor através da ação sobre receptores EP3 para reduzir a atividade de neurônios pré-ópticos GABAérgicos, dessa forma, desinibindo a ativação simpática da vasoconstrição da pele da cauda e a termogênese do tecido adiposo marrom.

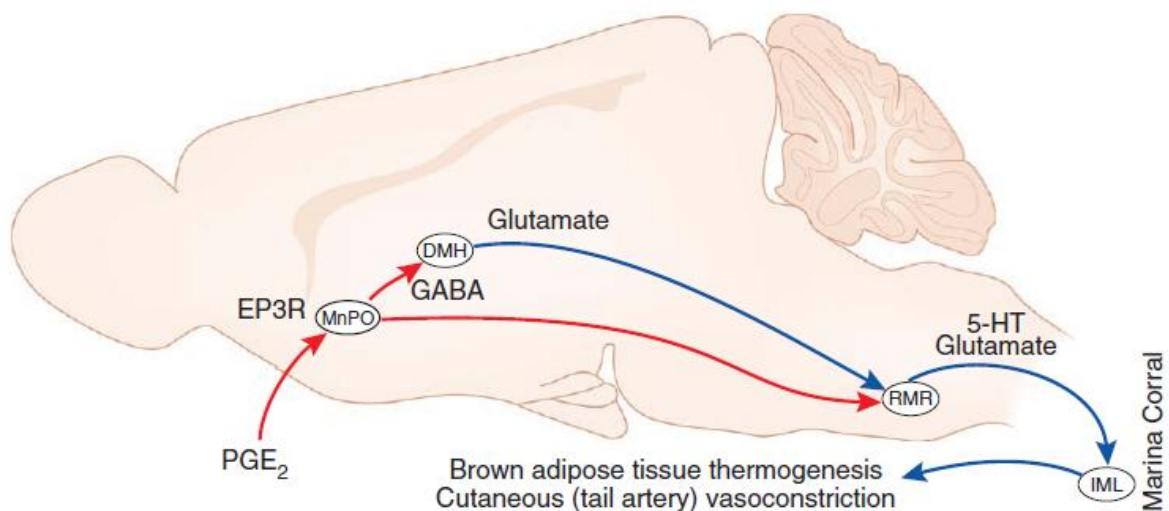


Figura 4: Vias neurais responsáveis pela febre durante inflamação sistêmica em resposta à prostaglandina E₂. A PGE₂ é produzida por células endoteliais e perivasculares ao longo de vênulas nas extremidades do cérebro, particularmente na área pré-óptica, onde age em receptores EP3 para inibir neurônios no núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Muitos desses neurônios são GABAérgicos e sua atividade inibe neurônios no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) e na rafe medular rostral (RMR) que age para aumentar a temperatura central. Os neurônios da RMR usam glutamato e serotonina (5-HT) para excitar neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da coluna espinhal (IML), que ativa o tecido adiposo marrom (para produzir calor) e leva à vasoconstrição cutânea (particularmente na artéria caudal, para conservar calor). Sendo assim, a PGE₂ no MnPO desinibe essas vias de produção e

conservação de calor, elevando a temperatura do corpo. Setas azuis indicam excitação e as vermelhas, inibição (Extraído de Saper *et al.*, 2012).

A febre por LPS também envolve muitos comportamentos termorregulatórios, incluindo a seleção por um ambiente de maior temperatura ou “busca por calor” (Almeida *et al.*, 2006). As vias neurais que controlam os comportamentos termorregulatórios diferem dos mecanismos termoefetores autonômicos. As vias não passam pela área pré-óptica, mas seguem vias talamo-corticais de sensibilidade térmica discriminatória. Ratos com lesões eletrolíticas na região pré-óptica mantêm um excelente comportamento termorregulatório, incluindo a habilidade de gerar febre após a administração de LPS, através da movimentação para um ambiente de temperatura elevada, mesmo que os mesmos animais sejam incapazes de montar respostas termorregulatórias autonômicas (Romanovsky, 2007; Nakamura, 2011).

1.2 A microbiota comensal e a homeostase do hospedeiro

As comunidades microbianas que colonizam os seres vivos são coletivamente conhecidas como “microbiota”. Estes comensais residentes são bem adaptados às condições ecológicas de seus hospedeiros e constituem um complexo ecossistema no qual as interações micro-organismo/hospedeiro, micro-organismo/ambiente e entre diferentes micro-organismos ditam a composição e dinâmica da comunidade. Como em todo ecossistema, as espécies comensais ocupam um nicho, são evolutivamente adaptadas, continuamente selecionadas por pressões ambientais e competem com outras espécies por recursos. Em mamíferos, a microbiota intestinal tem coevoluído para fornecer funções essenciais para os processos fisiológicos do hospedeiro, tais como a aquisição de nutrientes, o desenvolvimento e maturação do sistema imune e o reforço da barreira intestinal (Sassone-Corsi e Raffatellu, 2015).

O trato gastrointestinal é habitado por 10^{13} - 10^{14} micro-organismos, um número cerca de 10 vezes maior que a quantidade de células no corpo humano e 150 vezes mais genes que o nosso genoma (Gill *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010; Ohno, 2014). O número estimado de espécies varia muito, mas acredita-se que a microbiota em um adulto seja composta

de mais de 1000 espécies e mais de 7000 cepas (Ley *et al.*, 2006; Derrien *et al.*, 2015), espalhadas por toda superfície corporal (**Figura 5**). É um ambiente dominado por bactérias, principalmente anaeróbias estritas, mas também inclui vírus, protozoários, fungos e arqueia (Gill *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). A microbiota é amplamente definida por duas UTOs (unidades taxonômicas operacionais): *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, com *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* em menor abundância relativa (Eckburg *et al.*, 2005; Verdu *et al.*, 2015).

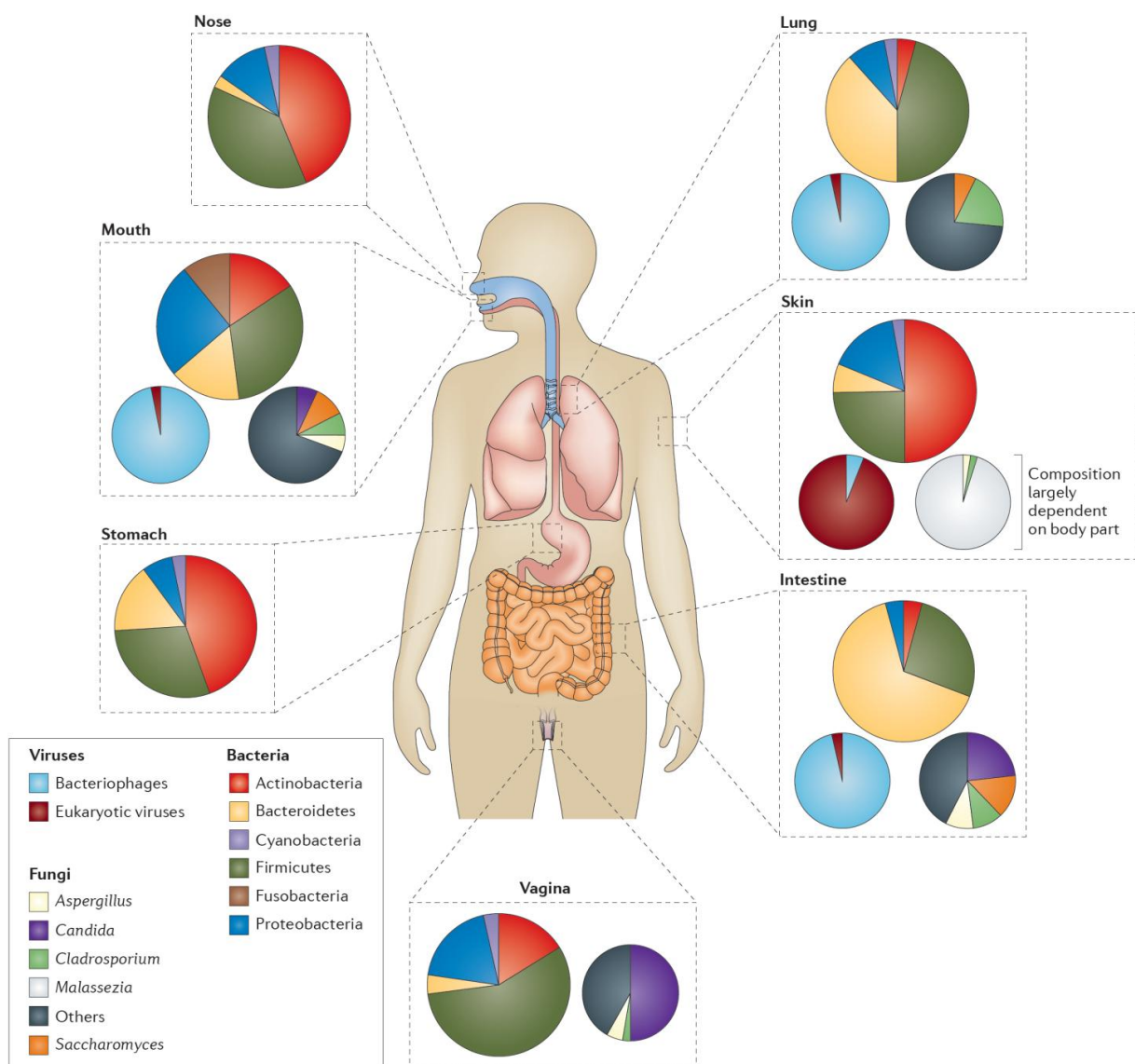


Figura 5. A composição da microbiota bacteriana, fúngica e viral em locais distintos do corpo humano. A figura mostra a abundância relativa das comunidades de bactérias, fungos e vírus nos

diferentes locais do corpo exposto ao ambiente externo. A composição bacteriana e fúngica é indicada pelas seis OTUs com maior representação (Extraído de Marsland e Gollwitzer, 2014).

Enquanto o conhecimento da diversidade microbiana aumenta, também cresce o interesse pelo seu desenvolvimento e variação longitudinal. A colonização de um ser humano, por exemplo, começa no nascimento quando o parto expõe o recém-nascido a uma complexa microbiota com uma “assinatura” materna característica e que se distingue em casos de parto normal ou por cirurgia cesariana (Palmer *et al.*, 2007; Adlerberth e Wold, 2009). O número e diversidade de anaeróbios estritos aumentam como resultado da dieta e do ambiente e depois de um ano de idade, a microbiota já começa a tomar proporções de um indivíduo adulto (Kurokawa *et al.*, 2007, Palmer *et al.*, 2007). Apesar da grande variação interpessoal da microbiota, há um equilíbrio que confere benefícios ao indivíduo e alterações nos micro-organismos ditos benéficos podem comprometer o bem-estar do hospedeiro (Cryan e O’Mahony, 2011). Muitos fatores podem alterar a microbiota como infecções, doenças, dieta e o uso de antibióticos, mas há a tendência de reversão à diversidade estável uma vez que o fator modificante seja removido do sistema (Forsythe *et al.*, 2010). De modo interessante, foi demonstrado que a microbiota de um indivíduo idoso é diferente daquela encontrada em adultos jovens e que as mudanças na composição microbiana relacionadas à idade são diretamente relacionadas a efeitos na saúde do hospedeiro (Claesson *et al.*, 2011).

1.2.1 Funções da microbiota comensal

Estudos com animais isentos de microbiota (*germ-free*, GF) têm sido cruciais no estabelecimento de um repertório de funções estruturais, metabólicas e protetoras que tem sido vinculado à microbiota (Janssen e Kersten, 2015). As consequências morfológicas do crescimento isento de germes são evidenciadas pelo ceco substancialmente aumentado, redução na área de superfície intestinal, menores placas de Peyer e vilos mais finos nesses animais quando comparados aos controles convencionais. Dessa forma, sabe-se que a microbiota é essencial para a motilidade normal do trato gastrointestinal, bem como para a manutenção da função clássica de

barreira. A reposição do epitélio intestinal é muito mais vagarosa em animais GF em relação aos seus controles, por exemplo (Abrams *et al.*, 1963; Shanahan, 2002).

Além disso, já há a demonstração de que o reconhecimento da microbiota comensal por receptores do tipo Toll (TLRs) são necessários para a indução da proliferação epitelial, acelerando o processo de reparo após lesão (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). A monoassociação de animais GF com *Bacteroides thetaiotamicron*, uma cepa representativa das bactérias da OTU dominante, leva à superexpressão de genes envolvidos na manutenção dos desmossomos e reforço da barreira intestinal (Hooper *et al.*, 2001). Em outro estudo, a ativação da via de sinalização por TLR2 aumenta diretamente a integridade epitelial através da translocação de proteínas envolvidas na junção celular (Cario *et al.*, 2004). Outro fator importante são as células de Paneth, que têm função secretora e se localizam na base das criptas no epitélio do intestino delgado. Essas células podem perceber a presença de bactérias no lúmen intestinal e com isso ativar a síntese de múltiplos fatores antimicrobianos, controlando a penetração de bactérias comensais e patogênicas. Também são conhecidas por expressar e liberar uma ampla variedade de peptídeos antimicrobianos, incluindo α -defensinas e lisozima C, mas precisam de uma microbiota completa para realizar essa tarefa (Hooper *et al.*, 2003; Vaishnava *et al.* 2008).

Diversos trabalhos com animais isentos de microbiota também revelaram que a microbiota é essencial para o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (do inglês, GALT) e de fato, tem um papel vital na formação de um repertório imunológico do trato gastrointestinal com secreção de IgA, tendo como consequência uma inflamação controlada em resposta à colonização bacteriana (Mayer, 2003; Quigley, 2008). Em comparação aos animais convencionais, os animais GF tem menos plasmócitos e IgA circulantes, menor expressão de marcadores de ativação de macrófagos intestinais, menor ativação de MHCII em células epiteliais, menor liberação de óxido nítrico e histamina no intestino delgado (Mikkelsen *et al.*, 2004; Sobko *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007). As placas de Peyer são reduzidas em número e tamanho e os linfonodos mesentéricos são menores e com menos células. No entanto, a reconstituição dos animais GF com microbiota intestinal é suficiente para restaurar o sistema imune da

mucosa (Umesaki *et al.*, 1995). Além disso, ligantes de bactérias comensais como polissacarídeo A, lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicoico (LTA) influenciam o desenvolvimento normal do sistema imune da mucosa (Mazmanian *et al.*, 2005). O mecanismo básico desse sistema é a imunidade inata e sua habilidade de distinguir micro-organismos potencialmente patogênicos dos antígenos inócuos através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Os receptores do tipo Toll são presentes nas células do sistema imune inato e reconhecem moléculas características chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, Akira e Hemmi, 2003). O reconhecimento de um patógeno por um TLR específico resulta em uma cascata de eventos começando com a ativação do sistema de sinalização por NF- κ B e resulta no aumento da produção de citocinas e ativação de células T. Contudo, na falta da microbiota residente, membros importantes da família dos TLRs estão em falta, comprometendo a resposta imune a ameaças patogênicas (Frosali *et al.*, 2015).

A microbiota também tem um papel crítico no suporte à digestão normal e metabolismo do hospedeiro. Há dois mecanismos pelos quais é possível maximizar a disponibilidade de nutrientes, tanto pela liberação de calorias por oligossacarídeos outrora indisponíveis ou pela modulação da absorção (Sekirov *et al.*, 2010). Uma fonte significativa de energia para os humanos é o metabolismo bacteriano das fibras da dieta em ácidos graxos de cadeia curta (Macfarlane e Macfarlane, 2003), que podem modular o equilíbrio energético do hospedeiro através da GPR41, uma proteína acoplada à proteína G que se liga aos ácidos graxos, cuja expressão é dependente da microbiota intestinal. A interação entre os ácidos graxos produzidos pelas bactérias e GPR41 aumenta os níveis circulantes de PYY, um hormônio enteroendócrino que reduz a motilidade intestinal levando ao aumento da absorção dos referidos ácidos graxos (Samuel *et al.*, 2008). Além disso, animais GF precisam de uma maior ingestão de calorias para manter o mesmo peso de animais convencionais e são susceptíveis à deficiências em vitaminas, sendo necessária a suplementação artificial com vitaminas dos complexos K e B, cuja síntese em animais convencionais é dependente da microbiota (Wostmann *et al.*, 1983; Hirayama *et al.*, 2007).

A prevenção da colonização por patógenos também é alcançada em grande parte através da microbiota residente pela competição por nutrientes e receptores e produção de compostos antimicrobianos (Sekirov *et al.*, 2010). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são bactérias gram-positivas e formam dois importantes gêneros da microbiota. Foi demonstrado que *Lactobacilli* inibem a infecção por *Listeria monocytogenes* através da combinação da produção e secreção de ácidos enquanto a inibição por *Bifidobacterium* foi associada a compostos proteicos secretados (Corr *et al.*, 2007a). Em outro estudo, uma cepa de *Lactobacillus salivarius* foi capaz de produzir uma bacteriocina *in vivo* que protegia os camundongos sujeitos à infecção com o mesmo patógeno (Corr *et al.*, 2007b).

1.2.2 A relação entre a microbiota e processo inflamatório

Apesar da natureza simbiótica desta relação, a associação tão próxima de uma comunidade microbiana tão abundante é um grande desafio à saúde do hospedeiro. As densas comunidades de bactérias no intestino (mais que $10^{12}/\text{cm}^3$ de conteúdo intestinal) são separadas dos tecidos corporais por uma camada epitelial de 10 μm por uma extensa área (~ 200 m^2 em humanos) (Hooper *et al.*, 2012). Embora já tenha sido demonstrado que a microbiota promove as funções antimicrobianas para neutrófilos e macrófagos (Starling e Balish, 1981), é necessário coletar mais informações sobre os efeitos da microbiota no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda. A inflamação é uma resposta essencial que permite a sobrevivência durante uma infecção ou lesão, na tentativa de manter a homeostase do tecido, mesmo sob uma diversa variedade de condições nocivas (**Figura 6**).

A fim de avaliar o papel da microbiota na modificação das respostas inflamatórias agudas, diversos experimentos foram conduzidos por nosso grupo de pesquisa utilizando animais isentos de microbiota. Por exemplo, quando submetidos à isquemia intestinal seguida de reperfusão, tais animais foram protegidos da resposta inflamatória massiva que se observou nos animais convencionais, colonizados. Além disso, os animais *germ-free* também foram resistentes à letalidade induzida por LPS (Souza *et al.* 2004). Ao contrário da resposta pró-inflamatória dos animais convencionais – evidenciada pela produção de

TNF- α , por exemplo – os animais isentos de microbiota respondem com alta produção de IL-10, uma citocina de caráter marcadamente anti-inflamatório (Souza *et al.*, 2007). No entanto, essa hiporresponsividade se traduz negativamente quando esses animais são expostos a agentes patogênicos. Animais GF são mais susceptíveis à infecção por certos micro-organismos. Quando desafiados com o enteropatógeno *Shigella flexneri*, esses animais mostram reduzida resistência à infecção e mortalidade aumentada em relação ao grupo convencional (Sprinz *et al.*, 1961). O mesmo padrão de hiporresponsividade se repete em infecções experimentais com *Trypanosoma cruzi* (Duarte *et al.*, 2005), *Listeria monocytogenes* (Zachar e Savage, 1979; dos Santos *et al.*, 2011) ou *Klebsiella pneumoniae* (Fagundes *et al.*, 2012a), que sucumbem à infecção já que a clássica resposta inflamatória a esses micro-organismos não é montada como ocorre nos animais convencionais.

Dessa forma, é possível postular que o hospedeiro mamífero pode estar em dois diferentes estados: o primeiro, “dormente”, é observado na fase não-colonizada, característica dos animais isentos de microbiota. Nesta fase, o hospedeiro tem a habilidade inata de produzir IL-10 e outras moléculas anti-inflamatórias ao sofrer um insulto, mantendo o hospedeiro em um estado de hiporresponsividade inflamatória. Por outro lado, a colonização pela microbiota indígena atenua este fenótipo de hiporresponsividade inflamatória. Em um estado “alerta”, o hospedeiro passa a ser capaz de gerar citocinas e demais mediadores pró-inflamatórios, além da promoção de recrutamento eficiente de leucócitos inatos durante lesões inflamatórias estéreis ou infecciosas (Fagundes *et al.*, 2012b).

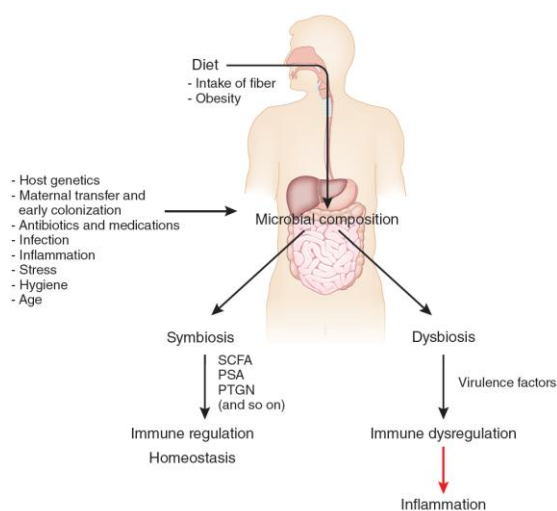


Figura 6: A dieta e outros fatores ambientais e do hospedeiro têm um grande efeito na composição da microbiota. Modelos sugerem que uma composição equilibrada resulta em simbiose, o que garante regulação das respostas imune e inflamatória através de produtos inflamatórios e/ou imunomoduladores como os ácidos graxos de cadeia curta, o polissacarídeo A e os peptidoglicanos (PTGN), que ajudam a manter a homeostase. A disbiose leva à desregulação do sistema imune pela falta de produtos microbianos benéficos e pelo aumento de fatores de virulência, que tornam o hospedeiro susceptível à inflamação (Extraído de Maloswski e Mackay, 2011).

1.3 Enzimas do grupo das fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K)

Desde sua descoberta nos anos 80, a família de quinases de lipídios chamada de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3Ks) têm sido associada a papéis reguladores importantes em muitos processos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Liu *et al.*, 2009). Como as maiores efetoras das vias dos receptores tirosina-quinase (RTK) e dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), as PI3Ks transmitem sinais de vários fatores de crescimento e citocina na forma de mensagens intracelulares, através da geração de fosfolipídios, que culminam ativando a serina-treonina quinase AKT (também conhecida como proteína quinase B, PKB) e outras vias efetoras. O supressor tumoral PTEN (fosfatase homóloga à tensina) é o regulador negativo mais importante da via de sinalização por PI3K (Hopkins *et al.*, 2014).

As PI3Ks são divididas em três classes de acordo com características estruturais e especificidade de substrato (**Figura 7**). Destas, as mais estudadas são as enzimas de classe I, ativadas diretamente por receptores de superfície celular. As PI3K de classe I podem ainda ser divididas em classe IA, ativadas por RTKs, GPCRs e alguns oncogenes como a proteína G RAS, e em enzimas da classe IB, que são reguladas exclusivamente por GPCRs (Burke e Williams, 2015).

As enzimas da classe IA são heterodímeros de uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora p85. A subunidade reguladora faz a mediação da ativação do receptor, ativação e localização da enzima. Em mamíferos, os genes das subunidades reguladoras de PI3K (PI3KR1, PI3KR2, PI3KR3) codificam as subunidades p85 α (e suas variantes de *splicing* p55 α e p50 α), p85 β e p55 γ , respectivamente. Este grupo de subunidades é coletivamente chamado de p85 (Bader *et al.*, 2005; Engelman *et al.*, 2006). Em resposta ao estímulo com fatores de crescimento e subsequente ativação de RTKs, PI3K é recrutada à membrana pela interação direta de sua subunidade p85 com motivos tirosina-fosfato nos receptores ativados ou a proteínas adaptadoras associadas aos receptores. A subunidade catalítica p110 gera fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que ativa múltiplas vias de sinalização (**Figura 8**).

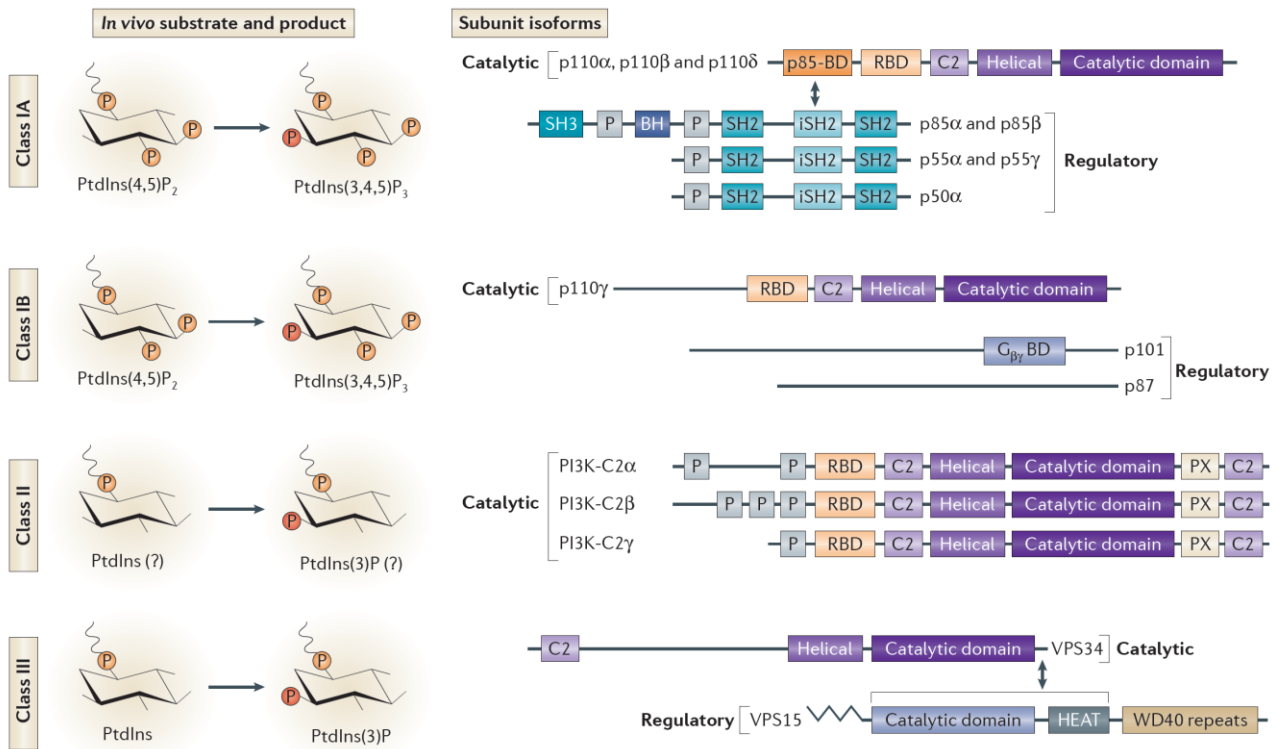


Figura 7: A família de enzimas PI3K, suas classes e isoformas. As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) são classificadas com base em suas estruturas e especificidades de substrato. In vivo, as classes IA e IB fosforilam fosfatidilinositol bifosfato e as classe III fosforila fosfatidilinositol. Enzimas da classe IA são heterodímeros com uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora do tipo p85. As isoformas catalíticas da classe IA têm um domínio de ligação a p85, um domínio de ligação a RAS (RBD), um domínio helicoidal e um domínio catalítico. As isoformas reguladoras p85 tem um domínio inter-SH2 que se liga às subunidades catalíticas, flanqueadas por domínios SH2 que se ligar a motivos YXXM fosforilados. As enzimas da classe IB são heterodímeros de uma subunidade catalítica p110 γ com uma subunidade reguladora p101 ou p87 (Adaptado de Liu *et al.*, 2009).

Já as enzimas da classe IB são constituídas de um heterodímero composto pela subunidade catalítica p110 γ e a subunidade reguladora p101 (Katso *et al.*, 2001). Duas outras subunidades reguladoras da classe IB – as proteínas adaptadoras p84 e p87 – foram descritas (Suire *et al.*, 2005; Voigt *et al.*, 2006). p110 γ é ativada diretamente por GPCRs através da interação de sua subunidade reguladora com a subunidade G $\beta\gamma$ das proteínas G triméricas (Katso *et al.*, 2001). p110 γ é expressa principalmente em leucócitos mas também é encontrada no coração, pâncreas, fígado e músculo esquelético (Chang *et al.*, 2007; Patrucco *et al.*, 2004; Sasake *et al.*, 2000).

As classes II e III das PI3K são menos estudadas. A primeira é representada por uma única subunidade catalítica, que usa preferencialmente fosfatidilinositol ou fosfatidilinositol-4-fosfato como substrato (Bader *et al.*, 2005 ; Engelman *et al.*, 2006). Há três isoformas de PI3K de classe II – PI3KC2 α , PI3KC2 β e PI3KC2 γ – que podem ser ativadas por RTKs, receptores de citocinas e integrinas, mas suas funções celulares ainda não estão claras. As PI3K de classe III também consistem em uma única subunidade catalítica VPS34, também conhecida como PI3KC3. VPS34 só produz fosfatidilinositol-3-fosfato, que é um importante regulado do tráfego pela membrana celular (Engelman *et al.*, 2006). VPS34 funciona como uma quinase de lipídios regulada por nutrientes que controla a sinalização através do alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), com um papel importante no desenvolvimento celular e na regulação da autofagia relacionada à escassez de nutrientes (Backer, 2008).

A geração de PIP3 a partir de PIP2 leva à ativação de diversas vias de sinalização, mediadas por outros grupos enzimáticos. Uma das vias mais relevantes e estudadas é a via por AKT. Trata-se uma serina-treonina quinase expressa em três isoformas – AKT1, AKT2 e AKT3 – codificadas pelos genes PKB α , PKB β e PKB γ , respectivamente (Scheid e Woodgett, 2001; Vivanco e Sawyers, 2002). As três isoformas dividem uma estrutura similar: um domínio N-terminal de homologia à pleckstrina (PH), um domínio catalítico central e um domínio regulador C-terminal. A ativação de AKT é iniciada pela translocação à membrana plasmática, que é mediada pela ligação do domínio de homologia à pleckstrina ao PIP3 na membrana. A mudança conformacional resultante expõe dois resíduos de aminoácidos cruciais para fosforilação (Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998). Tanto a fosforilação de T308 pela quinase dependente de 3-fosfoinositol (PDPK1) quanto a fosforilação de S473 por uma suposta PDPK2 são necessários para a ativação total de AKT. Alguns potenciais representantes de PDPK2 já foram identificados, como a proteína quinase C β 2, quinase dependente de DNA (DNA-PK) e a própria AKT (Scheid e Woodgett, 2001). Uma vez que AKT está fosforilada e ativada, ela fosforila muitas outras proteínas, regulando portanto uma grande variedade de processos celulares como síntese proteica, metabolismo, sobrevivência e proliferação celular (Manning e Cantley, 2007).

O fosfolipídio PIP3, gerado pela atividade das PI3K de classe I, é o segundo mensageiro chave que direciona diversas cascatas de sinalização que regulam processos celulares. Os níveis de PIP3 são firmemente regulados pela atividade de PTEN (fosfatase homóloga à tensina) (Hopkins *et al.*, 2014). PTEN, um importante supressor de tumores, antagoniza a atividade de PI3K através da atividade intrínseca de fosfatase que reduz a concentração de PIP3 convertendo-o de volta a PIP2 (**Figura 8**). A perda de PTEN resulta na sinalização descontrolada da via de PI3K, levando ao câncer (Cully *et al.*, 2006).

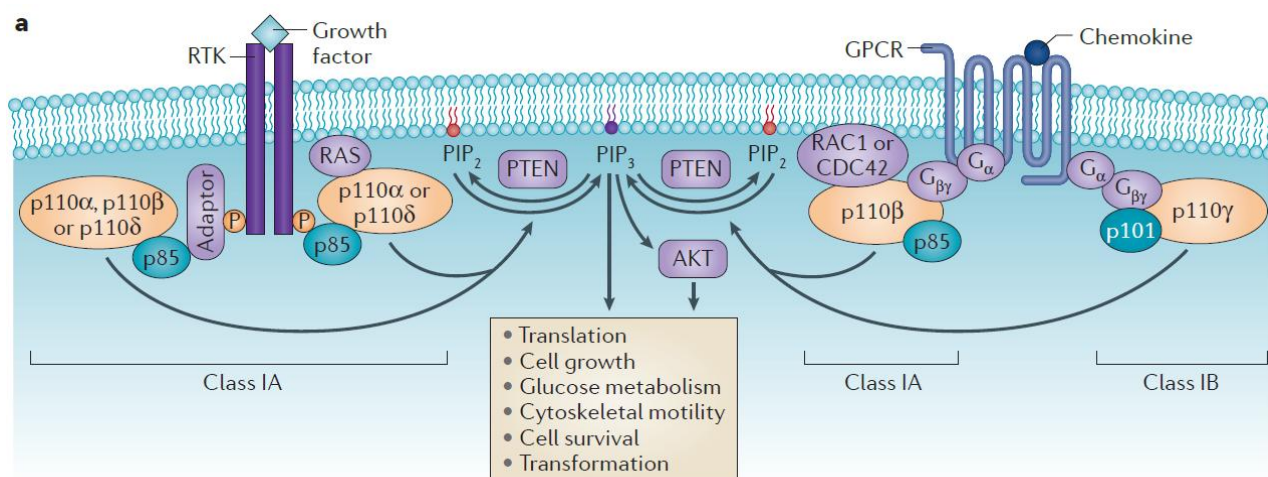


Figura 8: Sinalização pelas isoformas de PI3K da classes I. A partir da ativação de receptores tirosina-quinase (RTK) ou receptores acoplados à proteína G (GPCR), as fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) são recrutadas à membrana plasmática por interação com motivos YXXM fosforilados nos RTKs ou seus adaptadores ou ainda com subunidades G $\beta\gamma$ associadas ao GPCR. Neste local, as PI3Ks fosforilam o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para gerar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), um segundo mensageiro que ativa uma grande variedade de vias de sinalização dependentes ou não de AKT; tais vias regulam diversas funções celulares como metabolismo, movimentação, sobrevivência e transformação. A fosfatase lipídica PTEN remove o fosfato da posição 3' de PIP₃ para inativar a sinalização por PI3K de classe I. (Extraído de Thorpe *et al.*, 2015).

1.3.1 Papel da fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3K γ) na inflamação

Embora tenham desenvolvimento normal de neutrófilos, monócitos, células dendríticas e *natural killer*, camundongos deficientes para p110 γ tem defeitos funcionais relevantes (Koyasu, 2003). A classe IB de PI3K está crucialmente envolvida na migração de neutrófilos induzida por quimioatraentes, visto que os produtos de PI3K são essenciais na polarização celular e extensão de pseudópodes (Hirsch *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* também sugerem um papel importante para PI3K γ no endotélio inflamado,

no qual a perda de PI3K γ reduz o recrutamento inicial das células imunes inatas para o local da inflamação (Puri *et al.*, 2004; 2005).

Além disso, a deficiência em PI3K γ afeta diretamente o desenvolvimento e função das células T. Um menor número de timócitos foi observado em animais nocaute para p110 γ , pois morrem mais facilmente do que os timócitos selvagens, possivelmente porque os sinais para sobrevivência não são enviados na ausência da ativação de PKB (Sasaki *et al.*, 2000). PI3K γ também tem uma importante função na migração de células dendríticas para linfonodos para que realizem a apresentação de antígenos (Del Prete *et al.*, 2004; Comerford *et al.*, 2012). Em outros contextos celulares, as respostas desencadeadas por PI3K γ são essenciais nas vias subsequentes à ativação de receptores do tipo Toll (Condliffe *et al.*, 1998; 2005).

Dado o papel central de PI3K γ na promoção da resposta inflamatória, muitos estudos foram conduzidos a fim de investigar os efeitos da inibição genética ou farmacológica da enzima em diversos modelos de doenças inflamatórias em modelos murinos, *in vitro* ou *in vivo*, que podem ser extrapoladas para o ser humano, conforme revisado por Rückle e colaboradores (2006) (**Figura 9**). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa apontam um papel central da enzima no acúmulo de eosinófilos e sua manutenção frente a um estímulo inflamatório em um modelo de pleurisia alérgica (Pinho *et al.*, 2005), bem como no recrutamento neutrofílico nos pulmões mediado por CXCL1, C5a ou fMLP (peptídeos N-formilados)(Pinho *et al.*, 2007). PI3K γ também se faz importante na fisiopatologia da doença enxerto-versus-hospedeiro e na inflamação induzida por bleomicina, visto que a ausência ou bloqueio da enzima promoveu menor recrutamento e ativação leucocitária e conseqüentemente, melhores sinais clínicos e sobrevida de animais submetidos a tais modelos (Castor *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2011).

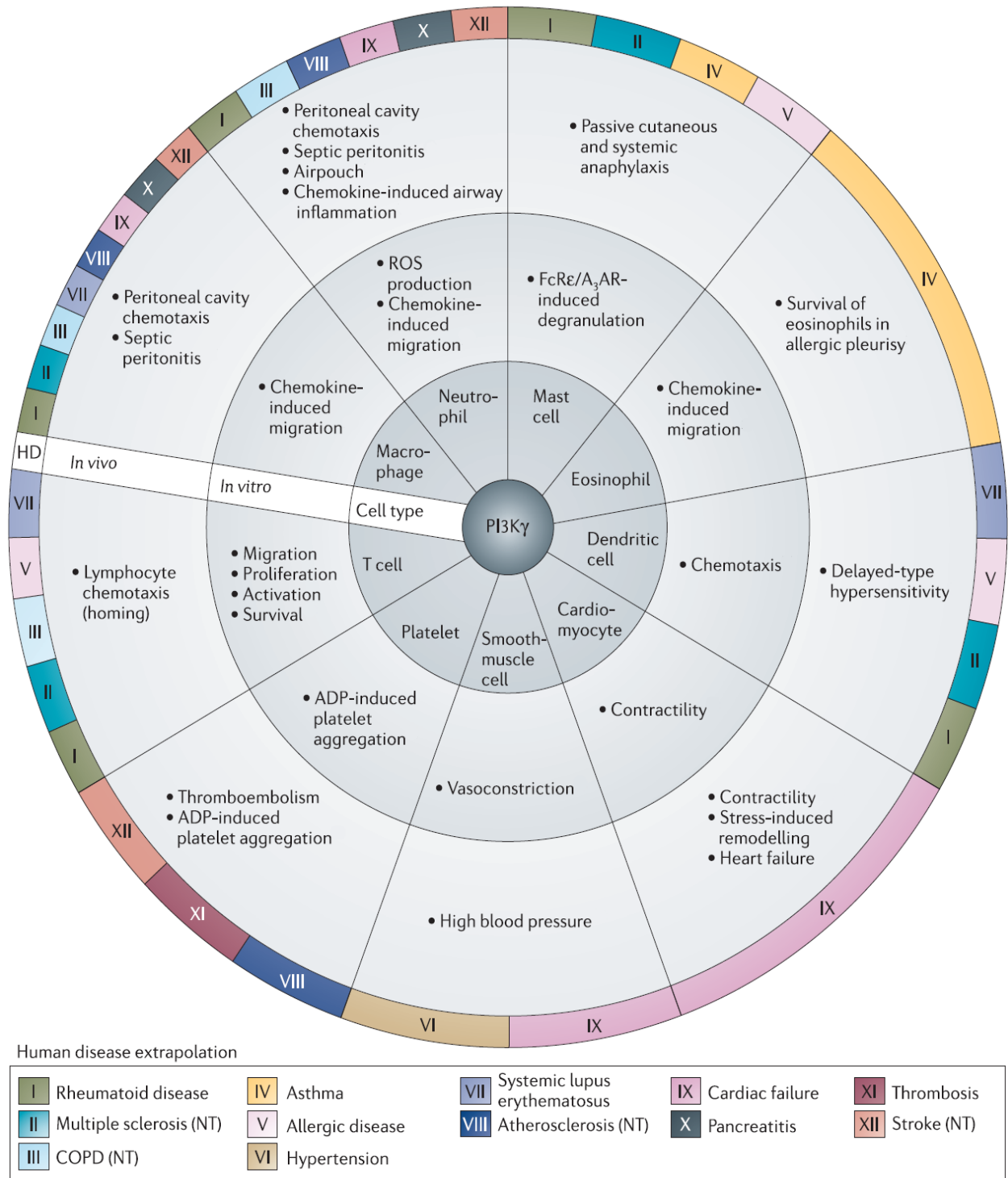


Figura 9: Compilação de processos bioquímicos que dependem da atividade da PI3K γ . Círculo interno: fenótipos celulares in vitro (por exemplo, quimiotaxia de neutrófilo). Círculo central, mecanismos correspondentes em modelos animais (por exemplo, recrutamento de neutrófilos ao peritônio com tioglicolato). Círculo externo: combinação de dois ou mais processos (por exemplo, recrutamento de neutrófilos e ativação de mastócitos), que podem ser extrapolados para doenças humanas de origem multifatorial (por exemplo, artrite reumatoide). A2AR, receptor de adenosina; COPD, doença pulmonar obstrutiva crônica; FcεR (receptor de complexo imune); HD, doença humana; NT, não testado em modelos animais; ROS, espécies reativas de oxigênio. (Extraído de Rückle *et al.*, 2006).

1.4 O fator ativador de plaquetas (PAF)

O fator ativador de plaquetas (PAF, 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) é um fosfolípido de grande potência, conhecido por seu papel central na causa de muitas doenças imunes e inflamatórias (Venable *et al.*, 1993). Do ponto de vista evolutivo, os registros de fósseis mais distantes indicam a presença de PAF em muitos protozoários, leveduras e bactérias, talvez exercendo um papel regulador. Conseqüentemente, muitos estudos identificaram a presença do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) em muitos tipos de células, especialmente aquelas envolvidas na defesa dos hospedeiros, como basófilos, mastócitos, macrófagos e monócitos, junto com neutrófilos, eosinófilos e células endoteliais (Imaizumi *et al.*, 1995).

O papel de PAF foi inicialmente descrito na literatura por Jacques Benveniste, imunologista francês que buscava descrever a relação da molécula com a histamina através de um processo dependente de IgE e como mediador da anafilaxia (Benveniste, 1974). Nos anos 60, experimentos com coelhos demonstraram o papel de PAF na liberação de histamina por mecanismos dependentes de antígenos e leucócitos, mediados através da termorregulação e homeostase de cálcio. Subseqüentemente, o papel de PAF na agregação e ativação plaquetária e o resultante aumento da permeabilidade vascular foram elucidados (Benveniste *et al.*, 1977).

PAF é produzido através de síntese rápida em resposta ao estresse, seja por remodelamento ou por uma via *de novo*, e não é armazenado dentro da célula. No remodelamento, a via é iniciada por mediadores inflamatórios e resulta na remoção de um ácido graxo do esqueleto fosfolípido pela fosfolipase A₂. Isso resulta na produção de um intermediário, lisofosfatidilcolina, que é transformado em PAF com a adição de um grupo acetil. O ácido graxo mais comumente acetilado é o ácido araquidônico. Já a síntese *de novo* envolve a adição de fosfolina da citidinafosfolina à posição sn-3 do 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerol (**Figura 10**)(Brock, 2009). PAF pode ser produzido por muitos tipos celulares em resposta a vários estímulos, embora sua geração por células endoteliais e plaquetas seja mais estudada. Essa molécula pode estar distribuída em muitos fluidos corporais, incluindo soro, salina e fluidos brônquicos, bem como em diversas células,

como queratinócitos, neutrófilos, monócitos e células de Küpffer (Chao e Olson, 1993). Para que PAF seja secretado, deve ser transferido para a membrana plasmática em um processo que ocorre através de proteínas transportadoras ou fusão de vesículas lipídicas (Venable *et al.*, 1993). O metabolismo do PAF é fortemente regulado por uma família de enzimas chamadas PAF-AHs (PAF acetil-hidrolases), que têm a habilidade de hidrolisar e inativar o composto através de remoção enzimática dos grupos acetil da posição sn-2 (Prescott *et al.*, 2000; Stafforini *et al.*, 1997).

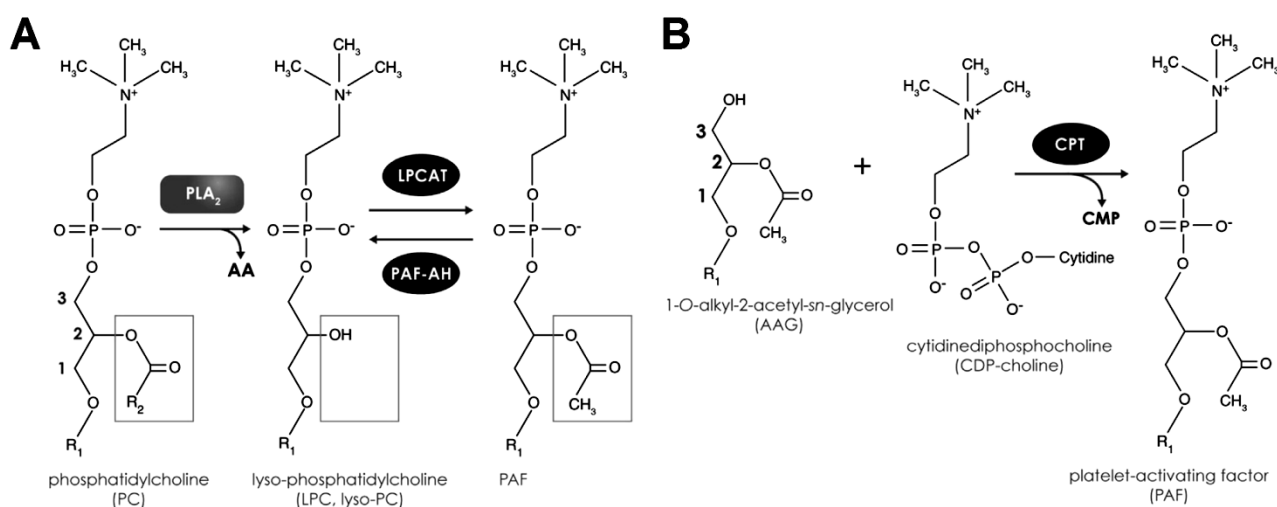


Figura 10: Síntese de PAF por (A) remodelamento e (B) síntese *de novo* (Adaptado de Gill *et al.*, 2015).

1.4.1 O receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) e sua ação

O receptor de PAF (PAFR) pertence à família de receptores da rodopsina, com sete domínios transmembrana e acoplado à proteína G. Nesta família, os resíduos críticos para a alocação do ligante estão localizados dentro dos domínios helicoidais na bicamada lipídica (Ishii e Shimizu, 2000). Através de um mecanismo ligado à proteína G_q, a ativação de PAFR inicia a hidrólise de PIP₂ mediada pela fosfolipase C, resultando em trifosfato de inositol e diacilglicerol. Isso leva a um aumento transitório da concentração de Ca²⁺ e à ativação da fosfoquinase C. A maior concentração de cálcio também ativa a fosfolipase 2α, levando à liberação de ácido araquidônico e lisofosfolípídeos, que servem como

substrato para eicosanoides e PAF, respectivamente (Honda *et al.*, 2002, Shimizu *et al.*, 1992) (**Figura 11**). A expressão de PAFR é regulada por AMP cíclico intracelular, que pode reduzir a expressão de mRNA de PAFR e diminuir a liberação de ácido araquidônico induzida por PAF (Thivierge *et al.*, 1996; Vadas e Perelman, 2012).

PAF exerce sua atividade ao se ligar em seu receptor, conseqüentemente ativando leucócitos, estimulando a agregação plaquetária e induzindo a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão celular (Ishii *et al.*, 2002; Farooqui *et al.*, 2007). Durante o processo inflamatório, PAF ativa leucócitos na parede dos vasos sanguíneos via adesão específica de moléculas expressas pelas células do endotélio. PAF também estimula a isoforma indutível de PLA2 e COX-2. COX-2 é codificada por um gene de expressão aguda e é responsável pela síntese de prostaglandina. Os receptores de PAF também estão envolvidos com a liberação de PGE₂ dos astrócitos. Esta liberação de prostaglandina E₂ está intimamente associada com a fisiopatologia da dor inflamatória (Watkins *et al.*, 2001). Em monócitos, a ativação de PAFR sinaliza a translocação de NF-κB para o núcleo e alterações na expressão gênica para respostas inflamatórias (Weyrich *et al.*, 1995). PAFR é constitutivamente presente em plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Sua expressão pode ser induzida por GM-CSF, IL-5 e n-butirato. Sua ativação nessas células culmina em agregação de plaquetas, adesão de leucócitos, motilidade, quimiotaxia, e geração de espécies reativas de oxigênio. Muitos desses efeitos envolvem a ativação de p38, ERK1/2 e MAP quinases. PAF também ativa células endoteliais, promovendo migração celular e estimulando a angiogênese. Além disso, PAF induz a expressão de diversos genes, incluindo a cicloxigenase-2, sintase indutível de óxido nítrico (iNOS), IL-6 e metaloproteinase 9 (Prescott *et al.*, 2000; Yost *et al.*, 2010). De modo importante, PAF é capaz de causar febre quando injetado por via intravenosa em ratos, na forma ligada à albumina. Mostra-se também importante na febre induzida por LPS, visto que a utilização de um antagonista específico de PAFR parece inibir o aumento de temperatura derivado do estímulo inflamatório (Ivanov *et al.*, 2003). A atividade fisiológica de PAF também está envolvida como uma grande variedade de outros processos incluindo reações alérgicas, função cerebral e distúrbios do sistema circulatório, como aterosclerose (Honda *et al.*, 2002). De modo relevante, PAF foi descrito como um potente pirógeno endógeno, além de também regular a hipotermia. No entanto,

sua participação na febre mediada por LPS ainda é confusa e merece maiores esclarecimentos (Ivanov *et al.*, 2003; Steiner e Romanovsky, 2015).

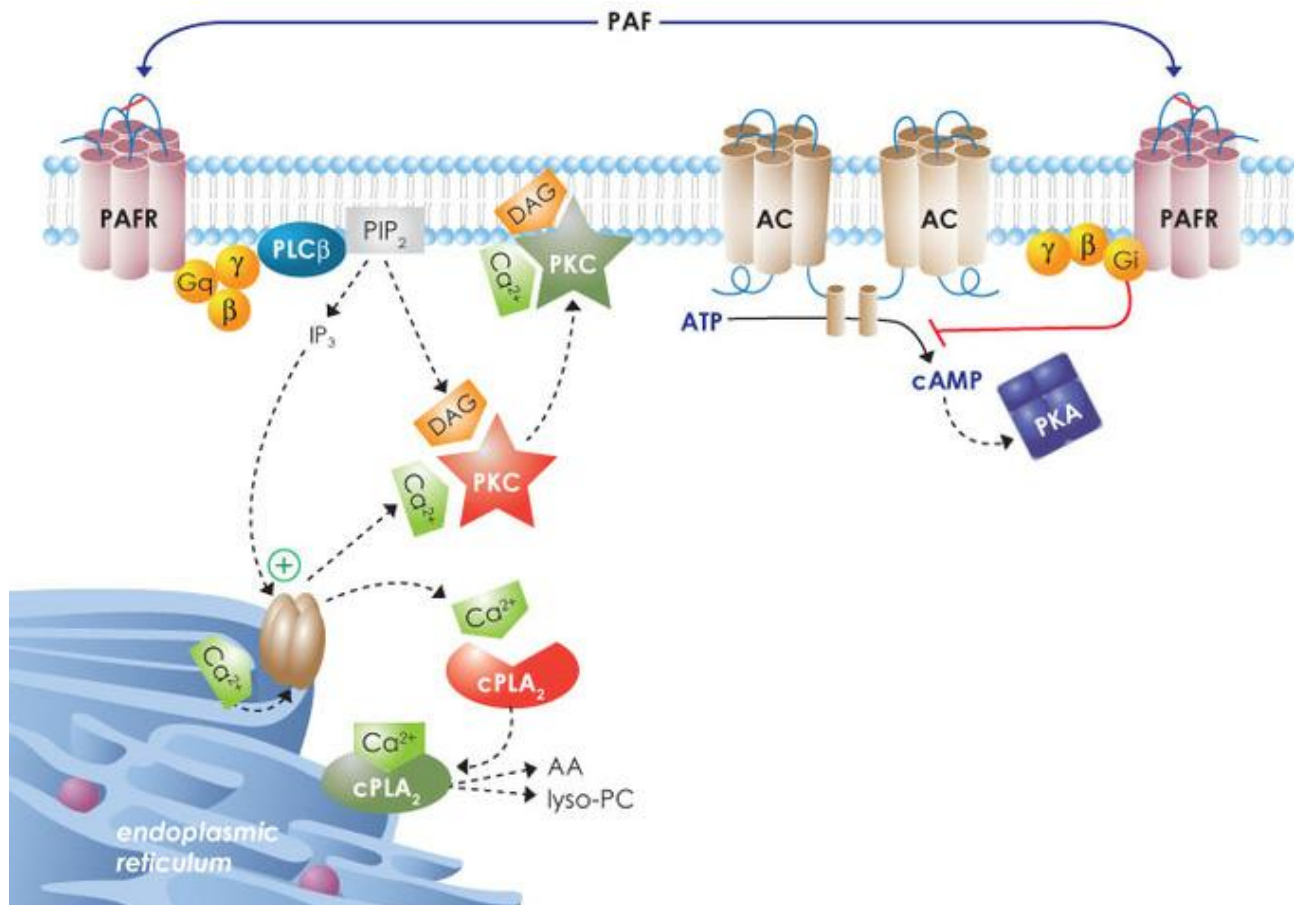


Figura 11: Sinalização intracelular pelo receptor do fator ativador de plaquetas. AA, ácido araquidônico; AC, adenilato ciclase; ATP, trifosfato de adenosina; cAMP, Monofosfato de adenosina cíclico; cPLA₂, fosfolipase A₂ citoplasmática; DAG, diacilglicerol; IP₃, trifosfato de inositol; PAF, fator ativador de plaquetas; PAFR, receptor de PAF; PIP₂, fosfatidilinositol-bi-fosfato; PKA, fosfoquinase A; PKC, fosfoquinase C; PLCβ, fosfolipase C β. (Adaptado de Brock, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A febre é parte importante do processo inflamatório, seja no contexto fisiológico ou infeccioso. Trata-se de um sinal cardinal de característica aguda e muitas vezes autorresolutiva. Apesar de sua relevância reconhecida, ainda há importantes lacunas entre o processo febril e importantes mediadores inflamatórios.

A microbiota comensal tem um papel importante ao primar o sistema imune e fornecer vantagens ao hospedeiro. Esse conjunto de micro-organismos prepara o organismo para reconhecer os simbioses e lutar contra os potenciais patógenos, visando à manutenção da homeostase do processo inflamatório entre as duas partes. Dentro da inflamação, duas importantes estruturas se destacam: o receptor do fator ativador de plaquetas, cuja ativação promove a migração celular e ativação de genes pró-inflamatórios e a enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama, que pode ser ativada pela ação de receptores de sete domínios transmembranas - como PAFR - e está envolvida em diversos processos celulares e também é parte importante de muitas vias de sinalização da resposta inflamatória, como a ativação de leucócitos e produção de citocinas. Contudo, ainda não há encaixe consistente entre essas peças do quebra-cabeça inflamatório e a indução de febre, sendo de grande importância a busca pela compreensão sobre o efeito da inflamação no processo fisiológico que é a febre.

Assim sendo, é evidente a importância dos referidos mediadores para o processo inflamatório. Contudo, os mecanismos e a participação de tais mediadores na indução de febre ainda não são claros. Portanto, este estudo abre novas perspectivas e ajuda a esclarecer os mecanismos inflamatórios associados ao processo de indução da febre.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos inflamatórios envolvidos na febre induzida por LPS. Por terem papéis centrais na resposta inflamatória, a hipótese é de que a microbiota comensal, a enzima PI3K γ e o receptor do fator ativador de plaquetas também participem do processo de indução de febre por LPS. Para isso, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- *Objetivo específico 1: avaliar o papel da microbiota comensal na indução de febre em um modelo experimental com camundongos isentos de germes,*
 - Comparar a variação de temperatura entre animais convencionais e *germ-free* (isentos de microbiota) após a administração de LPS;
 - Verificar o efeito da convencionalização dos animais *germ-free* na resposta inflamatória (estado febril);
 - Compreender a participação da microbiota através de sua redução por antibióticos;

- *Objetivo específico 2: verificar a participação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3K γ) na febre induzida por LPS e para isso:*
 - Aferir a variação de temperatura entre animais selvagens ou deficientes para o gene da PI3K γ após a injeção de LPS;
 - Avaliar a resposta inflamatória periférica e hipotalâmica através da avaliação das citocinas relevantes ao processo febril;
 - Tratar animais selvagens com o inibidor seletivo da enzima PI3K γ e em seguida, induzir febre com lipopolissacarídeo.

- *Objetivo específico 3: investigar a participação do receptor de PAF no protocolo experimental de febre induzida por LPS:*
 - Verificar a resposta febril induzida por LPS em animais com deleção do gene do receptor de PAF e em seus controles selvagens;
 - Avaliar o efeito do antagonista de PAFR na febre induzida por LPS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem C57BL/6 (doravante conhecidos como *selvagens*, ou *WT*) de 8 a 12 semanas, com peso entre 25 e 30 gramas. Também foram utilizadas duas variantes, da mesma linhagem: uma delas é deficiente para o gene da enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3K γ) e a outra tem deleção no gene do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR). Além desses, foram utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss (também chamados, neste documento, como *convencionais*) de 8 a 10 semanas, com peso entre 30 e 40 gramas. Em comparação ao grupo supracitado, também foram utilizados animais isentos de microbiota (denominados *germ-free* ou GF), de mesma idade e peso do grupo anterior.

Os animais das linhagens C57BL/6 e Swiss foram adquiridos no Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais deficientes para as proteínas PI3K γ e PAFR foram fornecidos pelo biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, no ICB/UFMG. Os animais isentos de microbiota foram cedidos pelo Laboratório de Gnotobiologia, do mesmo instituto. Os experimentos foram realizados em ambientes separados do local de alojamento. As gaiolas têm dimensões de 28x13x16 cm e receberam no máximo 6 animais, cada. A temperatura ambiente foi artificialmente ajustada para que fosse equivalente à zona termoneutra dos animais ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, Rudaya *et al.*, 2005) durante todo o protocolo experimental. Havia ventilação e ciclo determinado de luz (12 horas/claro-escuro). Os animais tinham acesso irrestrito a água e ração.

Além dessas condições, os animais isentos de microbiota foram alojados em microisoladores esterilizados e adaptados para que essa condição estéril fosse garantida durante todo o experimento. Todos os suprimentos fornecidos a esses foram previamente preparados e esterilizados em autoclave a vácuo.

Os projetos para utilização dos animais acima descritos foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/UFMG) e aprovados sob os protocolos 355/2012 (para experimentos com animais da linhagem Swiss e animais isentos de microbiota) e 214/2014 (para experimentos com animais da linhagem C57BL/6 e os grupos deficientes para PI3K γ e PAFR).

4.2 Aferição de temperatura abdominal e coleta de dados

A temperatura dos animais foi aferida por um sensor (SubCue Dataloggers– Calgary, Canadá) constituído de um microtermômetro digital, um *chip* e uma bateria de lítio, cobertos por silicone biocompatível e não imunogênico (Dow Corning 732), com uma massa de 2,5 gramas e 2,2 cm em sua maior dimensão. Um dia antes do implante, os sensores foram calibrados com o auxílio do *software* SubCue Analyzer. Nesta etapa, os sensores foram programados para serem ativados dois dias antes da indução de febre, registrando a temperatura de cada camundongo em intervalos de 15 minutos. No dia do implante, os sensores foram esterilizados em solução de glutaraldeído 2% por 30 minutos e profusamente lavados em seguida com PBS (salina tamponada por fosfato) estéril. Após a eutanásia dos animais, os sensores foram recuperados e o mesmo *software* supracitado foi utilizado para a coleta dos dados.

Foram realizados testes para verificação do protocolo de esterilização mais eficiente. Foram avaliados os seguintes protocolos (em triplicata): 1) imersão em álcool 70% por 30 minutos; 2) imersão em álcool 70% por 60 minutos; 3) imersão em glutaraldeído 2% por 30 minutos e 4) irradiação de luz ultravioleta, 30 minutos em cada lado. Em seguida, os sensores foram lavados com PBS estéril e colocados em frascos contendo 100 mL de caldo tioglicolato (meio microbiológico rico em nutrientes). O crescimento de microorganismos foi evidenciado pela turvação do meio, avaliado durante 15 dias. Apenas o tratamento com glutaraldeído mostrou-se eficiente durante todo o tempo avaliado, com ausência de turvação (dados não apresentados). Estratégias clássicas como vaporização com óxido de etileno, autoclavagem ou esterilização por radiação gama foram descartadas devido à sensibilidade dos componentes eletrônicos do sensor.

4.3 Protocolo experimental

No dia do implante, os animais foram pesados e aqueles que tinham massa inferior a 25 gramas não foram utilizados para o estudo, a fim de não provocar desconforto desnecessário devido ao implante do sensor (Johnston *et al.*, 2007). Os animais foram então anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), via intraperitoneal (100 µL). Assim que a anestesia geral surtiu efeito, foi realizada laparotomia mediana pela *linea alba*. Em seguida, o sensor de temperatura foi implantado na cavidade peritoneal e logo após, foi realizada laparorrafia com fio de seda 4.0. Após a intervenção cirúrgica, os animais foram colocados individualmente em isoladores e acompanhados quanto aos sinais vitais e possível constipação intestinal por 7 dias, tempo necessário para acomodação do sensor.

Após esse período de espera, os animais receberam uma injeção intraperitoneal ou intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* O111:B4; Sigma-Aldrich – Saint Louis, MO, EUA) diluído em salina estéril (NaCl 0,9%, apirogênica) em doses determinadas, com o propósito de induzir a resposta febril. A injeção intravenosa foi realizada pela veia caudal, com auxílio de um aparato de contenção cilíndrico com pistão (Braintree Scientific Inc., MA, EUA). Depois da estimulação, em tempos pré-definidos, os animais eram novamente anestesiados e uma nova laparotomia (no mesmo local da incisão anterior) foi feita a fim de recuperar o sensor de temperatura. A partir dessa incisão, foi coletado o sangue periférico através da punção da veia cava inferior. Após a eutanásia por deslocamento cervical, foram extraídos o hipotálamo e o tecido adiposo marrom (BAT) subescapular dos animais. Por centrifugação (5000 x g, 10 minutos, 4 °C) o plasma foi obtido do sangue e em seguida congelado a -20 °C até a avaliação da concentração de citocinas por ELISA. O hipotálamo e o BAT foram refrigerados a -80 °C até a extração de RNA, com posterior transcrição reversa e PCR quantitativa (qPCR).

Os animais isentos de microbiota foram testados quanto à esterilidade em duas ocasiões: a) após sua retirada dos isoladores centrais e b) um dia antes da estimulação com LPS. Esse teste era realizado através da incubação de fezes frescas em caldo tioglicolato e incubação a 37° C por 7 dias. Os animais com indício de colonização microbiana foram

descartados do estudo. Além disso, para esses animais, todo o procedimento de implante cirúrgico acima citado foi realizado dentro de cabine de segurança biológica classe II e todo material utilizado foi previamente esterilizado.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos com simbologia infectante, destinadas ao armazenamento intermediário em freezer, recolhida pela equipe de limpeza do ICB. Foram enviadas para abrigo interno específico para resíduo infectante e coletadas por caminhões próprios e destinadas ao aterro sanitário.

4.4 Intervenções farmacológicas

A droga AS605240 (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, EUA) é um inibidor seletivo da isoforma gama da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K γ) e foi administrada na forma de suspensão em carboximetilcelulose (CMC) 0,5%, por gavagem, na dose de 50 mg/kg (100 μ L), 60 minutos antes do estímulo com LPS (Pinho et al., 2007). Animais do grupo controle receberam o veículo (CMC 0,5%) pela mesma via. Também foi utilizado o fármaco PCA4248 (Tocris, Bristol, Reino Unido), que é um antagonista seletivo do receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFR). A droga foi inicialmente diluída em etanol P.A. (5% do volume final) e em seguida completada em q.s.p. com PBS 1X estéril, para uma dose final de 5 mg/kg. A injeção se deu de forma subcutânea na região lombar do animal (100 μ L), 60 minutos antes da injeção de LPS (Garcia et al., 2010). O grupo de animais controle recebeu o veículo (PBS com 5% de etanol) pela mesma via.

4.5 Convencionalização de animais isentos de microbiota

A fim de verificar se a resposta ao estímulo febril em animais *germ-free* artificialmente colonizados, foi realizada a convencionalização deste grupo de camundongos. Para isso, fezes de animais convencionais (Swiss/NIH) foram coletadas em microtubos estéreis e diluídas em PBS 1X estéril na proporção de 10% (p/v). Depois de homogeneizada, a suspensão fecal foi administrada aos camundongos GF por gavagem (100 μ L). Em seguida, os animais foram recolocados nos microisoladores adaptados e permaneceram

sem contato com o ambiente externo, recebendo água e ração estéreis. A cada sete dias, foi realizado um teste com caldo tioglicolato para verificar a eficácia da colonização intestinal. Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica classe 2A. Ao final de 28 dias, o experimento de indução de febre foi realizado.

4.6 Redução de microbiota comensal com antibióticos

Um grupo de animais da linhagem Swiss/NIH recebeu um tratamento com coquetel de antibióticos de amplo espectro, a fim de reduzir a microbiota comensal desses animais. Para isso, foi utilizado o protocolo adaptado de McDonald e colaboradores (2010), no qual foram utilizados: ampicilina (2 g/L), metronidazol (1 g/L), ciproflaxacina (0,2 g/L), vancomicina (0,5 g/L) e neomicina (2 g/L), com a inclusão de nistatina (0,12 g/L) para prevenir a proliferação fúngica. Os fármacos foram diluídos na água oferecida aos animais e a solução era renovada diariamente. As trocas de maravalha foram feitas constantemente para evitar a recolonização e a cada sete dias era realizado o teste com caldo tioglicolato para atestar a redução da carga microbiana. O tratamento foi mantido por 28 dias, incluindo o período do experimento de indução de febre. Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica classe 2A.

4.7 Quantificação de citocinas plasmáticas

A quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no plasma foi realizada pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando *kits* murinos específicos (R&D Systems - Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS estéril e adicionados em microplacas de 96 poços (Nunc Flat, Thermo Fisher Scientific – Waltham, MA, EUA) em um volume de 50 μ L por poço. Após a incubação a 4°C de um dia para o outro, as placas foram lavadas três vezes com solução PBS acrescida de 0,05% de Tween 20. Após as sucessivas lavagens e secagem das placas foram adicionados 100 μ l por poço do tampão de bloqueio (PBS com 1% de albumina séria bovina, BSA) seguido de incubação e agitação à temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados e em

seguida, 50 µL de cada amostra, previamente diluída em BSA 0,1% (em PBS) na proporção de 1:2. A curva padrão com as citocinas recombinantes foi preparada e incluída ao lado das amostras. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte, após repetido o processo de lavagem das placas, foram adicionados 50 µl por poço dos anticorpos de detecção biotinilados. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado novo ciclo de lavagem, seguido da adição de 50 µl por poço de solução de conjugado estreptavidina-HRP (*horse radish peroxidase*) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente submetidas ao ciclo de lavagem e então foi realizada a revelação pela adição de 50 µl por poço da solução de OPD (dicloridrato de ortofenilenodiamina) e peróxido de hidrogênio diluídos em tampão citrato. A incubação foi feita por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e a reação foi bloqueada adicionando 25 µl por poço de 1M H₂SO₄. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro com filtro de 492 nm e a concentração calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram apresentados como a concentração de proteína por mililitro de plasma.

4.8 Avaliação da expressão de genes envolvidos na resposta febril

A quantidade de transcrito referente aos genes responsáveis pela resposta febril (Tabela 1) foi avaliada por PCR quantitativa a partir de amostras do hipotálamo e do tecido adiposo marrom subescapular dos animais. Para tanto, os seguintes passos foram tomados.

4.8.1 Extração e dosagem de RNA

O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol[®] (Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas alterações do protocolo original. O tecido (hipotálamo ou BAT) devidamente acondicionado em tubo de 2,0 mL foi retirado da refrigeração a -80 °C e recebeu imediatamente 1,0 mL do reagente e em seguida, foi triturado com homogeneizador mecânico. Os tubos foram então deixados à temperatura ambiente por 5 minutos para a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos.

Depois, 200 μL de clorofórmio foram adicionados aos tubos, que foram agitados e novamente incubados à temperatura ambiente por 5 minutos para separação das fases. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Sobre essa fase aquosa foram pipetados 500 μL de isopropanol e em seguida, 5 μg de glicogênio estéril (Sigma-Aldrich – Saint Louis, MO, EUA) apenas para as amostras de hipotálamo. O glicogênio facilita a extração do RNA e visualização do *pellet* formado. Seguindo, os tubos contendo o RNA foram deixados por 24 horas a -20 °C, para precipitação a frio do ácido nucleico. Após o período citado, foi realizada centrifugação a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C, com a qual se obteve um pellet translúcido e claro no fundo do tubo. A solução de isopropanol foi descartada por inversão direta do tubo. O pellet foi então lavado por duas vezes através da adição ao tubo de 1 mL de álcool etílico a 75% (em água ultrapura livre de RNase) seguida de centrifugação a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. Depois disso, a solução sobrenadante foi descartada por inversão e o tubo foi deixado à temperatura ambiente até que não houvesse resquícios ou gotículas de álcool em seu interior. Em seguida, foram adicionados 20 μL de água ultrapura livre de RNase e o tubo foi aquecido a 60 °C para facilitação da dissolução do pellet. Em seguida, o tubo contendo o RNA em solução foi levado ao *freezer* e armazenado a -80 °C até o próximo passo.

Para a dosagem do RNA extraído, os tubos contendo as amostras foram deixados em gelo para que descongelassem. Em seguida, a quantificação e avaliação do RNA obtido foi feita através do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific – Waltham, MA, EUA). A concentração era obtida em $\text{ng}/\mu\text{L}$ e também eram observadas as relações de absorvância entre os comprimentos de onda de 260 nm/230 nm e 280 nm/260 nm, cujos valores variando entre 1,8 e 2,0 são indicativos de amostras de boa qualidade.

4.8.2 Transcrição reversa

De posse dos valores de concentração, as amostras foram diluídas em água ultrapura livre de RNase para que todas contivessem 2 μg de RNA em 10 μL de solução. Sobre esse volume foram adicionados 2 μL de OligoDT (5'-(TTT)⁵-3'), uma sequência curta de

15 bases de timidina, que se anela à cauda de poliadenina do RNA mensageiro. O tubo contendo os 12 µL foi aquecido a 70° C por 5 minutos e em seguida, acondicionado imediatamente em gelo. Sobre esse volume foram adicionados 8 µL de uma mistura contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III, inibidor recombinante de ribonuclease (RNase Out) (Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), um agente redutor para proteção da reação (ditiotretitol, DTT, 1 mM) e o tampão concentrado da mesma enzima. A solução final de 20 µL foi levada ao termociclador e mantida a 25°C por 5 minutos, 50° C por 90 minutos, 70° C por 15 minutos e em seguida, 4° C. O cDNA resultante foi diluído em 1:5 em água ultrapura livre de DNase e armazenado a -20° C até o uso.

4.8.3 PCR quantitativa (qPCR)

Antes de avaliar as alterações de expressão dos diferentes genes abordados, foram realizadas curvas-padrão para averiguar a eficiência dos iniciadores responsáveis pela amplificação dos genes de expressão constitutiva. Diluições seriadas em triplicata foram feitas para os genes *Rn45s*, *Gapdh*, *Hprt* e *Rpl4*. Os dados obtidos com as amplificações foram introduzidos no algoritmo *NormFinder* (Andersen *et al.*, 2004), que avalia a estabilidade de expressão e indica qual o melhor gene (ou combinação de genes) para a normalização dos resultados.

Para a condução da qPCR, foi feita inicialmente uma solução com o reagente Power SYBR® Master Mix (Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) – que contém nucleotídeos livres, corante intercalante SYBR® Green, enzima DNA polimerase e seu respectivo tampão – e os pares de iniciadores (**Tabela 1**, Integrated DNA Technologies – Coralville, IA, EUA) em uma concentração final de 0,5 µM. Um volume de 8 µL desta solução foi distribuída em placa de 96 poços e em seguida as amostras diluídas de cDNA foram adicionadas aos poços em duplicata. A reação aconteceu com o auxílio do instrumento 7500 Fast (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), com programa de reação de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95° C por 60 segundos e 60° C por 60 segundos), seguido de curva de dissociação. Os resultados, dados pelo ciclo limitante (*threshold cycle*, C_T), foram calculados através do método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001),

normalizados pela expressão do gene da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) para o hipotálamo ou da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para o tecido adiposo marrom subescapular. Os valores finais são apresentados em variação numérica linear (aumento ou redução) em relação à mesma.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados quanto às diferenças significativas entre os grupos por meio do teste *t* não pareado com teste *post-hoc* de Mann-Whitney ou análise de variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Newman-Keuls, utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados para avaliação de expressão de transcritos por PCR quantitativa, com as sequências e tamanho do fragmento gerado.

Gene	Proteína	Sequências dos iniciadores		Fragmento (pb)	Referência
		Senso/Forward	Antissenso/Reverse		
<i>Rn45s*</i>	18S	5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3'	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'	110	Garcia CC <i>et al.</i> , 2010
<i>Gapdh*</i>	GAPDH	5'-ACGGCCGCATCTTCTTGCA-3'	5'-CGCAATCCGTTACACCGA-3'	75	Dorner M <i>et al.</i> , 2011
<i>Hprt*</i>	HPRT	5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT-3'	5'-GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC-3'	163	Amaral FA <i>et al.</i> , 2007
<i>Rpl4*</i>	RPL4	5'-TCCCTCAAGAGTAACTATAACCTGCCC-3'	5'-TGGTGCTCGGAGGGCTCTTTG-3'	102	Original
<i>Ptgs2</i>	COX-2	5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3'	5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'	194	Arita M <i>et al.</i> , 2005
<i>Ptger1</i>	EP ₁ R	5'-CAGAAGCTAAGTCAAACCATT-3'	5'-CCCTAGGCACACTGAGTTTGAGA-3'	69	Nasrallah R <i>et al.</i> , 2007
<i>Ptger2</i>	EP ₂ R	5'-GGGAAAGCCCAGCCATCAG-3'	5'-CAGTGCATGAGATTCCC-3'	65	Nasrallah R <i>et al.</i> , 2007
<i>Ptger3</i>	EP ₃ R	5'-GCTGGCCATGCTGCTCGTG-3'	5'-GGAAAGACTTCTTGCCTTGCT-3'	65	Nasrallah R <i>et al.</i> , 2007
<i>Ptger4</i>	EP ₄ R	5'-TGTACGCCGGCTTCAGCTC-3'	5'-CGCACACCAGCACGTTGC-3'	63	Nasrallah R <i>et al.</i> , 2007
<i>Il1b</i>	IL-1β	5'-CTACAGGCTCCGAGATGAACAAC-3'	5'-TCCATTGAGGTGGAGAGCTTTC-3'	79	Kim YH <i>et al.</i> , 2012
<i>Il6</i>	IL-6	5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3'	5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'	123	Jimeno R <i>et al.</i> , 2010
<i>Il10</i>	IL-10	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'	5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'	105	Amaral FA <i>et al.</i> , 2007
<i>Ppargc1a</i>	PGC-1α	5'-GGAGCCGTGACCACTGACA-3'	5'-TGGTTTGCTGCATGGTTCTG-3'	176	Villena JÁ <i>et al.</i> , 2007
<i>Ptges</i>	PTGES	5'-GAAGAAGGCTTTTGCCAACC-3'	5'-TCCACATCTGGGTCACTCCT-3'	78	Ninomiya Y <i>et al.</i> , 2007
<i>Tnf</i>	TNF-α	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-AGATAGCAAATCGGCTGACG-3'	138	Kumar S <i>et al.</i> , 2012
<i>Ucp1</i>	UCP-1	5'-ACCCGAGTCGCAGAAAAGAAG-3'	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGA-3'	75	Becerril S <i>et al.</i> , 2010

*Genes de expressão constitutiva, utilizados para normalização dos dados. 18S: subunidade ribossomal; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; HPRT: hipoxantina-guanina fosforiltransferase; RPL4: proteína ribossomal L4; COX-2: ciclooxigenase-2; EP₁R: receptor 1 de prostaglandina E; EP₂R: receptor 2 de prostaglandina E; EP₃R: receptor 3 de prostaglandina E; EP₄R: receptor 4 de prostaglandina E; IL-1β: interleucina 1β; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10; PGC-1α: coativador 1-α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo; PTGES: prostaglandina sintase endossomal; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; UCP-1: proteína desacopladora 1 (termogenina).

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento da técnica

Para o estabelecimento do implante e da dose de LPS, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (n=6 por grupo). Uma semana antes do experimento, os sensores foram calibrados e implantados no flanco direito do peritônio dos animais, que foram mantidos em zona termoneutra ($28 \pm 1^\circ \text{C}$) até a eutanásia. No dia dos testes, os animais receberam doses intravenosas ou intraperitoneais (100 μL) de LPS nas doses de 10, 100 ou 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou uma solução de cloreto de sódio 0,9% (estéril e apirogênica) para os grupos controle (**Figura 12**).

Quando administrado por via intraperitoneal ou intravenosa, o veículo (NaCl 0,9%) não causou alterações na temperatura basal do animal ($y = 0$) ao longo das 6 horas. A injeção intraperitoneal do LPS nas três doses estudadas levou a um aumento significativo de temperatura de $\sim 0,5^\circ \text{C}$, entre a segunda e quarta horas (**Figura 12A**). A administração intravenosa de LPS levou a um processo febril mais tardio (entre a terceira e sexta horas), porém mais relevante, com aumento de temperatura de $\sim 1,5^\circ \text{C}$ em relação à marca basal (**Figura 12B**). Não houve diferença de temperatura entre as três doses de LPS para as duas vias de injeção testadas.

Devido ao caráter mais expressivo da resposta febril ao LPS e pela menor dispersão dos dados obtidos, a via intravenosa com a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi escolhida para prosseguir com o modelo em animais Swiss e em animais isentos de microbiota (*germ-free*, GF). Assim como verificado nos ensaios de estabelecimento, o pico de febre foi observado 6 horas após a injeção do pirógeno exógeno. Portanto, foi esse o tempo utilizado para o acompanhamento da temperatura nesses animais. No entanto, a temperatura de ambos os grupos também foi acompanhada por 24 horas para certificar que a febre nos animais isentos de microbiota não era atrasada em relação aos convencionais (**Anexo 2**).

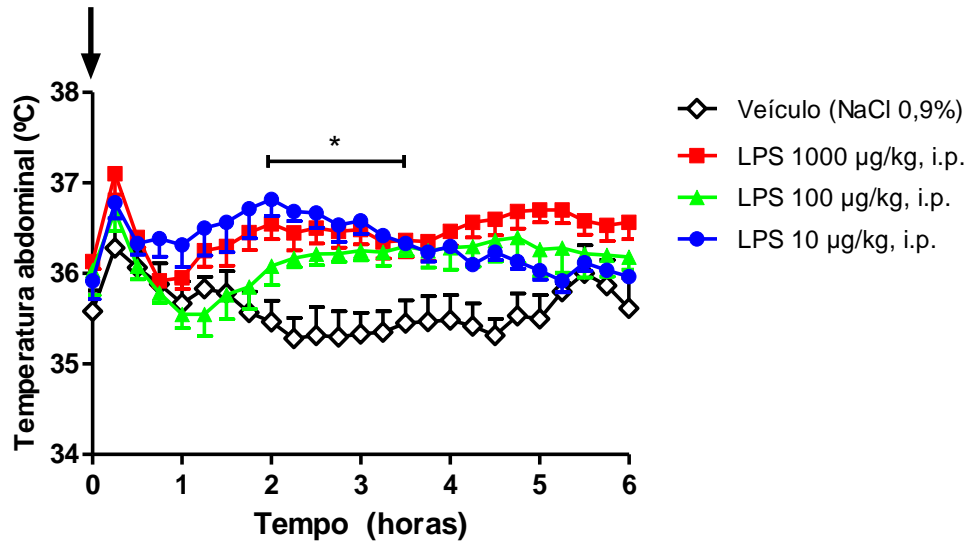
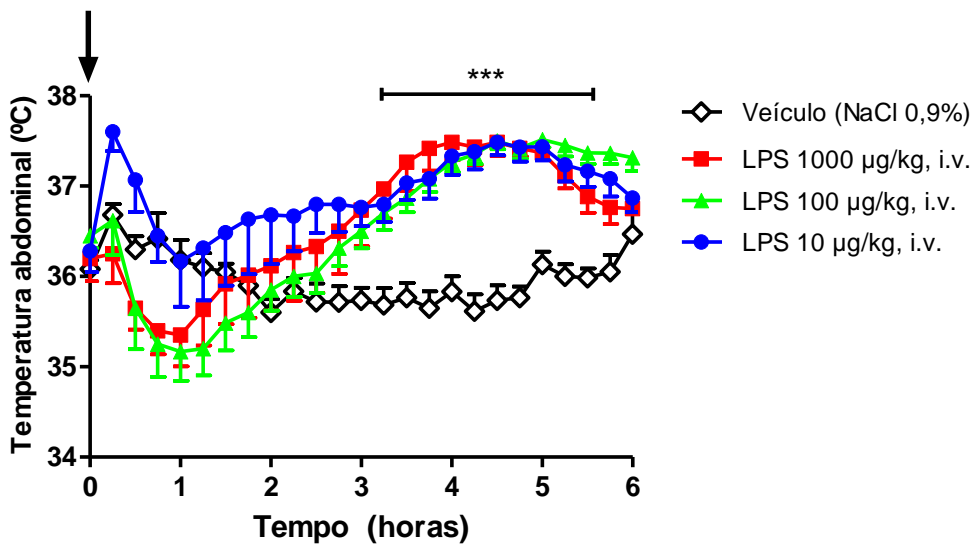
AInjeção i.p. de
veículo ou LPS**B**Injeção i.v. de
veículo ou LPS

Figura 12: Animais da linhagem Swiss têm aumento de temperatura quando injetados com LPS e a resposta pela via intravenosa é mais pronunciada que a intraperitoneal. Foi realizado o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem Swiss submetidos a estímulo febril com LPS. Registro de temperatura após injeção intraperitoneal (A) ou intravenosa (B) de LPS, nas doses de 1000, 100 ou 10 µg/kg, ou seu veículo. * Valor $p < 0,05$ em teste ANOVA de duas vias, representativo para as três doses em relação ao grupo veículo; *** Valor $p < 0,001$ em teste ANOVA de duas vias, representativo para as três doses em relação em grupo veículo. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).

5.2 Efeito da microbiota comensal na febre provocada por lipopolissacarídeo

Com o propósito de verificar o papel da microbiota comensal no processo de indução de febre por LPS, foram utilizados animais isentos de microbiota (*germ-free*), bem como a redução dessa microbiota em animais convencionais através do uso de antibióticos.

5.2.1 Animais isentos de microbiota não têm febre após injeção de LPS

Os dois grupos de camundongos que receberam o veículo não tiveram aumento na temperatura. Os camundongos convencionais que receberam a dose intravenosa de LPS tiveram aumento da temperatura, significativamente maior que o grupo controle a partir da terceira hora, mantendo o nível até o término do acompanhamento (**Figura 13A**). Entretanto, animais isentos de microbiota não tiveram nenhum sinal de febre durante as 6 horas de aferição pós-estímulo. Esse padrão de hiporresponsividade também pode ser representado através da área sob as curvas de temperatura, tendo o ponto basal médio como referência (**Figura 13B**).

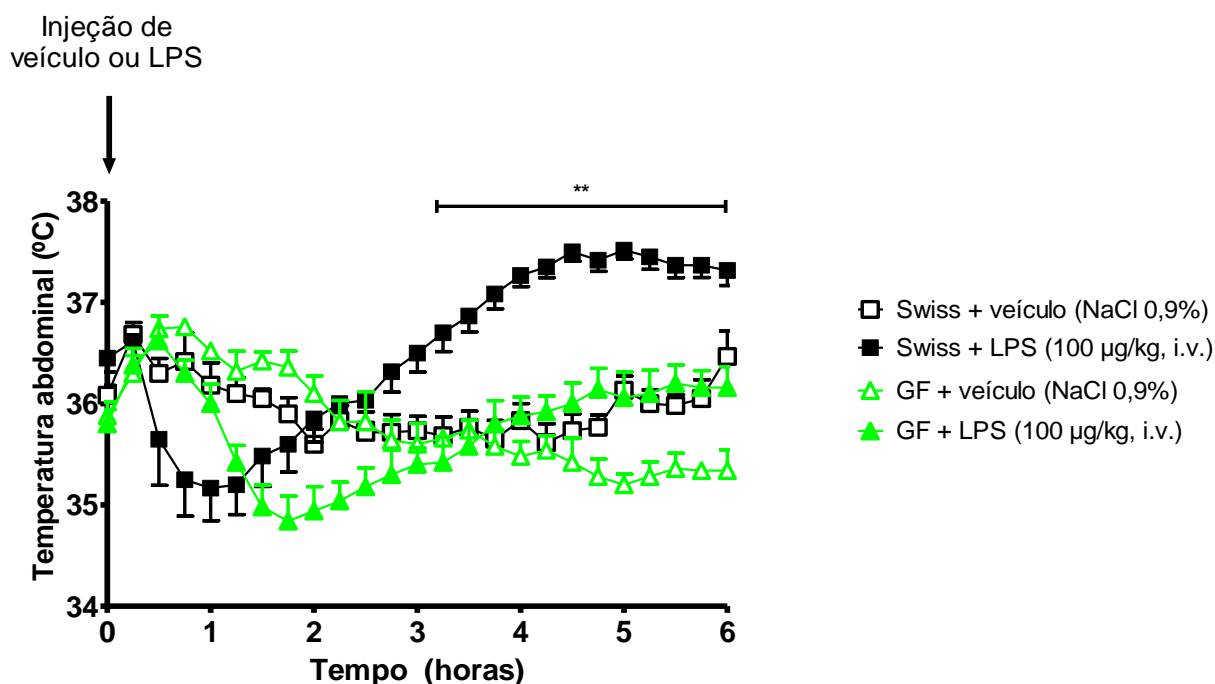
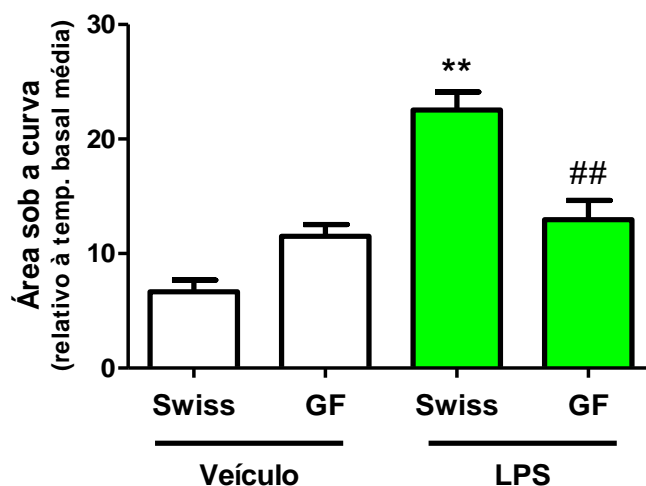
A**B**

Figura 13: Animais isentos de microbiota não desenvolvem febre após a injeção intravenosa de LPS. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem Swiss ou isentos de germes (*germ-free*, GF), submetidos a estímulo febril com LPS, por via intravenosa na dose de 100 µg/kg. (A) Registro de temperatura por 6 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. ** Valor $p < 0,01$ em relação em grupo controle; ## Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo Swiss. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).

5.2.2 Concentração de pirógenos endógenos é menor em animais germ-free após indução de febre por LPS

Para checar o motivo da ausência de resposta febril ao LPS nos animais isentos de microbiota, o plasma dos animais foi utilizado para a dosagem de citocinas importantes para a indução de febre, na forma de sinais periféricos se encaminhando ao hipotálamo. Para simplificar a apresentação dos resultados, as amostras dos animais que receberam veículo foram agrupados em um único grupo, uma vez que não houve diferença significativa entre os dois grupos. Após injeção intravenosa de LPS, os animais que possuíam microbiota tiveram aumento na concentração das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Figuras 14A, 14B e 14C, respectivamente). Ao serem expostos ao LPS, contudo, animais isentos de microbiota mostraram níveis estatisticamente menores que o grupo colonizado para as citocinas avaliadas.

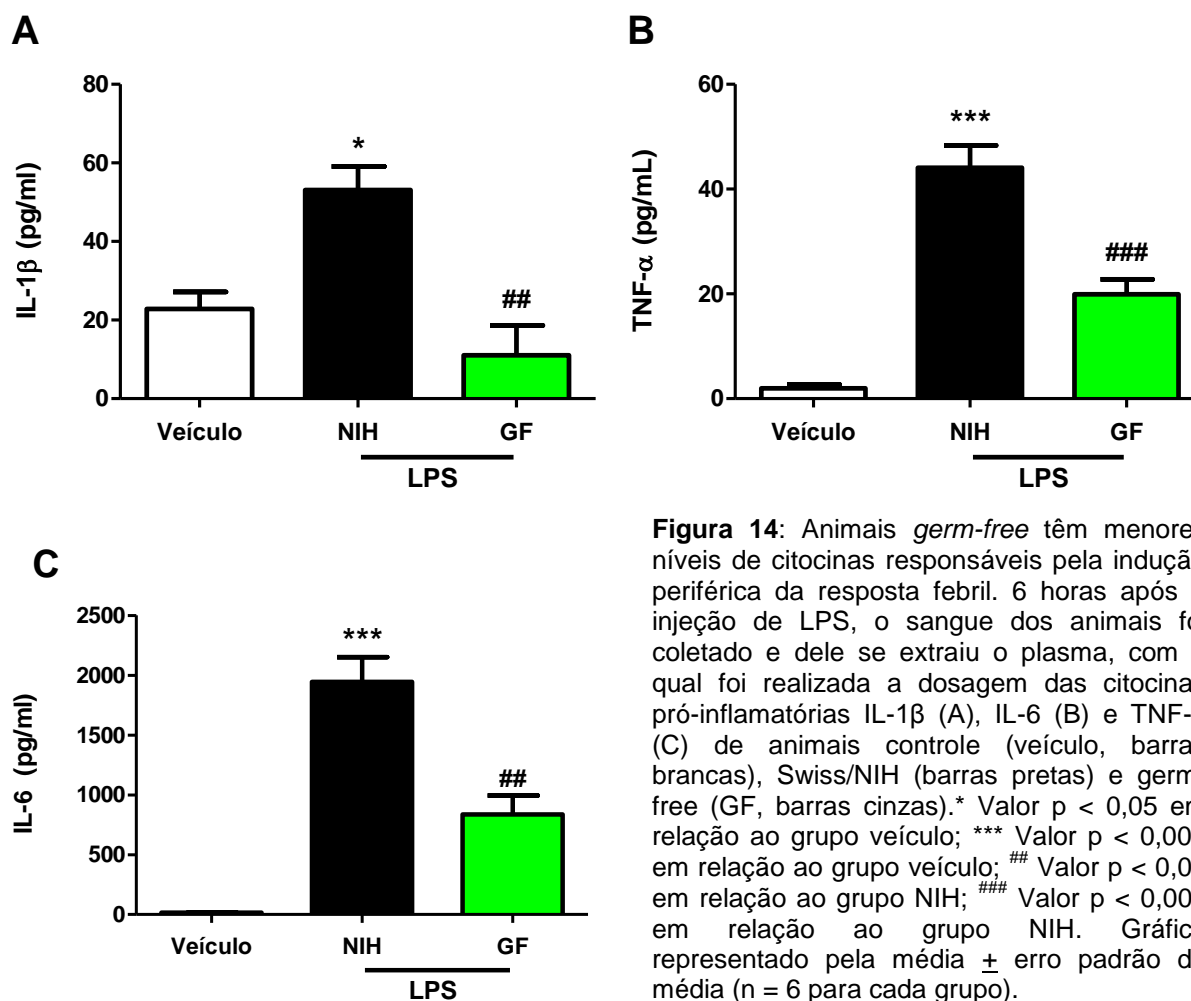


Figura 14: Animais *germ-free* têm menores níveis de citocinas responsáveis pela indução periférica da resposta febril. 6 horas após a injeção de LPS, o sangue dos animais foi coletado e dele se extraiu o plasma, com o qual foi realizada a dosagem das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) de animais controle (veículo, barras brancas), Swiss/NIH (barras pretas) e germ-free (GF, barras cinzas). * Valor $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo; *** Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo; ## Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo NIH; ### Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo NIH. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).

5.2.3 Expressão de TNF- α no hipotálamo de animais isentos de microbiota é menor após estímulo pirogênico

Para confirmar as consequências da menor produção periférica de citocinas no sistema nervoso central, foi avaliada a expressão de transcritos para TNF- α no hipotálamo. Animais da linhagem Swiss/NIH ou GF receberam a injeção intravenosa de LPS e, em tempos determinados, foram eutanasiados para avaliações posteriores.

Os animais com microbiota comensal tiveram alta expressão de transcritos para TNF- α 1,5 horas após a indução de febre, seguida de queda nos tempos de 3, 6 e 12 horas. Já os animais isentos de germes tiveram uma redução significativa para o mesmo ponto inicial em relação ao grupo convencional, mantendo baixa a concentração de TNF- α nos períodos posteriores (**Figura 15**).

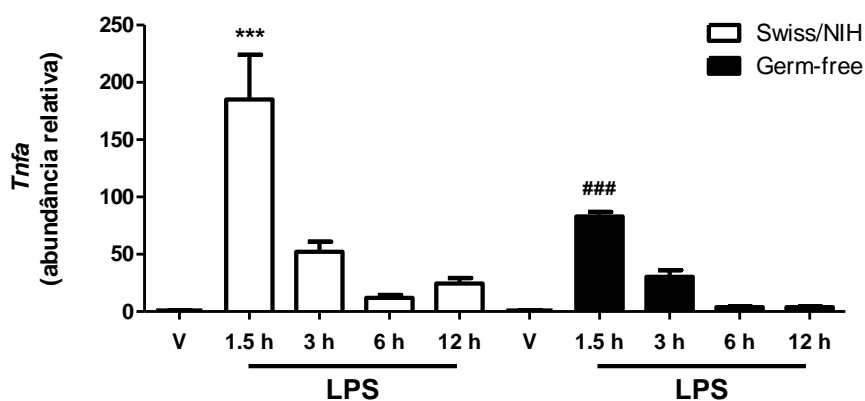


Figura 15: A ausência da microbiota comensal culmina em hiporresponsividade hipotalâmica, através da menor expressão de TNF- α . O RNA foi extraído e convertido em cDNA para avaliação da expressão da citocina após o estímulo com LPS, em tempos determinados. *** Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo; ### Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo Swiss/NIH.

5.2.4 A reposição da microbiota comensal em animais germ-free também restaura a resposta febril

Para confirmar a importância da microbiota no processo febril, animais isentos de microbiota receberam uma solução por via oral contendo 10% de material fecal oriundo de animais convencionais. Após 28 dias de colonização microbiana, esses animais foram submetidos ao mesmo protocolo de indução de febre citado anteriormente.

Os camundongos que receberam o veículo tiveram um leve aumento na temperatura devido ao estresse causado pela manipulação, retornando sua temperatura rapidamente aos níveis basais. Animais convencionais (NIH) injetados com LPS tiveram um aumento na temperatura, mantido até a sexta hora de avaliação (**Figura 16A**). Os animais isentos de microbiota, por sua vez, apresentaram uma hipotermia aguda, seguida do retorno aos níveis basais. O grupo de animais ditos “convencionalizados” (CVN) teve indução febril idêntica ao grupo NIH, mostrando que a reposição da microbiota em animais GF também restaura a resposta inflamatória pirogênica. A área sob cada curva também foi aferida e representa o resultado de maneira resumida (**Figura 16B**).

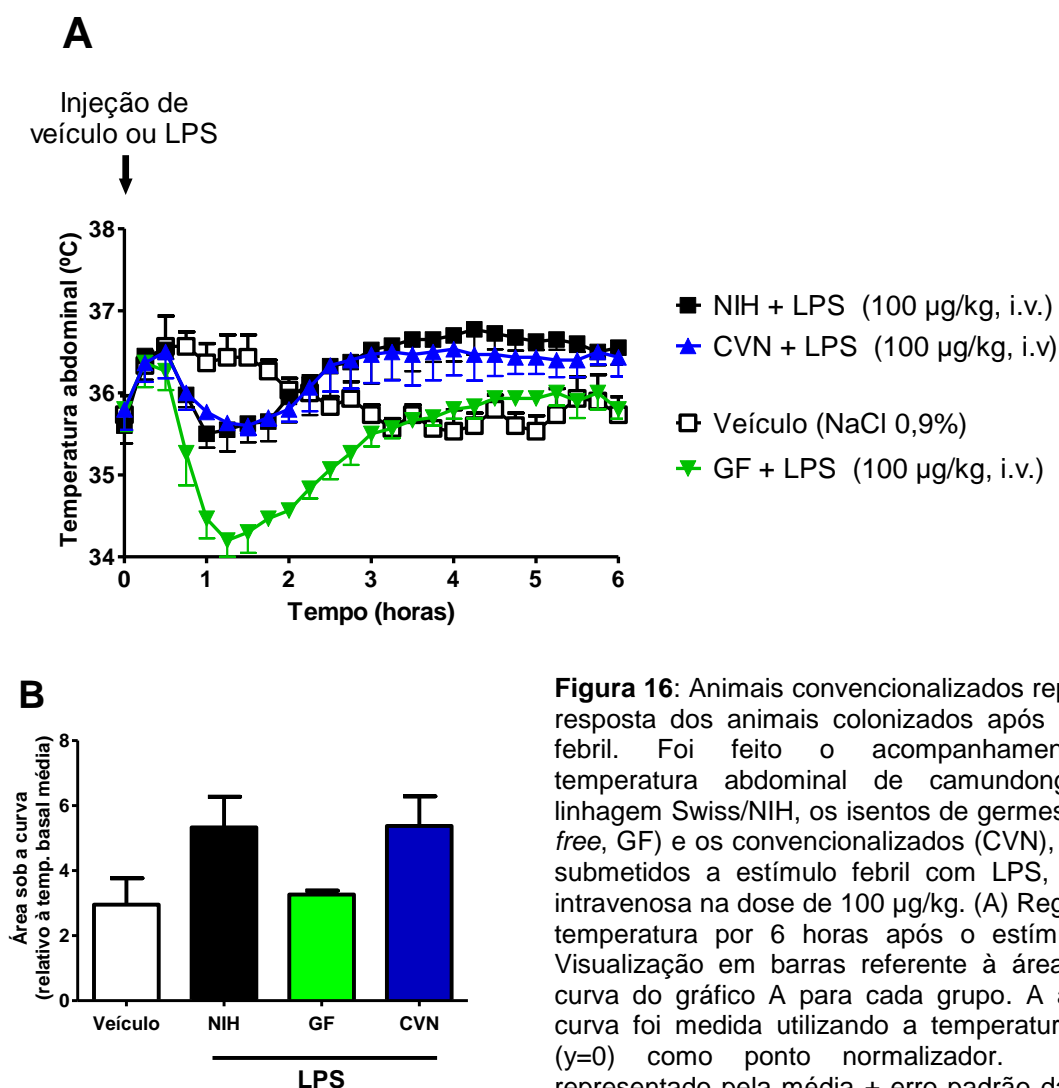


Figura 16: Animais convencionalizados repetem a resposta dos animais colonizados após indução febril. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem Swiss/NIH, os isentos de germes (*germ-free*, GF) e os convencionalizados (CVN), quando submetidos a estímulo febril com LPS, por via intravenosa na dose de 100 µg/kg. (A) Registro de temperatura por 6 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).

5.2.5 A redução da microbiota pelo uso de antibióticos inibe a indução de febre em camundongos convencionais

Para entender a participação da microbiota na indução de febre em animais adultos convencionais, foi utilizada um coquetel de antibióticos de amplo espectro para a redução da microbiota nesses animais. Cerca de um mês após o início do tratamento, os camundongos receberam a dose intravenosa de LPS e foram acompanhados quanto à temperatura.

Os animais de ambos os grupos tratados com o veículo não tiveram alterações relevantes em sua temperatura. Novamente, animais da linhagem Swiss que não foram tratados e receberam a injeção de LPS tiveram aumento na temperatura condizente com a evolução de um quadro febril. (**Figura 17A**). Contudo, nota-se que a temperatura basal do grupo de animais tratado com antibiótico é menor do que aquela do grupo não tratado. Logo, para normalizar os dados, utilizou-se a variação da temperatura ao longo do tempo em relação à temperatura basal antes da injeção com LPS (*lembrando: a temperatura basal – valor zero no eixo y - é a média das 3 horas anteriores à injeção de veículo ou LPS*). Dessa forma, é possível discernir os dados e verificar que o grupo tratado com antibiótico não teve resposta febril após a injeção com LPS. (**Figura 17B**). Também é possível verificar essa afirmação ao calcular a área sob a curva (**Figura 17C**).

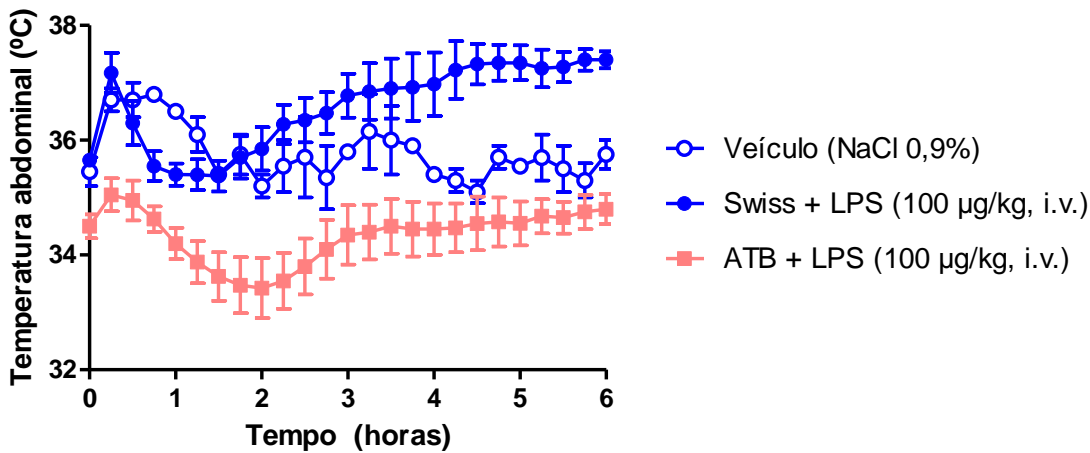
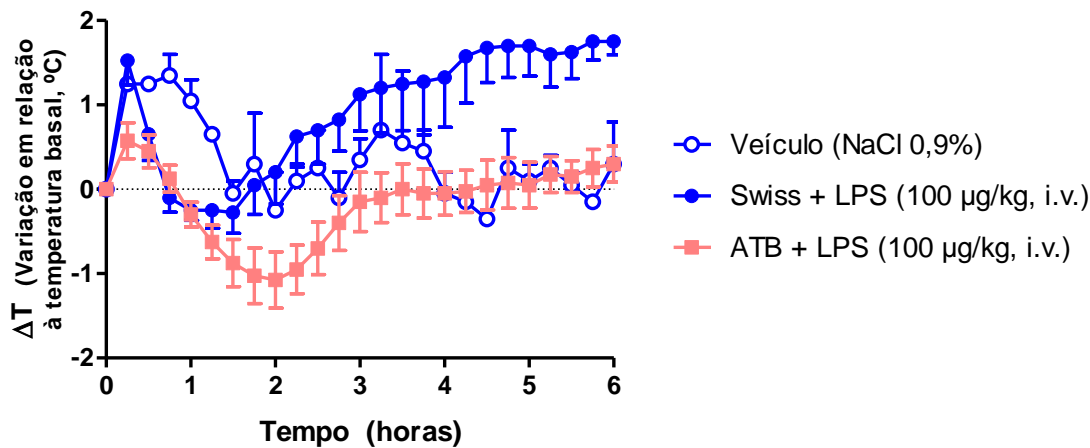
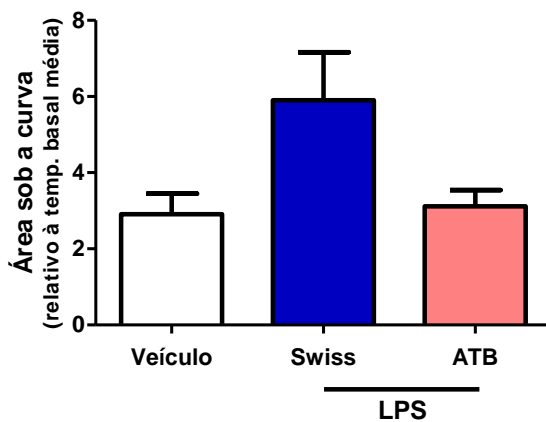
A**B****C**

Figura 17: A redução de microbiota através da administração de antibióticos impede a indução de febre em camundongos convencionais. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem Swiss quando submetidos (ATB) ou não (Swiss) ao tratamento com antibiótico. Em seguida, receberam estímulo febril com LPS, por via intravenosa na dose de 100 µg/kg. (A) Registro de temperatura por 6 horas após o estímulo; (B) Registro normalizado pela variação em relação à temperatura basal; (C) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico B para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).

Para os animais C57BL/6, foram testadas as mesmas doses e mesmas vias. No entanto, não houve aumento de temperatura significativo com as doses utilizadas. Além disso, o menor tamanho destes animais quando comparados à linhagem Swiss faz com que o acesso venoso seja muito mais estressante para os animais. Essa manipulação provoca grandes variações na temperatura basal do animal, mesmo que não haja injeção de fato. Para resolver os problemas acima, decidiu-se usar uma dose conhecida de LPS, maior e capaz de provocar febre nestes animais por via intraperitoneal (2,5 mg/kg – Kozak *et al.*,1995), para reduzir a manipulação e os efeitos negativos da contenção para acesso venoso.

5.3 Papel da via da fosfatidilinositol 3-quinase gama na indução de febre

A participação da PI3K γ na indução de febre foi avaliada através de estratégia genética - utilização de camundongos com deleção do gene da enzima - e pela intervenção farmacológica com o inibidor seletivo AS605240.

5.3.1 A enzima PI3K γ é essencial para a indução de febre em camundongos

Os animais (selvagens ou nocautes) que receberam o veículo não tiveram mudanças relevantes na temperatura. Contudo, notou-se nos animais selvagens um aumento significativo na temperatura, indicativo de febre, atingindo o pico (~ 38,5° C) cerca de 6 horas após o estímulo. A temperatura desses animais voltou aos padrões basais por volta de 12 horas. Já os animais deficientes para a PI3K γ não apresentaram nenhum aumento importante de temperatura durante todo o período avaliado (**Figura 18A**), demonstrando que a ausência da enzima previne a indução de febre nestes animais. Esses achados são demonstrados pelo cálculo da área sob a curva para cada grupo experimental (**Figura 18B**).

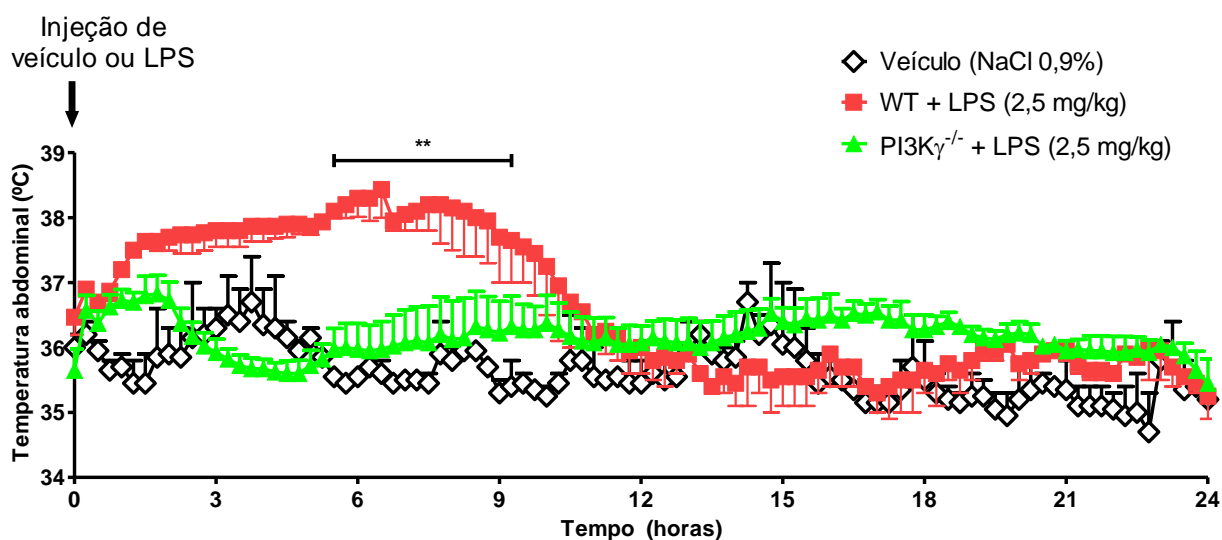
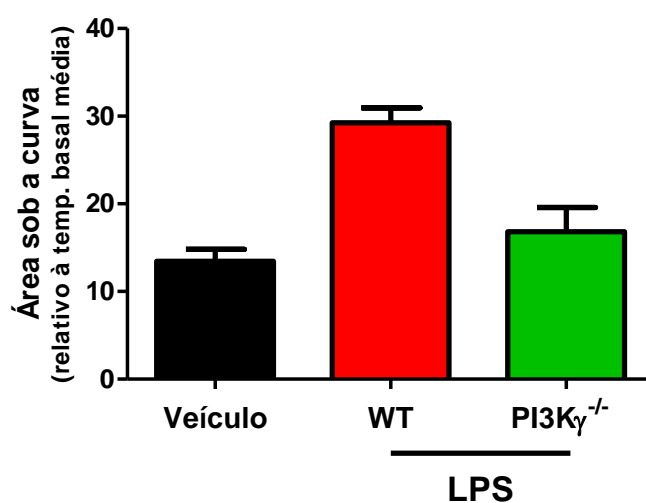
A**B**

Figura 18: Animais deficientes para a enzima PI3K γ não manifestam resposta febril após indução por LPS. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem C57BL/6 (WT) ou deficientes para a enzima PI3K γ , submetidos a estímulo febril com LPS, por via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (A) Registro de temperatura por 24 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. Para melhorar a visualização dos dados, os dois grupos de animais (WT e PI3K γ ^{-/-}) que receberam o veículo foram agrupados em um único conjunto de dados. ** Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-8$ para cada grupo).

5.3.2 A ausência de febre nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ está relacionada com menor concentração de citocinas pirogênicas no plasma

O estímulo inflamatório leva à produção de pirógenos endógenos, como as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6. Tais moléculas foram dosadas no plasma dos animais WT e KO, em três tempos distintos: 6, 12 e 24 horas após a injeção de LPS (**Figura 19**).

Todos os animais que receberam o veículo (NaCl 0,9%) apresentaram níveis basais das citocinas dosadas. Os animais selvagens tiveram aumento na concentração de IL-1 β no tempo de 6 horas após a injeção de LPS (**Figura 19A**). Nos tempos de 12 e 24 horas após a indução de febre, a concentração da citocina voltou aos níveis basais. Em contrapartida, não houve aumento da produção de IL-1 β no plasma dos animais deficientes em PI3K γ nos tempos avaliados.

Para a citocina TNF- α houve um aumento significativo da concentração dessa citocina no grupo selvagem em relação ao controle correspondente, 6 horas após a injeção de LPS (**Figura 19B**). Nos animais PI3K γ KO, a concentração da citocina foi estatisticamente menor em relação ao grupo selvagem. Em 12 e 24 horas pós-estímulo, os níveis de TNF- α voltaram aos valores basais. Os achados acima confirmam a importância da produção de citocinas pelos animais selvagens para a indução de febre, visto que o ponto de maior concentração desses agentes pirogênicos coincide com o pico de temperatura febril desses animais.

Já para IL-6, o panorama foi diferente. Houve aumento consistente na concentração da citocina depois de 6 horas, tanto para o grupo selvagem quanto para o grupo deficiente para a enzima PI3K γ (**Figura 19C**), o que torna o dado surpreendente, dada a importância dessa molécula para a indução do processo febril. Nos pontos de 12 e 24 horas, houve redução em relação ao período anterior em ambos os grupos.

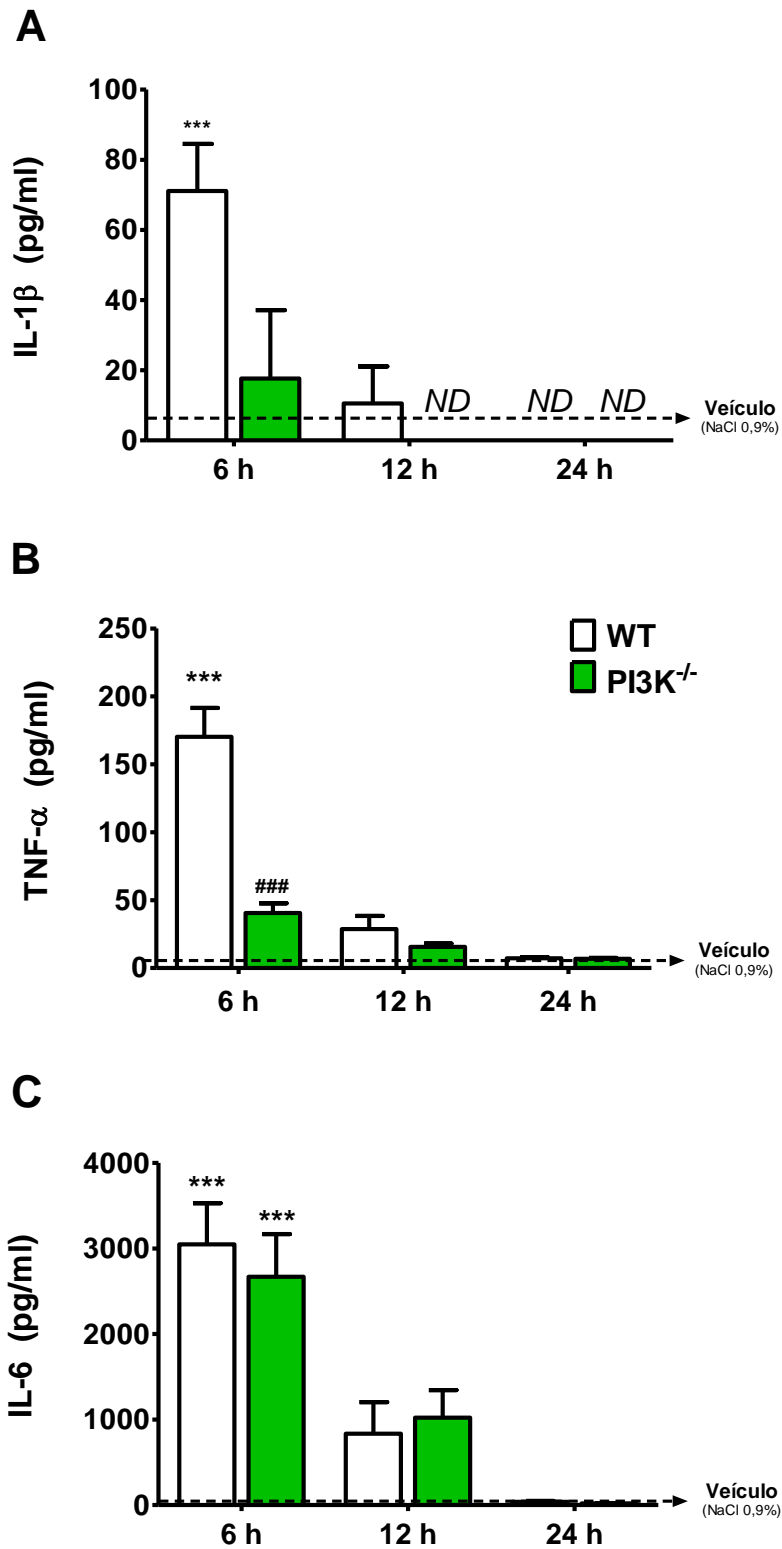


Figura 19: Animais deficientes para PI3K γ têm menor concentração das citocinas IL-1 β e TNF- α no plasma, apesar das concentrações similares de IL-6. Em tempos determinados após a injeção de LPS, o sangue dos animais foi coletado, com o qual foi realizada a dosagem das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A) e TNF- α (B) e IL-6 (C) de animais selvagens (WT, barras brancas) e nocautes (PI3K γ ^{-/-}, barras preenchidas). *** Valor p < 0,001 em relação ao grupo selvagem Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média (n = 4-6 para cada grupo). ND = não detectado.

5.3.3 Após o estímulo com LPS, a resposta hipotalâmica de animais PI3K γ KO é menor em relação ao grupo WT

A fim de avaliar a resposta hipotalâmica ao insulto inflamatório por LPS, foi realizada a avaliação relativa da produção de transcritos (RNA mensageiro) através de qPCR, visto que o tamanho do órgão impossibilita a mensuração dos mediadores finais.

A enzima cicloxigenase 2 (COX-2) participa da cascata de degradação do ácido araquidônico e um dos principais produtos dessa via é a prostaglandina E₂, mediador lipídico mais importante na indução do processo febril. A expressão dessa enzima esteve significativamente aumentada após 6 horas de injeção do LPS em animais WT, novamente coincidindo com o pico da temperatura encontrada nesses animais (**Figura 20A**). A expressão diminui nos tempos de 12 e 24 horas, para os quais não há diferença em relação com grupo controle. Por outro lado, animais deficientes para a enzima PI3K γ não expressam o mesmo nível do transcrito para COX-2 e essa redução é estatisticamente significativa.

Após o estímulo periférico, também há produção local de citocinas no hipotálamo, para amplificação autócrina do sinal inflamatório. Neste modelo, a expressão hipotalâmica de IL-6 (**Figura 20B**) e TNF- α (**Figura 20C**) também foi avaliada. O mesmo padrão de COX-2 se repete para tais citocinas: os animais selvagens possuem expressão elevada dos transcritos no tempo de 6 horas pós-estímulo, enquanto os animais deficientes para PI3K γ não apresentam o mesmo aumento, sendo assim estatisticamente diferentes dos animais WT. Para os tempos de 12 e 24 horas, não há diferenças entre os grupos estudados.

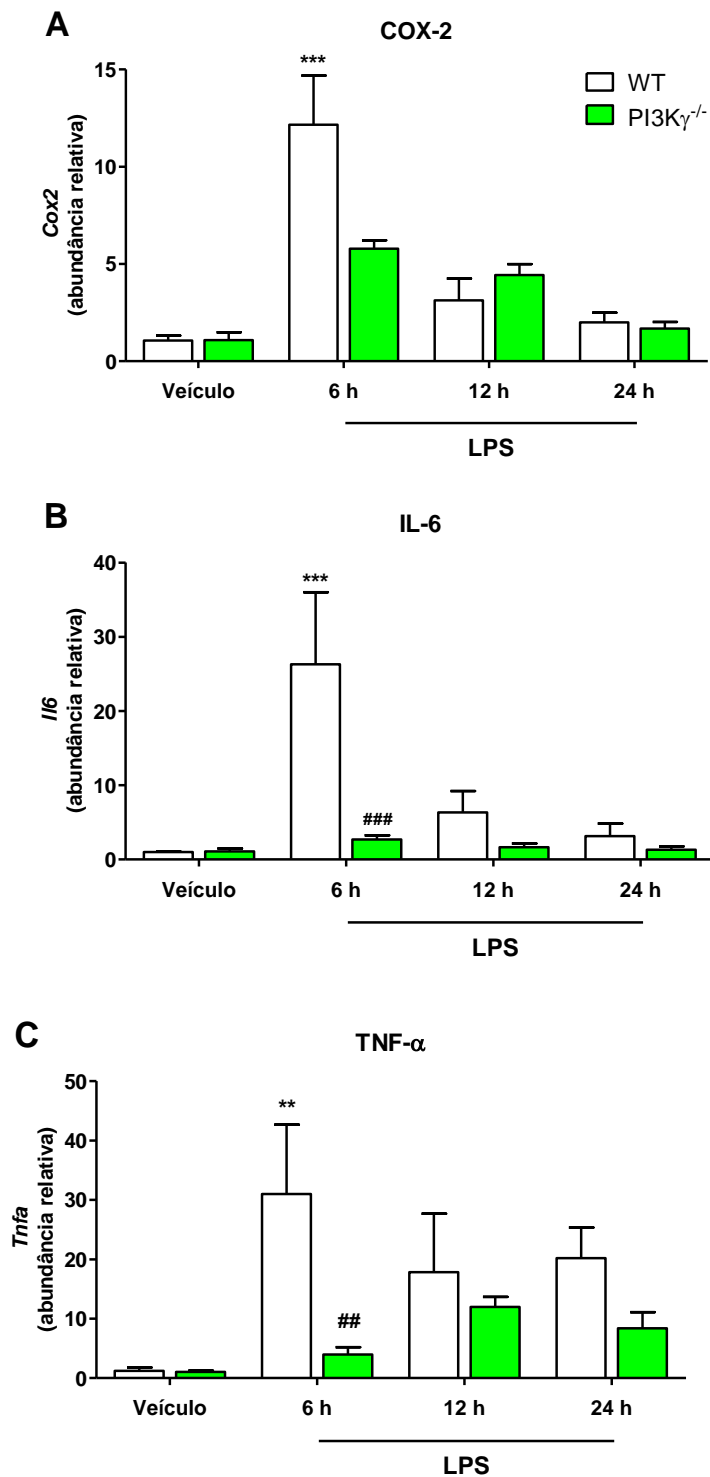


Figura 20: A ausência da enzima PI3K γ impede a expressão de transcritos de COX-2, IL-6 e TNF- α no hipotálamo. O RNA foi extraído e convertido em cDNA para avaliação da expressão de mediadores inflamatórios após o estímulo com LPS, em tempos determinados. Foi aferida a expressão de COX-2 (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) no hipotálamo de animais selvagens (WT, barras brancas) e nocautes (PI3K $\gamma^{-/-}$, barras preenchidas). ** Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. *** Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ### Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo selvagem. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-6$ para cada grupo).

5.3.4 A inibição farmacológica da enzima reproduz os resultados encontrados para os camundongos com deleção gênica.

A fim de confirmar os resultados encontrados em animais deficientes para PI3K γ , camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com o AS605240, inibidor seletivo da isoforma gama da enzima, uma hora antes do estímulo com LPS.

A injeção do veículo não gerou aumento de temperatura nos animais. Por outro lado, os animais que receberam a dose intraperitoneal de 2,5 mg/kg de LPS tiveram aumento de temperatura sustentado entre a quinta e oitava hora pós-injeção, com pico na sexta hora, caindo em seguida (**Figura 21A**). O tratamento de um grupo de animais C57BL/6 com o inibidor seletivo da PI3K γ manteve a temperatura nos mesmos níveis do grupo injetado com o veículo. Este resultado pode ser avaliado também pela área sob a curva, tendo como ponto de início a média da temperatura basal (**Figura 21B**). Em conjunto, os resultados supracitados demonstram a participação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama na indução de febre por LPS em camundongos.

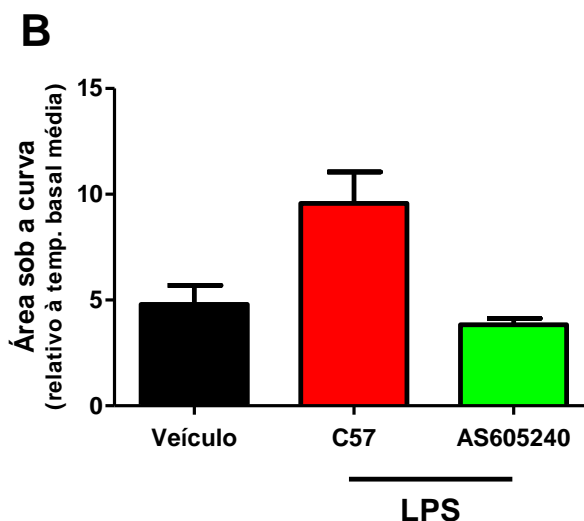
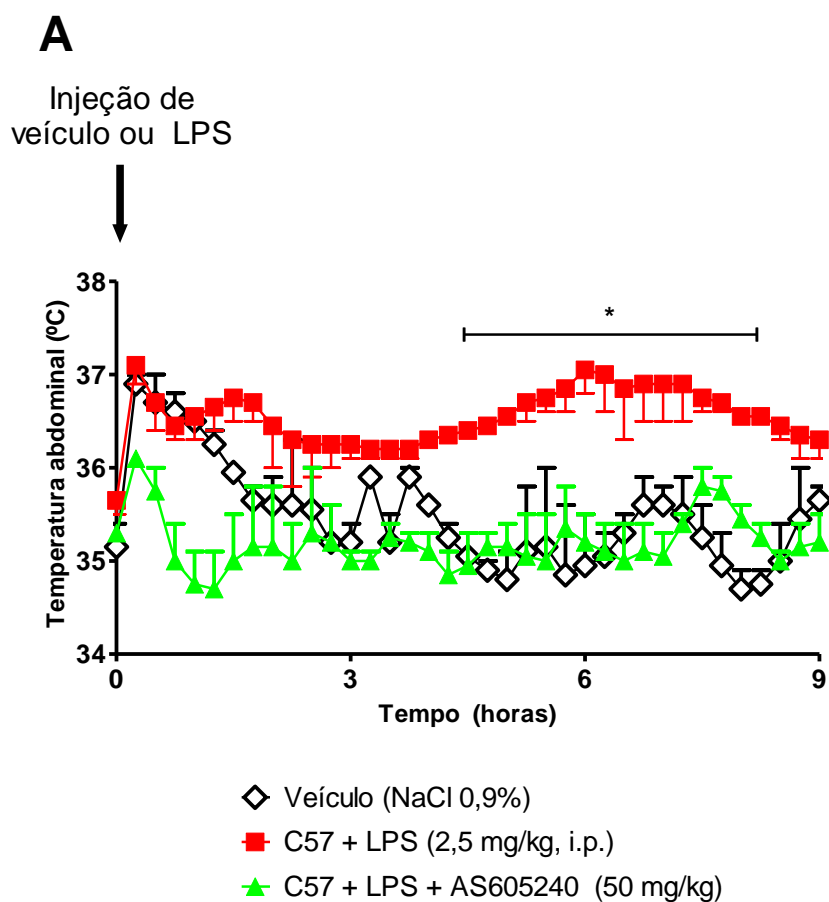


Figura 21: Animais tratados com inibidor seletivo da PI3K γ mimetizam o fenótipo do camundongo KO, com ausência de febre. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem C57BL/6 ou tratados com AS605240, submetidos a estímulo febril com LPS, por via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (A) Registro de temperatura por 9 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. * Valor $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-6$ para cada grupo).

5.4 Participação do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) na febre induzida por LPS

O papel do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) na febre induzida por LPS foi avaliado através da utilização de camundongos com deleção do respectivo gene e pela administração do fármaco PCA4245, antagonista específico.

5.4.1 Camundongos deficientes para PAFR tem febre atrasada, porém mais longa

Animais selvagens e deficientes para o receptor do fator ativador de plaquetas receberam o sensor por implante, foram estimulados com 2,5 mg/kg de LPS pela via intraperitoneal e acompanhados por 24 horas (**Figura 22**).

Os animais que receberam veículo não tiveram aumento de temperatura característico. A indução da febre foi alcançada nos animais selvagens, com pico de temperatura às 6 horas após a injeção (**Figura 22A**). Entretanto, o grupo de animais PAFR KO alcançou o mesmo aumento de temperatura, com atraso em relação ao grupo WT, porém mantida por mais tempo. Houve um breve aumento nas três primeiras horas, seguida de redução aos valores basais. O ponto mais alto de temperatura ocorreu por volta de 10 horas após a administração do LPS e só voltou a níveis comparáveis ao grupo controle após 18 horas.

O gráfico relativo à curva de 24 horas reflete a consequência de um processo febril tardio e mais prolongado: a área sob a curva para os animais deficientes para PAFR semelhante ao grupo selvagem, após estímulo com LPS (**Figura 22B**).

5.4.2 Altas concentrações de IL-1 β são responsáveis pela manutenção da febre

A fim de avaliar se há fatores periféricos envolvidos no caráter anômalo da febre induzida por LPS em animais deficientes para PAFR, o plasma dos animais foi coletado e submetido ao teste de ELISA para quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (**Figura 23**).

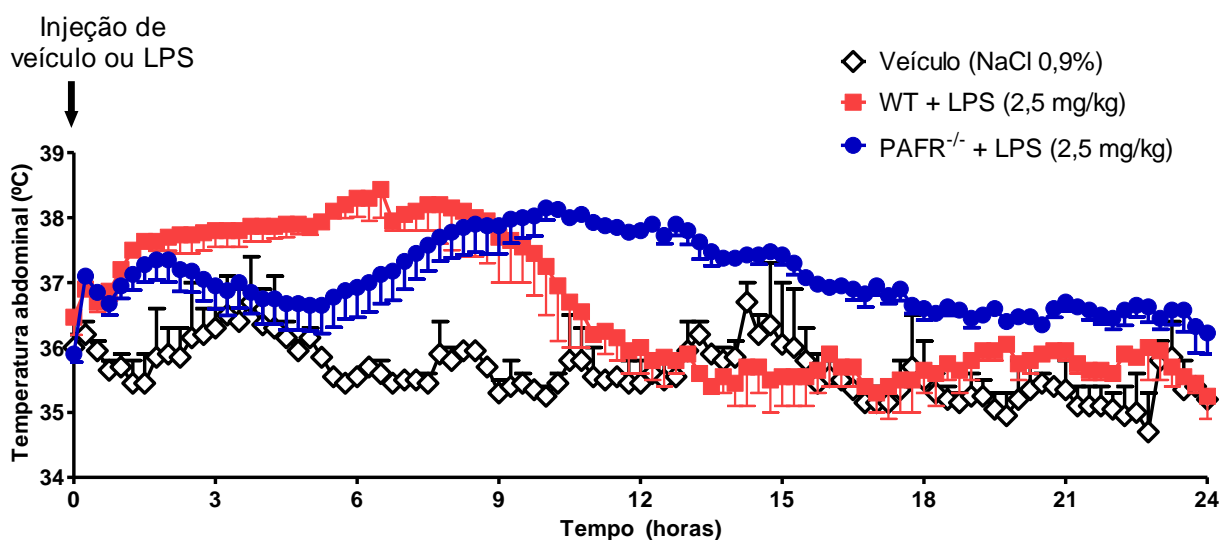
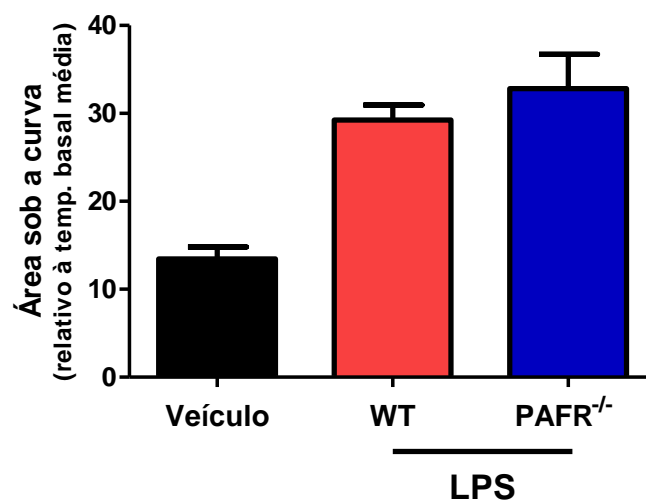
A**B**

Figura 22: Animais deficientes para o receptor de PAF têm febre após injeção de LPS, mas o processo é tardio e mais prolongado. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem C57BL/6 (WT) ou deficientes para o receptor de PAF, submetidos a estímulo febril com LPS, por via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (A) Registro de temperatura por 24 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. A área da curva foi medida utilizando a temperatura basal ($y=0$) como ponto normalizador. Para melhorar a visualização dos dados, os dois grupos de animais (WT e PAFR^{-/-}) que receberam o veículo foram agrupados em um único conjunto de dados. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-6$ para cada grupo).

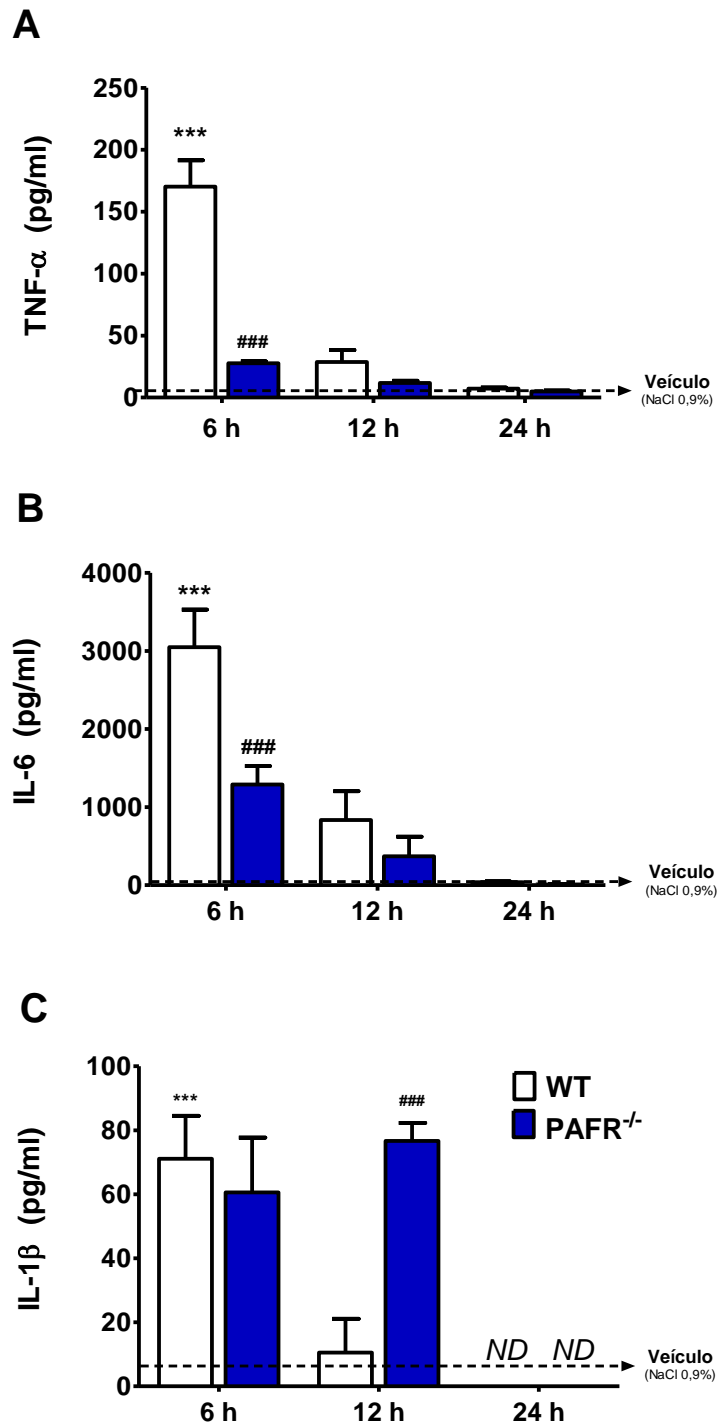


Figura 23: Animais com deleção do gene que codifica PAFR mantêm alta concentração plasmática de IL-1 β após estímulo com LPS. Apesar da menor produção de TNF- α , a alta produção de IL-1 β coincide com o momento de maior temperatura nos animais KO. Em tempos determinados após a injeção de LPS, o sangue dos animais foi coletado e dele se extraiu o plasma, com o qual foi realizada a dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) de animais selvagens (WT, barras brancas) e nocautes (PAFR^{-/-}, barras preenchidas). *** Valor $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ### Valor $p < 0,001$ em relação com grupo selvagem. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-6$ para cada grupo).

A concentração de TNF- α e IL-6 no plasma dos animais selvagens foi significativamente maior em relação ao seu controle no período de 6 horas após a injeção de LPS (**Figura 23A e 23B**). Contudo, reduziu e retornou aos níveis menores nos tempos de 12 e 24 horas. Para os animais deficientes no receptor de PAF, não houve aumento na concentração de TNF- α e IL-6, sendo significativamente menor em relação ao grupo WT. A produção das citocinas foi reduzida para estes animais nos tempos de 12 e 24 horas após a indução de febre, assim como para o grupo WT.

Já os níveis de IL-1 β - um pirógeno endógeno importante - mostraram um padrão diferente. Houve produção significativa da citocina no período de 6 horas após o estímulo com LPS, tanto para o grupo selvagem quanto para o nocaute. Contudo, para o período de 12 horas pós-injeção, a concentração de IL-1 β manteve-se alta apenas para o grupo de animais deficientes para PAFR, enquanto caiu drasticamente para o grupo WT (**Figura 23C**). A manutenção de altos níveis desta citocina se correlaciona com a manutenção e prolongamento do período febril nos animais PAFR^{-/-}.

5.4.3 Ausência de PAFR não altera a transcritos de COX-2, mas a expressão de citocinas é alterada.

Para verificar as modificações centrais e o controle hipotalâmico de termorregulação, foi investigada a expressão de transcritos de moléculas envolvidas na via de indução da febre (**Figura 24**). A expressão de COX-2 mostrou-se aumentada para o grupo selvagem e o grupo nocauteado, mas apenas no tempo de 6 horas após a injeção de LPS, mostrando que as diferenças no padrão de temperatura podem ser independentes da via clássica da COX-2 para indução de febre. Não houve diferença entre os grupos nos demais tempos observados (**Figura 24A**). Também houve aumento local da quantidade de transcritos para IL-1 β , tanto para o grupo WT quanto para o grupo KO, (**Figura 24B**). A citocina TNF- α também teve sua expressão aumentada para o grupo selvagem no tempo de 6 horas, mas essa observação não foi notada para o grupo nocauteado (**Figura 24C**), para o qual a redução foi estatisticamente significativa. Para os períodos observados não houve alteração da concentração dessa citocina.

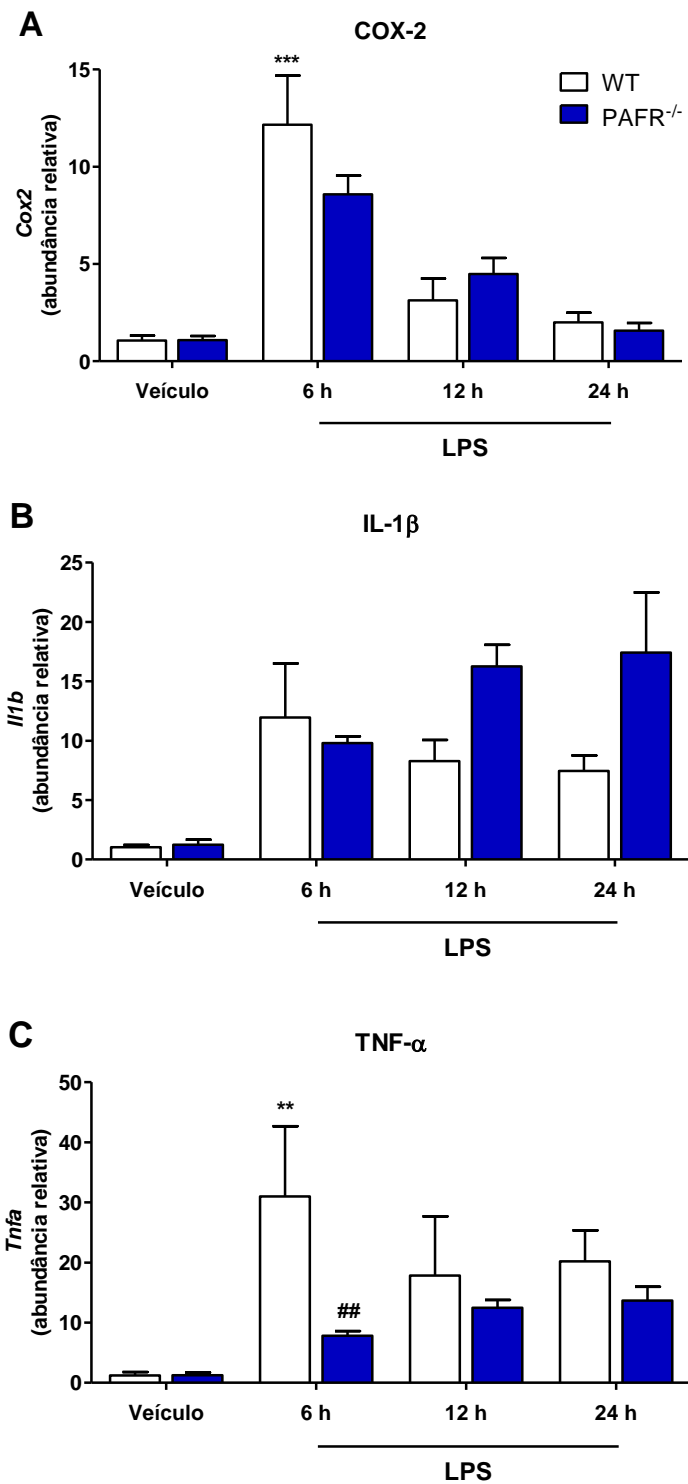


Figura 24: A deleção do gene para PAFR não modifica a expressão de COX-2 no hipotálamo, mas há alterações na expressão local de citocinas. O RNA foi extraído e convertido em cDNA para avaliação da expressão de mediadores inflamatórios após o estímulo com LPS, em tempos determinados. Foi aferida a expressão de COX-2 (A), IL-1β (B) e TNF-α (C) no hipotálamo de animais selvagens (WT, barras brancas) e nocautes (PAFR^{-/-}, barras preenchidas). ** Valor p < 0,01 em relação ao grupo controle. *** Valor p < 0,001 em relação ao grupo controle; ## Valor p < 0,01 em relação ao grupo selvagem. Gráfico representado pela média ± erro padrão da média (n = 4-6 para cada grupo).

5.4.4 Antagonismo específico do receptor de PAF pode reproduzir os efeitos do animal geneticamente modificado

A fim de verificar se intervenções farmacológicas poderiam reproduzir o padrão febril distinto observado nos animais deficientes, foi administrado a um grupo de animais um antagonista específico do receptor do fator de ativador de plaquetas (PCA4248), uma hora antes da indução de febre com LPS.

Apesar do acompanhamento da temperatura não ter ultrapassado as 9 horas, como seria o ideal, é possível observar que o tratamento com o PCA4248 tende a confirmar o fenótipo dos animais deficientes, com aumento tardio da temperatura, após o pico de 6 horas encontrado no grupo de animais selvagens (**Figura 25**).

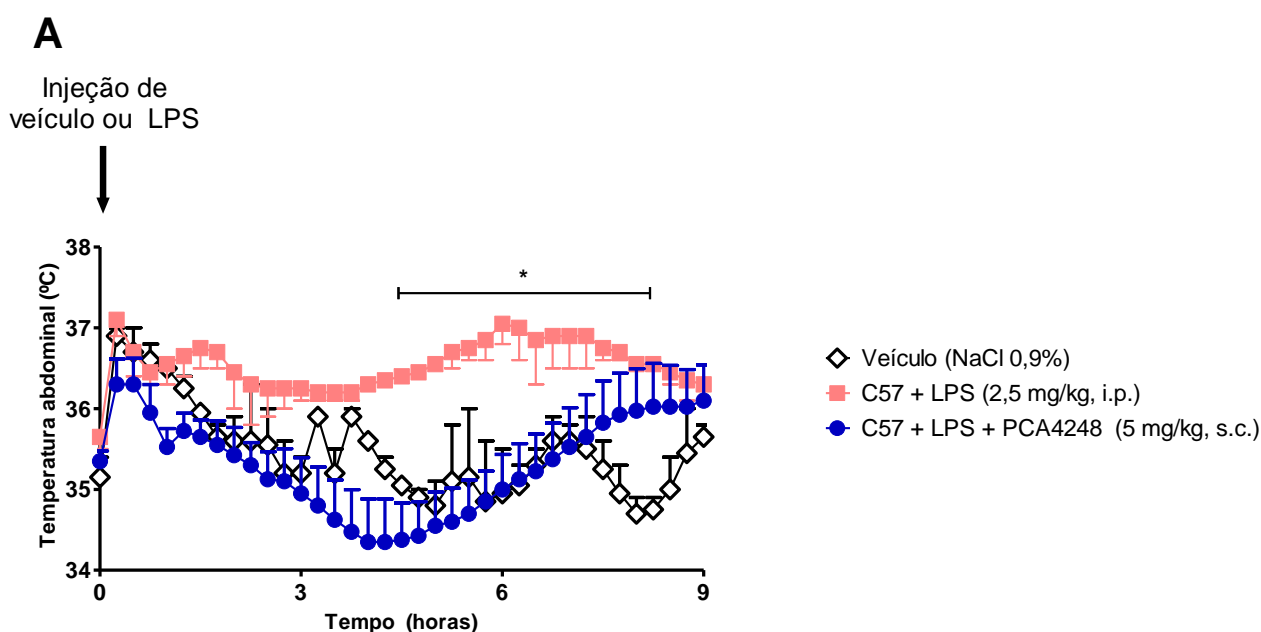


Figura 25: Intervenção farmacológica com antagonista específico de PAFR pode gerar resposta semelhante àquela observada em camundongos geneticamente modificados. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem C57 ou tratados com PCA4248, submetidos a estímulo febril com LPS, por via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (A) Registro de temperatura por 9 horas após o estímulo. * Valor $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 4-6$ para cada grupo).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho de tese apresentou a associação entre a indução de febre por lipopolissacarídeo e três importantes mecanismos inflamatórios. De forma inédita, foi abordada a relação entre a enzima fosfatidilinositol 3-quinase gama e o processo febril. A correlação entre a febre e o receptor do fator ativador de plaquetas foi tratada de uma forma diferente da conhecida, trazendo mais detalhes a respeito da via. Também foi estudada a conexão entre a microbiota comensal e a resposta febril, com boas perspectivas a respeito da maquinaria que as relaciona.

6.1 A indução de febre por LPS e o papel da microbiota comensal

O conjunto de resultados dispostos nessa tese relata a importância da microbiota comensal na ativação dos mecanismos inflamatórios envolvidos na indução experimental de febre. De forma sucinta, mostrou-se que a ausência da microbiota impediu o aumento de temperatura em animais *germ-free* após a injeção de LPS. Isso se deve à menor concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias de caráter pirogênico – IL-1 β , IL-6 e TNF- α –, que resultou na menor expressão de transcritos para TNF- α no hipotálamo, principal zona cerebral da termorregulação. A reposição da microbiota em animais isentos de germes restaura a resposta febril, ao passo que a redução da comunidade microbiana por antibióticos impede o aumento de temperatura.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado muito nos últimos anos ao estudo da importância da microbiota dentro do processo inflamatório e da relação micro-organismo-hospedeiro. O trabalho seminal de Souza e colaboradores (2004) investigou o papel da microbiota na inflamação sistêmica provocada por um modelo murino experimental de isquemia intestinal seguida de reperfusão. Em animais convencionais, houve dano tecidual local e remoto, com alta concentração de TNF- α no plasma. Por outro lado, animais *germ-free* além de não apresentarem a típica resposta inflamatória, produziram grandes quantidades de IL-10, uma citocina classicamente anti-inflamatória. O mesmo resultado foi obtido depois da administração de LPS em ambos os grupos. O bloqueio de

IL-10 com anticorpos nos animais isentos de germes induziu o *status* inflamatório após a isquemia/reperfusão, determinando o importante papel desta citocina na hiporresponsividade derivada da ausência de microbiota (Souza *et al.*, 2004). Mais tarde, foi demonstrado o papel crucial da anexina-1 e da lipoxina A4 para a produção endógena de IL-10. Animais isentos de microbiota têm alta expressão dessas duas substâncias e seu bloqueio nesses animais levou à redução da produção de IL-10, acompanhado da reversão parcial da resposta inflamatória (Souza *et al.*, 2007). A importância da microbiota também foi avaliada através de um modelo de dor inflamatória. A hipernocicepção em animais *germ-free* estimulados localmente com carragenina, LPS, TNF- α , IL-1 β e CXCL-1 é reduzida em relação aos seus controles colonizados. Contudo, a indução do estímulo inflamatório com os mediadores finais da dor – prostaglandina E2 e dopamina – foi similar para os dois grupos, indicando que as vias terminais de nocicepção são conservadas e ativas nos animais isentos de microbiota. A menor hipernocicepção nesses animais era acompanhada da maior expressão de IL-10 e podia ser revertida com a administração de anticorpos anti-IL-10 (Amaral *et al.*, 2008). De modo interessante, não houve diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura células de Küpffer extraídas de camundongos convencionais ou *germ-free*, após tratamento com LPS (Ikeda *et al.*, 2007). A citocina IL-10 tem um papel muito importante na termorregulação, no controle da febre e efeitos centrais associados ao estado febril. Seu papel antipirético foi descrito por Leon e colaboradores em 1999: animais tratados com IL-10 (i.p.) foram resistentes à indução de febre por LPS, principalmente através do controle da produção periférica de IL-6. Ademais, camundongos deficientes para IL-10 tiveram febre exacerbada e prolongada em relação aos controles selvagens (Leon *et al.*, 1999). Esta citocina também foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-1 β no cérebro após a injeção local de LPS. O bloqueio da atividade de IL-10 com anticorpos potencializou a produção das referidas citocinas pró-inflamatórias (Di Santo *et al.*, 1995). Em outro estudo, culturas primárias de células do OVLT (importante zona do cérebro na captação de sinais periféricos circulantes) foram estimuladas com LPS, com consequente produção de IL-6 e TNF- α . Ao serem pré-tratadas com anticorpos anti-IL-10, a resposta inflamatória foi abolida (Harden *et al.*, 2013). O pré-tratamento intracerebroventricular com IL-10 também foi capaz de evitar a elevação da temperatura e prevenir o aumento da concentração de glutamato, PGE₂ e TNF- α no hipotálamo, promovidas pela administração sistêmica de LPS em coelhos (Kao

et al., 2011). Além disso, IL-10 também tem importante função periférica. A injeção intraperitoneal de soro anti IL-10 4 horas antes do desafio com LPS foi capaz de reduzir a concentração plasmática de IL-10, atenuou a hipotermia e aumentou a amplitude da febre. Também aumentou os níveis plasmáticos – mas não hipotalâmicos – de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE₂ (Harden *et al.*, 2014).

Dessa forma, conhecendo o papel antipirético de IL-10 e sabendo que animais isentos de germes produzem essa citocina quando submetidos a estímulos inflamatórios, é natural que essa molécula fosse abordada em nosso modelo de febre em animais *germ-free*. O experimento foi realizado e, como “controle positivo”, camundongos convencionais foram tratados com IL-10 recombinante, ao passo que animais axênicos foram tratados com anticorpo anti-IL-10. Ambos tratamentos foram realizados uma hora antes do estímulo com LPS. No entanto, tanto os animais que receberam IL-10 recombinante quanto aqueles que receberam veículo tiveram resposta febril semelhante. Além disso, animais *germ-free* tratados com o anticorpo anti-IL-10 não tiveram nenhuma alteração na temperatura, tal qual o grupo controle (dados não apresentados). Tais dados parecem ser inconclusivos, visto que a clássica resposta antipirética de IL-10 não foi observada. Logo, o experimento precisa ser repetido para a confirmação do fenótipo observado.

Além de mecanismos periféricos, a ação da microbiota sobre o sistema nervoso central também é conhecida e amplamente estudada. Dentre outras conexões, destaca-se a via neuroendócrina representada pelo eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), cuja ativação ocorre em resposta a diversos estímulos de estresse físico e psicológico (Dinan *et al.*, 2006). O estudo de Sudo e colaboradores (2004) apresentou as primeiras evidências conclusivas sobre o papel da microbiota no desenvolvimento do eixo HPA. Em camundongos *germ-free*, um leve estresse por contenção induziu a liberação exagerada de corticosterona e adrenocorticotrofina (ACTH), quando comparados aos controles livres de patógenos específicos (SPF). A resposta ao estresse nos animais GF foi parcialmente revertida pela recolonização com material fecal dos animais SPF e totalmente revertida após monoassociação com *Bifidobacterium infantis*, demonstrando claramente que o conteúdo do trato gastrointestinal é crítico para o desenvolvimento de uma resposta apropriada ao estresse (Sudo *et al.*, 2004). Há uma grande variedade de mecanismos

propostos – incluindo rotas humorais e neurais – através das quais a microbiota pode modular a sinalização do eixo cérebro-intestino. Por exemplo, estudos demonstraram o papel do nervo vago (Cryan e O'Mahony, 2011, Forsythe *et al.*, 2014) e do ajuste dos níveis sistêmicos de triptofano (Desbonnet *et al.*, 2008, Zelante *et al.*, 2013) na configuração da microbiota residente e exógena ao longo dessa configuração bidirecional. No entanto, a participação dos glicocorticóides na relação entre a microbiota e a resposta imune inflamatória se faz mais interessante.

Animais isentos de microbiota tem maior produção de ACTH e corticosterona em relação aos controles convencionais quando submetidos a estresse por contenção (Sudo *et al.*, 2004). Também foi verificado aumento na concentração de corticoides e na expressão hipotalâmica do fator liberador de corticotropina (CRF) em ratos GF comparados ao grupo controle, quando submetidos a estresse em campo aberto em testes de ansiedade (Crumeyolle-Arias *et al.*, 2014). A administração de LPS em animais axênicos também provoca aumento de corticosterona no plasma, concomitante com menor produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α e proteína amiloide sérica A (Ikeda *et al.*, 1999). Interessantemente, evidências obtidas em nosso grupo de pesquisa apontam que os animais *germ-free* mantêm níveis elevados de corticosterona durante os períodos diurno e noturno, enquanto os animais convencionais têm variações circadianas do hormônio no soro: níveis baixos ao dia e níveis elevados à noite (Menezes *et al.*, artigo em submissão).

Ainda mais estabelecido é o vínculo entre os corticoides e o processo febril. O tratamento com dexametasona inibe completamente a indução de febre por uma única dose intraperitoneal de LPS em ratos. Além disso, a adrenalectomia promoveu uma resposta febril mais acentuada, vinculada aos menores níveis de corticosterona nesses animais (Coelho *et al.*, 1992). De forma complementar, a produção de IL-6 e TNF- α é maior em animais adrenalectomizados ou tratados com o antagonista RU-38486 e a temperatura é mais acentuada em relação aos controles (Morrow *et al.*, 1993). Essa ação ocorre principalmente devido à ação central dos corticoides no hipotálamo anterior durante a febre induzida por LPS, gerando um feedback negativo que promove a regulação do ponto de ajuste térmico (Morrow *et al.*, 1996). Pelos argumentos acima citados, traçam-se

novas perspectivas para essa seção de estudo, que podem ser planejadas em diferentes estratégias experimentais, como a adrenalectomia em animais *germ-free* ou o tratamento com o antagonista do receptor de corticoides RU-38486/mifepristona.

O papel da microbiota comensal na regulação da temperatura já foi abordado por outros autores em publicações passadas, mas apenas um trabalho reportou um modelo experimental de indução de febre. Neste trabalho, camundongos e pequenos leitões isentos de microbiota foram utilizados em um modelo experimental de indução de febre. O estudo mostrou que os animais colonizados apresentavam temperatura basal superior àquela dos animais *germ-free*. Após injeção do estímulo pirogênico, os animais isentos de microbiota não tiveram aumento significativo de temperatura, enquanto os controles colonizados apresentaram o início de febre (Podoprigora, 1978). Apesar de esses resultados serem compatíveis com os encontrados no presente trabalho, é necessário fazer algumas observações. Não foi descrito o agente pirogênico utilizado, certamente por ausência da distribuição comercial desse tipo de produto na época em que o experimento foi realizado. Além disso, no trabalho de Podoprigora, o estado termoneutro dos animais foi ignorado, visto que os experimentos foram conduzidos a 20° C, gerando alterações metabólicas importantes que podem comprometer a reprodutibilidade e os resultados (Cannon e Nedergaard, 2011). Além disso, foi usada a medição de temperatura retal, que proporciona estresse desnecessário e pode comprometer a precisão da aferição (Saegusa e Tabata, 2003).

Em um trabalho de metodologia mais elegante, Kluger e colaboradores (1990) ratificaram alguns dos achados do trabalho supracitado, em um modelo experimental utilizando medição da temperatura por telemetria e tendo como modelo ratos *germ-free* ou redução da microbiota por antibióticos não absorvíveis. Apesar da variação circadiana da temperatura ser a mesma entre os grupos, os animais isentos de microbiota tiveram temperaturas inferiores tanto ao dia quanto à noite, provando que a comunidade microbiana comensal tem papel importante na manutenção tônica da temperatura nesses roedores. Essa resposta foi posteriormente confirmada em coelhos submetidos a tratamento com antibióticos e mantidos em condições termoneutras (Fuller e Mitchell, 1999). Esse estudo preparou terreno para uma proposta mais específica, publicada no

ano seguinte pelo mesmo grupo. No novo estudo, foi demonstrado que camundongos resistentes e sensíveis à endotoxina tinham a mesma variação basal de temperatura após o tratamento com antibióticos, excluindo a possibilidade de participação de micro-organismos Gram-negativos, principal grupo constituinte da microbiota. Então, animais *germ-free* foram colonizados exclusivamente com micro-organismos Gram-positivos e como resultado, a temperatura basal desse grupo foi maior do que a do grupo controle. Sendo assim, foi atribuída a esse grupo de micro-organismos o propósito de manutenção da temperatura basal (Conn *et al.*, 1991).

6.2 Ação da enzima PI3K γ na febre induzida por LPS

Os resultados apresentados nesta tese demonstram, pela primeira vez, a participação da fosfatidilinositol 3-quinase gama na indução de febre por lipopolissacarídeo. A ausência da enzima impediu o aumento de temperatura decorrente da injeção intraperitoneal de LPS em camundongos. Esse fenótipo está associado à redução na concentração de IL-1 β e TNF- α no plasma dos animais deficientes. Como consequência da menor produção periférica dos pirógenos endógenos, a expressão hipotalâmica de COX-2, IL-6 e TNF- α também foi reduzida. O tratamento com o inibidor seletivo da subunidade p110 γ reproduziu o resultado inicial.

São escassas as evidências da participação de qualquer isoforma de PI3K em processos de regulação da temperatura. Um estudo recente utilizou um modelo experimental de exposição ao frio em ratos. Depois de 4 horas submetidos à temperatura de 4^o C, o tecido adiposo marrom desses animais foi extraído e analisado por meio de avaliações transcriptômicas de *microarray*. Diversos genes da via da PI3K estavam superexpressos e como confirmação, foi observado que a fosforilação de AKT neste tecido era mais acentuada nos animais expostos ao frio do que no grupo em situação termoneutra (Wang e Wahl, 2014). Becattini e colaboradores (2011) demonstraram que camundongos deficientes para PI3K γ são protegidos da resistência à insulina e inflamação metabólica. Esses achados são consequência de um menor ganho de massa adiposa, derivada do maior gasto de energia, dissipada na forma de calor por termogênese (Becattini *et al.*,

2011). Além disso, o principal mediador central de febre – a prostaglandina E_2 – atua sobre receptores EP_3 para ativação dos mecanismos intracelulares que culminam no aumento de temperatura. Um trabalho demonstrou que o receptor EP_3 tem múltiplas isoformas obtidas por *splicing* alternativo. Uma dessas isoformas (EP_{3III}) utiliza a via de PI3K/PKC/Src para exercer seus efeitos através da fosforilação de ERK1-2, mas seus efeitos sobre a termorregulação não foram aprofundados (Israel e Regan, 2009).

Por outro lado, o papel da enzima PI3K γ no processo inflamatório é amplamente estudado, desde os três importantes relatos de sua participação no acúmulo de macrófagos, desenvolvimento de timócitos, ativação de células T e migração de neutrófilos, publicados por grupos independentes na mesma edição de um importante periódico (Hirsch *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000). A importância dessa enzima se faz evidente pelo alto conteúdo e qualidade de publicações, abrangendo os mais variados modelos experimentais, além de ultrapassar os limites da bancada e se transformando em fármacos com atividade comprovada (Hawkins e Stephens, 2015). Nosso laboratório e colaboradores associados também se esforçaram a fim de descrever as funções da PI3K γ na inflamação. Em um modelo de pleurisia alérgica, foi constatado menor acúmulo de eosinófilos em animais deficientes para a enzima, evento associado com menor fosforilação de AKT e produção de IL-5 e confirmado com a administração de inibidores farmacológicos (Pinho *et al.*, 2005). Também no cérebro foi confirmada a importância de PI3K γ na indução de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Animais deficientes para a enzima tiveram sinais clínicos atrasados e mais amenos em relação ao grupo selvagem. Junto a esse achado estão menores concentrações das quimiocinas CCL2 e CCL5, além da redução do rolamento e adesão de leucócitos em na microvasculatura cerebral (Rodrigues *et al.*, 2010). A ação da enzima também tem importância em processos infecciosos: a malária cerebral é caracterizada por uma forte resposta imune, com recrutamento de leucócitos e quebra da barreira hematoencefálica. Camundongos deficientes para PI3K γ infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentaram maior sobrevivência que os controles selvagens, apesar da mesma parasitemia. Esse fenótipo foi acompanhado por menor hemorragia, menor acúmulo de leucócitos e menor ativação da micróglia no cérebro de animais nocauteados. A população de células CD8+ e os níveis de I κ B- α fosforilado também estavam

reduzidos, determinando a importância da enzima na patogênese da malária cerebral (Lacerda-Queiroz *et al.*, 2015). Na sepse, a inflamação sistêmica exacerbada é a principal causa da falha de múltiplos órgãos, da dispersão microbiana e conseqüentemente, da morte do indivíduo. Em modelos experimentais, sabe-se que a migração neutrofílica é prejudicada pela redução da expressão de receptores de quimiocinas como CXCR2 em neutrófilos, impedindo que cheguem ao local primário da infecção (Rios-Santos *et al.*, 2007). Utilizando a indução de sepse por perfuração e ligação cecal, Martin e colaboradores (2010) demonstraram que animais com deleção genética da enzima ou inativação do sítio catalítico (“*kinase-dead*”) tiveram maior sobrevivência, menor lesão tecidual e restrição da bacteremia. Associados a esses parâmetros estão menores níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e quimiocinas como MIP-1 α , MIP-2, CXCL-1 e MCP-1. Na forma grave da doença, os animais deficientes tiveram maior número de neutrófilos na cavidade peritoneal, cuja expressão de CXCR2 também era elevada em relação aos animais selvagens (Martin *et al.*, 2010). Além da função *per se*, a ação de PI3K γ pode ser dependente de vias paralelas. Utilizando um modelo de recrutamento de neutrófilos em diferentes compartimentos com a quimiocina CXCL-1, foi demonstrado que a inibição farmacológica ou genética exclusiva dessa enzima não alterava o fenótipo inflamatório. Contudo, associada a um inibidor de PI3K delta, houve redução do recrutamento celular (Pinho *et al.*, 2007). No entanto, a enzima também pode ter um importante papel no controle da inflamação. Em um modelo experimental de convulsão induzida por pilocarpina, a ausência da PI3K γ levou a um aumento da concentração de TNF- α , IL-6 e BDNF no hipocampo de camundongos. Somada à redução nos níveis de IL-10, a deleção da enzima levou ao aumento da gravidade das convulsões nesses animais (Lima *et al.*, 2015).

De uma forma geral, a inibição da PI3K γ leva à redução da inflamação pela menor produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas, fato comprovado em diversos parâmetros e modelos e ratificado neste trabalho na indução experimental de febre. Conhecidas as vias inflamatórias periféricas e a resposta do sistema nervoso central em animais selvagens ou deficientes para a PI3K γ , era preciso compreender as vias efetoras responsáveis pela febre. Para isso, o tecido adiposo marrom desses animais foi extraído e a expressão de transcritos para a proteína desacopladora 1 (UCP-1, termogenina) e para

a proteína mitogênica PGC-1 α foi avaliada. No entanto, não houve diferença relativa entre os animais selvagens e os deficientes (dados não apresentados), indicando que a termogênese parece não ser afetada pela atividade da PI3K γ . Portanto, é provável que os mecanismos envolvidos na vasoconstrição e redução da troca superficial de calor estejam envolvidos em nosso modelo experimental. Para avaliar esse parâmetro termorregulador, podem ser utilizados sensores termométricos acoplados à base da cauda desses animais, a fim de registrar a variação da temperatura nessa região.

Além disso, a fim de compreender de forma mais completa os mecanismos que envolvem a participação de PI3K γ na indução da febre por LPS, é possível propor estratégias metodológicas associadas a essa via de sinalização. Para comprovar a especificidade entre as isoformas de PI3K, animais seriam tratados com um inibidor global da atividade enzimática (wortmanina) e um inibidor seletivo para PI3K delta, que é uma das subunidades mais estudadas, além da PI3K γ . Também é uma perspectiva a verificação da fosforilação de AKT no hipotálamo por *western blotting* ou imunohistoquímica, a fim de verificar a importância de PI3K γ no processo inflamatório local que culmina na indução de febre.

6.3 Participação de PAF e seu receptor na indução de febre por LPS

Os dados demonstrados neste trabalho apontam uma resposta anômala de animais deficientes para o receptor do fator ativador de plaquetas após o estímulo febril com lipopolissacarídeo. Após a injeção intraperitoneal do pirógeno, os animais deficientes para PAFR tiveram o início da febre atrasado em relação ao grupo selvagem. Além disso, a febre se estendeu por um período muito maior. Surpreendentemente, os níveis de TNF- α no soro dos animais deficientes foram menores em todos os tempos avaliados. No entanto, a concentração plasmática de IL-1 β no tempo de 12 horas p.i. permaneceu elevada nos animais deficientes, enquanto nos animais selvagens já havia retornado aos níveis basais. No hipotálamo, a expressão das citocinas seguiu o mesmo parâmetro encontrado no plasma. Contudo, não houve diferença na expressão da enzima COX-2 em nenhum dos tempos observados, indicando que o fenótipo observado pode atuar sobre outro mecanismo indutor de febre.

A importância do fator ativador de plaquetas no processo febril já é conhecida e destacada. Mesmo em concentrações picomolares, PAF é capaz de induzir febre em ratos mantidos em ambiente termoneutro e hipotermia em temperaturas subneutras. Ao utilizar um antagonista do receptor de PAF, tanto a febre induzida por PAF quanto por LPS foram atenuadas, demonstrando portanto a ação pirogênica desse lipídio e sua ação como mediador dos efeitos do LPS (Ivanov *et al.*, 2003). No entanto, o estudo de Ivanov e colaboradores só avaliou os efeitos pirogênicos do LPS durante um período de 7 horas, ao passo que o pico da febre em nosso modelo foi observado entre 10 e 11 horas após o estímulo. Outra diferença a se destacar é que o estudo acima citado não utiliza camundongos deficientes para o receptor, apenas a intervenção farmacológica é realizada. Em outro recente estudo, a função de PAF e seu receptor sobre a febre foi novamente abordada. Ratos receberam um cateter na veia jugular por onde foi injetado o LPS e dois diferentes antagonistas do receptor de PAF. Em condições termoneutras, os animais apresentaram febre após o estímulo pirogênico, mas não houve diferença na variação da temperatura com a administração dos fármacos. Com isso, os autores sugerem que a via de sinalização de PAF esteja *upstream* aos eventos inflamatórios induzidos por LPS (Steiner e Romanovsky, 2015). Mais uma vez as diferenças metodológicas devem ser mencionadas. Mesmo utilizado uma via diferente (intraperitoneal ao invés de intravenosa), nosso modelo foi capaz de reproduzir o aspecto da curva de febre em animais selvagens, com ponto máximo por volta de 6 horas. No entanto, tanto animais deficientes para o receptor quanto os tratados com um diferente antagonista tiveram fenótipos diferentes. A princípio, não é possível comparar os dois estudos, pois apenas o presente trabalho é o primeiro a realizar um acompanhamento longitudinal mais extenso, capaz de detectar as variações tardias observadas.

Os mecanismos pelos quais a febre é atrasada e prolongada em animais deficientes para PAFR ainda não são bem esclarecidos. A redução dos níveis periféricos e hipotalâmicos de TNF- α observados nesses animais é suportada por diversos estudos conduzidos em diversos modelos experimentais. O componente inflamatório tem extrema relevância na patogênese da malária experimental. Ao infectar camundongos com *Plasmodium berghei* ANKA, foram encontrados altos níveis plasmáticos de TNF- α nos animais selvagens, mas

não naqueles deficientes para PAFR (Lacerda-Queiroz *et al.*, 2012). Em outro modelo infeccioso, níveis reduzidos de TNF- α também foram encontrados no soro de camundongos deficientes para PAF após a exposição ao vírus da Dengue (Souza *et al.*, 2009). Níveis reduzidos da citocina também foram encontrados em animais deficientes de PAFR ou selvagens tratados com antagonista do receptor após indução de sepse por CLP (Moreno *et al.*, 2006). Em estratégias de lesão estéril o fenótipo se repete: utilizando um modelo de isquemia e reperfusão intestinal, as intervenções genética e farmacológica levaram à menores concentrações sistêmicas e locais de TNF- α (Souza *et al.*, 2003).

De forma interessante, Fernandes e colaboradores abordaram as duas citocinas-chave em nosso estudo. O trabalho foi conduzido com um modelo de edema plantar induzido por PAF em ratos. Através do bloqueio seletivo de TNF- α e IL-1 β com anticorpos, foi demonstrado que PAF atua diretamente na produção local de TNF- α , enquanto a produção de IL-1 β é oriunda das células polimorfonucleares que chegam ao local da inflamação, em um processo dependente da produção inicial de TNF- α (Fernandes *et al.*, 2005). Aplicando essa teoria em nosso modelo de febre, a ausência de sinalização por deficiência do receptor de PAF leva à menor produção de TNF- α , o que foi confirmado no plasma e no hipotálamo. Na ausência de TNF- α , a produção de IL-1 β é prejudicada mas não extinta, pois fica dependente exclusivamente da reação leucocitária, justificando a diferença da concentração nos tempos de 6 e 12 horas.

Pelo que os nossos dados sugerem, a ausência do receptor e da sinalização de PAF leva a um atraso no início da febre. A primeira fase de indução de febre é mediada pela produção de C5a estimulada por LPS, responsável pela ativação de células de Küpffer que respondem a esse sinal com a produção de grandes quantidades de prostaglandina E2 (Perlik *et al.*, 2005). Portanto, podemos traçar algumas perspectivas e estratégias para esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta febril diferenciada nos animais deficientes. Uma das alternativas é dosar a anafilotoxina C5a em tempos curtos após a injeção de LPS, a fim de verificar se as células de Küpffer estão recebendo o estímulo inicial necessário. Outra hipótese é de que a produção de PGE₂ por estas células é regulada por PAF e, na ausência de seu receptor, a primeira fase de indução de febre estaria prejudicada e dessa forma, a febre só aconteceria após a liberação de citocinas e

demais mediadores tardios. No entanto, a manutenção da febre em períodos tardios e vinculada a uma maior concentração de IL-1 β não tem referências descritas na literatura. Além disso o processo febril que ocorre nos animais deficientes parece ser independente de COX-2, visto que não há diferença na expressão hipotalâmica da enzima em comparação com o grupo selvagem. Uma importante de indução de febre independente de COX-2 tem a participação central da endotelina-1 (ET-1).

PAF é um mediador fundamental da produção de endotelina-1 mediada por LPS (Slomiany e Slomiany, 2006). Também já foi descrito que ET-1 pode estimular a produção de PAF em culturas primárias de células de Küpffer, por um mecanismo dependente de cálcio (Mustafa *et al.*, 1995).

Como o aumento de temperatura observado nos animais deficientes para PAFR parece ser independente de COX-2, é plausível propor uma relação entre os resultados encontrados e a atuação do sistema PAFR/ET-1 em nosso modelo. Para ratificar esse hipótese, os animais deficientes serão tratados com inibidores seletivos do receptor ET_B, estimulados com LPS e em seguida, terão sua temperatura abdominal acompanhada para confirmação dos resultados.

6.4 Considerações finais

A febre é um mecanismo fisiológico mantido ao longo da evolução dos seres vivos e representa uma das respostas mais imediatas do corpo a um insulto inflamatório. A microbiota também evoluiu junto com seu hospedeiro, fornecendo-lhe entre outras vantagens, a maturação do sistema imune e a manutenção de níveis basais de inflamação, importantes para a homeostase do indivíduo. Uma das vias de sinalização do processo inflamatório passa pelo mediador lipídico PAF que, uma vez ligado ao seu receptor, PAFR, exerce diversas funções como a ativação do endotélio e facilitação da migração celular. Parte desses eventos pode acontecer através da via das PI3Ks, que estão *downstream* aos receptores de sete domínios transmembranas e são conhecidas por mediar a ativação leucocitária e transcrição de citocinas e fatores de transcrição cruciais para a resposta inflamatória.

A abordagem conjunta entre o fator ativador de plaquetas e a microbiota é antiga. No entanto, não é bem esclarecida. Foi descrita a participação dos micro-organismos comensais na modulação da composição de fosfolípidios da membrana, incluindo PAF e seus precursores/metabólitos, bem como sua localização diferencial e expressão reduzida em animais *germ-free* (Denizot *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1999). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que a atividade da fosfolipase A₂ (pró-inflamatória e bactericida) no intestino após o estímulo com PAF é dependente da microbiota. Animais isentos de germes ou tratados com antibióticos tiveram resposta inflamatória reduzida ou nula e a reconstituição da população microbiana também restaura a atividade e os efeitos da enzima (Rozenfeld *et al.*, 2001).

PAF é um mediador lipídico de produção e degradação rápida e sua dosagem direta é laboriosa e onerosa. Uma forma viável de estabelecer uma conexão entre a microbiota comensal e a sinalização por PAF é avaliar, através de qPCR, a expressão de seu receptor (PAF) e das enzimas responsáveis por sua biossíntese, a acetil-coA:liso-PAF acetiltransferase e pelo seu catabolismo, a PAH-acetil-hidrolase (Shindou *et al.*, 2007) em animais convencionais ou *germ-free*. A inibição da via *downstream* ao receptor PAFR torna-se inviável, pois a transdução de sinal é feita pela proteína G e afetaria outros sistemas incluindo, por exemplo, a sinalização por PI3K.

A relação direta entre a microbiota comensal e a via de sinalização por PI3K também não é abordada com detalhes pela literatura. Dois trabalhos de um mesmo grupo de pesquisa abordaram a importância da isoforma delta no desenvolvimento de colite. No primeiro, foi verificado que animais com uma mutação na subunidade catalítica p110 γ desenvolvem colite de forma espontânea, com resposta inflamatória marcante e maior sensibilidade à resposta derivada por ligantes de TLR em macrófagos. Além disso, a reconstituição da microbiota em animais *germ-free* selvagens provocou um grande aumento na expressão de mRNA para p110 γ , indicando que a enzima tem um importante papel na regulação da resposta imune inata e homeostase intestinal (Uno *et al.*, 2010). Em um estudo posterior, o grupo confirmou a necessidade da microbiota para a indução da colite nos animais deficientes, nos quais os níveis de IL-10 estão drasticamente reduzidos (Steinbach *et al.*,

2014). A relação entre a microbiota e PI3K se mostra mais estreita no trabalho de Vinolo e colaboradores (2011). É evidenciada a importância da PI3K γ na via de sinalização de GPR43, um receptor de sete domínios transmembrana ativado por ácidos graxos de cadeia curta, cuja principal origem é o metabolismo das fibras alimentares pela microbiota comensal. Neutrófilos derivados de medula óssea de camundongos p110 γ ^{-/-} foram estimulados com agonistas deste receptor e mostraram migração reduzida em relação aos animais selvagens. A mesma resposta foi obtida com a intervenção farmacológica, determinando a relação entre os metabólitos da microbiota e a sinalização por PI3K γ .

Em nosso modelo de febre induzida por LPS, é possível traçar estratégias experimentais que possam ligar os dois temas. Por exemplo, verificar por *western blotting* ou imunohistoquímica o nível de fosforilação da proteína AKT no hipotálamo, zona central da termorregulação. Sabe-se ainda que o fígado tem grande importância na captação e “filtração” de micro-organismos que escapam da barreira intestinal, sendo as células de Küpffer a responsável por essa tarefa (Balmer *et al.*, 2014). Como esse tipo celular tem fundamental importância na produção periférica de PGE₂ após estímulo pirogênico com LPS (Perlik *et al.*, 2005) e sua ativação é reduzida em animais com microbiota suprimida por antibióticos (El Kasmi *et al.*, 2012), torna-se interessante verificar a via de sinalização por PI3K γ em animais natural ou artificialmente isentos de microbiota dentro do modelo experimental de febre.

A via de ativação das PI3Ks está *downstream* a diversos receptores de 7 domínios transmembrana, como o receptor de PAF. De fato, a ativação de PAFR leva à ativação de PI3K e fosforilação das vias subsequentes (Penna *et al.*, 2001; Bloes *et al.*, 2015). Vários trabalhos utilizaram a relação sequencial entre essas estruturas para delinear mecanismos associados à inflamação e diversas doenças (Slomiany e Slomiany, 2004; Kang *et al.*, 2011; Gountopoulou *et al.*, 2008). Especificamente a respeito da PI3K γ , foi descrito o papel essencial da enzima na indução de quimiotaxia em eosinófilos estimulados por PAF (Hasan *et al.*, 2010). No presente trabalho, contudo, não parece haver relação direta entre as vias de sinalização de PAF/PAFR e PI3K γ , visto que as respostas ao estímulo febril nos dois modelos distintos apresentam fenótipos bem diferentes.

Finalmente, é possível propor experimentos a serem realizados em curto prazo que tem o propósito de esclarecer os mecanismos individuais envolvidos na indução de febre. Para a via da PI3K γ , serão geradas quimeras entre animais selvagens e deficientes para a enzima, com transferência de medula óssea para animais irradiados. Também será realizado nesses animais o protocolo de indução de febre com injeção intracerebroventricular de PGE₂, para verificação da resposta local. Para desvendar as vias que abrangem a microbiota comensal, serão planejados novos experimentos com os quais seja possível determinar o papel de TNF- α , IL-10 e dos corticoides na modulação da resposta febril, bem como o aspecto comportamental de busca por calor. Assim como para o modelo do receptor de PAF, é importante verificar a via de indução de febre independente da cicloxigenase-2. Para isso, será estudada a via da endotelina e seus componentes. Também é de interesse estudar os mecanismos efetores da termorregulação, como a participação da proteína desacopladora (UCP-1), da proteína mitogênica PGC1- α , bem como o efeito da vasoconstrição/dilatação dos vasos caudais.

7. CONCLUSÕES

A microbiota é fundamental para a indução da febre por lipopolissacarídeo. Animais axênicos falham em desenvolver febre devido ao menor nível de citocinas pró-inflamatórias circulantes e pela menor expressão de TNF- α no hipotálamo, em relação ao grupo colonizado. A convencionalização dos animais germ-free restaura o padrão inflamatório. Por outro lado, a redução da microbiota de animais convencionais impede o desenvolvimento do estado febril.

A ausência de PI3Ky impede a indução de febre por LPS em camundongos e a inibição farmacológica da enzima em animais selvagens leva à mesma resposta. Este fenótipo está relacionado à redução da concentração plasmática de IL-1 β e TNF- α . Ademais, camundongos PI3Ky $^{-/-}$ têm expressão reduzida de COX-2, TNF- α e IL-6 no hipotálamo após injeção de LPS.

A ausência do receptor de PAF não extingue o processo febril, mas o torna atrasado e prolongado. O antagonismo farmacológico confirma o fenótipo. Esta característica está ligada a uma maior concentração plasmática de IL-1 β , um importante pirógeno endógeno. Além disso, não houve alteração da expressão hipotalâmica de COX-2 nos animais KO, o que sugere uma via alternativa para os achados.

Dessa forma, é possível afirmar que a microbiota comensal e a enzima PI3Ky agem por um mecanismo semelhante: após o estímulo com LPS, promovem a ativação da produção periférica de citocinas pró-inflamatórias, que promovem a transcrição de TNF- α e conseqüentemente, na indução de febre. Contudo, ainda é possível que haja interferências de ambas as vias no hipotálamo, regulando processos dependentes de COX-2 que ainda serão averiguados.

Além disso, foi demonstrado que a via de sinalização por PAFR participa da febre induzida por LPS e atua por mecanismos independentes de COX-2, cujos participantes ainda precisam ser revelados.

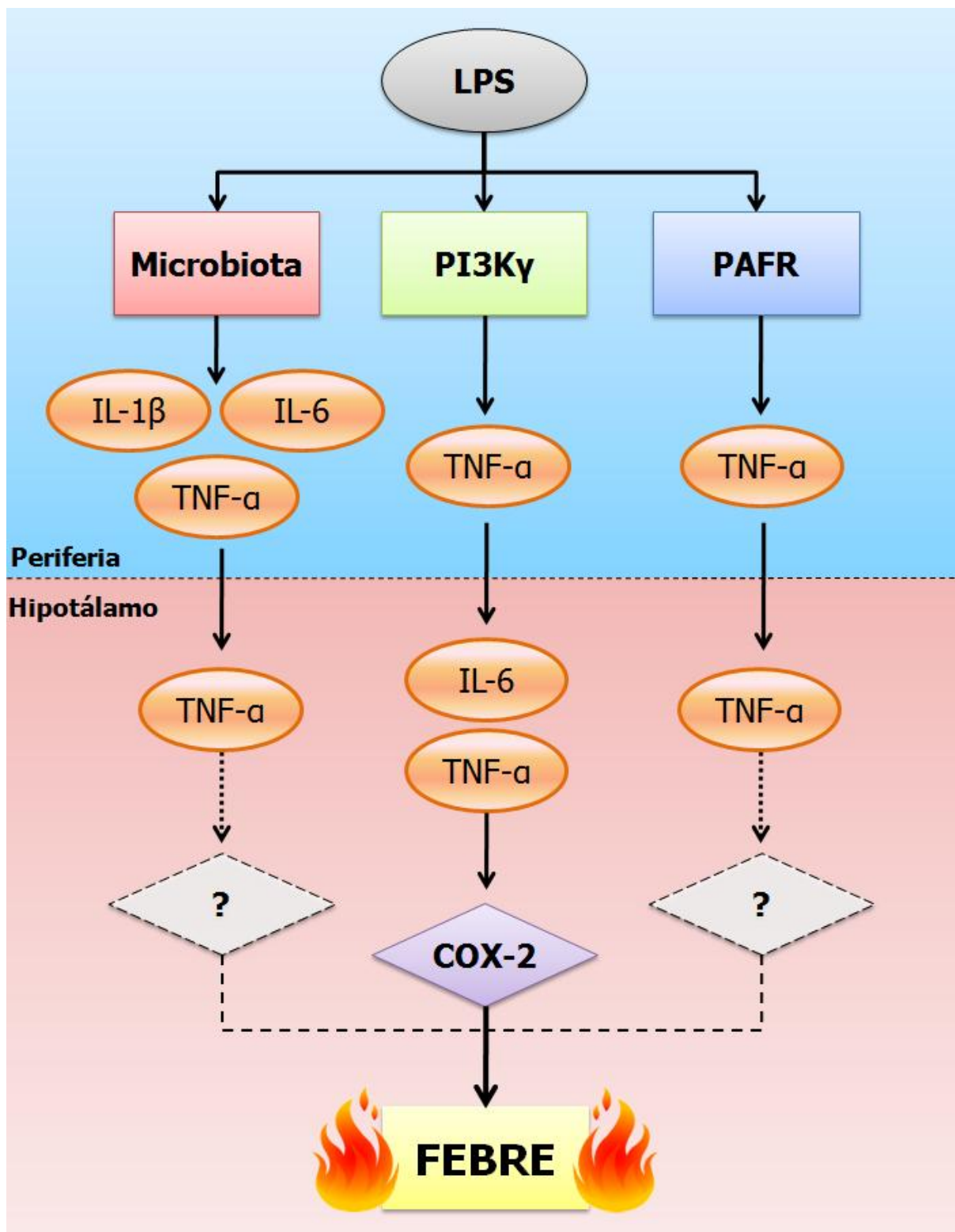


Figura 26: Mecanismos e mediadores inflamatórios envolvidos na indução de febre por LPS, conforme os dados apresentados neste trabalho. A entrada de LPS no organismo promove ativação da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Essas citocinas atingem o hipotálamo e levam à produção local de TNF- α e IL-6 que, na via da PI3K γ , estimula a expressão de COX-2 que culmina na indução de febre. As vias pelas quais a microbiota e o receptor de PAF atuam ainda precisam de maiores esclarecimentos.

8. REFERÊNCIAS

Abrams GD, Bauer H, Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest.* 1963 Mar;12:355-64. PMID: 14010768

Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009 Feb;98(2):229-38. PMID: 19143664

Akin, JA. Homeostatic Processes for Thermoregulation. *Nature Education Knowledge.* 2011, 3(10):7. No PMID available.

Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 2003 Jan 22;85(2):85-95. PMID: 12527213

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol.* 1997 Oct 1;7(10):776-89. PMID: 9368760

Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J Neurosci.* 2006 Jun;23(12):3359-67. PMID: 16820025

Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Fagundes CT, Cisalpino D, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Silva TA, Nicoli JR, Vieira LQ, Souza DG, Teixeira MM. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 12;105(6):2193-7. PMID: 18268332

Andersen CL, Ledet-Jensen J, Ørntoft T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research.* 2004 (64): 5245-5250. PMID: 15289330

Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.* 2008 Feb 15;410(1):1-17. PMID: 18215151

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer.* 2005 Dec;5(12):921-9. PMID: 16341083

Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, Lawson MA, Hapfelmeier S, Miele L, Grieco A, Van Vlierberghe H, Fahrner R, Patuto N, Bernsmeier C, Ronchi F, Wyss M, Stroka D, Dickgreber N, Heim MH, McCoy KD, Macpherson AJ. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*. 2014 May 21;6(237):237ra66. PMID: 24848256

Becattini B, Marone R, Zani F, Arsenijevic D, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG, Thorens B, Preitner F, Wymann MP, Solinas G. PI3K γ within a nonhematopoietic cell type negatively regulates diet-induced thermogenesis and promotes obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 18;108(42):E854-63. PMID: 21949398

Benveniste J. Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature*. 1974 Jun 7;249(457):581-2. PMID: 4275800

Benveniste J, Le Couedic JP, Polonsky J, Tence M. Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature*. 1977 Sep 8;269(5624):170-1. PMID: 909582

Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. Cytokines, PGE₂ and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005 May;76(1-4):1-18. PMID: 15967158

Bloes DA, Kretschmer D, Peschel A. Enemy attraction: bacterial agonists for leukocyte chemotaxis receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Feb;13(2):95-104. PMID: 25534805

Boulant JA. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol*. 2006 Apr;100(4):1347-54. PMID: 16540713

Brock TG. Platelet-Activating Factor: Activator of Inflammation, Angiogenesis, and Metastasis. Cayman Chemicals Online Article Library, 2009.

Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends Biochem Sci*. 2015 Feb;40(2):88-100. PMID: 25573003

Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol*. 2011 Jan 15;214(Pt 2):242-53. PMID: 21177944

Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):224-38. PMID: 15236188

Castor MG, Rezende BM, Bernardes PT, Vieira AT, Vieira EL, Arantes RM, Souza DG, Silva TA, Teixeira MM, Pinho V. PI3K γ controls leukocyte recruitment, tissue injury, and

lethality in a model of graft-versus-host disease in mice. *J Leukoc Biol.* 2011 Jun;89(6):955-64. PMID: 21402770

Chang JD, Sukhova GK, Libby P, Schwartz E, Lichtenstein AH, Field SJ, Kennedy C, Madhavarapu S, Luo J, Wu D, Cantley LC. Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 8;104(19):8077-82. PMID: 17483449

Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 (Pt 3):617-29. PMID: 8391253

Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4586-91. PMID: 20571116

Coelho MM, Souza GE, Pelá IR. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am J Physiol.* 1992 Aug;263(2 Pt 2):R423-7. PMID: 1510181

Comerford I, Litchfield W, Kara E, McColl SR. PI3K γ drives priming and survival of autoreactive CD4(+) T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2012;7(9):e45095. PMID: 23028778

Condliffe AM, Hawkins PT, Stephens LR, Haslett C, Chilvers ER. Priming of human neutrophil superoxide generation by tumour necrosis factor- α is signalled by enhanced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate but not inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation. *FEBS Lett.* 1998 Nov 13;439(1-2):147-51. PMID: 9849896

Condliffe AM, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Turner M, Webb L, Wymann MP, Hirsch E, Ruckle T, Camps M, Rommel C, Jackson SP, Chilvers ER, Stephens LR, Hawkins PT. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1432-40. PMID: 15878979

Conn CA, Franklin B, Freter R, Kluger MJ. Role of gram-negative and gram-positive gastrointestinal flora in temperature regulation of mice. *Am J Physiol.* 1991 Dec;261(6 Pt 2):R1358-63. PMID: 1750560

Corr SC, Gahan CG, Hill C. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 (a) Aug;50(3):380-8. PMID: 17537177

Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 (b) May 1;104(18):7617-21. PMID: 17456596

Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Apr;42:207-17. PMID: 24636517

Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*. 2011 Mar;23(3):187-92. PMID: 21303428

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3):184-92. PMID: 16453012

Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann MP, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J*. 2004 Sep 1;23(17):3505-15. PMID: 15318168

Denizot Y, Raibaud P, Ducluzeau R, Ladiré M, Thomas Y, Benveniste J. Modulation of gut wall paf-acether and precursors by intestinal microflora. *Res Immunol*. 1990 Mar-Apr;141(3):235-40. PMID: 2218055

Derrien M, van Hylckama Vlieg JE. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol*. 2015 Jun;23(6):354-366. PMID: 25840765

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*. 2008 Dec;43(2):164-74. PMID: 18456279

Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):304-11. PMID: 16472586

Di Santo E, Sironi M, Pozzi P, Gnocchi P, Isetta AM, Delvaux A, Goldman M, Marchant A, Ghezzi P. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 beta production in the brain without affecting the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*. 1995 May-Jun;2(3):149-54. PMID: 8646564

dos Santos LM, Santos MM, de Souza Silva HP, Arantes RM, Nicoli JR, Vieira LQ. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med Microbiol Immunol* 2011;200:29–38. PMID: 20838807

Duarte R, Silva AM, Vieira LQ, Afonso LC, Nicoli JR. *Trypanosoma cruzi*: influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice. *Exp Parasitol* 2005;111:87–96. PMID: 16038901

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8. PMID: 15831718

Engblom D, Saha S, Engström L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson PJ, Blomqvist A. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*. 2003 Nov;6(11):1137-8. PMID: 14566340

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):606-19. PMID: 16847462

Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jun;15(6):335-49.

Fabricio AS, Rae GA, Zampronio AR, D'Orléans-Juste P, Souza GE. Central endothelin ET(B) receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jan;290(1):R164-71. PMID: 16123229

Fagundes CT, Souza DG, Nicoli JR, Teixeira MM. Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. *Microbes Infect*. 2011 Dec;13(14-15):1121-32. PMID: 21867769

Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM, Souza DG. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to

control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol.* 2012a Feb 1;188(3):1411-20. PMID: 22210917

Fagundes CT, Amaral FA, Teixeira AL, Souza DG, Teixeira MM. Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses. *Immunol Rev.* 2012b Jan;245(1):250-64. PMID: 22168425

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem.* 2007 May;101(3):577-99. PMID: 17257165

Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, de Souza GE, Fittipaldi JF, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. *Br J Pharmacol.* 2005 Sep;146(2):209-16. PMID: 16025141

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun.* 2010 Jan;24(1):9-16. doi: 10.1016/j.bbi.2009.05.058. Epub 2009 May 28. PMID: 19481599

Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:115-33. PMID: 24997031

Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015:489821. PMID: 26090491

Fuller A, Mitchell D. Oral antibiotics reduce body temperature of healthy rabbits in a thermoneutral environment. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1999;10(1):1-13. PMID: 10392312

Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, Tavares LP, Salgado AP, Cassali GD, Sousa LP, Machado AV, Teixeira MM. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. *PLoS Pathog.* 2010 Nov 4;6(11):e1001171.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1355-9. PMID: 16741115

Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jun;135(6):1424-32. PMID: 26051949

Gountopoulou A, Leondaritis G, Galanopoulou D, Mavri-Vavayanni M. TNFalpha is a potent inducer of platelet-activating factor synthesis in adipocytes but not in preadipocytes. Differential regulation by PI3K. *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):174-81. PMID: 18180165

Grigg GC, Beard LA, Augee ML. The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds. *Physiol Biochem Zool*. 2004 Nov-Dec;77(6):982-97. PMID: 15674771

Hasan AM, Mourtada-Maarabouni M, Hameed MS, Williams GT, Dent G. Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates chemotactic responses of human eosinophils to platelet-activating factor. *Int Immunopharmacol*. 2010 Sep;10(9):1017-21. PMID: 20685403

Harden LM, Rummel C, Luheshi GN, Poole S, Gerstberger R, Roth J. Interleukin-10 modulates the synthesis of inflammatory mediators in the sensory circumventricular organs: implications for the regulation of fever and sickness behaviors. *J Neuroinflammation*. 2013 Feb 6;10:22. doi: 10.1186/1742-2094-10-22. PMID: 23388469

Harden LM, Rummel C, Laburn HP, Damm J, Wiegand F, Poole S, Gerstberger R, Roth J. Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflugers Arch*. 2014 Jul;466(7):1451-66. PMID: 24114176

Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1851(6):882-897. PMID: 25514767

Hirayama K, Uetsuka K, Kuwabara Y, Tamura M, Itoh K. Vitamin K deficiency of germfree mice caused by feeding standard purified diet sterilized by gamma-irradiation. *Exp Anim*. 2007 Jul;56(4):273-8. PMID: 17660681

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000 Feb 11;287(5455):1049-53. PMID: 10669418

Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem*. 2002 Jun;131(6):773-9. PMID: 12038971

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001 Feb 2;291(5505):881-4. PMID: 11157169

Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol*. 2003 Mar;4(3):269-73. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12548285

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1268-73. PMID: 22674334

Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):183-90. PMID: 24656806

Ikeda M, Hamada K, Sumitomo N, Okamoto H, Sakakibara B. Serum amyloid A, cytokines, and corticosterone responses in germfree and conventional mice after lipopolysaccharide injection. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Jun;63(6):1006-10. PMID: 10427685

Ikeda M, Ohira H, Toyama Y, Katagiri T, Sakakibara B. Effect of intestinal microflora on the production of interleukin 10 and prostaglandin e(2) in serum and Kupffer cells from germfree and conventional mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2007 Nov;41(3):169-74. PMID: 18299711

Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med*. 1995 Jul;238(1):5-20. PMID: 7608647

Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res*. 2000 Jan;39(1):41-82. PMID: 10729607

Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:599-609. PMID: 12432946

Israel DD, Regan JW. EP(3) prostanoid receptor isoforms utilize distinct mechanisms to regulate ERK 1/2 activation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1791(4):238-45. PMID: 19416642

IUPS Thermal Commission - Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences. Glossary of terms for thermal physiology: Third edition. *Jpn J Physiol*. 2001.51: 245-280. No PMID available.

Ivanov AI, Patel S, Kulchitsky VA, Romanovsky AA. Platelet-activating factor: a previously unrecognized mediator of fever. *J Physiol*. 2003 Nov 15;553(Pt 1):221-8. PMID: 14565987

Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1977-93. PMID: 14977603

Ivanov AI, Patel S, Kulchitsky VA, Romanovsky AA. Platelet-activating factor: a previously unrecognized mediator of fever. *J Physiol.* 2003 Nov 15;553(Pt 1):221-8. PMID: 14565987

Ivanov KP. The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *J Therm Biol.* 2006; 31:24-29. No PMID available.

Janssen AW, Kersten S. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB J.* 2015 Apr 28. pii: fj.14-269514. PMID: 25921831

Johnston NA, Bosgraaf C, Cox L, Reichensperger J, Verhulst S, Patten C Jr, Toth LA. Strategies for refinement of abdominal device implantation in mice: strain, carboxymethylcellulose, thermal support, and atipamezole. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2007 Mar;46(2):46-53. PMID: 17343353

Kabat AM, Srinivasan N, Maloy KJ. Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. *Trends Immunol.* 2014 Nov;35(11):507-17. PMID: 25172617

Kang NI, Yoon HY, Kim HA, Kim KJ, Han MK, Lee YR, Hwang PH, Soh BY, Shin SJ, Im SY, Lee HK. Protein kinase CK2/PTEN pathway plays a key role in platelet-activating factor-mediated murine anaphylactic shock. *J Immunol.* 2011 Jun 1;186(11):6625-32. PMID: 21531890

Kao CH, Huang WT, Lin MT, Wu WS. Central interleukin-10 attenuated lipopolysaccharide-induced changes in core temperature and hypothalamic glutamate, hydroxyl radicals and prostaglandin-E(2). *Eur J Pharmacol.* 2011 Mar 5;654(2):187-93. PMID: 21237148

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:615-75. PMID: 11687500

Kearney M, Shine R, Porter WP. The potential for behavioral thermoregulation to buffer "cold-blooded" animals against climate warming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 10;106(10):3835-40. PMID: 19234117

Klingenspor M. *Exp Physiol.* 2003 Jan;88(1):141-8. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. PMID: 12525862

Kluger MJ, Conn CA, Franklin B, Freter R, Abrams GD. Effect of gastrointestinal flora on body temperature of rats and mice. *Am J Physiol.* 1990 Feb;258(2 Pt 2):R552-7. PMID: 2309941

Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.* 1991 Jan;71(1):93-127. PMID: 1986393

Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):313-9. PMID: 12660731

Kozak W, Zheng H, Conn CA, Soszynski D, van der Ploeg LH, Kluger MJ. Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol.* 1995 Nov;269(5 Pt 2):R969-77. PMID: 7503324

Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 2007 Aug 31;14(4):169-81. PMID: 17916580

Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Rachid MA, Soriani FM, Sousa LP, Campos RD, Quesniaux VF, Teixeira MM, Teixeira AL. Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol.* 2012 Jan;180(1):246-55. PMID: 22079430

Lacerda-Queiroz N, Brant F, Rodrigues DH, Vago JP, Rachid MA, Sousa LP, Teixeira MM, Teixeira AL. Phosphatidylinositol 3-Kinase γ is required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One.* 2015 Mar 16;10(3):e0119633. PMID: 25775137

Launey Y, Nessler N, Mallédant Y, Seguin P. Clinical review: fever in septic ICU patients - friend or foe? *Crit Care.* 2011;15(3):222. PMID: 21672276

Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, Saper CB. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci.* 2007 Sep;10(9):1131-3. PMID: 17676060

Leon LR, Kozak W, Rudolph K, Kluger MJ. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):R81-9. PMID: 9887180

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):837-48. PMID: 16497592

Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000 Feb 11;287(5455):1046-9. PMID: 10669417

Li Z, Perlik V, Feleder C, Tang Y, Blatteis CM. Küpffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 May;290(5):R1262-70. PMID: 16410400

Lima IV, Campos AC, Miranda AS, Vieira ÉL, Amaral-Martins F, Vago JP, Santos RP, Sousa LP, Vieira LB, Teixeira MM, Fiebich BL, Moraes MF, Teixeira AL, de Oliveira AC. PI3K γ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Exp Neurol*. 2015 May;267:123-34. PMID: 25749189

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Aug;8(8):627-44. doi: 10.1038/nrd2926. PMID: 19644473

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PMID: 11846609

Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*. 2003 Feb;62(1):67-72. PMID: 12740060

Machado RR, Soares DM, Proudfoot AE, Souza GE. CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (*E. coli*) and RANTES in rats. *Brain Res*. 2007 Aug 3;1161:21-31. Epub 2007 Jun 9. PMID: 17604006

Mackowiak PA. Temperature regulation and the pathogenesis of fever. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. 2010. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. ISBN: 978-0-443-06839-3

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1261-74. PMID: 17604717

Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):827-35. PMID: 25421702

Martin EL, Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Assenzio B, Puntorieri V, Del Sorbo L, Fanelli V, Bosco M, Delsedime L, Pinho JF, Lemos VS, Souto FO, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Slutsky AS, Ruckle T, Hirsch E, Teixeira MM, Ranieri VM. Phosphoinositide-3 kinase

gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):762-73. PMID: 20508212

Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011 Jan;12(1):5-9. PMID: 21169997

Matsumura K, Cao C, Ozaki M, Morii H, Nakadate K, Watanabe Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci.* 1998 Aug 15;18(16):6279-89. PMID: 9698320

Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics.* 2003 Jun;111(6 Pt 3):1595-600. PMID: 12777598

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):107-18. PMID: 16009137

McCafferty DJ, Gilbert C, Paterson W, Pomeroy PP, Thompson D, Currie JI, Ancel A. Estimating metabolic heat loss in birds and mammals by combining infrared thermography with biophysical modelling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2011 Mar;158(3):337-45. PMID: 20869456

McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010 Oct 15;330(6002):362-6. PMID: 20947763

Mikkelsen HB, Garbarsch C, Trantum-Jensen J, Thuneberg L. Macrophages in the small intestinal muscularis externa of embryos, newborn and adult germ-free mice. *J Mol Histol.* 2004 May;35(4):377-87. PMID: 15503811

Moreno SE, Alves-Filho JC, Rios-Santos F, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, Teixeira MM. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):1264-71. PMID: 16818786

Morrow LE, McClellan JL, Conn CA, Kluger MJ. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1993 May;264(5 Pt 2):R1010-6. PMID: 8498588

Morrow LE, McClellan JL, Klir JJ, Kluger MJ. The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. *Am J Physiol.* 1996 Sep;271(3 Pt 2):R732-7. PMID: 8853398

Mustafa SB, Gandhi CR, Harvey SA, Olson MS. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. *Hepatology*. 1995 Feb;21(2):545-53. PMID: 7843729

Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci*. 2002 Jun 1;22(11):4600-10. PMID: 12040067

Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Nov;301(5):R1207-28. PMID: 21900642

O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006 Jul;7(7):688-93. PMID: 16819463

Ohno H. Impact of commensal microbiota on the host pathophysiology: focusing on immunity and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2015 Jan;37(1):1-3. PMID: 25487033

Oka T, Oka K, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S, Saper CB. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol*. 2003 Sep 15;551(Pt 3):945-54. PMID: 12837930

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177. PMID: 17594176

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):375-87. PMID: 15294162

Penna C, Bassino E, Alloatti G. Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 Apr 1;236(4):390-401. PMID: 21378031

Perlik V, Li Z, Goorha S, Ballou LR, Blatteis CM. LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Aug;289(2):R332-R339. PMID: 15802558

Pinho V, Souza DG, Barsante MM, Hamer FP, De Freitas MS, Rossi AG, Teixeira MM. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in

vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005 May;77(5):800-10. PMID: 15860799

Pinho V, Russo RC, Amaral FA, de Sousa LP, Barsante MM, de Souza DG, Alves-Filho JC, Cara DC, Hayflick JS, Rommel C, Ruckle T, Rossi AG, Teixeira MM. Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7891-8. PMID: 18025236

Podoprigora GI. Body temperature and the reaction to pyrogenal in germ-free and ordinary animals. *Biull Eksp Biol Med.* 1978 Mar;85(3):263-4. PMID: 667317

Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:419-45. PMID: 10966465

Puri KD, Doggett TA, Douangpanya J, Hou Y, Tino WT, Wilson T, Graf T, Clayton E, Turner M, Hayflick JS, Diacovo TG. Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3448-56. PMID: 14751923

Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG. The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):150-7. PMID: 15769890

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):59-65. PMID: 20203603

Quigley EM. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: what are the facts? *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Dec;8(6):704-8. PMID: 18775516

Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Mar 1;175(5):490-7. PMID: 17138957

Robertshaw D. Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals. *J Appl Physiol*. 2006 Aug;101(2):664-8. PMID: 16675613

Rodrigues DH, Vilela MC, Barcelos LS, Pinho V, Teixeira MM, Teixeira AL. Absence of PI3Kgamma leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2010 May;222(1-2):90-4. PMID: 20303183

Roth J, Blatteis CM. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol*. 2014 Oct;4(4):1563-604. PMID: 25428854

Romanovsky AA, Simons CT, Kulchitsky VA. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):R323-31. PMID: 9688995

Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci*. 2005 Sep 1;10:2193-216. PMID: 15970487

Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Jan;292(1):R37-46. PMID: 17008453

Rozenfeld RA, Liu X, DePlaen I, Hsueh W. Role of gut flora on intestinal group II phospholipase A2 activity and intestinal injury in shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Oct;281(4):G957-63. PMID: 11557516

Rückle T, Schwarz MK, Rommel C. PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Nov;5(11):903-18. PMID: 17080027

Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Nov;289(5):R1244-52. PMID: 16081879

Russo RC, Garcia CC, Barcelos LS, Rachid MA, Guabiraba R, Roffê E, Souza AL, Sousa LP, Mirolo M, Doni A, Cassali GD, Pinho V, Locati M, Teixeira MM. Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Leukoc Biol*. 2011 Feb;89(2):269-82. PMID: 21048214

Saegusa Y, Tabata H. Usefulness of infrared thermometry in determining body temperature in mice. *J Vet Med Sci*. 2003 Dec;65(12):1365-7. PMID: 14709829

Sajadi MM, Bonabi R, Sajadi MR, Mackowiak PA. Akhawayni and the first fever curve. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct;55(7):976-80. PMID: 22820543

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16767-72. PMID: 18931303

Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 26;15(8):1088-95. PMID: 22837039

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 2000 Feb 11;287(5455):1040-6. PMID: 10669416

Sassone-Corsi M, Raffatellu M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4081-7. PMID: 25888704

Scammell TE, Elmquist JK, Griffin JD, Saper CB. Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci*. 1996 Oct 1;16(19):6246-54. PMID: 8815905

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Oct;2(10):760-8. PMID: 11584303

Schiltz JC, Sawchenko PE. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci*. 2002 Jul 1;22(13):5606-18. PMID: 12097512

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859-904. PMID: 20664075

Serrats J, Schiltz JC, García-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE. Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):94-106. PMID: 20152116

Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002 Dec;16(6):915-31. PMID: 12473298

Shanahan F. Gut microbes: from bugs to drugs. *Am J Gastroenterol*. 2010 Feb;105(2):275-9. PMID: 20068561

Shimizu T, Honda Z, Nakamura M, Bito H, Izumi T. Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 1992 Sep 25;44(6):1001-8. PMID: 1329754

Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):6532-9. Epub 2006 Dec 20. PMID: 17182612

Schortgen F. Fever in sepsis. *Minerva Anesthesiol*. 2012 Nov;78(11):1254-64. PMID: 22772856

Slomiany BL, Slomiany A. Platelet-activating factor mediates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interference with salivary mucin synthesis via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent constitutive nitric-oxide synthase activation. *J Physiol Pharmacol*. 2004 Mar;55(1 Pt 1):85-98. PMID: 15082869

Slomiany BL, Slomiany A. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced cytosolic phospholipase A2 activation interferes with salivary mucin synthesis via platelet activating factor generation. *Inflammopharmacology*. 2006 Aug;14(3-4):144-9. PMID: 16983494

Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007 Apr;19(2):59-69. PMID: 17118672

Sobko T, Reinders C, Norin E, Midtvedt T, Gustafsson LE, Lundberg JO. Gastrointestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Nov;287(5):G993-7. PMID: 15256364

Souza DG, Pinho V, Soares AC, Shimizu T, Ishii S, Teixeira MM. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol*. 2003 Jun;139(4):733-40. PMID: 12812996

Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, Kroon EG, Sachs D, Cunha FQ, Bukin E, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):14138-43. PMID: 19666557

Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol.* 2004 Sep 15;173(6):4137-46. PMID: 15356164

Souza DG, *et al.* The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol* 2007; 179:8533–8543. PMID: 18056401

Sprinz H, Kundel DW, Dammin GJ, Horowitz RE, Schneider H, Formal SB. The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Am J Pathol.* 1961 Dec;39:681-95. PMID: 13915950

Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem.* 1997 Jul 18;272(29):17895-8. PMID: 9218411

Starling JR, Balish E. Lysosomal enzyme activity in pulmonary alveolar macrophages from conventional, germfree, monoassociated, and conventionalized rats. *J Reticuloendothel Soc* 1981;30:497–505. PMID: 7341772

Steinbach EC, Kobayashi T, Russo SM, Sheikh SZ, Gipson GR, Kennedy ST, Uno JK, Mishima Y, Borst LB, Liu B, Herfarth H, Ting JP, Sartor RB, Plevy SE. Innate PI3K p110 δ regulates Th1/Th17 development and microbiota-dependent colitis. *J Immunol.* 2014 Apr 15;192(8):3958-68. PMID: 24634494

Steiner AA, Rudaya AY, Robbins JR, Dragic AS, Langenbach R, Romanovsky AA. Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Nov;289(5):R1253-7. PMID: 16081878

Steiner AA, Chakravarty S, Rudaya AY, Herkenham M, Romanovsky AA. Bacterial lipopolysaccharide fever is initiated via Toll-like receptor 4 on hematopoietic cells. *Blood.* 2006 (a) May 15;107(10):4000-2. PMID: 16403908

Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, Roberts JL, Kobayashi S, Matsumura K, Sawchenko PE, Romanovsky AA. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 2006 (b) Sep;4(9):e284. PMID: 16933973

Steiner AA, Romanovsky AA. Platelet-activating factor is a potent pyrogen and cryogen, but it does not mediate lipopolysaccharide fever or hypothermia. *Temperature.* 2015, 2 (4). No PMID available.

Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):710-4. PMID: 9445477

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004 Jul 1;558(Pt 1):263-75. PMID: 15133062

Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, Stephens L. p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol*. 2005 Mar 29;15(6):566-70. PMID: 15797027

Székely M, Balaskó M, Romanovsky AA. Peripheral neural inputs. Their role in fever development. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Mar 15;813:427-34. PMID: 9100916

Tanaka M, McKinley MJ, McAllen RM. Roles of two preoptic cell groups in tonic and febrile control of rat tail sympathetic fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Apr;296(4):R1248-57. PMID: 19211726

Tattersall GJ, Sinclair BJ, Withers PC, Fields PA, Seebacher F, Cooper CE, Maloney SK. Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Compr Physiol*. 2012 Jul;2(3):2151-202. PMID: 23723035

Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. *J Immunol*. 1996 Nov 15;157(10):4681-7. PMID: 8906849

Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jan;15(1):7-24. PMID: 25533673

Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol Immunol*. 1995;39(8):555-62. PMID: 7494493

Uno JK, Rao KN, Matsuoka K, Sheikh SZ, Kobayashi T, Li F, Steinbach EC, Sepulveda AR, Vanhaesebroeck B, Sartor RB, Plevy SE. Altered macrophage function contributes to colitis in mice defective in the phosphoinositide-3 kinase subunit p110δ. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1642-53, 1653.e1-6. PMID: 20637203

Vadas P, Perelman B. Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1329-33. PMID: 22460068

Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20858-63. PMID: 19075245

Vasilache AM, Andersson J, Nilsberth C. Expression of PGE2 EP3 receptor subtypes in the mouse preoptic region. *Neurosci Lett*. 2007 Aug 23;423(3):179-83. PMID: 17706357

Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res*. 1993 May;34(5):691-702. PMID: 8389794

Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun 9. PMID: 26055247

Vinolo MA, Ferguson GJ, Kulkarni S, Damoulakis G, Anderson K, Bohlooly-Y M, Stephens L, Hawkins PT, Curi R. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One*. 2011;6(6):e21205. PMID: 21698257

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501. PMID: 12094235

Voigt P, Dorner MB, Schaefer M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):9977-86. PMID: 16476736

Wang H, Tan X, Chang H, Huang W, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Platelet-activating factor receptor mRNA is localized in eosinophils and epithelial cells in rat small intestine: regulation by dexamethasone and gut flora. *Immunology*. 1999 Jul;97(3):447-54. PMID: 10447766

Wang X, Wahl R. Responses of the insulin signaling pathways in the brown adipose tissue of rats following cold exposure. *PLoS One*. 2014 Jun 10;9(6):e99772. PMID: 24915042

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*. 2001 Aug;24(8):450-5. PMID: 11476884

Wegner NC, Snodgrass OE, Dewar H, Hyde JR. Animal physiology. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus*. *Science*. 2015 May 15;348(6236):786-9. PMID: 25977549

Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion. Signal integration and NF- κ B translocation. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2297-303. PMID: 7537762

Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1983 Feb;33(1):46-50. PMID: 6834773

Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, Coutinho PM, Minx P, Latreille P, Cordum H, Van Brunt A, Kim K, Fulton RS, Fulton LA, Clifton SW, Wilson RK, Knight RD, Gordon JI. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e156. PMID: 17579514

Yoshida K, Li X, Cano G, Lazarus M, Saper CB. Parallel preoptic pathways for thermoregulation. *J Neurosci*. 2009 Sep 23;29(38):11954-64. PMID: 19776281

Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*. 2010 Jun;92(6):692-7. PMID: 20167241

Zachar Z, Savage DC. Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1979 Jan;23(1):168-74. PMID: 106003

Zampronio AR, Melo MC, Hopkins SJ, Souza GE. Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor (PFPF). *Inflamm Res*. 2000 Sep;49(9):473-9. PMID: 11071122

Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372-85. PMID: 23973224

8.1 Referências dos iniciadores utilizados para qPCR

- **18S**

Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, Tavares LP, Salgado AP, Cassali GD, Sousa LP, Machado AV, Teixeira MM. **Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice.** PLoS Pathog. 2010 Nov 4;6(11):e1001171.

- **GAPDH**

Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A. **A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection.** Nature. 2011 Jun 8;474(7350):208-11.

- **HPRT**

Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Fagundes CT, Cisalpino D, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Silva TA, Nicoli JR, Vieira LQ, Souza DG, Teixeira MM. **Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 12;105(6):2193-7.

- **RPL4**

Iniciador desenhado no Laboratório de Imunofarmacologia

- **COX-2**

Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. **Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 24;102(21):7671-6.

- **EP₁₋₄R**

Nasrallah R, Xiong H, Hébert RL. **Renal prostaglandin E2 receptor (EP) expression profile is altered in streptozotocin and B6-Ins2Akita type I diabetic mice.** Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Jan;292(1):F278-84.

- **IL-1 β**

Kim YH, Kim JK, Kim DJ, Nam JH, Shim SM, Choi YK, Lee CH, Poo H. **Diet-induced obesity dramatically reduces the efficacy of a 2009 pandemic H1N1 vaccine in a mouse model.** J Infect Dis. 2012 Jan 15;205(2):244-51.

- **IL-6**

Jimeno R, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Martínez C, Juarranz Y, Leceta J. **New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes.** Immunol Cell Biol. 2010 Oct;88(7):734-45.

- **IL-10**

Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Fagundes CT, Cisalpino D, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Silva TA, Nicoli JR, Vieira LQ, Souza DG, Teixeira MM. **Commensal**

microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 12;105(6):2193-7.

- **PGC-1 α**

Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguère V, Kralli A. **Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 23;104(4):1418-23.

- **PTGES**

Ninomiya Y, Yasuda T, Kawamoto M, Yuge O, Okazaki Y. **Liver X receptor ligands inhibit the lipopolysaccharide-induced expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and diminish prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2007 Jan;103(1):44-50.

- **TNF- α**

Kumar S, Jaffar-Bandjee MC, Giry C, Connen de Kerillis L, Merits A, Gasque P, Hoarau JJ. **Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection.** Virol J. 2012 Dec 19;9:313.

- **UCP-1**

Becerril S, Rodríguez A, Catalán V, Sáinz N, Ramírez B, Collantes M, Peñuelas I, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. **Deletion of inducible nitric-oxide synthase in leptin-deficient mice improves brown adipose tissue function.** PLoS One. 2010 Jun 4;5(6):e10962.

ANEXO 1: CERTIFICAÇÕES PARA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA EXPERIMENTAÇÃO

Protocolo 355/2012

A respeito da utilização de animais da linhagem Swiss e sua contraparte, os animais *Germ-Free*.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 355 / 2012, relativo ao projeto intitulado Avaliação do papel da microbiota comensal em um modelo experimental de febre induzida em camundongos , que tem como responsável MAURO MARTINS TEIXEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 22/11/2012. Este certificado expira-se em 22/11/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 355 / 2012, related to the Project entitled Assessment of the role of commensal microbiota in an experimental model of induced fever in mice , under the supervision of MAURO MARTINS TEIXEIRA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 22/11/2012. This certificates expires in 22/11/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 22/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 - 31270-901
Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Protocolo 214/2014

A respeito da utilização de animais da linhagem C57BL/6 e suas contrapartes, os animais deficientes para as proteínas fosfatidilinositol 3-quinase e receptor do fator ativador de plaquetas.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 214 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do papel da enzima PI3K-gama e do receptor de PAF em um modelo experimental de febre em camundongos", que tem como responsável MAURO MARTINS TEIXEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/09/2014. Este certificado expira-se em 05/09/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 214 / 2014, related to the Project entitled "Assessment of the role of PI3K-gamma and PAF receptor in an experimental model of induced fever in mice", under the supervision of MAURO MARTINS TEIXEIRA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/09/2014. This certificate expires in 05/09/2019.

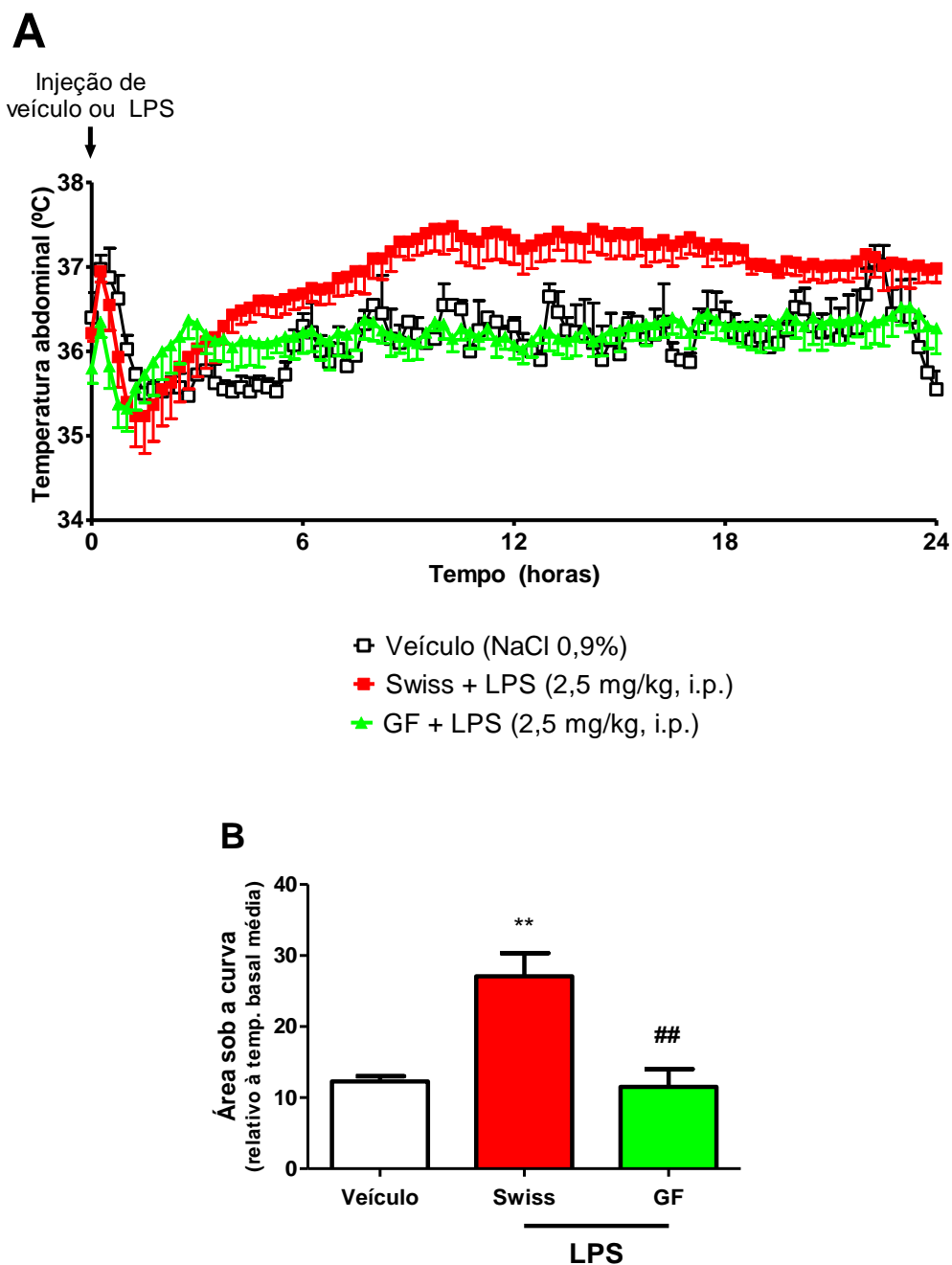
Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 05/09/2014.

Atenciosamente.

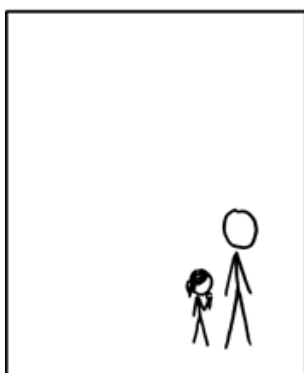
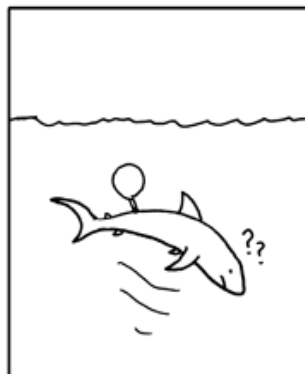
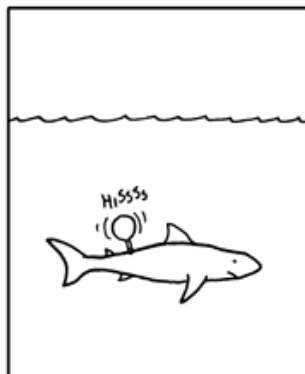
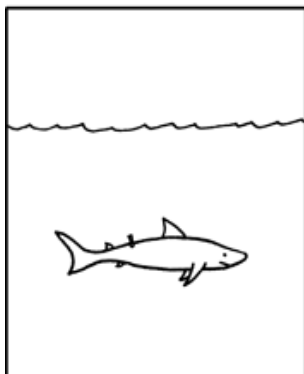
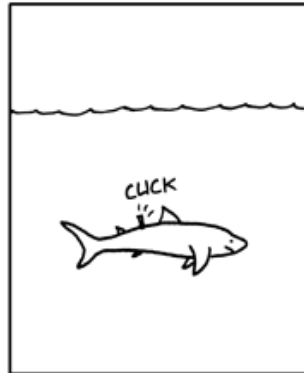
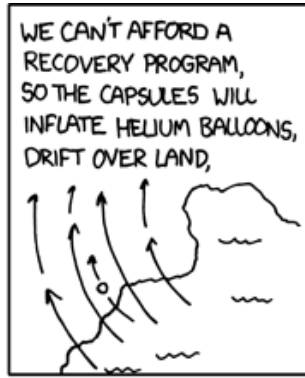
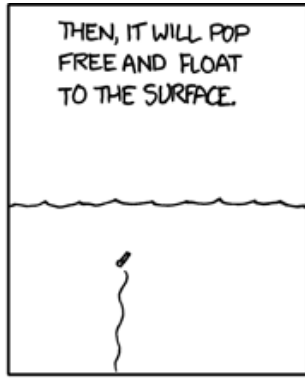
Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 - 31270-901
Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2: ACOMPANHAMENTO DA TEMPERATURA DE ANIMAIS SWISS/NIH E GF POR 24 HORAS, APÓS INDUÇÃO DE FEBRE POR LPS



Anexo 2: Animais isentos de microbiota mantém o aspecto hiporresponsivo frente ao estímulo pirogênico. Foi feito o acompanhamento da temperatura abdominal de camundongos da linhagem Swiss/NIH ou GF, submetidos a estímulo febril com LPS, por via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (A) Registro de temperatura por 24 horas após o estímulo; (B) Visualização em barras referente à área sob a curva do gráfico A para cada grupo. Para melhorar a visualização dos dados, os dois grupos de animais (Swiss/NIH e GF) que receberam o veículo foram agrupados em um único conjunto de dados. ** Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo. ## Valor $p < 0,01$ em relação ao grupo Swiss. Gráfico representado pela média \pm erro padrão da média ($n = 6$ para cada grupo).



Completely implausible? Yes.
Nevertheless, worth keeping a can of shark repellent next to the bed.

xkcd.com/585