

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HAISSA OLIVEIRA BRITO

**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA
EM RATAS: INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**

**CURITIBA
2016**

HAISSA OLIVEIRA BRITO

**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA
EM RATAS: INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**

*Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora em Farmacologia,
Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.*

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

**CURITIBA
2016**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Brito, Haissa Oliveira

Resposta febril induzida por endotoxina bacteriana em ratas: influência dos hormônios sexuais. / Haissa Oliveira Brito. – Curitiba, 2016.

143 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Febre. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Endotoxina. 4. Hormônios sexuais. I. Título II. Zamprônio, Aleksander Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **HAISSA OLIVEIRA BRITO**, intitulada: "**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA EM RATAS: INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

APROVAÇÃO

Curitiba, 29 de Abril de 2016.

Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof ANA CLAUDIA BOARETO (UFPR)

Prof DAVID DO CARMO MALVAR (UFRRJ)

Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)

Prof LUANA FISCHER (UFPR)

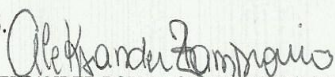



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de Abril de dois mil e dezesseis às 13:30 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **HAISSA OLIVEIRA BRITO** para a Defesa Pública de sua Tese intitulada: "**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA EM RATAS: INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Professores Doutores: ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UFPR), ANA CLAUDIA BOARETO (UFPR), DAVID DO CARMO MALVAR (UFRRJ), JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR), LUANA FISCHER (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela **APROVAÇÃO** da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 29 de Abril de 2016.


Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof ANA CLAUDIA BOARETO (UFPR)


Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)


Prof LUANA FISCHER (UFPR)


Prof DAVID DO CARMO MALVAR (UFRRJ)

À minha mãe, Luciane Brito, meu tudo, meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nosso Senhor e à Virgem Maria, Nossa Senhora e a todos os Santos e Espíritos de luz, agradeço ontem, hoje e sempre, por tudo.

Ao Prof. Dr. Aleksander Zamprônio, o meu mentor científico, pela orientação, pela amizade de anos, pelo perfeccionismo exigido, pelas risadas, pelos ensinamentos passados, ética, pelos jantares regados de histórias da Farmacologia Brasileira, pelo pulso firme e cobranças toda vez que eu precisava, pelo primor e valorização do estudo. Quando o senhor quer, o senhor é o melhor orientador do mundo.

À Profa. Dra. Luciane Brito, pelo auxílio e pela confiança depositada em nossa equipe de que poderíamos auxiliar no desenvolvimento da ciência brasileira.

À Profa. Célia Clavichiolo, não só pelos ensaios de imunofluorescência por confocal e por simplesmente, ser um ser de LUZ, a pessoa mais iluminada que conheço. A competência, o profissionalismo, a responsabilidade, a humildade, palavras não são suficientes pra lhe dizer o quanto eu lhe admiro como profissional e principalmente, como ser humano. A vida não tem graça sem a sua amizade. Deus lhe enviou para o meu caminho.

Ao Prof. Dr. David Engblom (Universidade de Linköping, Suécia) e toda sua equipe, em especial, Dr. Daniel Wilhelms e Dra. Andrea Stojakovic, que nos recebeu de braços abertos e não mediu esforços em ajudar no que podia e não podia.

À Débora Radulski, a minha “primeira” aluna de iniciação científica. Muito obrigada por deixa-la “orientar”. Eu nunca lhe vi como IC e sim como uma pós-

graduanda e profissional de mão cheia. Tenha certeza que aprendi mais com você, do que você comigo. No que precisar, pode contar comigo sempre. Sua amizade é muito importante pra mim.

Aos amigos e colegas do cotidiano da Farmacologia, Fernanda Lapa, Renata Reis, Felipe Barbosa, Danizinha, Priscila de Souza, Fofotele, Ritona, Carol, Eder, Thaysa, Thiago, Bruna, Claudia, Pandora e Marcela, pelos momentos inesquecíveis. Todos moram no meu coração.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e da Biologia Celular e Tecidual, pela amizade e contribuição na formação.

Aos funcionários do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial, às secretárias Ely e Patrícia e à Farmacêutica Sílvia pelo ouvidos e coração sempre abertos.

Aos Professores Lineu Werneck e Rosana Scola, do Laboratório de Doenças Neurosmusculares do Hospital das Clínicas da UFPR e seus funcionários, em especial, Nyvea, pelo carinho, pelas orações, pelas conversas e pelo apoio sempre dispostos a nos ajudar com suas instalações.

A Profa. Silvana Cirio, pelo carinho, pelas ligações quase que madrugada, pela competência e pelos anos de amizade.

Ao Professor Edvaldo Trindade e toda a equipe maravilhosa de técnicos do Confocal, em especial, a Liz, Israel e Alessandra, profissionais de mão cheia. Agradeço por sempre nos estender a mão e nos ajudar, por acreditar em pesquisa de qualidade, pela ética e claro, pelas conversas à beira do Confocal.

Aos amigos que obtive no Doutorado Sanduíche, tanto suecos, quanto não suecos e brasileiros: Asia, Anand, Anna, Elahe, Maaritt, Giota, Daniel, Andrea, Michael, Frederick, Mauro, Katharyne, enfim, todos que me ajudaram nessa passagem mais importante do Doutorado. Muito obrigada eternamente.

Aos funcionários do Biotério, pelas conversas, apoio e pelo fornecimento dos animais.

Aos animais, indispensáveis para a realização deste trabalho e progresso da Ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Maranhão (FAPEMA) e CAPES, pelo apoio financeiro e científico.

À minha mãe, Luciane, meu amor maior, meu tudo, meu exemplo de mulher e de profissional vencemos várias batalhas juntas. Nada do que eu consegui seria possível sem a senhora. Sem seu apoio constante, eu não teria conseguido chegar até o final. Linhas e palavras não são suficientes para descrever o quanto eu lhe admiro e o quanto eu lhe amo.

A Bethânia, minha segunda mãe, por todo o zêlo, por todo o amor, e até mesmo, por todas as brigas que tivemos. O porto seguro da minha família é você. Eu serei sempre seu diamante bruto que precisa ser lapidado. Te amo.

Ao meu irmão, Luiz Gustavo e sua família, pelo amor que descobri ao ser Tia, pelo sinônimo de perseverança, competência e garra. Harvard teve sorte por lhe recrutar. Minha admiração, sempre. Amo todos vocês.

À Maria de Lourdes, minha irmã. Obrigada pelo amor, pela atenção, pela dedicação, pelo carinho e dedicação. Te amo.

À tia Lúcia e Ricardo, meu segundo irmão, pelo carinho, pelo amor, pela força, pelas saudades, por me ensinar o conceito de família. Amo vocês.

À papai, Luiz Carlos, exemplo de força, de luta, de honestidade, de honestidade e de pessoa trabalhadora. Sempre na luta. Te amo.

A Família IGMA, Alda, Eliane e Dona Aparecida, pelo incentivo, pelas orações, pela energias, por cuidar e zelar sempre pelo meu bem mais precioso que é minha mãe. Que Deus sempre lhes abençoe.

À Raimunda, seu Raimundo e Sr. Manoel, pelas orações e pela força, sempre.

À minha família em São Paulo, em especial, Laurinda, Bia, Alessandra ,Luana e Irá pelas orações, pela fé, pelos ensinamentos de humildade, pelos anos de convivência, o meu muito obrigada nunca será demais.

À minha família no Rio de Janeiro, Sr. Fausto e Dra. Magdalena, que sempre torceram pelo meu sucesso e me deram apoio.

Aos meus amigos e amigas da longa jornada desta vida e de outras vidas, Elda, Isabela, Carol Peixoto, Caroline, Priscila, Danizinha, Felipe, Rafaela Montalvão, Ju Pamplona, Fofolete e Renata. Pontos, vírgulas, experimentos, tudo da Tese devo a vocês. Sem vocês em meu cotidiano, não poderia ter terminado. Todos são doutores junto comigo.

Ao meu padrinho, Raimundo Antônio da Silva pelas palavras de incentivo e conforto, como “Minha cientista favorita”. Meu carinho sempre.

As Profas. Desterro e Marilene, pelo carinho, incentivo e disposição sempre em me ajudar, mesmo depois de tanto tempo que fui aluna de ambas de iniciação científica. Vocês duas moram no meu coração.

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

A todos que um dia manusearem esta Tese.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

Todas as vitórias ocultam uma renúncia.

Simone De Beauvoir

Eu faço parte dos que acham que a Ciência é belíssima.

Marie Curie

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>xiv</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xviii</i>
RESUMO	<i>xxi</i>
ABSTRACT	<i>xxiv</i>
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	02
1.2 RESPOSTA FEBRIL	05
1.3 MEDIADORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA FEBRIL.....	07
1.3.1. PIROGÊNIOS ENDÓGENOS.....	07
1.3.2. MEDIADORES CENTRAIS DA RESPOSTA FEBRIL.....	10
1.4. ANTIPIRÉTICOS E SUAS LIMITAÇÕES.....	14
1.5. DIFERENÇAS NAS RESPOSTAS IMUNE/INFLAMATÓRIA E TERMO REGULATÓRIAS RELACIONADAS AO GÊNERO.....	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 ANIMAIS.....	22
3.2 OVARECTOMIA.....	22
3.3 IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL.....	22
3.4 IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL.....	23
3.5 DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	24
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	25
3.7 COLETA DE SANGUE PARA ENSAIO DE DOSAGEM HORMONAL.....	27
3.8 COLETA DE FLUIDO CEREBROESPINHAL PARA QUANTIFICAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS.....	27
3.9 IMUNOFLORESCÊNCIA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL.....	27
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 . RESULTADOS	31
4.1 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DE RATAS FALSO- OPERADAS E OVARECTOMIZADAS.....	32

4.2 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS MACHOS E FÊMEAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS.....	34
4.3 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 17 β -ESTRADIOL SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO LPS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS HORMÔNIOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO LPS.....	36
4.4 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR INTERLEUCINA -1 β , FATOR DE NECROSE TUMORAL- α E PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DERIVADA DE MACRÓFAGOS-1 α EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS..	38
4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OSTEOPROTEGERINA E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES RANK EM NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DURANTE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO LPS.....	40
4.6 ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINAS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS.....	44
4.7 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROPINA (CRF) E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CRF/II NO HIPOTÁLAMO EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS.....	51
4.8 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA ENDOTEINA-1 E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES ET _B NO HIPOTÁLAMO DE RATAS FALSO-OPERADAS.....	55
4.9 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR MORFINA E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES μ EM NO HIPOTÁLAMO DE RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS	59
4.10 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SUBSTÂNCIA P E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES NK ₁ NO HIPOTÁLAMO EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS	63
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	84
APÊNDICE.....	87
REFERÊNCIAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo neuroanatômico e de neurotransmissores para vias centrais termoregulatórias.....	03
Figura 2:	Vias centrais propostas para desencadear a resposta febril.....	13
Figura 3:	Temperatura corporal de ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	33
Figura 4:	Resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas falso-operadas e OVX.....	35
Figura 5:	Efeito do tratamento dos animais com 17β -estradiol sobre a resposta febril induzida pelo LPS e níveis plasmáticos de hormônios após a administração de LPS.....	37
Figura 6:	Resposta febril induzida por $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $CCL3/MIP-1\alpha$ em ratas falso-operadas e ovariectomizadas	39
Figura 7:	Efeito do tratamento com antagonista para receptor RANK osteoprotegerina sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	41
Figura 8:	Receptores RANK são expressos em neurônios hipotalâmicos de	

	ratas tratadas com LPS.....	42
Figura 9:	Receptores RANK não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	43
Figura 10:	Envolvimento de prostaglandinas na resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	46
Figura 11:	Enzimas COX-2 são expressas no hipotálamo de ratas tratadas com LPS.....	47
Figura 12:	Resposta febril induzida pela prostaglandina E_2 em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	48
Figura 13:	Receptores EP_3 são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	49
Figura 14:	Receptores EP_3 não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	50
Figura 15:	Resposta febril induzida pelo CRF em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	52
Figura 16:	Receptores CRFI/II são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	53
Figura 17:	Receptores CRFI/II não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	54
Figura 18:	Resposta febril induzida por ET-1 em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	56
Figura 19:	Receptores ET_B não são expressos em astrócitos hipotalâmicos em ratas tratadas com LPS.....	57

Figura 20:	Resposta febril induzida por morfina em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	60
Figura 21:	Receptores μ são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	61
Figura 22:	Receptores μ não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	62
Figura 23:	Resposta febril induzida por Substância P em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	64
Figura 24:	Receptores NK ₁ são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	65
Figura 25:	Receptores NK ₁ não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH-hormônio adrenocorticotrófico
ADAM-a desintegrina A e metaloproteinase
AVP - arginina-vassopressina
BHE – barreira hemato-encefálica
CD-Corno dorsal
CINC-1 – *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* – 1
COX - ciclooxigenase
CRF- fator liberador de corticotropina
CSF – Fluido cerebrospinal
DMH-Hipotálamo Dorso Medial
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina I
ET - endotelina
HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPG-Hipotálamo-Pituitária-Gônadas
IASP-Associação Internacional para o Estudo da Dor
icv - intracerebroventricular
IFN - interferon
IL – interleucina
IML-Núcleo intermédio Lateral
ip - intraperitoneal
LPBd-Subnúcleo dorsal do núcleo parabraqueal lateral
LPBel-Subnúcleo lateral do núcleo parabraqueal lateral
LPS - Lipopolissacarídeo
MALP2 – *macrophage-activating lipopeptide-2*
MAPKp38 – *p38 mitogen-activated protein kinase*
MIP – proteína inflamatória derivada de macrófagos – 1
MnPO-área pré-óptica mediana do hipotálamo
NF-IL6 – fator nuclear interleucina-6
NF κ B – fator nuclear κ b

ODF- fator de diferenciação de osteoclastos
OPG-osteoprotegerina
OVLT - *organum vasculosum da laminae terminalis*
OVX-ovariectomia
PAMP – padrões moleculares associadas à patógenos
PE – pirogênio endógeno
PFPP – Fator Pirogênico Pré-Formado de Macrófagos
PGs - prostaglandinas
PO/HA - área pré-óptica do hipotálamo anterior
POLI (I:C) – Ácido Polinosina:policetidílico
RANKL – *receptor activator of nuclear factor-Kb ligand*
RANTES – *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
rPA-Núcleo pálido da rafe rostral
SNC – Sistema Nervoso Central
SP – Substância P
TAM - tecido adiposo marrom
TLR – receptor do tipo toll-like
TNF - fator de necrose tumoral
VGLUT3-transportador de glutamato vesicular
 α – MSH – hormônio melanócito estimulante
OpiE – opióides endógenos

RESUMO

RESUMO

A febre pode ser definida como um aumento controlado da temperatura corporal interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico (*set point*). Existem diferentes maneiras de mimetizar a febre em animais de laboratório, porém o modelo de administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) é amplamente utilizado e estável. Uma vez injetada, essa substância se liga à receptores do tipo Toll-Like 4 em células do sistema imune como macrófagos, que passam a sintetizar e liberar diversos pirogênios endógenos, tais como interleucina(IL) -1β , IL- 1α , IL-6, IL-8, proteína inflamatória de macrófago (MIP- 1α) e o ligante do receptor ativador de fator nuclear κ B (RANKL) entre outros. Estes mediadores induzem a formação e liberação de diversos mediadores centrais como prostaglandinas (PG), endotelina-1 (ET-1), fator liberador de corticotrofina (CRF), substância P (SP), opióides endógenos e endocanabinóides que por sua vez irão atuar em respostas complexas culminando na resposta febril. Entretanto, esses estudos foram todos realizados em animais de experimentação machos. Considerando-se que há evidências de diferenças na resposta inflamatória e febril relacionadas ao gênero em animais experimentais e que mulheres possuem maior incidência de patologias inflamatórias e relacionadas à dor, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta febril induzida por LPS e por diferentes mediadores que são liberados por este pirogênio em ratas, bem como a influência de hormônios sexuais femininos nestas respostas. Em complementação, investigamos a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e de diversos receptores destes mediadores centrais em ratas e a influência da ovariectomia sobre esta expressão. Verificamos que fêmeas ovariectomizadas (OVX) apresentaram temperaturas basais maiores que fêmeas falso-operadas. A injeção de LPS (50 μ g/kg,i.p.) em animais falso-operados induziu uma resposta febril significativamente menor quando comparado com ratas OVX. Estas apresentaram um perfil de resposta febril similar ao observado em machos. O tratamento subcrônico com 17β -estradiol (1 mg/kg, s.c.) em animais OVX reduziu a febre induzida pelo LPS. Fêmeas OVX apresentaram uma redução nos níveis de estradiol plasmático. A administração de LPS aumentou os níveis de testosterona em animais falso-operados e OVX. A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de TNF- α (250 ng) e MIP- 1α (500 ng) promoveram um aumento da temperatura corporal em animais falso-operados que foi abolida em ratas OVX. Já a administração de IL- 1β (3.1 pg) em animais falso-operados e OVX induziu uma resposta febril similar em ambos os grupos. O tratamento com antagonista para RANK, osteoprotegerina, aboliu a resposta febril induzida pelo LPS em animais OVX, porém não modificou essa resposta em animais falso-operados. A administração de LPS aumentou a expressão de receptores RANK em neurônios hipotalâmicos de ratas falso-operadas e este aumento foi reduzido após a ovariectomia. A fim de avaliar o envolvimento de prostaglandinas nestas respostas, observamos que o tratamento com o inibidor não seletivo de ciclooxigenase indometacina reduziu a resposta febril induzida pelo LPS tanto em animais falso-operados e OVX. A injeção de LPS aumentou a concentração de PGE_2 no fluido cerebrospinal tanto em animais falso-operados como em OVX mas os

níveis deste eicosanoide foi significativamente maior em animais OVX quando comparado com falso-operados. A administração de LPS também aumentou a expressão de COX-2 no hipotálamo em ambos os grupos mas a expressão desta enzima foi significativamente maior em OVX quando comparado com animais falso-operados. A administração i.c.v. de PGE₂ (250 ng) também induziu uma resposta febril maior em animais OVX quando comparado com animais falso-operados. No mesmo sentido, a expressão de receptores de prostaglandinas EP₃ aumentou em neurônios hipotalâmicos de ambos os grupos após a administração de LPS mas foi significativamente maior em animais OVX quando comparada à animais falso-operados. A injeção i.c.v. de CRF (2,5µg), ET-1 (1 pg), do agonista opioide morfina (10 µg) e de substância P (500 ng) induziu febre em animais falso-operados. A ovariectomia reverteu a resposta febril induzida por CRF, ET-1 e substância P mas não aquela induzida por morfina. Por outro lado, a administração de LPS aumentou a expressão de receptores CRF_{I/II}, μ -opioide, e NK₁ sem alterar significativamente a expressão de receptores ET_B em animais falso-operados. A ovariectomia não modificou o aumento promovido pelo LPS de receptores de CRF e de opióides, mas um aumento significativo na expressão de receptores ET_B e NK₁ foi observado em fêmeas OVX que receberam LPS quando comparadas a falso-operadas. No presente estudo discutimos as relações entre estes diferentes mediadores e seus receptores na resposta febril e a modulação destas respostas por hormônios ovarianos. Os dados obtidos sugerem que a resposta febril em fêmeas, embora menor do que em machos envolve mediadores similares. No entanto, a ação de alguns destes mediadores é modificada pela na ausência dos hormônios gonadais apresentando-se mais dependente de prostaglandinas nesta condição que simula a menopausa do que de outros mediadores centrais.

Palavras-chave: Febre, Lipopolissacarídeo, Endotoxina, Hormônios sexuais.

ABSTRACT

ABSTRACT

Fever can be defined as a controlled increase in internal body temperature resulting from a change in the hypothalamic thermoregulatory set point. There are different ways to mimic this phenomenon in laboratory animals, but the model of intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS) is widely used and stable. Once injected, LPS binds to Toll-Like type 4 receptor in immune cells such as macrophages, and induces the synthesis and release various endogenous pyrogens such as interleukin (IL) -1 β , IL-1 α , IL-6, IL -8, macrophage inflammatory protein (MIP-1 α) and the receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), among others. These mediators induce formation and release of several central mediators such as prostaglandins (PG), endothelin-1 (ET-1), corticotrophin-releasing factor (CRF), substance P (SP), endogenous opioids and endocannabinoids which in turn will act in complex ways culminating in the febrile response. However, these studies were all performed in male experimental animals. Considering that there is evidence of differences in inflammatory and febrile response related to gender in experimental animals and that women have a higher incidence of inflammatory disorders and related pain, the aim of this study was to evaluate the fever induced by LPS and different mediators that are released by this pyrogen in female rats as well as the influence of female sex hormones in these responses. Additionally, we investigated the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and various receptors of these central mediators in female rats and the influence of ovariectomy on this expression. We found that ovariectomized (OVX) female rats had higher baseline temperatures than sham-operated female rats. The injection of LPS (50 μ g/kg, i.p.) in sham-operated animals induced a significantly lower febrile response when compared to OVX rats. OVX female rats had a febrile response similar to that observed in males. The subchronic treatment with 17 β -estradiol (1 mg/kg, s.c.) in OVX animals reduced the LPS-induced fever. OVX females showed a reduction in plasma oestradiol levels. The LPS administration increased testosterone levels in sham-operated and OVX animals. The intracerebroventricular (i.c.v.) administration of TNF- α (250 ng) and MIP-1 α (500 ng) promoted an increase in body temperature sham-operated animals was abolished in OVX rats. However, the administration of IL-1 β (3.1 pg) in sham-operated and OVX animals induced a similar febrile response. The treatment with RANK receptor antagonist, osteoprotegerin, abolished the fever induced by LPS in OVX animals but did not modify this response in sham-operated animals. The LPS administration increased expression of RANK receptors on hypothalamic neurons of sham-operated rats, and this increase was reduced after ovariectomy. In order to assess the involvement of prostaglandins in these responses, we observed that the treatment with the nonselective cyclooxygenase inhibitor indomethacin reduced the fever induced by LPS in both sham-operated and OVX animals. The injection of LPS increased the PGE₂ concentration in the cerebrospinal fluid in both sham-operated and OVX animals but the levels of this eicosanoid was significantly higher in OVX rats compared to sham-operated ones. The LPS administration also increased COX-2 expression in the hypothalamus in both groups but the expression of this enzyme was significantly higher in OVX female rats compared to sham-operated animals. The i.c.v. administration of PGE₂ (250 ng) also induced a higher febrile response in OVX

compared to sham-operated animals. Similarly, the expression of prostaglandin EP₃ receptors was increased in hypothalamic neurons of both groups after administration of LPS but was significantly higher in OVX compared to sham-operated animals. The i.c.v. injection of CRF (2,5µg), ET-1 (1 pg), opioid receptor agonist morphine (10 g) and substance P (500 ng) induced fever in sham-operated animals. The ovariectomy reversed the febrile response induced by CRF, ET-1 and substance P but not that induced by morphine. Moreover, LPS administration increased the expression of CRF1/II, µ-opioid and NK₁ receptors without significantly altering the expression of ET_B receptors sham-operated animals. Ovariectomy did not affect the increase in the expression of CRF and µ-opioid receptors promoted by LPS but a significant increase in the expression of NK₁ and ET_B receptors was observed in OVX females which received LPS as compared to sham-operated rats. In the present study we discuss the relationship between these different mediators and their receptors in the febrile response and modulation of these responses by ovarian hormones. The data suggest that the febrile response in females, although lower than in males involves similar mediators. However, the action of some of these mediators is modified by the absence of gonadal hormones, being more dependent on prostaglandin synthesis in this condition that simulates menopause than other central mediators.

Key-words: Fever, Lipopolysaccharide, Endotoxin, Sexual Hormones.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação da temperatura corporal

Em 1965, H.T. Hammel publicou *Neurons and the temperature regulation* como um capítulo do livro *Physiological controls and regulations*. Neste elegante manuscrito, há a descrição de um modelo de como os neurônios hipotalâmicos poderiam controlar a temperatura corporal dentro de limites estreitos e ajudou a construir o conceito de “ponto de regulação da temperatura corporal” (*set point*, em inglês) existente nos animais endotérmicos (Boulant, 2006). O modelo proposto por Hammel se baseou em estudos de seu grupo e de outros grupos que, através de termodos implantados no hipotálamo, promoviam o aquecimento e resfriamento do hipotálamo anterior, e particularmente, da área pré-óptica, e avaliavam as respostas termorregulatórias. Estudos posteriores fizeram algumas modificações no modelo original de Hammel, mas a essência do modelo continua a mesma (Adair, 1977; Hammel et al., 1960; Hammel et al., 1963; Hellstrom and Hammel, 1967). Uma excelente revisão do assunto foi feita por Boulant (Boulant, 2006). Esta proposição de Hammel foi importante para dar suporte aos estudos que se seguiram.

Mais recentemente, o modelo proposto por Morrison & Nakamura (2011) descrevem de maneira detalhada a neuroanatomia e neuroquímica de vias neuronais da termoregulação (Figura 1). A presença de receptores sensoriais térmicos cutâneos para frio e calor transmitem sinais para neurônios sensoriais primários no gânglio da raiz dorsal, aonde essa informação segue para neurônios sensoriais de segunda ordem no corno dorsal. Na medula espinhal, esses sinais se dividem. Para o frio, neurônios glutamatérgicos sensoriais do corno dorsal (CD) ativam neurônios sensoriais de terceira ordem na parte externa do subnúcleo lateral do núcleo parabraqueal lateral (LPBel). Para o calor, neurônios sensoriais ao calor do corno dorsal, projetam para neurônios sensoriais de terceira ordem no subnúcleo dorsal do núcleo parabraqueal lateral (LPBd). Em paralelo, os sinais sensoriais dos neurônios do corno dorsal também serão transmitidos ao cérebro (sem ação via neurônios de terceira ordem). Esses sinais atingem as regiões do tálamo e do córtex cerebral para que a pessoa tenha percepção térmica e a localização da origem dessas regiões de calor e frio.

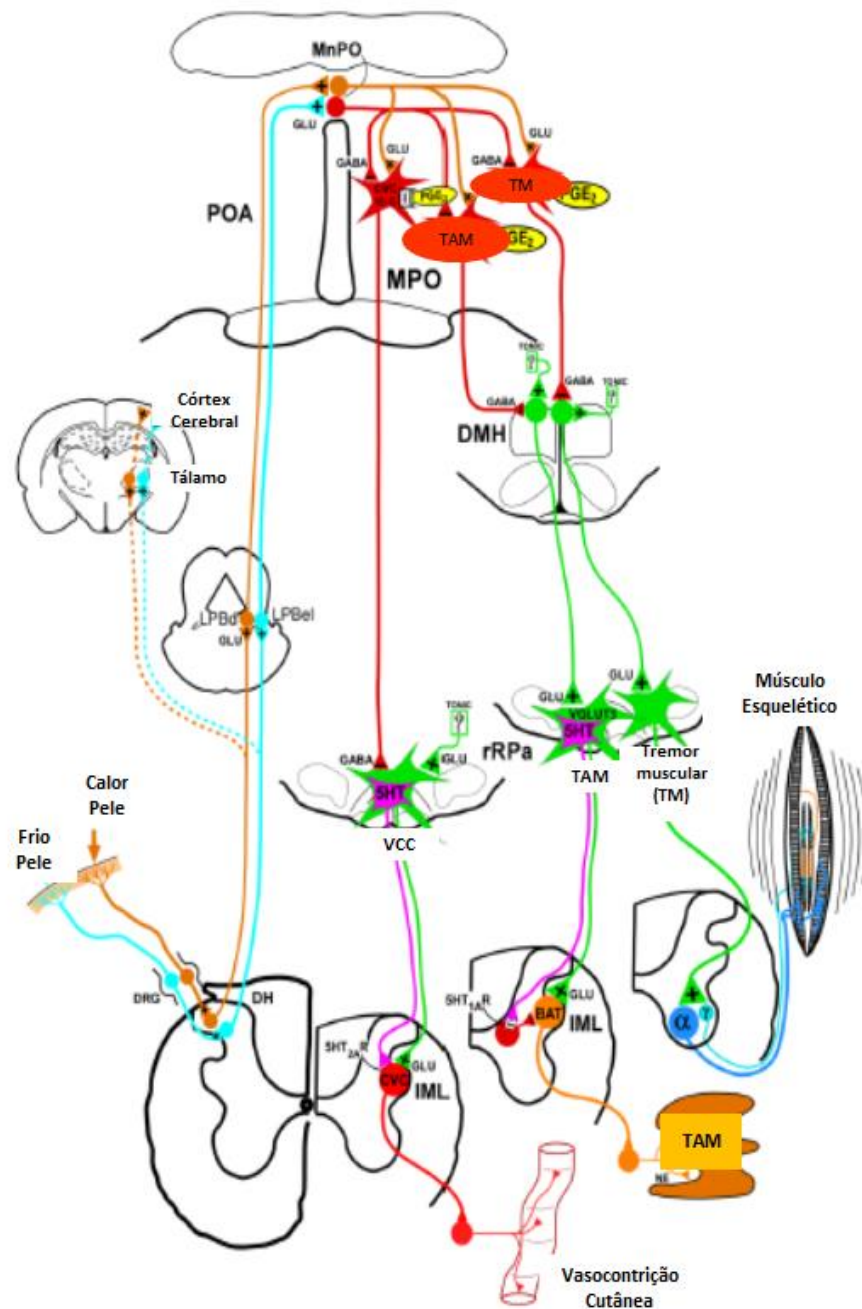


Figura 1– Modelo neuroanatômico e de neurotransmissores para vias centrais termoregulatórias que podem promover tanto o controle termoregulatório quanto ativação pirogênica e seus efeitos nas respostas periféricas de vasoconstrição cutânea (VCC), tecido adiposo marrom (TAM) e contração muscular (*shivering*). POA, área pré-óptica; MnPO, área pré-óptica mediana do hipotálamo; DMH, Hipotálamo Dorso Medial; IML, Núcleo Intermédio Lateral; rPA, núcleo pálido da rafe rostral; DRG, Gânglio da Raiz Dorsal; GLU, glutamato; 5-HT, serotonina; GABA, ácido gama-aminobutírico. Adaptado de Nakamura & Morrison, 2011.

Esses sinais periféricos conseguem ser transmitidos para a área pré-óptica mediana do hipotálamo (MnPO), aonde interneurônios GABAérgicos presentes nesse subnúcleo são ativados por neurônios sensíveis ao frio no LPBel e que inibem neurônios sensíveis ao calor, que por sua vez, controlam a vasoconstrição cutânea

(VCC), tecido adiposo marrom (TAM) e *shivering* (tremor muscular). As prostaglandinas E₂ (PGE₂) produzidas se ligam em receptores EP₃ presentes nos neurônios sensíveis ao calor na POA para inibir sua atividade.

A regulação de respostas periféricas como a vasoconstrição cutânea se dá quando neurônios sensíveis ao calor na área pré-óptica inibem neurônios pré-motores simpáticos na medula ventromedial rostral (incluindo o núcleo pálido da rafe rostral-rRPa), que projeta para neurônios pré-ganglionares simpáticos no núcleo intermediolateral. Neurônios pré-motores podem aumentar o tônus simpático de vasoconstrição cutânea pela liberação de glutamato e/ou serotonina (5-HT) no núcleo intermediolateral (IML).

Já as respostas periféricas que irão agir diretamente no TAM, continuam com os neurônios sensíveis ao calor na área pré-óptica, que atuam promovendo inibição de simpatoexcitação de neurônios do TAM no hipotálamo dorsomedial, que quando desinibidos, durante o resfriamento da pele, podem excitar os neurônios pré-motores simpáticos do TAM no rRPa, que projeta para neurônios pré-ganglionares simpáticos do TAM no IML. Alguns neurônios pré-motores do TAM contêm o transportador de glutamato vesicular (VGLUT3), que libera glutamato para excitar neurônios pré-ganglionares simpáticos do TAM e aumentar a atividade do nervo simpático do TAM pela liberação de glutamato, enquanto outros neurônios podem liberar 5-HT, que pode interagir com receptores 5-HT_{1A} (que ficam nos interneurônios inibitórios do IML) e irão aumentar o fluxo simpático no TAM e sua termogênese.

Em relação ao tremor muscular (*shivering*), neurônios sensíveis ao calor na POA promovem seu controle termoregulatório pela inibição de neurônios que promovem o *shivering* no Hipotálamo Dorso Medial (DMH), que podem promover excitação em neurônios pré-motores no rRPA, que projetam para o corno ventral para excitar motoneurônios α e γ durante a contração de músculos esqueléticos.

Assim, a temperatura corporal dos endotermos é mantida relativamente constante. Em algumas condições, no entanto, ajustes na temperatura corporal são benéficos, como em uma infecção, por exemplo.

1.2 A resposta febril

A febre é um sinal e um sintoma presente no quadro clínico de diversas doenças não-infecciosas bem como em infecções de origem fúngica, bacteriana, viral e de protozoária (Dalal & Zhukovsky, 2006). Classicamente, a resposta febril pode ser definida como uma elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico (*set point*) (Dinarello et al., 1988).

Trata-se de uma resposta complexa, na qual há integração de sinais vindos da periferia, processados no sistema nervoso central e que promovem, em consequência, respostas periféricas extremamente importantes para o organismo. Também possui funções protetoras durante os processos infecciosos como a redução do crescimento bacteriano e a estimulação de mecanismos de defesa do hospedeiro (Zeisberger et al., 1999).

Existem diversas maneiras de se estudar febre em modelos animais de laboratório, porém a maioria dos estudos utiliza o modelo de resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) isolado de *E.coli*. É essencial salientar que durante o estímulo com LPS em animais, os mesmos podem desenvolver além de febre, ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), hiperalgesia, anorexia, falta de apetite e sono (Elander et al., 2009; Ferreira et al., 1972; Huang et al., 2001; Ruud et al., 2013).

Em animais de experimentação, a administração do LPS pode induzir respostas febris monofásicas ou bifásicas dependendo da dose de estímulo, da espécie animal utilizada (ratos ou camundongos), da via de administração e da temperatura ambiente em que o experimento é realizado (Romanovsky et al., 1998). No caso de respostas bifásicas, cada fase envolveria diferentes mecanismos (Romanovsky et al., 2000; Roth & Souza, 2001).

O LPS estimula receptores do tipo *Toll* (TLR) 4, presentes na membrana de células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, linfócitos) estimulando a produção e liberação de citocinas. Estas citocinas, no caso da febre chamadas de pirogênios endógenos (PE), atuam levando essa mensagem da periferia aos centros superiores a fim de induzir a febre (Kluger, 1991). Dentre os PE reconhecidos, encontram-se as citocinas como interleucina (IL)-1 β , IL-1 α , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-8, fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas-1

(CINC-1), proteína inflamatória de macrófago CCL3/(MIP)-1 α e β , interferon β e γ e o ligante do receptor-ativador do fator nuclear κ B (RANKL, do inglês *receptor-activator of NF- κ B ligand*) (Dinarello et al., 1988; Hanada et al., 2009; Kluger, 1991; Minano et al., 1996; Soares et al., 2008; Zampronio et al., 1994). Dentre estas, algumas como a IL-8, CINC-1, CCL3/MIP-1 α e RANKL parecem ser geradas diretamente no sistema nervoso central (Hanada et al., 2009; Tavares & Minano et al., 2000; Zampronio et al., 1994) enquanto as outras poderiam ser geradas periféricamente. Particularmente interessante para este estudo é o RANKL que parece estar também envolvido no controle da temperatura corporal em ratas (Hanada et al., 2009). Existem várias hipóteses que tentam explicar como estas citocinas, geradas periféricamente, modificam a atividade neuronal dentro da POA do hipotálamo (Banks et al., 1991; Banks et al., 1994; Blatteis, 1992; Cao et al., 1996; Watkins et al., 1995; Werner et al., 2003). Uma delas sugere que as citocinas podem entrar diretamente no SNC através de áreas onde não há barreira hematoencefálica (BHE), como o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) ou órgãos sensoriais circunventriculares (Eskilsson et al., 2014). Outras, através do transporte seletivo e saturável de citocinas para o cérebro ou pela ativação periférica de nervos aferentes cutâneos e vagal (Erickson et al., 2012).

Qualquer que seja a via de comunicação, esses eventos culminariam na síntese e liberação de mediadores centrais como prostaglandinas E₂ (PGE₂) e F_{2 α} (PGF_{2 α}) (Coelho et al., 1993; Milton, 1989), fator liberador de corticotrofina (CRF) (Rothwell, 1989), opióides endógenos (Blatteis et al., 1991; Fraga et al., 2008), substância P (SP) (Blatteis et al., 1994; Reis et al., 2011; Brito et al., 2016) e endotelina-1 (ET-1) (Fabricio et al., 1998) resultando em um reajuste do termostato hipotalâmico que passaria a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5-37°C. Portanto, são estes mediadores que em última análise, promovem a mudança da amplitude e frequência de disparos do grupo de neurônios hipotalâmicos. As características específicas da liberação e ação de cada um destes mediadores, por sua relevância neste estudo, serão discutidas com mais detalhes posteriormente.

Estes mediadores centrais ativam respostas periféricas de produção e conservação de calor, como contração muscular esquelética intensa (termogênese associada à tremores), ativação do sistema nervoso simpático através da termogênese do TAM e vasoconstricção cutânea (Aronoff & Neilson, 2001).

Entretanto, substâncias endógenas com o intuito de manter, limitar e reduzir a resposta febril podem ser liberadas na circulação, e por isso são conhecidas como criogênios endógenos. A arginina-vasopressina (AVP), o α -hormônio estimulador de melanócito (α -MSH), os glicocorticóides e interleucina-10 (IL-10) estão entre as mais conhecidas (Cartmell et al., 2003; Tatro et al., 2000). Estas substâncias, portanto, promovem o retorno da temperatura aos níveis normais.

1.3 Mediadores envolvidos na resposta febril

Descrevemos anteriormente, em termos gerais, a instalação e o término da resposta febril induzida por LPS. Através desta breve descrição pudemos verificar que esta resposta é uma resposta altamente complexa e orquestrada por diferentes substâncias. Nosso grupo de pesquisa concentra seus estudos em entender de que maneira ocorre essa comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central, ou seja, de que maneira as diversas citocinas e mediadores centrais podem atuar a fim de desencadear e manter essa resposta. Nos capítulos subsequentes apresentaremos mais detalhes sobre estes mediadores, enfocando essencialmente suas ações relacionadas à resposta febril. Para facilitar o entendimento, dividimos estas informações em dois tópicos que passaremos a descrever abaixo: pirogênios endógenos, que incluem as citocinas e quimiocinas que são liberadas tanto periféricamente como no sistema nervoso central para induzir febre e mediadores centrais, que incluem peptídeos e ácidos graxos que em última análise atuam nos neurônios presentes na área POA do hipotálamo.

1.3.1. Pirogênios endógenos

Dentre todas as citocinas envolvidas na resposta febril, a mais estudada é a IL-1, particularmente a isoforma IL-1 β . A administração dessa citocina por via intracerebroventricular (i.c.v.) ou intraperitoneal (i.p.) pode induzir febre e a injeção de antagonistas ou anticorpos anti-IL-1, tanto i.c.v. quanto i.p., podem reduzir a febre induzida pelo LPS (Dinarello et al., 1984; Rothwell, 1991; Luheshi et al., 1996). Contudo, camundongos com deleção para IL-1 β ou para seu receptor, podem apresentar resposta febril induzida pelo LPS intacta (Alheim et al., 1997; Leon et al.,

1996) sugerindo que talvez essa citocina possa não ser o único mensageiro como se pensava inicialmente.

Outra citocina muito importante para a resposta febril é o TNF- α . Essa citocina é muito relevante para o sistema imune pois pode ativar macrófagos, monócitos, células *natural killer*, dentre outras. Existem duas isoformas para esta citocina, o TNF- α solúvel (sTNF- α) e o TNF- α metaloproteinase (mTNF- α), sendo que a segunda possui um ectodomínio que é clivado por metaloproteinases como a desintegrina A e metaloproteinase 17 (ADAM17) para formar o sTNF- α . O TNF- α se liga aos receptores TNFR1 e TNFR2, que estão presentes em células endoteliais e leucócitos (Bradley et al., 2008). Alguns estudos clássicos utilizando a administração dessa citocina diretamente no sistema nervoso central de ratos e coelhos demonstraram que o TNF- α induz febre nestas espécies animais (Rothwell, 1988; Morimoto et al., 1988). A injeção periférica desta citocina também causa febre em diversas espécies como camundongos, coelhos e ratos (Dinarello et al., 1986; Morimoto et al., 1988). É possível que a atividade pirogênica do TNF- α possa ser em parte mediada por IL-6 (Sundgren-Andersson et al., 1998).

A IL-6 é uma citocina que possui diversas funções durante a resposta imune e conseqüentemente, no processo inflamatório. Sua administração i.c.v. em ratos produz uma febre potente. Adicionalmente, animais com deleção do gene para esta citocina não desenvolvem febre induzida pelo LPS, IL-1 β ou TNF- α (Sundgren-Andersson et al., 1998) sugerindo que suas ações dependem da liberação de IL-6.

Outro fator que é liberado no sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS é o Fator Pirogênico Pré-Formado (FPFP) que causa uma resposta febril independente da síntese de prostaglandinas quando injetado por via intravenosa (i.v.) em ratos. Ainda a administração de dexametasona e o antagonista para CRF reduz esse efeito e in vitro, foi verificado que esse fator libera CRF (Zampronio et al., 1994).

Todas essas citocinas supracitadas participam da resposta febril induzida pelo LPS (Bastos-Pereira et al., 2015). Entretanto, existem outras citocinas cuja atividade pirogênica foi identificada, porém não participam da resposta febril induzida pelo LPS, como a quimiocina CCL3/MIP-1 α . Davatellis et al. (1989) observaram que a administração de ibuprofeno não reduziu a resposta febril induzida por essa quimiocina, sugerindo que sua atividade pirogênica, além de não fazer parte da via do LPS, atua de maneira independente da síntese de prostaglandinas. Tavares &

Minano (1998; 2002) verificaram que a isoforma CCL4/MIP-1 β também induz um aumento da temperatura corporal que é independente da síntese de prostaglandinas e insensível ao tratamento dos animais com glicocorticóide. Adicionalmente, estes autores demonstraram também que a administração de anticorpos dirigidos contra as ciclooxigenases (COX) 1 e 2, enzimas produtoras de prostaglandinas, não diminuiu a resposta febril induzida por essa quimiocina.

Além dessas, outras citocinas também podem induzir febre como TNF- β (Kapas & Krueger, 1992), interferon- α , β e γ (Bogdahn et al, 1985; Dinarello et al., 1984), IL-2 (Mier et al., 1988), CINC-1 (Soares et al.,2008), CCL5 (Tavares & Minano, 2000) e CXCL8/IL-8 (Zampronio et al., 1995; Zampronio 1994). Os estudos relativos a estas citocinas são mais escassos e não entraremos em detalhes sobre as características da resposta febril induzida por cada uma delas uma vez que o presente estudo não avaliou sua capacidade de indução de febre em fêmeas. No entanto, Zampronio e colaboradores fizeram uma excelente revisão sobre o assunto (Zampronio et al., 2015).

A atividade pirogênica do RANKL foi descrita mais recentemente e, portanto, sua interação com as vias já conhecidas da resposta febril induzida por LPS ainda não foi determinada. O sistema RANKL/receptor-ativador do fator nuclear κ B (RANK)/osteoprotegerina (OPG) foi descoberto no final dos anos 90 por quatro grupos independentes com nomes, inclusive, alternativos TRANCE (Wong et al., 1997), *Osteoclast Differentiation Factor* (ODF) (Yasuda et al., 1998), *OPG-ligand* (OPGL) (Lacey et al., 1998) e *Tumor Necrosis Factor Ligand Super Family member 11* (TNFSF11). Este sistema é muito importante na imunidade, onde suas ações primárias são mediadas principalmente via células dendríticas, e para a homeostase óssea através da regulação de osteoclastos. Por este motivo, suas ações podem estar envolvidas em diversas patologias, como osteoporose, câncer, artrite reumatóide, doença periodontal, osteoartrite, mieloma múltiplo e até mesmo diabetes mellitus (Kiechl et al., 2013; Walsh et al., 2006).

O receptor RANK pode ser detectado no timo, fígado, colon, glândulas mamárias, próstata, pâncreas, cérebro, músculo esquelético, rim e pele (Hanada et al., 2011). O OPG é um antagonista endógeno do RANK, sendo o equilíbrio na produção RANK/OPG fundamental para a homeostase, principalmente, óssea. Animais nocaute para OPG, desenvolveram osteoporose pois houve um aumento na

atividade de osteoclastos e consequente reabsorção óssea, calcificação profunda de artérias de grande calibre e proliferação da íntima (Bucay et al., 1998).

Esses pirogênicos, uma vez que alcançam o SNC, promovem a geração de circuito de mediadores centrais, entre eles, as prostaglandinas, CRF, ET-1, opióides endógenos e substância P, que passaremos a descrever em seguida.

1.3.2 Mediadores Centrais da Resposta Febril

As prostaglandinas são ácidos graxos poli-insaturados derivados da membrana fosfolipídica e são produzidos em questão de minutos. Elas exercem diversas funções no organismo, não somente relacionadas ao sistema imune, como cardiovascular, reprodução, metabolismo ósseo e homeostase renal.

O primeiro passo para sua síntese é catalizado enzimaticamente pela fosfolipase A₂ citosólica. Essa enzima libera o ácido araquidônico dos fosfolídeos de membrana. A próxima etapa é regulada pelas enzimas COX. A primeira enzima a ser descoberta foi a COX-1 (Hamberg et al., 1974). Posteriormente a COX-2 foi identificada e clonada (COX-2) (Kujubu et al., 1991). As duas enzimas possuem características bem distintas como por exemplo, são codificadas por genes diferentes e tem padrões de expressão distintos. A primeira é constitutiva e, portanto, é expressa em todos os tecidos, mas em poucos tipos celulares como macrófagos e fibroblastos. Por outro lado, a COX-2 é induzida e transitória e encontrada em baixíssimos níveis em alguns tecidos não-inflamados. Uma vez induzida por LPS ou citocinas durante a resposta inflamatória ou febril (Smith et al., 2011), seus níveis se elevam e se tornam superiores em relação à COX-1 (Serrano et al., 2011). Essas enzimas convertem o ácido araquidônico em seus precursores, prostaglandina G₂ (PGG₂) e em seguida prostaglandina H₂ (PGH₂).

O último passo é a biossíntese das mais diferentes isoformas de prostaglandinas. Para a formação de cada uma, é necessária uma enzima específica. Iremos enfatizar a síntese da PGE₂ pois é o autacóide que será discutido no presente estudo. Mais especificamente, 3 enzimas foram identificadas e caracterizadas para sintetizar PGE₂: prostaglandina E sintase-1 microsomal (mPGES-1), prostaglandina E sintase-2 microsomal (mPGES-2) e prostaglandina E sintase citosólica (cPGES). A primeira é a mais estudada. A mPGES-1 é induzida, é encontrada em baixas concentrações e em geral, é co-expressa com COX-2 (Ek et

al., 2001; Jakobsson et al., 1999; Murakami et al., 2000). Outras prostaglandinas que também podem ser paralelamente sintetizadas são as: $PG_{F2\alpha}$, PG_{D2} e PG_{I2} .

A administração i.c.v. de PGE_2 em ratos causa uma resposta febril extremamente rápida e intensa (Fraga et al., 2008; Brito et al., 2016). Ainda, animais com deleção para COX-2 e mPGES-1 não desenvolvem resposta febril com a administração de LPS (Wilhelms et al., 2014; Engblom et al., 2003) sugerindo que essas duas enzimas são cruciais para a indução de febre. Uma vez sintetizada e liberada, a PGE_2 pode se ligar a 4 diferentes subtipos de receptores, EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 e todos foram encontrados na área POA do hipotálamo (Oka et al., 2000). No entanto, o receptor EP_3 parece ser o principal envolvido na resposta febril induzida por LPS (Ushikubi et al., 1998). Os receptores EP_3 existem em três isoformas: $EP_{3\alpha}$, $EP_{3\beta}$ e $EP_{3\gamma}$. Estas isoformas diferem entre si pela sua cauda c-terminal, sua eficiência em ativar e ligar à proteína G e sua via de transdução de sinal (Sugimoto et al., 1993). As duas primeiras isoformas do receptor EP_3 estão acopladas à proteína G inibitória enquanto que a isoforma γ pode tanto estimular quanto inibir a adenilato ciclase (Irie et al., 1993).

O CRF é um outro mediador que está envolvido na efetivação da resposta febril embora também esteja relacionado com respostas envolvendo estresse e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Após a administração i.c.v. de CRF, o aumento da temperatura corporal é acompanhado de uma vasoconstrição caudal, confirmando a ativação de mecanismos de conservação de calor (Figueiredo et al., 2010). A administração de antagonista não-seletivo para os receptores de CRF, reduziu a temperatura corporal e ativação do TAM induzida por $IL-1\beta$, mas não a induzida por $TNF-\alpha$ ou PGE_2 em ratos (Rothwell et al., 1989) sugerindo que o CRF induz uma resposta febril com ativação de mecanismos de dissipação de calor e participa da febre induzida pela $IL-1\beta$ mas não da febre induzida por $TNF-\alpha$ ou PGE_2 .

A ET-1 faz parte de uma família de peptídeos que são importantes como vasoconstritores bem como, para a resposta febril. Ela é produzida e liberada durante a estimulação com LPS e induz febre através de receptores ET_B (Fabrício et al., 1998). A ET-1 induz uma resposta febril independente de síntese de prostaglandinas e $IL-1\beta$, embora a mesma possa ter a capacidade de liberar estes eicosanóides (Fabrício et al., 1998; Wanecek et al., 2000). Embora participe da resposta febril induzida por LPS, a ET-1 não está envolvida nas respostas febris induzida por

PAMPs como zimosan e ácido poliinosínico:policitidílico (Poli I:C) (Kanashiro et al., 2015; Bastos-Pereira et al., 2015).

A relação entre os opióides endógenos e a resposta febril tem sido extensivamente estudada. A administração de morfina i.c.v. induz um aumento de temperatura corporal em ratos e o uso de antagonistas opioidérgicos reduzem a febre induzida por TNF- α , IL-6, CRF, ET-1 e CCL3/MIP-1 α mas não por IL-1 β e PGE₂ (Fraga et al., 2008). Ainda, animais com deleção para receptores μ -opioidérgicos não desenvolveram febre após a administração de LPS (Benamar et al., 2005).

Fraga et al. (2015) verificaram recentemente que os endocanabinóides também estão envolvidos na atividade pirogênica de IL-1 β , TNF- α , IL-6, CRF e ET-1, mas não de PGE₂ e PGF_{2 α} . Além disso, a anandamida, atuando via receptor CB₁ induz febre que é dependente de prostaglandinas e opióides.

Szelenyi et al. (1997) verificaram pela primeira vez que a administração i.c.v. da SP aumentou a temperatura corporal em ratos. Em nosso grupo de pesquisa, verificamos que a resposta febril induzida pela SP ocorre via a ativação de receptores NK₁ e que a somente a SP gerada no sistema nervoso central, mas não aquela gerada periféricamente, é importante para a resposta febril induzida pelo LPS (Reis et al., 2011). Ainda, verificamos que esta taquicinina está envolvida no desenvolvimento da resposta febril induzida pelo TNF- α , IL-6 e PGE₂, mas não de CCL3/MIP-1 α (Brito et al., 2016).

Esses dados reunidos, sugerem que há uma regulação complexa da resposta febril. Portanto, nosso grupo de pesquisa sugere que existam duas vias paralelas atuando: uma dependente de prostaglandinas e outra, independente. A via dependente é ativada por citocinas periféricas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e algumas quimiocinas (CCL5, CCL22, CXCL1) que liberam PGE₂, PGF_{2 α} e CRF no cérebro. A outra via, seria comandada pelo Fator Pirogênico Pré-Formado de Macrófagos (PFPP) e outras quimiocinas que estimulam a liberação de CRF, que por sua vez libera ET-1, que atuando via receptores ET_B, liberam opióides endógenos. Estas vias são representadas na Figura 2.

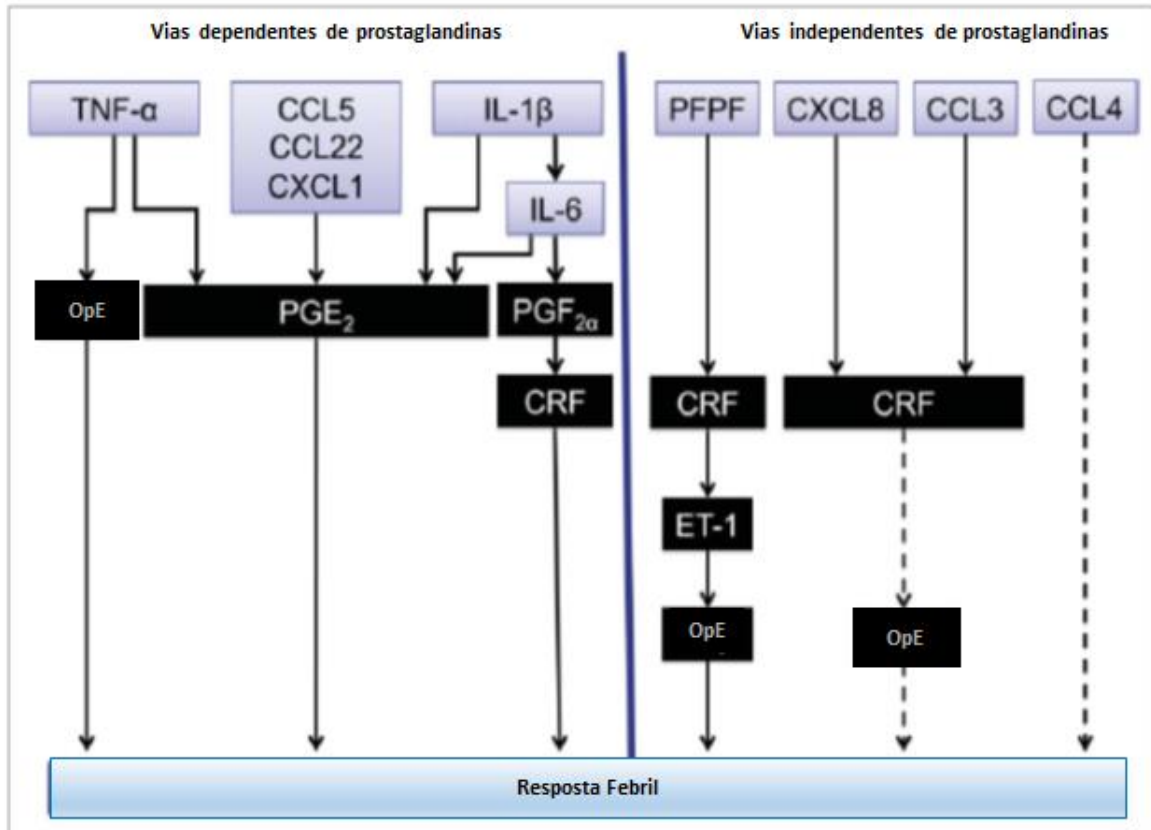


Figura 2- Vias centrais propostas para desencadear a resposta febril. O lado esquerdo demonstra como seria a via dependente de prostaglandinas que iniciaria com TNF- α , CCL5, CXCL1, IL-1 β e IL-6. O lado direito mostra vias independentes de prostaglandinas que por sua vez são iniciadas por PPPF, CXCL8, MIP-1 α /CCL3 e CCL4. Nota-se claramente que o CRF é um mediador que atua em ambas as vias, integrando ambas as vias, seja de maneira direta, ou de maneira indireta através da ET-1 ou opióides endógenos. As linhas pontilhadas representam vias que ainda não foram investigadas. A substância P e os endocanabinóides ainda não foram inseridos nesse contexto pois mais estudos ainda precisam ser realizados a fim de elucidar sua real posição nessa via. OpE, opióides endógenos (adaptado de Zamprônio et al., 2015).

É indispensável salientar que, embora estas vias pareçam redundantes e bastante complexas, não temos dados suficientes para afirmar se todas elas envolvem os mesmos tipos celulares presentes na área POA hipotalâmica (neurônios ou glia) e nem ao mesmo tempo, sendo mais provável uma ocorrência sequencial. Mas o que sabemos, de fato, é que todas são orquestradas a fim de culminar no desenvolvimento da resposta febril.

A compreensão dos detalhes da indução destas vias, sua interação com diversos sistemas, bem como novas maneiras de bloquear o sistema, são úteis não somente para se entender a febre *per se* (e conseqüentemente como controlá-la mais adequadamente durante processos inflamatórios e infecciosos), mas também para se entender como se processa a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central.

É importante citar que todos os estudos realizados a fim de elucidar essas vias de regulação da resposta febril induzida pelo LPS, foram conduzidos em animais experimentais machos. Portanto, não há evidências de que estas vias estejam presentes em fêmeas ou que haja algum tipo de regulação, principalmente hormonal, dessas vias.

1.4 Antipiréticos e suas limitações

A despeito das diferentes vias de indução de febre, as estratégias terapêuticas para bloquear a resposta febril atualmente se restringem somente às drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINE) que bloqueiam as enzimas COX reduzindo a síntese de prostaglandinas. Também se necessita de mais estudos para situações febris em caso de doenças negligenciadas como dengue, malária, febre na infância, na gravidez e na menopausa, pacientes com câncer em fase terminal e convulsões febris.

Por exemplo, o uso de AINEs na dengue é contra-indicado devido as suas propriedades anti-agregantes plaquetárias (Singhi et al., 2007). A dipirona ou o paracetamol são as drogas mais indicadas justamente por não exercerem esse efeito de maneira tão pronunciada. Por mais que a dipirona possa causar agranulocitose aguda que tem uma incidência rara, este quadro é bastante grave e potencialmente letal podendo desencadear pneumonia e sepse (Hedenmalm and Spigset, 2002; Garbe, 2007). Recentemente, verificou-se que os metabólitos dessa droga possuem propriedade antipiréticas diferentes e ainda resta avaliar possíveis diferenças nos mecanismos antipiréticos destes metabólitos, mesmo após tanto tempo de comercialização da dipirona (Malvar et al., 2014). No caso do paracetamol, mesmo em doses usuais, pode ocorrer hepatotoxicidade (Broughan and Soloway, 2000; Greisman & Mackowiak, 2002). Assim, a busca de novas estratégias

terapêuticas para o bloqueio da resposta febril demonstra ser de extrema importância.

1.5 Diferenças nas respostas imune/inflamatória e termoregulatórias relacionadas ao gênero

Sabe-se há bastante tempo que mulheres e homens possuem respostas inflamatórias e imunes bastante diferenciadas. As doenças autoimunes, por exemplo, afetam aproximadamente 8% da população e 78% destes indivíduos são mulheres. As razões para a prevalência alta de doenças autoimunes em mulheres são desconhecidas porém atribui-se à diferenças do sistema imune feminino (Fairweather et al., 2004).

A influência dos hormônios sexuais chega a ser tão profunda que as fêmeas produzem mais reações imunes celulares e humorais e são mais resistentes a certas infecções. Uma excelente revisão da influência de hormônios sexuais na função de linfócitos T e B, monócitos, granulócitos e células NK foi feita por Bouman et al. (2005).

Outro parâmetro da resposta imune/inflamatória que é diferenciado na mulher é a percepção do estímulo doloroso. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) publicou uma série de consensos sobre o estudo da dor na mulher. Os diversos estudos levantados pela IASP sugerem fortemente que há uma maior prevalência de patologias relacionadas à dor, como enxaquecas, dor na articulação temporomandibular, fibromialgia, artrite reumatóide e síndrome do túnel carpal e a inflamação em mulheres (Racine *et al.*, 2012a; Racine *et al.*, 2012b).

É importante que se conheçam estas diferenças de gênero para que possamos individualizar a terapia medicamentosa. Diversos pesquisadores defendem a necessidade da criação de medicamentos específicos (Manson, 2010). Pode-se atribuir as diferenças da farmacologia de gênero, em parte, às variações na resposta terapêutica e toxicidade em decorrência da influência dos efeitos hormonais na farmacocinética e na farmacodinâmica (Tran et al., 1998). Estas diferenças poderiam ser melhor conhecidas se mulheres fossem incluídas com maior frequência em estudos clínicos e se os efeitos relacionados ao gênero fossem analisados como parte dos resultados. Enquanto isso não ocorre, pode-se verificar

que as reações adversas são maiores em mulheres que nos homens (Franconi et al., 2007).

Outro parâmetro que pode ser considerado diferente entre homens e mulheres é o controle da temperatura corporal. A temperatura corporal das mulheres varia de acordo com a fase do ciclo menstrual em que ela se encontra. Durante a gravidez, por exemplo, ocorre uma redução da febre em animais experimentais (Chen *et al.*, 1999; Harre et al., 2006). Isso é bastante perigoso tanto para a mãe quanto para o feto, pois em eventuais infecções a febre não seria observada, intervenções adequadas não seriam tomadas o que poderia então comprometer o desenvolvimento fetal. Isso ocorre provavelmente devido a uma redução na expressão supressão da enzima COX-2 em células endoteliais cerebrais com consequente redução dos níveis de PGE₂ (Mouihate *et al.*, 1998).

Alem disso, alguns pesquisadores demonstraram haver diferenças das respostas febris entre machos e fêmeas. Mouihate & Pittman (2003) reportaram que a reposição hormonal com estrogênio e progesterona em ratas ovariectomizadas reduziram a resposta febril ao LPS comparativamente a ratas ovariectomizadas controles. Mouihate et al. (1998) verificaram ainda que os hormônios ovarianos também reduziram os níveis plasmáticos de IL-1 β , mas não de IL-6, induzidos pelo LPS. Entretanto, a resposta febril induzida por IL-1 β em fêmeas durante diferentes fases do ciclo estral é similar à de machos. Mas a febre induzida por IL-1 β foi significativamente maior e mais prolongada em fêmeas no proestro do que em diestro.

Recentemente, Iwasa et al. (2014a, 2014b) verificaram que administração i.c.v. de LPS em ambos os animais falso-operados e ovariectomizados (OVX) aumentou os níveis hipotalâmicos de IL-1 β e COX-2 e que tratamento agudo com estradiol, não reduziu o aumento de temperatura induzido por endotoxina. Já a administração do mesmo pirogênio, porém via intraperitoneal nos mesmos grupos, aumentou os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 e a administração de LPS i.c.v. nos animais OVX desencadeou uma resposta febril maior quando comparados com animais falso-operados. Esses estudos foram conduzidos focando no modelo de ovariectomia como uma maneira de induzir obesidade nos animais e não para verificar a influência dos hormônios durante a resposta febril.

Os escassos estudos relacionando febre em fêmeas abrangem somente LPS e IL-1 β . Portanto, não sabemos até o momento, se todos as citocinas e mediadores

podem estar envolvidos na resposta febril induzida por LPS ou mesmo se as ratas possuem uma sensibilidade alterada a estes mediadores.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta febril induzida por endotoxina bacteriana e por diferentes mediadores que são liberados por este pirogênio em ratas, bem como a influência de hormônios sexuais femininos nestas respostas. Em complementação, investigamos a expressão de COX-2 e de diversos receptores destes mediadores centrais em ratas após a administração de LPS e a influência da ovariectomia sobre esta expressão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o ritmo circadiano da temperatura corporal em ratas falso-operadas e ovariectomizadas;
- avaliar a resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas e compará-la com a resposta febril induzida por esta endotoxina em machos;
- avaliar a influência do tratamento subcrônico com 17β -estradiol sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratas ovariectomizadas;
- avaliar os níveis plasmáticos de hormônios sexuais durante a resposta febril induzida pelo LPS;
- avaliar a resposta febril induzida por IL-1 β , TNF- α e CCL3/MIP-1 α em ratas falso-operadas e ovariectomizadas ;
- avaliar o efeito do antagonista para receptores RANK (OPG) na resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas;
- avaliar a expressão de receptores RANK em neurônios e astrócitos hipotalâmicos de ratas falso-operadas e ovariectomizadas ;
- avaliar a participação de prostaglandinas através do tratamento com indometacina na resposta febril induzida por LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas;
- avaliar os níveis de prostaglandinas no Fluido Cerebroespinal durante a resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas ;
- avaliar a expressão de COX-2 e receptores EP₃ em neurônios e astrócitos hipotalâmicos de ratas falso-operadas e ovariectomizadas que receberam ou não LPS;

- avaliar a resposta febril induzida por PGE₂, CRF, ET-1, opióides endógenos e Substância P em ratas falso-operadas e ovariectomizadas ;
- avaliar a expressão de receptores CRF I/II, ET_B , μ -opióide e NK₁ em neurônios e astrócitos hipotalâmicos de ratas falso-operadas e ovariectomizadas que receberam ou não LPS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água, antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e ficaram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado com animais de laboratório e com as considerações éticas descritas nos protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (nº 626) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. OVARIECTOMIA

A ovariectomia foi feita de acordo com Iwasa et al.(2014a). As ratas foram previamente anestesiadas com cetamina/xilasina (60/7,5 mg/kg, i.p.) e logo em seguida foi realizada uma assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Os ovários e as trompas foram identificados, as trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente, a incisão foi suturada. Após 21 dias foi feita a comprovação do anestro através do esfregaço vaginal. Animais falso-operados (sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas os ovários e as trompas permaneceram intactos.

3.3 IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL

O implante dos registradores remotos de temperatura foi feito de acordo com De Sousa et al. (2002).. Um dia antes do implante na cavidade peritoneal, os registradores remotos de temperatura (SubCue data loggers, Calgary, Canadá) foram programados para iniciar o registro de temperatura no dia do experimento (6 a 7 dias após o procedimento cirúrgico). Em seguida, o ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biocompatível. Para o implante do registrador no dia seguinte, os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina (60/7,5 mg/kg, i.p.). Após tricotomia e antissepsia da pele da região ventral dos animais, foi realizada uma incisão na pele, e posterior incisão da camada muscular e peritoneal, para inserção dos registradores na cavidade peritoneal. Os registradores ficaram imersos em etanol 70% no mínimo 30 min antes do implante, para garantir assepsia da superfície dos mesmos, e foram imersos em solução fisiológica estéril imediatamente antes do implante na cavidade peritoneal.

Em seguida, as camadas foram suturadas, separadamente, com fio cirúrgico de algodão 3-0. Após a cirurgia, os animais receberam injeção de oxitetraciclina - Terramicina (400 mg/kg, im), como profilaxia cirúrgica. Os animais também foram tratados durante dois dias com cetoprofeno, 10 mg/kg por via subcutânea logo em seguida ao procedimento cirúrgico para minimizar o desconforto decorrente da cirurgia.

3.4 IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL

O implante da cânula no ventrículo lateral direito dos animais foi realizado com o objetivo de injetarmos as substâncias por via i.c.v de acordo com De Sousa et al. (2002).. Este procedimento foi realizado após o implante do registrador remoto de temperatura na cavidade peritoneal, sob o mesmo efeito anestésico.

As cânulas foram preparadas utilizando-se agulhas descartáveis 30 x 8 mm que foram polidas até atingirem um comprimento de 14 mm. Antes do implante, as mesmas foram esterilizadas em estufa a 200 °C, por um período de 2 h.

Após tricotomia e antissepsia da pele, as cabeças dos animais foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-E.U.A). Foi administrado por via subcutânea (sc) 0,2 ml de lidocaína a 2% com noradrenalina na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele para exposição da calota craniana. Este procedimento facilita a remoção do periósteo, inibindo a resposta ao estímulo nociceptivo e diminuindo o sangramento.

Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral direito foram de -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, sendo a inclinação da barra incisal de -3,3 mm.

As cânulas esterilizadas foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotáxico, e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. Todas as coordenadas estereotáxicas foram determinadas com base no atlas de Paxinos & Watson (2005).

Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando-se uma prótese de acrílico auto-polimerizável, com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana (esterilizados previamente). Os experimentos foram conduzidos entre 6 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais.

A fim de verificarmos a posição da cânula, após o término dos experimentos de avaliação da resposta febril, os animais foram anestesiados com halotano e receberam 3 µl do corante azul de pontamida, no local correspondente à microinjeção. Em seguida, os ratos foram decapitados e os encéfalos extraídos, cortando-se transversalmente a região correspondente à localização da cânula, sendo o local da microinjeção verificado macroscopicamente.

Os animais em que a injeção do corante mostrou-se fora do ventrículo lateral ou que apresentaram um padrão anormal de ganho de peso foram excluídos dos experimentos.

3.5 DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

A determinação da variação da temperatura corporal foi feita conforme descrito por Bastos-Pereira, 2015. No dia anterior aos experimentos, os animais foram transferidos para uma sala climatizada a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ que corresponde à zona de termoneutralidade dos ratos (Gordon, 1990; Poole and Stephenson, 1977; Romanovsky et al., 2002). A leitura da temperatura corporal pelos registradores remotos iniciou-se às 07:00 h do dia seguinte. Permitiu-se a leitura da temperatura em torno de 2 h, a fim de se obter os níveis basais de temperatura corporal. Os tratamentos e estímulos foram feitos entre as 09:00 e 11:00 h para evitar possíveis interferências das variações circadianas de temperatura nos resultados obtidos. O registro da temperatura foi feito por pelo menos 6 h após o estímulo pirogênico, a cada 15 min (com exceção do experimento em que foi injetada PGE_2 que foi feito por 2 h).

Os animais foram mantidos dentro de suas respectivas gaiolas e manuseados o mínimo possível. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com *overdose* de anestésico, os registradores retirados da cavidade peritoneal e os dados coletados em computador. A temperatura basal dos animais foi calculada levando-se em conta pelo menos 4 medidas de temperatura antes da administração de qualquer substância. A partir desta basal foi calculada a variação da temperatura corporal de cada animal. Somente animais que apresentaram temperaturas basais entre $36,7$ e $37,4^\circ \text{C}$ foram considerados.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Iniciamos nossos experimentos avaliando a temperatura corporal basal de ratas falso-operadas e OVX durante um período de 24 h (ritmo circadiano). Em uma segunda etapa de experimentos, comparamos a resposta febril induzida pelo LPS derivado de *E. coli* em ratos machos, fêmeas falso-operadas e OVX. Os animais receberam LPS ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) e a temperatura corporal foi registrada conforme descrito anteriormente. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina estéril (veículo). Em um grupo separado de animais, ratas falso-

operadas e OVX receberam a mesma dose LPS e após 3 h amostras de sangue foram coletadas conforme descrito abaixo para dosagens hormonais.

Com o objetivo de verificar se a reposição crônica de estrogênio poderia influenciar essa resposta, animais OVX foram tratados com 17β -estradiol (1 mg/kg, s.c., 1 vez ao dia) ou o mesmo volume de óleo mineral (veículo) por 7 dias. Os animais receberam então LPS (50 μ g/kg, i.p) ou salina (veículo) 1 h após o tratamento hormonal e a temperatura corporal foi registrada.

Para avaliar possíveis diferenças na resposta febril induzida pelos diferentes mediadores envolvidos na resposta febril, animais falso-operados e OVX receberam IL- 1β (3.1 pg, i.c.v., 2 μ l), TNF- α (250 ng, i.c.v., 2 μ l), CCL3/MIP- 1α (500 ng, i.c.v., 2 μ l), PGE $_2$ (250 ng, i.c.v., 2 μ l), CRF (2,5 μ g, i.c.v., 2 μ L), ET-1 (1 pg, i.c.v., 2 μ l), morfina (agonista opióide, 10 μ g, i.c.v., 2 μ l) ou substância P (500 ng, i.c.v., 2 μ l) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril 0,9% em um volume de 2 μ L) e sua temperatura corporal foi registrada durante 6 h para todos as citocinas e mediadores e durante 2 h para a PGE $_2$. No caso da substância P, os animais receberam 15 min antes da substância P, captopril (5 μ g, i.c.v., 2 μ l) a fim de reduzir a metabolização deste peptídeo (Reis et al., 2011).

Ainda, a fim de aprofundar a avaliação do envolvimento de prostaglandinas na resposta febril induzida pelo LPS, animais falso-operados e OVX foram tratados com indometacina (2 mg/kg, i.p.) ou o mesmo volume (Tampão Tris-HCl, pH 8.2) e após 30 min, receberam LPS (50 μ g/kg, i.p) e a temperatura corporal foi avaliada por 6 h. Posteriormente, o mesmo protocolo foi repetido e amostras do fluido cerebrospinal foram coletadas conforme descrito abaixo para quantificação dos níveis de prostaglandinas.

Para avaliar uma possível participação de RANKL na resposta febril em fêmeas, os animais foram tratados com OPG (antagonista de RANKL, 1 μ g, i.c.v., 2 μ l) ou veículo (salina estéril 0,9%, 2 μ L) e após 30 min, receberam LPS (50 μ g/kg, i.p) ou veículo (salina estéril com mesmo volume) e a temperatura corporal foi avaliada por 6 h.

As doses dos pirogênios foram baseadas em curvas dose-resposta previamente determinadas pelo nosso laboratório e representam doses sub-máximas para indução da febre (Werner et al, 2006; Fraga et al, 2008, Reis et al.,

2011). As doses de indometacina e OPG também foram baseadas em estudos prévios (Fraga et al., 2008; Hanada et al., 2009).

As administrações por via i.c.v. foram realizadas no ventrículo lateral direito dos animais através de uma agulha de injeção (30 G), que excedeu a cânula em 2,0 mm, acoplada a um tubo de polipropileno P10, conectado a uma micro-seringa Hamilton (capacidade de 25 μ L).

3.7 COLETA DE SANGUE PARA ENSAIO DE DOSAGEM HORMONAL

Amostras de sangue foram coletadas a partir da veia cava posterior utilizando seringas heparinizadas e o plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 2000 g, a temperatura ambiente durante 20 min. Os níveis plasmáticos de estradiol e testosterona foram dosados pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Abbott Laboratories, Illinois, E.U.A.) e a reação foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.8 COLETA DE FLUIDO CEREBROESPINHAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS

Animais falso-operados e ovariectomizados foram tratados intraperitonealmente com LPS ou salina, após 3 h anestesiados com halotano e devidamente posicionados no estereotáxico. O líquido cerebroespinal (CSF) foi aspirado diretamente através de um escalpe tamanho 27 com acesso à cisterna magna (Consiglio & Lucio, 2000) e o volume coletado variou entre 50 a 100 μ l. As amostras foram coletadas em tubos contendo indometacina (2 μ g/2 μ l) para evitar uma produção tardia de prostaglandinas, sob gelo e centrifugadas a 1.000 g, 4°C, durante 10 min. Todas as amostras foram armazenadas em -80°C para posterior análise. Os níveis de PGE₂ foram quantificados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (ELISA, Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, E.U.A.).

3.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL

Adicionalmente, avaliamos a expressão de diversos receptores de mediadores centrais e de RANK em neurônios e astrócitos durante resposta febril

induzida por LPS. Para tanto, animais falso-operados e OVX foram tratados com LPS (50 µg/kg, i.p) ou o mesmo volume de salina. Os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina conforme descrito acima e após 3 h, submetidos à perfusão via transcardíaca com incisão no ventrículo esquerdo com 300 ml de PBS, 0,1 mM, pH 7,4 para remoção de sangue, seguido de 300 ml de solução de paraformaldeído (PFA) 4% para fixação do tecido. Os encéfalos foram removidos para posterior análise dos receptores EP₃, RANK, CRF I/II, ET_B, µ-opiíide ou NK₁ no tecido hipotalâmico identificando-se sua co-expressão em astrócitos e neurônios.

Após a remoção da caixa craniana, os encéfalos foram pós-fixado por 2 h em PFA 4%, e logo em seguida crioprotégido através de concentrações crescentes de sacarose (10%, 20%, e 30%). As amostras foram embebidas em Tissue-Tek® e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Fatias de cérebro foram seccionadas em uma espessura de 30 µm, em cortes seriados, em criostato Leica CM3050 (Leica Microsystems, Cingapura) de acordo com as coordenadas do cérebro de ratos (Paxinos & Watson, 1998). Todas as reações de imunofluorescência para confocal foram realizadas pelo método de *free-floating* (flutuação livre). Inicialmente, os cortes foram lavados por 4 vezes com PBS (pH=7,4) para retirada de impurezas decorrentes do processamento de corte, seguida de uma lavagem com Triton X-100 0,3% durante 1 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas com solução de glicina 1% durante 5 min seguida pela solução de bloqueio com solução de albumina sérica bovina (BSA) 1% durante 1 h. A partir desse passo, o protocolo foi diferenciado para marcação simples e para marcação dupla.

Para a marcação simples, foi realizada a imunomarcação para COX-2. Os cortes foram incubados durante 12 h com anticorpo anti-COX-2 (1:200, cabra, sc-1747, M-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, E.U.A.) a 4°C. A partir desta etapa, todas as reações foram realizadas no escuro. Após lavagem com solução de bloqueio de Triton X-100 0,3% (3x/5 min), os cortes foram incubados em uma placa de 12 poços em 300 µl/poço com anticorpo secundário Alexa Fluor 647 (1:300, cabra, sc-45066, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, E.U.A) por 2 h, a 4°C. Em seguida, os cortes, lavados com PBS e montados em lâminas de vidro utilizando o meio de montagem Fluoromont-G com DAPI (17984-24, Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, E.U.A.) para evidenciar os núcleos das células.

Para a marcação dupla, foram realizadas imunomarcações para os tipos celulares de neurônios e astrócitos e os diversos receptores investigados: CRF I/II,

NK₁, μ -opióide, EP₃, RANK e ET_B. Aqui, é importante enfatizar que a coleta dos cérebros para a realização de todas duplas marcações para astrócitos foi diferenciada. O mesmo protocolo foi executado, porém, não foi utilizado em nenhum passo, o paraformaldeído pois o mesmo modifica os epítomos de reconhecimento de alguns anticorpos, como para ET_B e GFAP, impossibilitando a visualização de sua imunomarcação. Dessa maneira, a imunomarcação de ET_B foi realizada somente em astrócitos e não em neurônios.

Os cortes foram incubados *overnight* com os anticorpos primários para tipo celular: anti-NeuN (MAB377, camundongo, 1:500,300 μ l/poço, Millipore, Massachusetts, E.U.A.), para neurônios, ou anti-GFAP (sc-51908, camundongo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, E.U.A) para astrócitos. Em seguida, as secções foram lavadas com solução de bloqueio Triton X-100 0,3% (3x/5 min) seguida de solução de PBS (2x/2 min). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos dos seguintes marcadores: CRF I/II (1:50;sc-5543;coelho), NK₁ (1:50;sc-14115;carneiro), μ (1:50;sc-15310;coelho), EP₃ (1:50;sc-20676; coelho) , RANK (1:300; sc-9072;coelho) e ET_B (1:50;sc-33538;coelho) todos provenientes da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, E.U.A. durante 12 h. Posteriormente, os cortes foram lavados com Triton X-100 0,3% (3x/5 min) seguida de solução de PBS (2x/2 min). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: Texas red (1:300, anti-mouse,T862, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) para neurônios e FITC (A11063, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA), para astrócitos, durante 2 h. Após isso, as secções foram lavadas novamente com Triton X-100 0,3% (3x/5 min) seguida de solução de PBS (2x/2 min). Os anticorpos secundários utilizados para os receptores foram provenientes de coelhos na cor verde FITC (F-0382, Sigma Alderich & Co, EUA), para a dupla marcação com neurônios e na cor vermelha (31573, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA), para a dupla marcação com astrócitos. Para finalizar a reação, o excesso de anticorpos foi retirado com lavagens sequenciais de Triton-X100 e PBS, como supracitado.

Os experimentos foram executados com 3 a 4 animais em cada grupo e a análise foi realizada com 6 a 10 cortes, no mínimo, por animal. Depois da última lavagem, os cortes foram montados utilizando o meio de montagem Fluoromont-G corado com DAPI (#17984-24, Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, E.U.A.) para visualização do núcleo celular. As secções foram montadas utilizando lâminas e lamínulas secas e limpas, devidamente vedadas com esmalte incolor. Os cortes

foram observados sob microscópio de fluorescência invertido da Nikon A1RiMP (Nikon, Tokyo, Japan), com ampliações para 60 e 100X em óleo. As imagens (imagens ópticas de Z) foram visualizadas e analisadas pelo programa de Software de Imagem Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan). Os controles das reações foram os seguintes: grupo branco, com DAPI, mas sem anticorpos primários ou secundários e grupo controle de secundários, com o anticorpo secundário e DAPI na ausência do anticorpo primário. Ambos são importantes para a devida calibração do aparelho, verificação da morfologia dos tecidos, determinação de possíveis reações inespecíficas e análise da autofluorescência do tecido. Os campos para análise foram escolhidos aleatoriamente, baseado na localização hipotalâmica, e sua intensidade de fluorescência foi quantificada pelo programa Image J 1.4 (National Institutes of Health, Maryland, E.U.A.) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados referentes à temperatura corporal basal foram analisados utilizando teste t de Student. Já os dados referentes à temperatura corporal e variação da temperatura corporal foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (Two-way) para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os níveis de prostaglandinas, hormônios e intensidade de fluorescência foram analisados por ANOVA de uma via (One-way) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, San Diego, California, E.U.A.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DE RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

Na avaliação do ritmo circadiano da temperatura corporal em ratas falso-operadas e OVX, ambos os grupos apresentaram temperaturas mais baixas durante o dia (fase clara) e mais altas no período da fase escura (Figura 3A). Não foram encontradas diferenças significativas de temperatura entre os grupos embora os registros da temperatura do grupo OVX tenham se mostrados mais variáveis ao longo do período.

Adicionalmente, analisamos todas as temperaturas basais (ou seja, antes de qualquer tratamento realizado nos animais) de grande parte dos animais utilizados nesse estudo. Embora os animais em ambos os grupos tenham apresentado temperaturas basais em torno dos limites normais atribuídos para esses experimentos (36,7 e 37,4 °C), os animais OVX apresentaram uma temperatura basal significativamente maior em relação aos animais falso-operados (Figura 3B). A fim de evitar possíveis influências desta diferença nas temperaturas basais, os dados serão apresentados como variação na temperatura corporal, nos experimentos subsequentes.

Ainda, já nesta fase inicial, observamos que os animais OVX apresentaram um ganho de peso superior aos falso-operados.

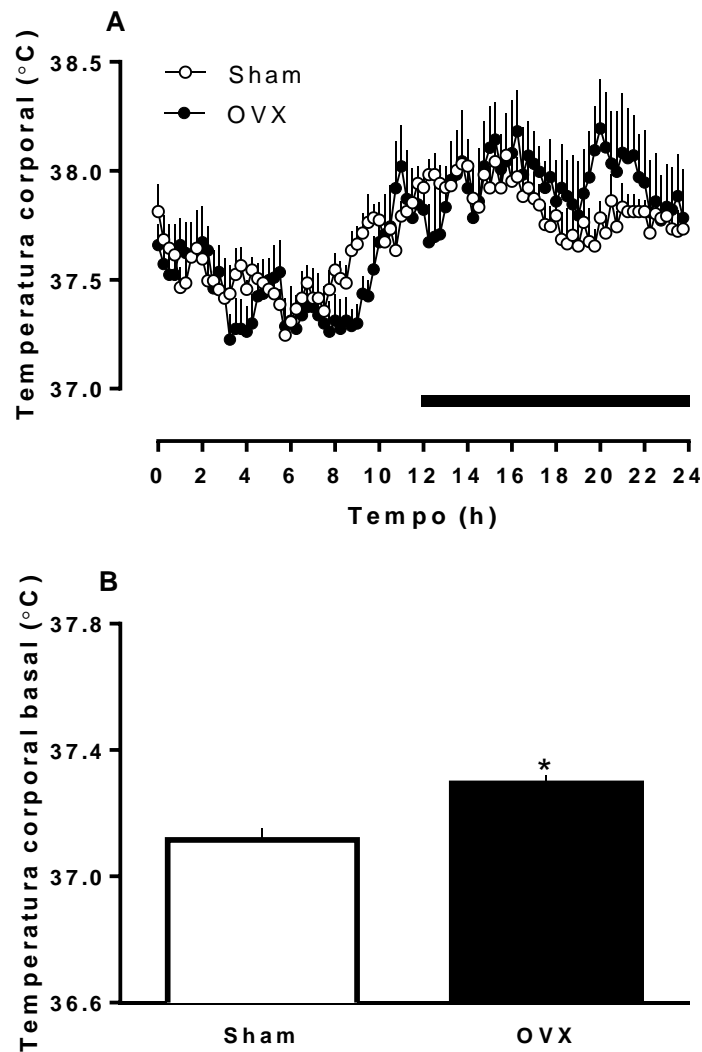


Figura 3- Temperatura corporal de ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Ratas falso-operadas (Sham) e OVX foram submetidas à cirurgia para implante na cavidade peritoneal de registradores remotos de temperatura 15 dias após a retirada ou não dos ovários. Uma semana após o implante, a temperatura corporal foi monitorada a cada 15 min durante 24 h (Painel A). A temperatura basal de um grande número de animais utilizados neste estudo foi considerada como no mínimo quatro medidas de temperatura antes de qualquer tratamento (Painel B). Os pontos e as barras representam a média \pm e.p.m. da temperatura corporal (°C) dos animais (n=8-10 para A e n=59-66 para B). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo falso-operado.

4.2 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS MACHOS E FÊMEAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração intraperitoneal de salina não alterou a temperatura corporal dos animais. A administração de LPS (50 µg/kg) em ratos machos induziu uma resposta febril significativa que iniciou em torno de 105 min após a administração do estímulo, atingiu valores máximos em 2 h e permaneceu significativamente maior do que o controle até a 6^a hora (Figura 4A). No entanto, a administração da mesma dose de LPS em ratas falso-operadas induziu uma resposta febril significativamente menor que iniciou somente 3 h após a administração de LPS e que permaneceu até o final do experimento (Figura 4A). Diferenças significativas entre machos e fêmeas falso-operadas foram observadas no início da febre (entre 105 e 135 min) e na fase tardia da febre (225 min e 285 min) (Figura 4A). Em contraposição, a administração de LPS em ratas OVX promoveu uma resposta febril significativamente maior quando comparada àquela observada em ratas falso-operadas (Figura 4B). A resposta febril em ratas OVX iniciou 2,5 h após a administração de LPS e permaneceu até o final do experimento. Esse perfil de resposta febril foi similar ao observado em machos (Figura 4B).

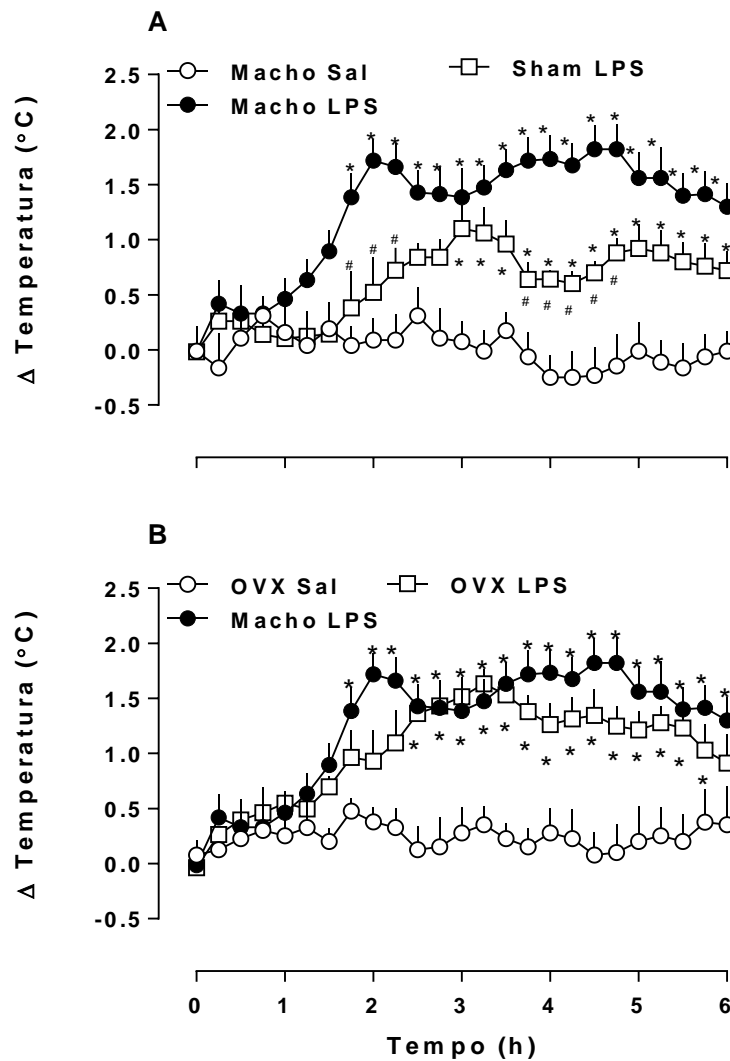


Figura 4- Resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas falso-operadas e OVX. Os animais foram tratados com LPS (50 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada durante 6 h. O painel A compara ratos machos e fêmeas falso-operadas (Sham) e o painel B compara ratos machos e fêmeas OVX. Os pontos representam a média ± e.p.m. da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-7). *p<0.05 quando comparado ao grupo salina, #p<0.05 quando comparado com o grupo Macho LPS.

4.3 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 17 β -ESTRADIOL SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO LPS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS HORMÔNIOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO LPS

A administração de LPS em ratas OVX promoveu um aumento na temperatura corporal (Figura 5A). Já o pré-tratamento subcrônico com 17 β -estradiol em animais OVX reduziu a febre induzida pelo LPS. A administração do 17 β -estradiol isoladamente não promoveu alterações significativas na temperatura corporal (Figura 5A).

Também foi observado que os níveis de estradiol foram reduzidos nos animais OVX tratados com salina quando comparado aos animais falso-operados tratados com salina (Figura 5B). A administração de LPS em animais falso-operados ou OVX não modificou de maneira significativa os níveis de estradiol (Figura 5B).

Não foram evidenciadas mudanças significativas nos níveis de testosterona entre os animais falso-operados e OVX que receberam salina (Figura 5C). Surpreendentemente, a administração de LPS aumentou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona em ambos os animais falso-operados e OVX. Além disso, os níveis de testosterona foram significativamente maiores em animais falso-operados quando comparados com animais OVX (Figura 5C).

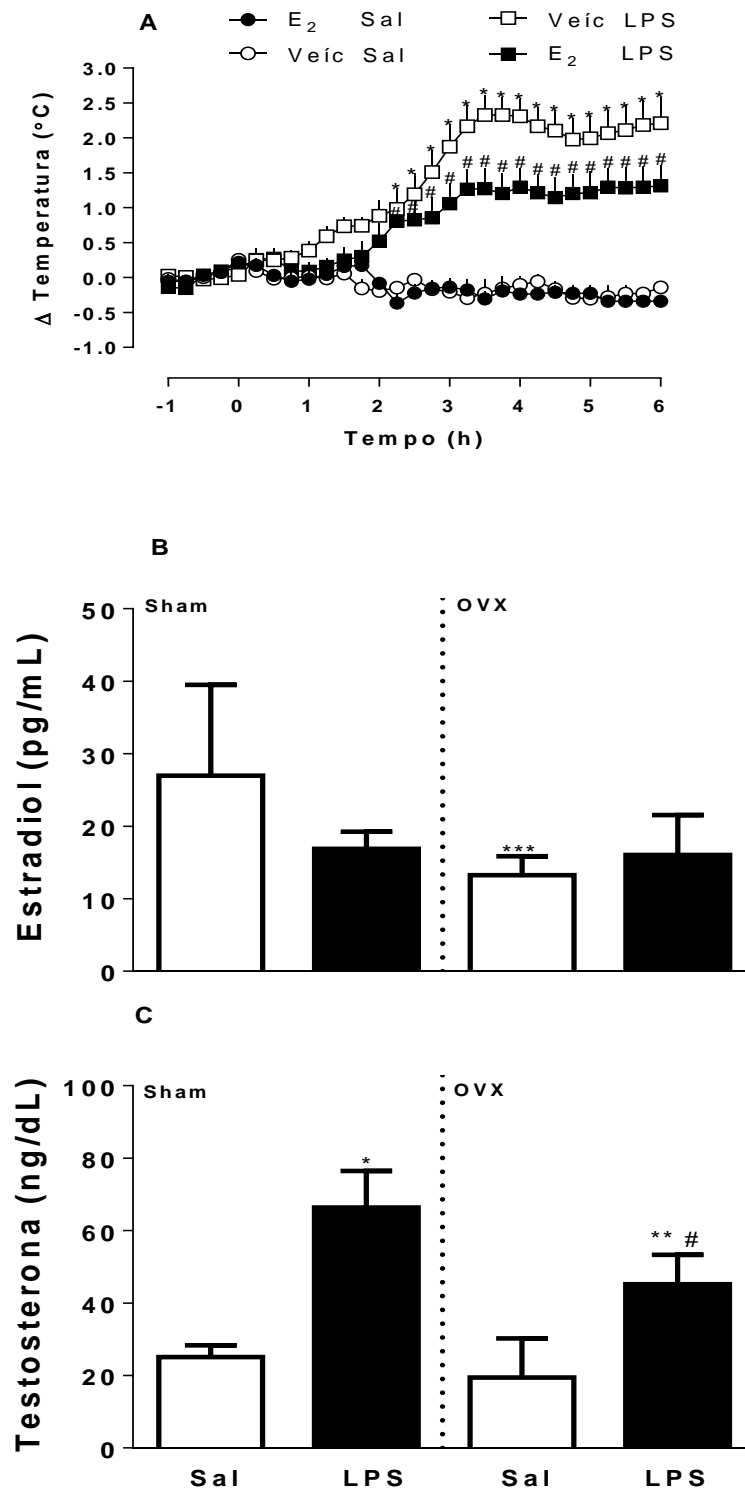


Figure 5- Efeito do tratamento dos animais com 17 β -estradiol sobre a resposta febril induzida pelo LPS e níveis plasmáticos de hormônios após a administração de LPS. Os animais OVX foram tratados durante 7 dias com 17 β -estradiol (E₂, 1 mg/kg, s.c.) ou veículo (Veic, óleo mineral) (Painel A). No 7º dia, os animais receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina e a temperatura corporal foi medida durante 6 h. Outro grupo de animais falso-operados (Sham) e OVX receberam a mesma dose de LPS ou salina (Sal) e os níveis plasmáticos de estradiol (Painel B) e testosterona (Painel C) foram analisados após 3 h. Os pontos e as barras representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal (°C) (n=5-10, Painel A) ou níveis hormonais (pg/ml) (n=5-7, Painéis B e C, respectivamente). *p<0.05 quando comparado com Veic Sal ou seu respectivo grupo salina; **p<0.05 quando comparado com Sham LPS; ***p<0.05 quando comparado com Sham Sal; #p<0.05 quando comparado com grupo Veic LPS ou Sham LPS.

4.4 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR INTERLEUCINA-1 β , FATOR DE NECROSE TUMORAL- α E PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DERIVADA DE MACRÓFAGOS-1 α EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração de IL-1 β em animais falso-operados e OVX induziu uma febre similar iniciada em torno de 2 h e que teve duração até o final do experimento não havendo diferenças significativas entre os dois grupos (Figura 6A).

A administração i.c.v. de TNF- α em ratas falso-operadas induziu uma resposta febril que iniciou 2 h após a administração da citocina e durou até a 6^a hora. No entanto, a administração desta citocina em ratas OVX não induziu uma resposta febril significativa (Figura 6B).

De maneira similar, a administração central de CCL3/MIP-1 α , em ratas falso-operadas promoveu um aumento da temperatura corporal que se iniciou em torno da terceira hora e permaneceu até a sexta hora. Essa resposta febril também foi abolida em ratas OVX (Figura 6C).

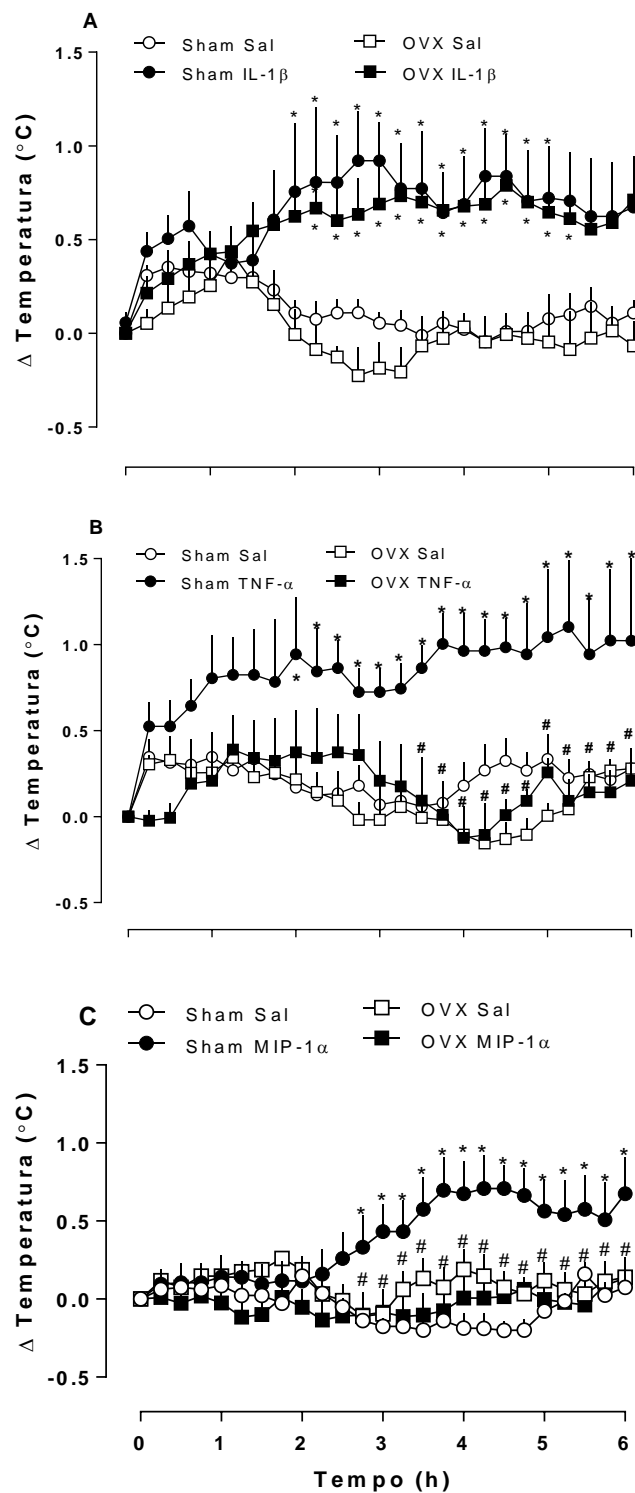


Figura 6- Resposta febril induzida por IL-1 β , TNF- α e CCL3/MIP-1 α em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Ratas OVX e falso-operadas (Sham) receberam interleucina-1 β (IL-1 β , 3.1 pg, i.c.v. Painel A), fator de necrose tumoral (TNF- α , 250 ng, i.c.v., Painel B) e proteína inflamatória de macrófago-1 α (CCL3/MIP-1 α , 500 ng, i.c.v., Painel C), ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada durante 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=4-7). *p<0.05 quando comparado ao respectivo grupo salina; # p<0.05 quando comparado com Sham TNF- α ou Sham CCL3/MIP-1 α .

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OSTEOPROTEGERINA E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES RANK EM NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DURANTE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO LPS

A administração do LPS i.p. promoveu um aumento da temperatura corporal de ratas falso-operadas a partir 230 min e permaneceu até o final do experimento. O pré-tratamento desses animais i.c.v. com OPG 1 µg/2µL não modificou a temperatura corporal induzido pelo LPS (Figura 7A).

A administração de LPS i.p. promoveu um aumento significativo da temperatura corporal de ratas OVX a partir de 170 min, com pico da resposta por volta de 3 h e permanecendo alta até o final do experimento. O pré-tratamento desses animais com esse antagonista promoveu uma redução significativa na resposta febril induzida pelo LPS (Figura 7B).

Animais falso-operados e OVX apresentaram níveis basais similares de receptores RANK no hipotálamo. A administração de LPS aumentou a expressão destes receptores em ambos os grupos falso-operados e OVX (Figura 8). No entanto, a expressão de receptores RANK em animais falso-operados estimulados com LPS foi significativamente maior que em animais OVX tratados com LPS (Figura 8). A expressão de receptores RANK ocorreu exclusivamente em neurônios e em nenhum grupo foi verificada co-localização dos receptores com astrócitos (Figuras 8 e 9, respectivamente).

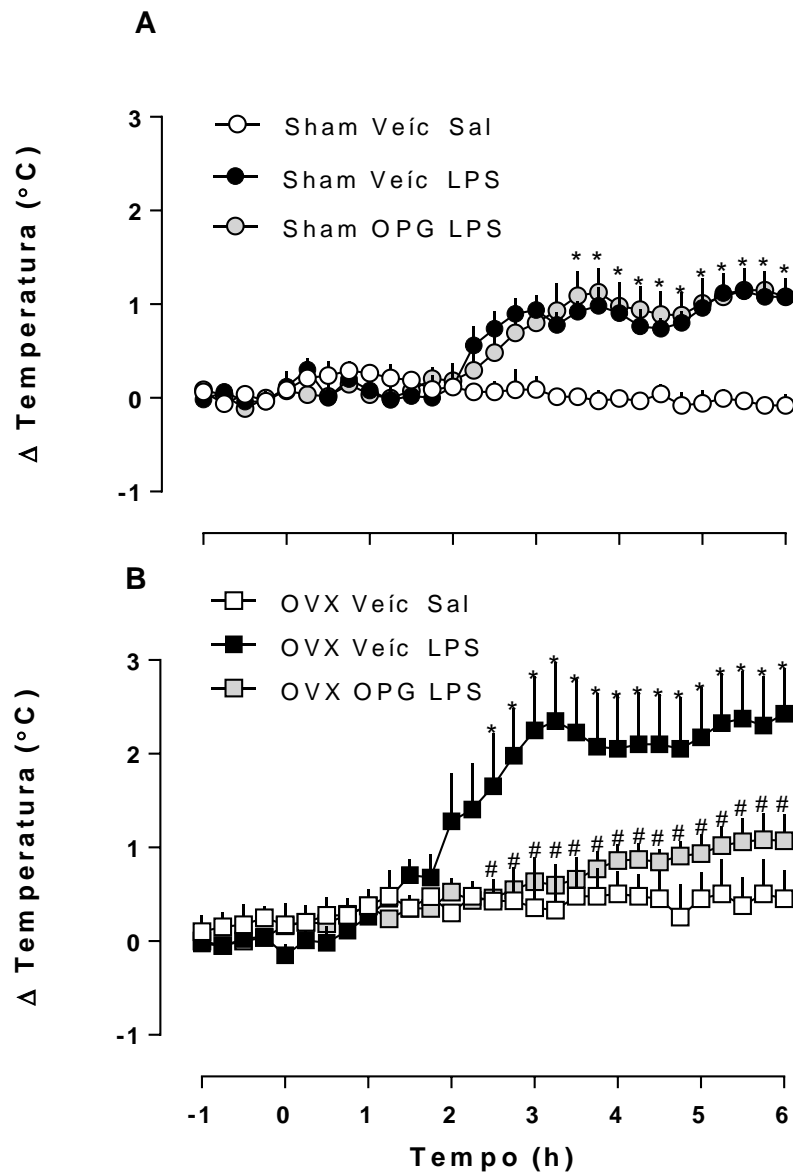


Figura 7- Efeito do tratamento com antagonista para receptor RANK osteoprotegerina sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Ratas falso-operadas (Sham) e OVX foram pré-tratadas com osteoprotegerina (OPG) ($1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.) ou salina (Sal, i.c.v.) e após 30 min receberam LPS ($50\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou o mesmo volume de Sal. A resposta febril foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=4-7$). * $p<0.05$ quando comparado com o respectivo grupo salina, # $p<0.05$ quando comparado com o grupo OVX LPS.

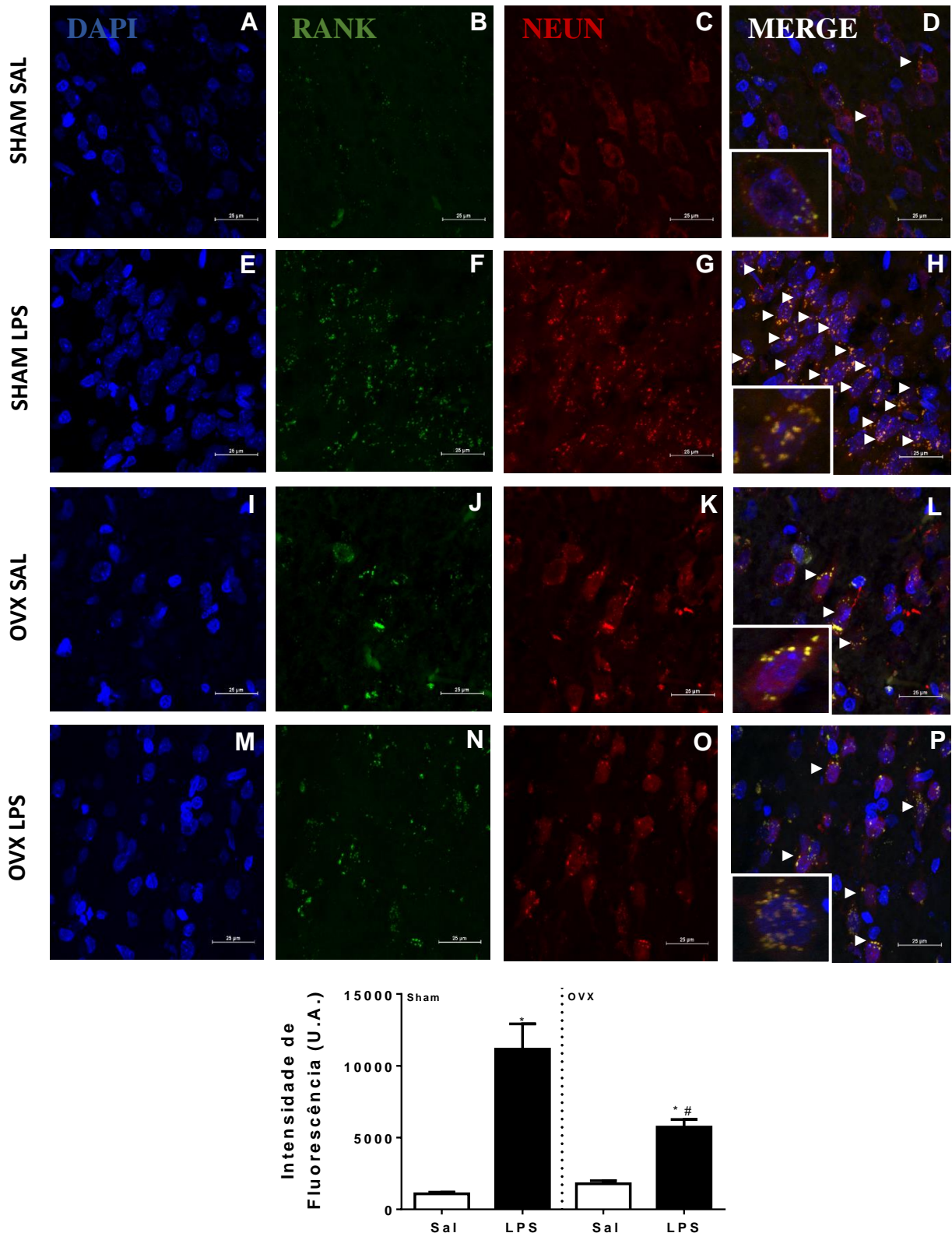


Figura 8- Receptores RANK são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50 µg/kg, i.p.) ou salina (Sal) (aumento 100x). Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,F,J e N para receptor RANK (verde), C,G,K e O para neurônio (NEUN,vermelho) e D,H,L e P a sobreposição das imagens (merge). As setas indicam áreas de co-localização (amarelo). Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). *p<0.05 quando comparado ao Sham Sal e OVX Sal;**p<0.05 quando comparado com Sham Sal, Sham LPS e OVX Sal.

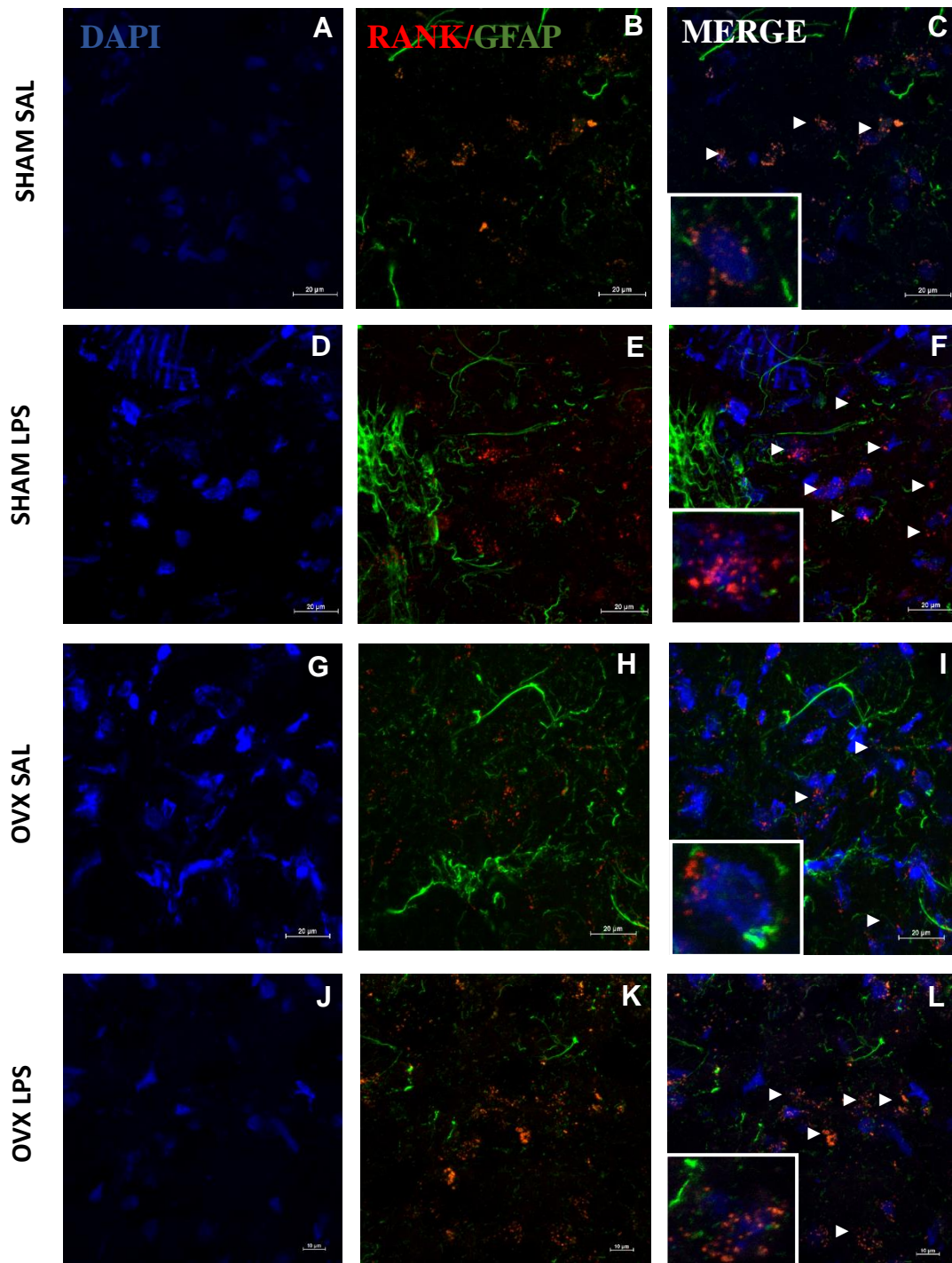


Figura 9- Receptores RANK não são expressos em astrócitos hipotálâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50µg/kg, i.p.) ou salina (aumento 100x). Os painéis A,D,G e I mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para receptor RANK (vermelho) e astrócitos (GFAP,verde), C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge), com áreas indicadas pelas setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a falta de co-localização em detalhe.

4.6 ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINAS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração de LPS i.p. em ratas falso-operadas promoveu um aumento da temperatura corporal que se iniciou em 170 min, com pico da resposta na terceira hora e sustentável até a 6ª hora. A administração de indometacina, um inibidor não seletivo das enzimas COX reduziu a resposta febril induzida pelo LPS a partir do pico da resposta até o final do experimento (Figura 10A).

O LPS administrado em animais OVX promoveu um aumento na temperatura corporal que se iniciou em torno de 170 min, atingindo o pico em 255 min permanecendo assim até o final do experimento. A administração de indometacina também reduziu a temperatura corporal a partir da terceira hora até o final do experimento (Figura 10B).

A administração de LPS via i.p. em animais falso-operadas foi capaz de aumentar a concentração de PGE₂ no fluido cerebrospinal 3 h após a sua administração. O tratamento com indometacina reduziu significativamente os níveis de PGE₂ (Figura 10C). A administração de LPS em animais OVX também promoveu um aumento da concentração de PGE₂ no pico da resposta febril e que foi reduzido com o pré-tratamento com indometacina. No entanto, este aumento foi significativamente maior quando comparado com o mesmo tratamento realizado em animais falso-operados. (Figura 10C).

Como ilustrado na Figura 11, a administração de LPS em animais falso-operados aumentou a expressão de COX-2 quando comparado com animais que receberam somente o veículo. A administração do mesmo estímulo em animais OVX não só aumentou a expressão de COX-2 mas também a distribuiu em toda a matriz quando comparado com animais tratados com veículo. O aumento da expressão dessas enzimas em animais OVX foi significativamente maior que em animais falso-operados sob o mesmo tratamento (Figura 11).

A administração i.c.v. de PGE₂ em animais falso-operados promoveu um aumento rápido da temperatura corporal com início em 30 min, atingindo o pico em 45 min e finalizando em 60 min (Figura 12). Já a adição da mesma prostaglandina em animais OVX promoveu um aumento significativo da temperatura corporal em 15 min, com pico de resposta em 30 min e finalizando a resposta em 60

min. O aumento de temperatura corporal em animais OVX foi significamente maior quando comparado com animais falso-operados tratados com a mesmo estímulo. O tratamento com veículo i.c.v. tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX não modificou a temperatura corporal dos animais (Figura 12).

No hipotálamo de ratas falso-operadas tratadas com LPS foi observado um aumento na expressão de receptores EP₃ quando comparado com animais tratados com veículo. Animais OVX tratados com LPS apresentaram um aumento na expressão de receptores EP₃ em neurônios hipotalâmicos quando comparado com cérebro de animais tratados com veículo (Figura 13). No entanto, a expressão de receptores EP₃ em animais OVX estimulados foi significativamente maior que em animais falso-operados tratados com LPS (Figura 13). Em nenhum grupo foi verificado co-localização dos receptores com astrócitos. (Figura 14).

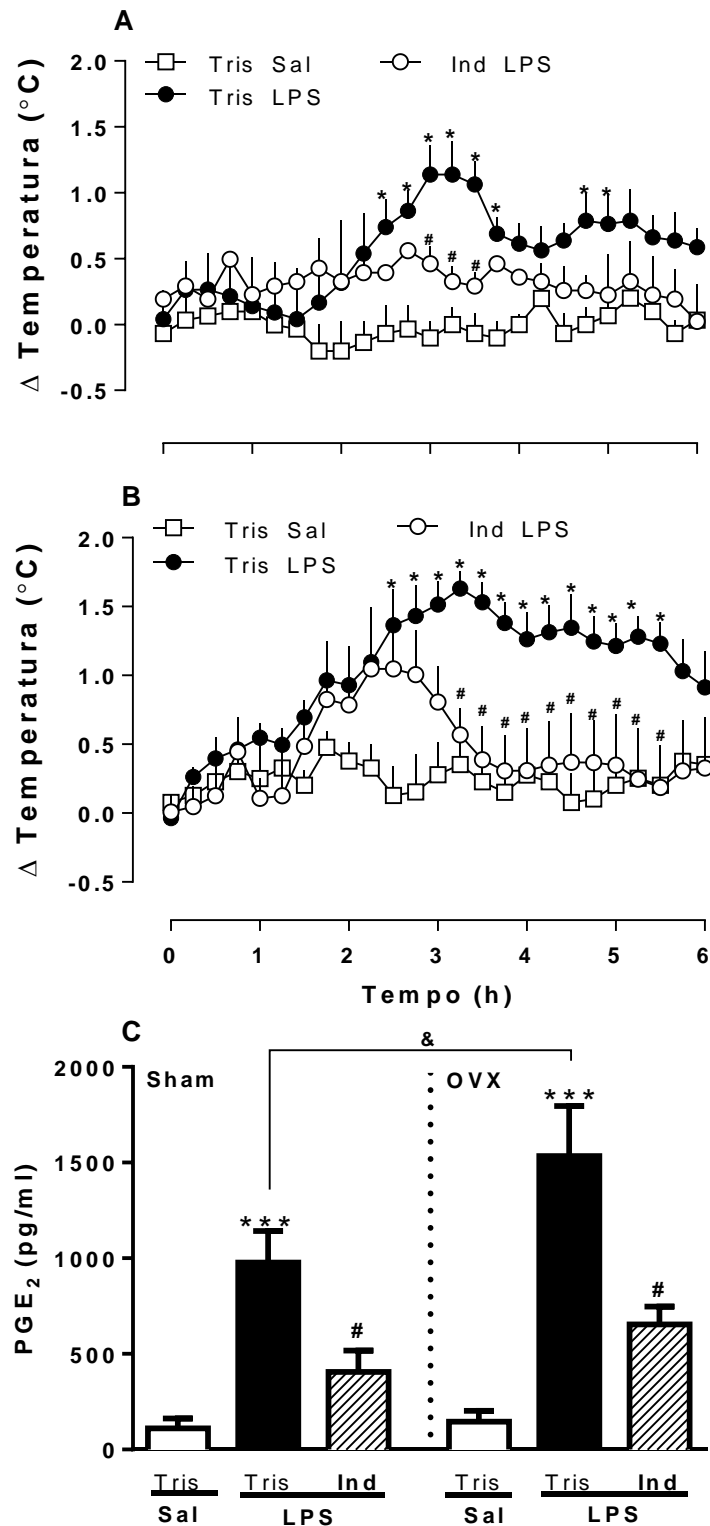


Figura 10- Envolvimento de prostaglandinas na resposta febril induzida por LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Ratas falso-operadas (Painel A) e OVX (Painel B) foram pré-tratadas com indometacina (Ind, 2 mg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de Tris e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 6 h. Em outro experimento, esse protocolo foi repetido e o CSF foi coletado após 3 h para dosagem de PGE₂ (Painel C). Os pontos e as barras representam a média ± e.p.m. da variação de temperatura corporal (°C, n=5-7) ou dos níveis de PGE₂ (pg/ml, n=9-14). *p<0.05 quando comparado com o grupo Tris Sal, #p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo Tris LPS, & p<0.05 quando comparado com grupo Sham LPS.

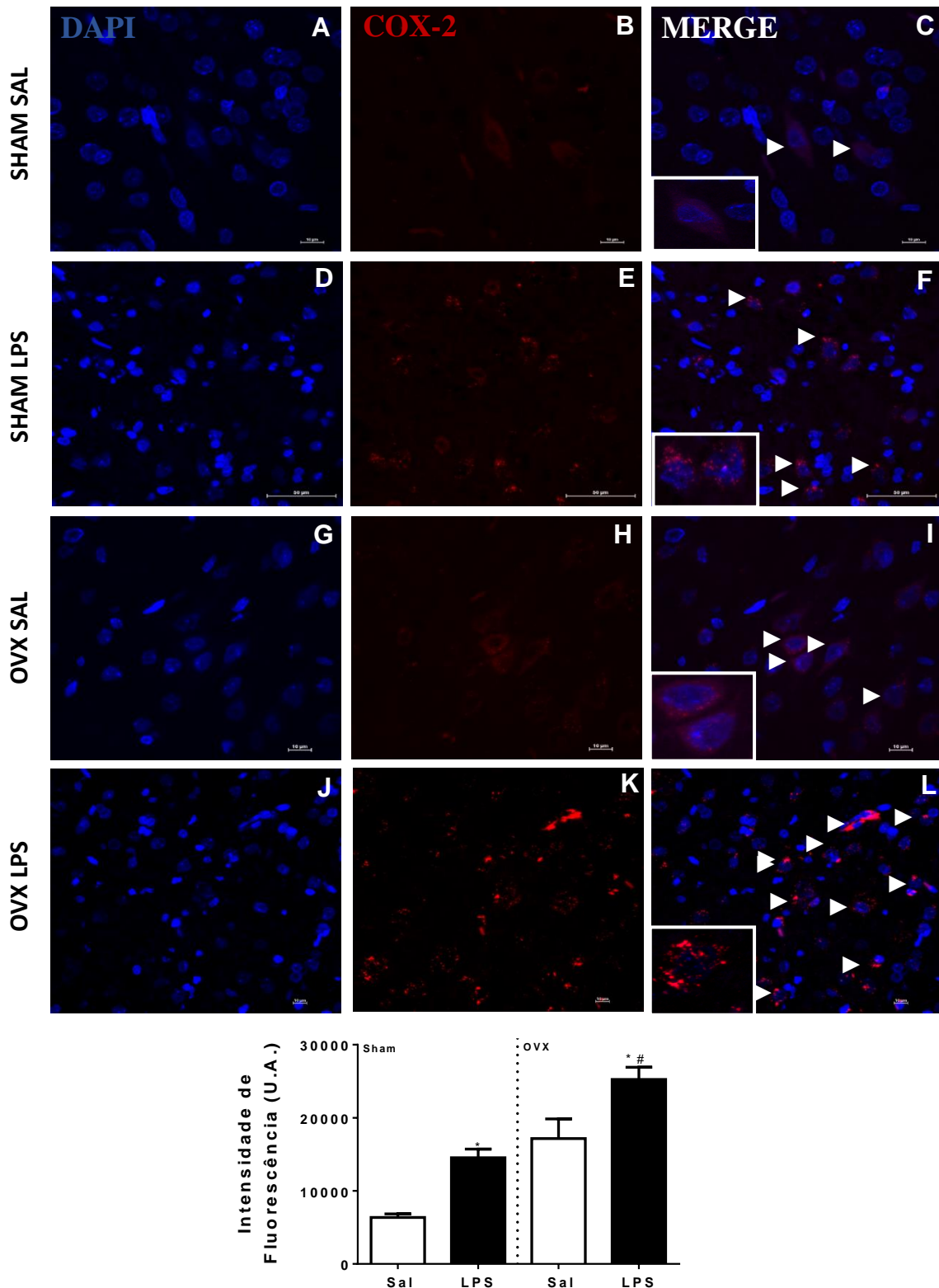


Figura 11 Enzimas COX-2 são expressas no hipotálamo de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50µg/kg, i.p.) ou salina (aumento 100x). Os painéis A, D, G e J mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para enzimas COX-2 (vermelho) e C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge). As setas indicam a localização da marcação. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a imunomarcacão em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcacões representadas pela média \pm e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). * $p < 0.05$ quando comparado com os respectivos grupos salina; # $p < 0.05$ quando comparado com Sham LPS.

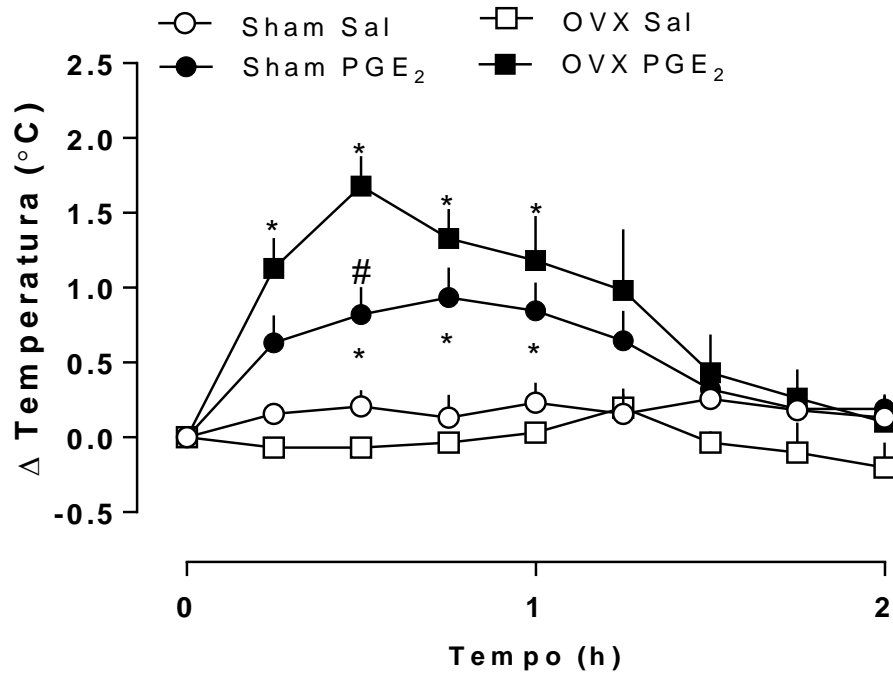


Figura 12- Resposta febril induzida pela prostaglandina E₂ em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam prostaglandina E₂ (PGE₂, 250 ng, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 2 h. Os pontos representam a média ± e.p.m. da variação da temperatura (°C) (n=4-7). *p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo salina, #p<0.05 quando comparado com o grupo Sham PGE₂.

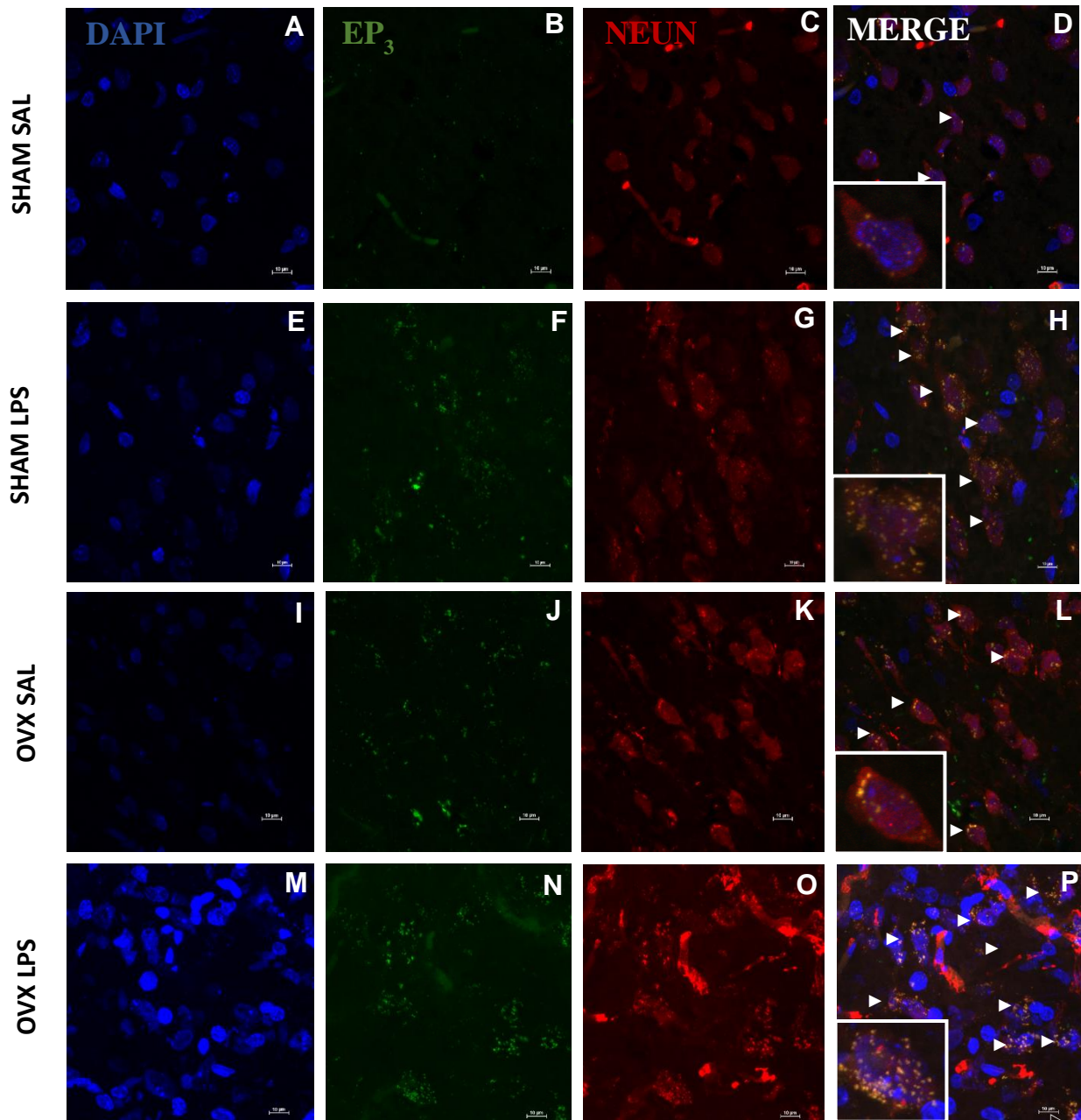


Figura 13- Receptores EP₃ são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS 50µg/kg, i.p. ou salina (aumento 100x). Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B, F, J e N para receptor EP₃ (verde), C, G, K e O para neurônio (NEUN, vermelho) e D, H, L e P a sobreposição das imagens (merge) As setas indicam áreas de co-localização (amarelo). Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhes. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). *p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo salina #p<0.05 quando Sham LPS.

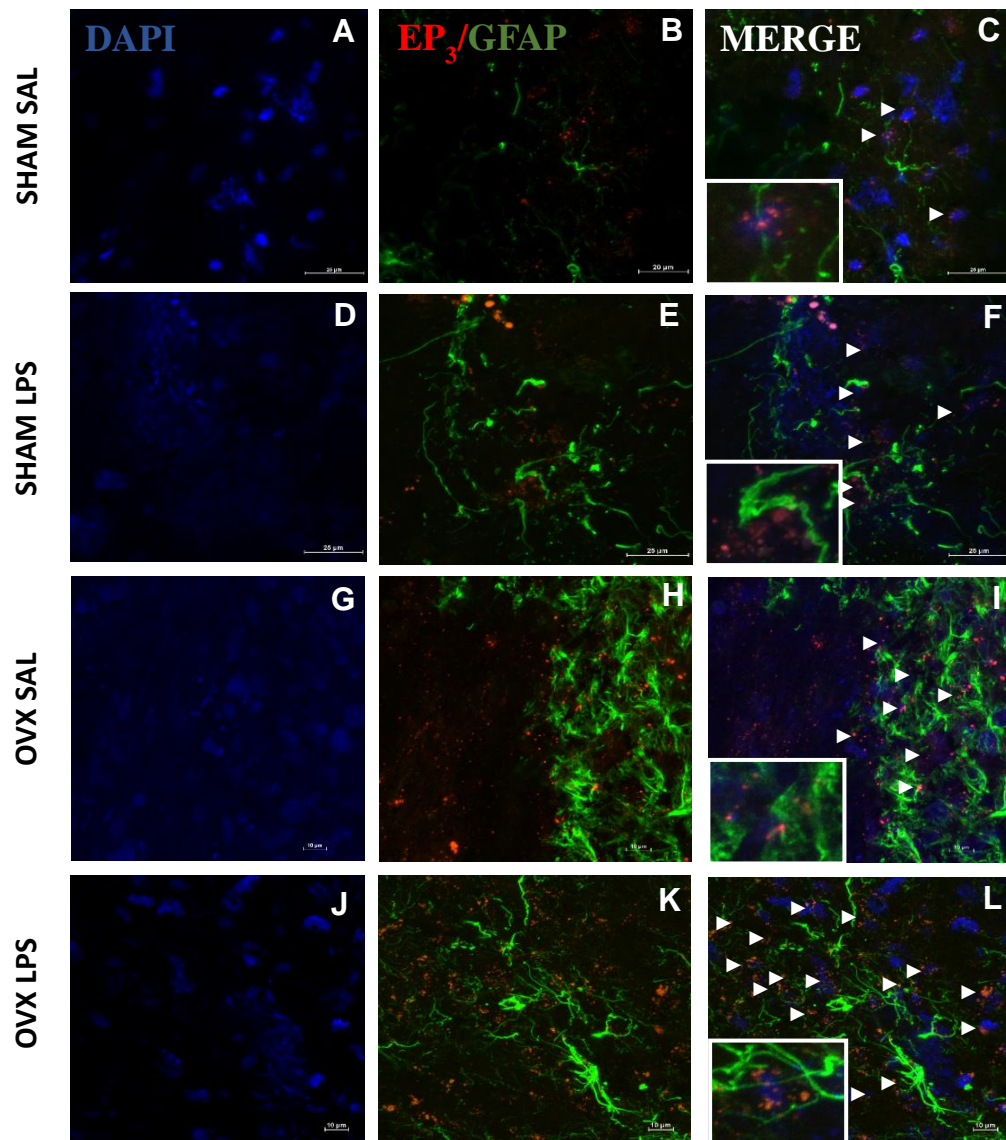


Figura 14- Receptores EP₃ não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS 50μg/kg, i.p. ou salina (aumento 100x). Os painéis A, D,G e I mostram imunoratividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para receptor EP₃ (vermelho) e astrócitos (GFAP,verde), C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge), com áreas indicadas pelas setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a falta de co-localização em detalhe.. Imagens representativas da secção de cérebros de animais falso-operadas e OVX tratadas com

4.7 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROPINA (CRF) E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CRF I/II NO HIPOTÁLAMO EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIETOMIZADAS

A administração i.c.v. de CRF em animais falso-operados promoveu um aumento rápido da temperatura corporal com início em 145 min, atingindo o pico em 230 min e permanecendo até o final do experimento (Figura 15). Já a injeção do CRF em animais OVX não alterou a temperatura corporal a partir de 170 min até o final do experimento (Figura 15). O tratamento com veículo i.c.v. tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX não modificou a temperatura corporal dos animais (Figura 15).

No hipotálamo de animais falso-operados tratados com LPS observou-se um aumento na expressão de receptores CRF I/II quando comparado com animais tratados com veículo (Figura 16). De maneira similar, animais OVX tratados com LPS também apresentaram um aumento na expressão de receptores CRF I/II em neurônios hipotalâmicos quando comparado com cérebro de animais OVX tratados com veículo (Figura 16). No entanto, não houve diferença significativa na expressão de receptores entre animais falso-operados e OVX quando ambos foram estimulados com LPS (Figura 16). Em nenhum grupo foi verificado co-localização dos receptores com astrócitos (Figura 17).

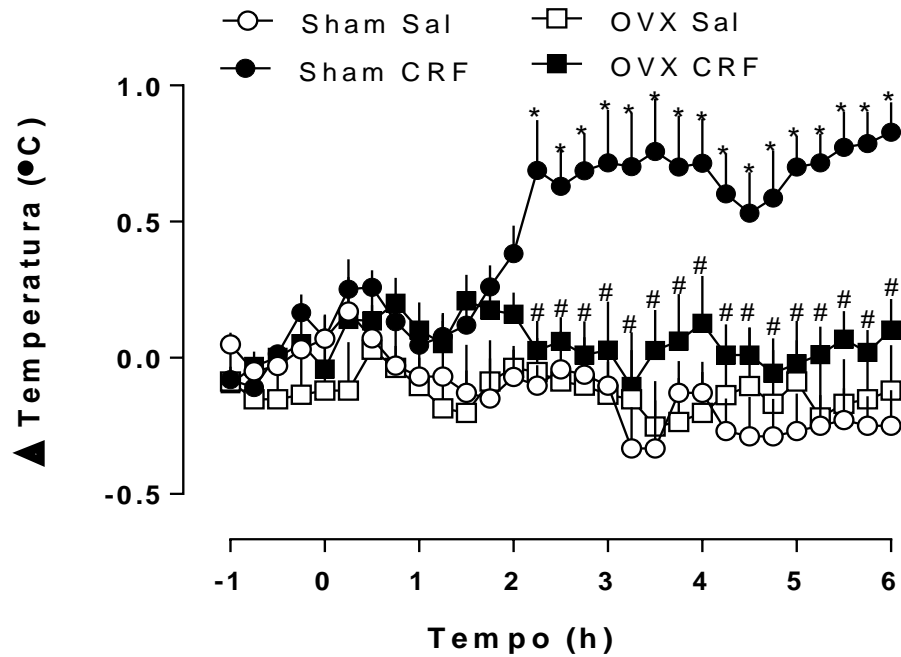


Figura 15- Resposta febril induzida por CRF em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam CRF (CRF,2,5 μ g/2 μ L, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura ($^{\circ}$ C) (n=4-7). *p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo salina, #p<0.05 quando comparado com o grupo Sham CRF.

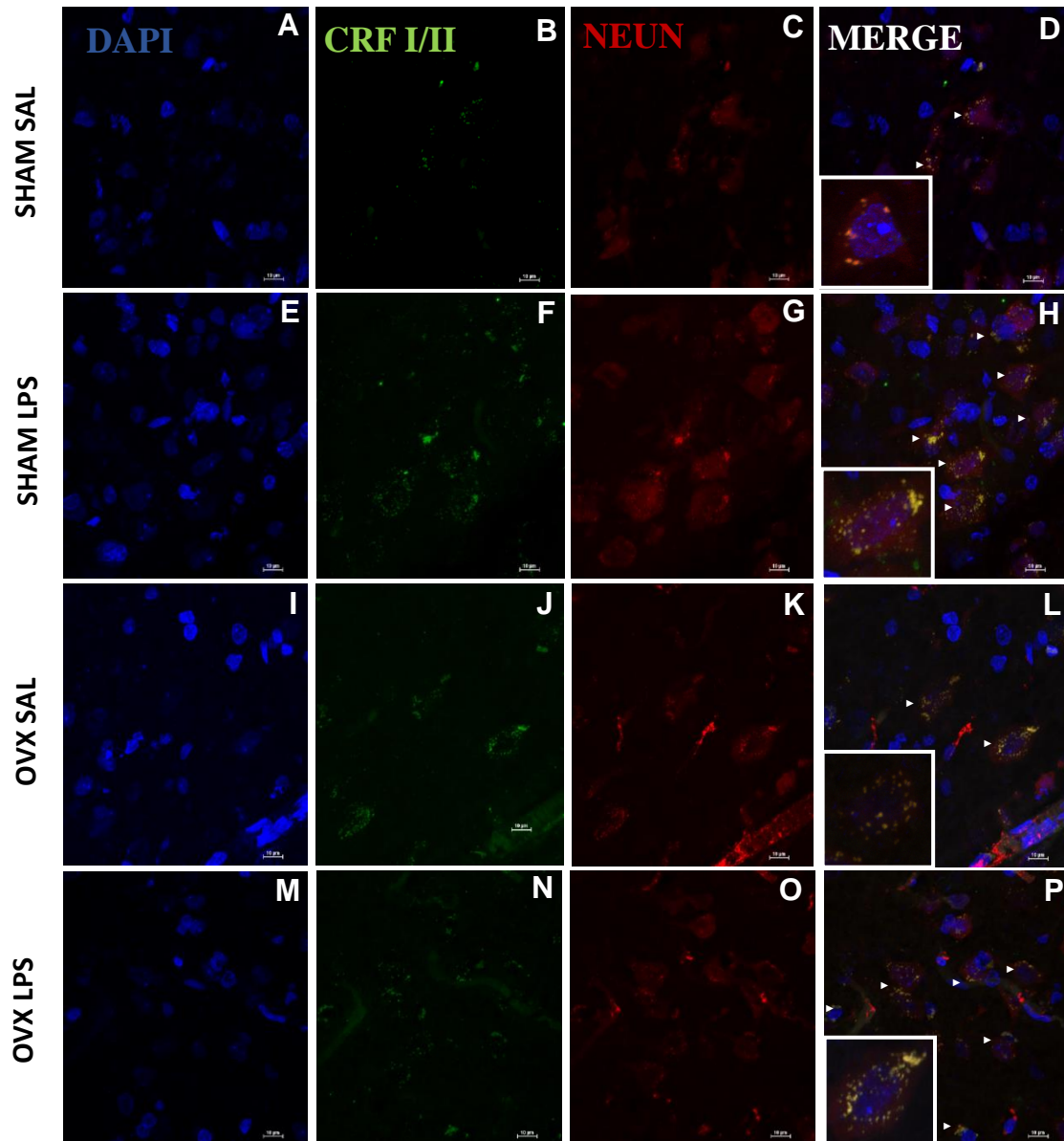


Figura 16- Receptores CRFI/II são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS 50µg/kg, i.p. ou salina (aumento 100x). Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B, F, J e N para receptores CRFI/II (verde), C, G, K e O para neurônio (NEUN, vermelho) e D, H, L e P a sobreposição das imagens (merge). As setas indicam áreas co-localização (amarelo). Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela média \pm e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). * $p < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo salina; ** $p < 0.05$ quando comparado com os respectivos grupos salina e Sham LPS.

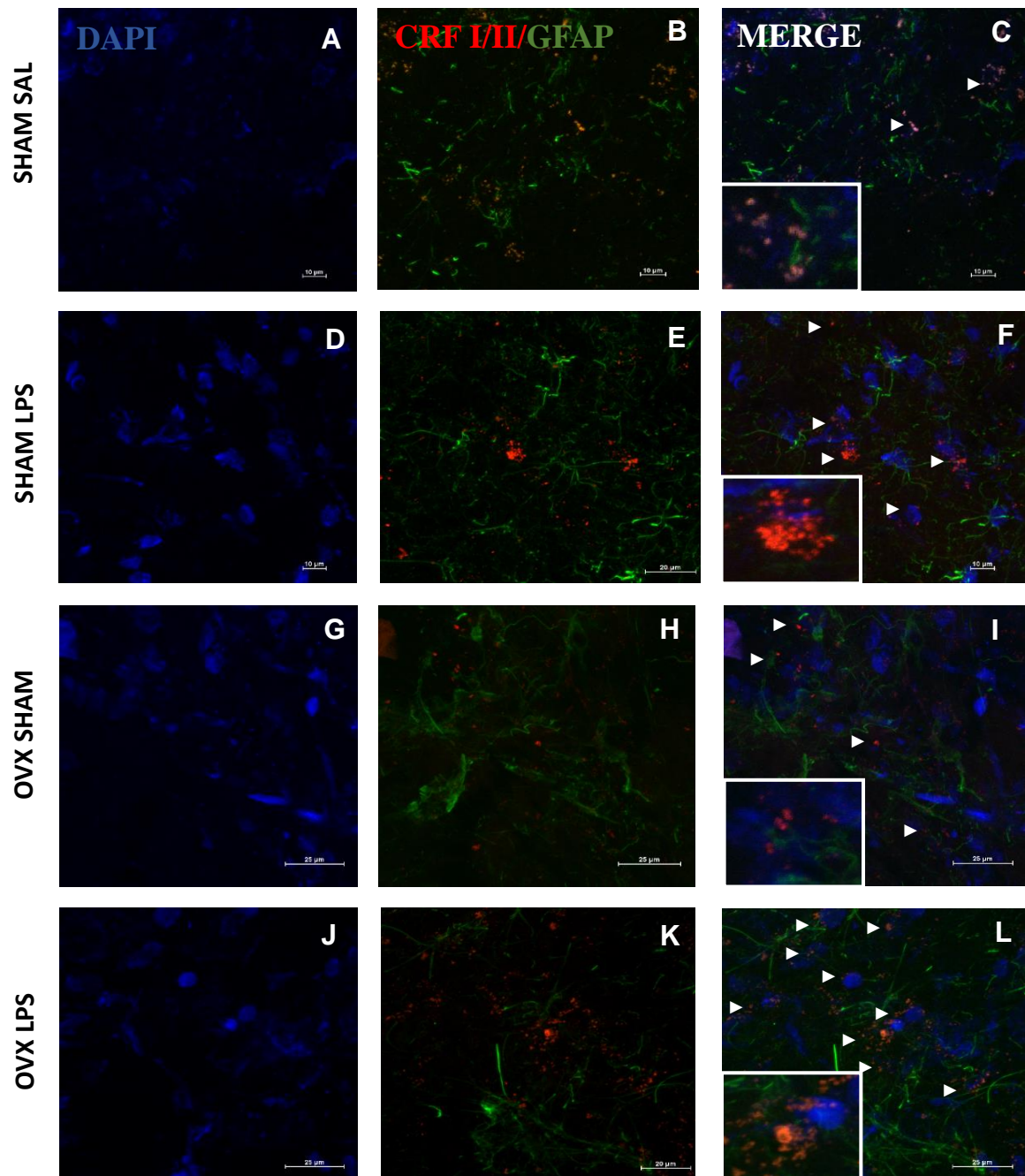


Figura 17- Receptores CRF1/II não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina (aumento 100x). Os painéis A, D,G e I mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para receptor CRF1/II (vermelho) e astrócitos (GFAP,verde), C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge), com áreas indicadas pela setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a falta de co-localização em detalhe.

4.8 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA ENDOTELINA-1 E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES ET_B NO HIPOTÁLAMO EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração i.c.v. de ET-1 em animais falso-operados promoveu um aumento rápido da temperatura corporal com início em 170 min, atingindo o pico em 315 min e permanecendo até o final do experimento (Figura 18). Já a injeção da ET-1 em animais OVX não alterou a temperatura corporal a partir de 170 min até o final do experimento (Figura 18). O tratamento com veículo i.c.v. tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX não modificou a temperatura corporal dos animais (Figura 18).

No hipotálamo de ratas falso-operadas tratadas com LPS foi observado um discreto aumento na expressão de receptores ET_B quando comparado com animais tratados com veículo, porém a quantificação da intensidade de fluorescência não apresentou valores significativos (Figura 19). Animais OVX tratadas com LPS apresentaram um aumento na expressão de receptores ET_B quando comparado com cérebro de animais OVX tratados com veículo (Figura 19). No entanto, a expressão de receptores ET_B em animais OVX tratados com LPS foi estatisticamente maior quando comparado com os demais grupos. (Figuras 19). Estes receptores ET_B não se apresentaram co-localizados com astrócitos (Figura 19).

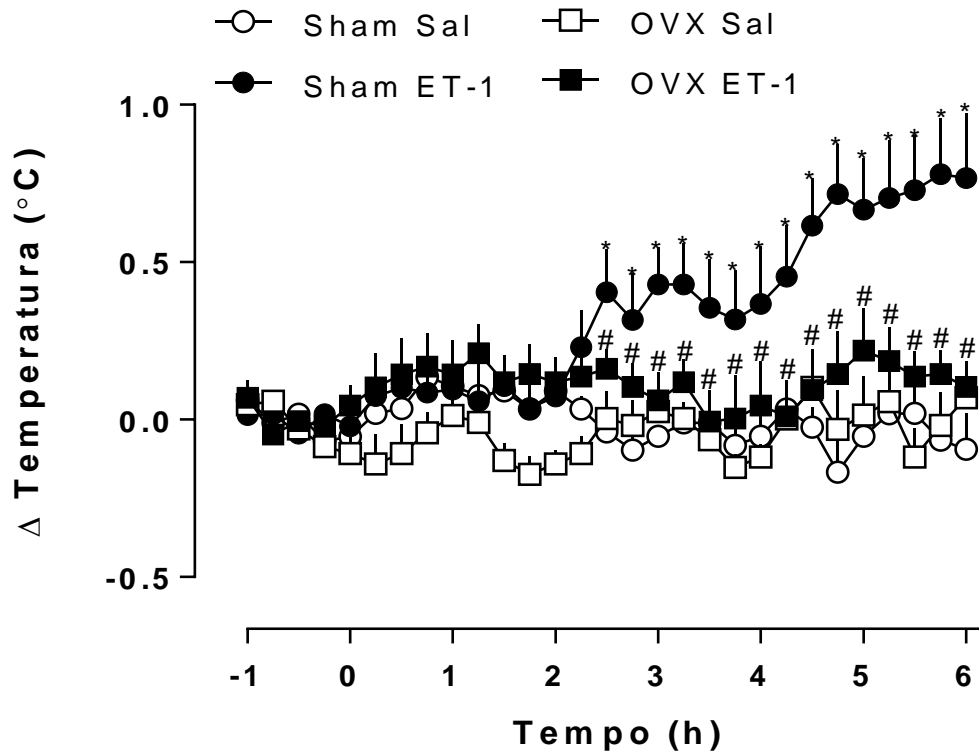


Figura 18- Resposta febril induzida por ET-1 em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam ET-1 (ET-1, 1 pg, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=4-7$). * $p < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo salina, # $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Sham ET-1.

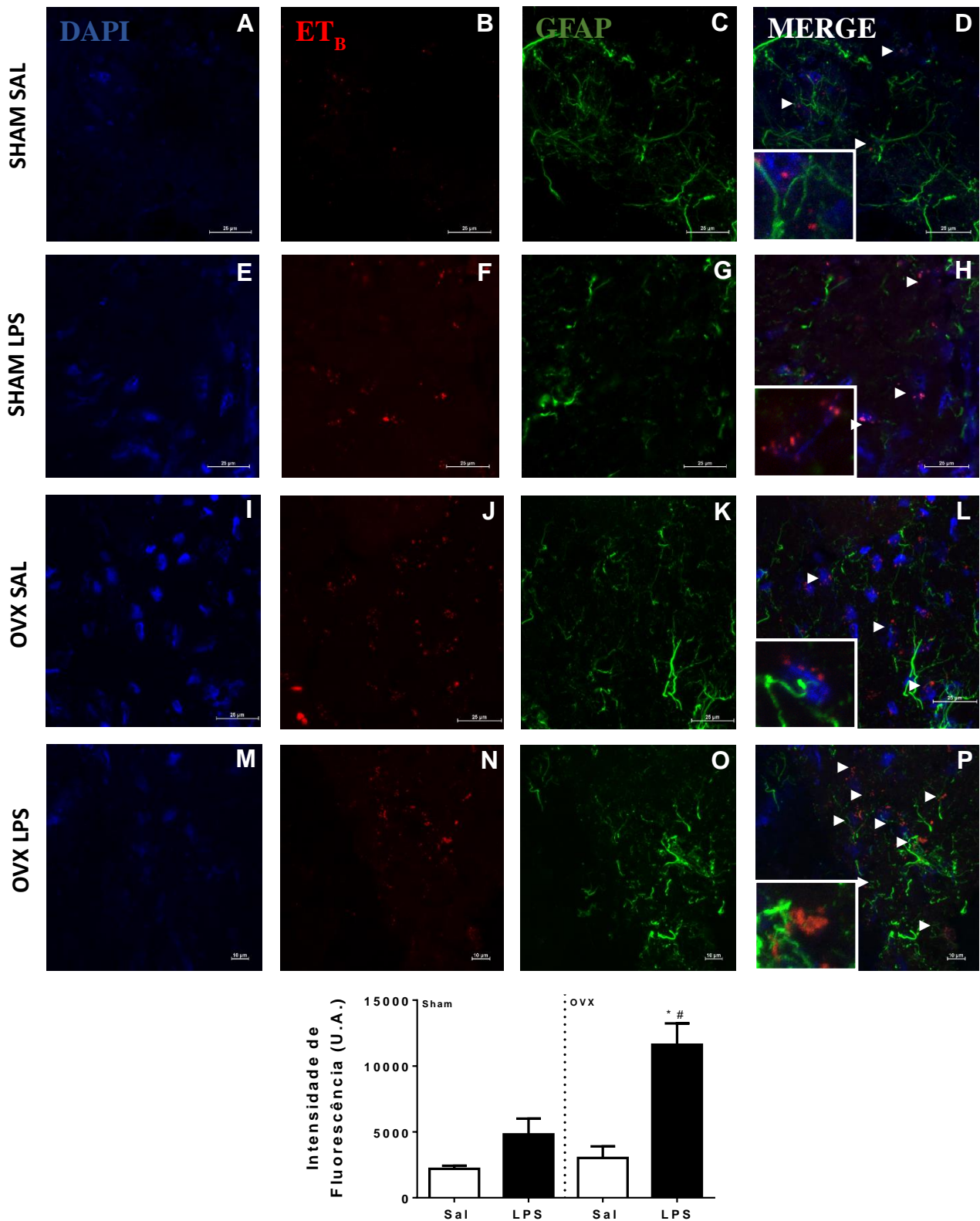


Figura 19- Receptores ET_B não são expressos em astrócitos hipotalâmicos em ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50μg/kg, i.p.) ou salina (aumento 100x). Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,F,J e N para receptor ET_B (vermelho), C,G,K e O para astrócito (GFAP,verde) e D,H,L e P a sobreposição das imagens (merge), com áreas com áreas indicadas pela setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). *p<0.05 quando comparado com OVX Sal ;# p<0.05 quando comparado com Sham LPS

4.9 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR MORFINA E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES μ EM NO HIPOTÁLAMO DE RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração i.c.v. de morfina em animais falso-operados promoveu um aumento rápido da temperatura corporal com início em 45 min, atingindo o pico em 105 min e finalizando em 195 min (Figura 20). Já a injeção de morfina em animais OVX também promoveu um aumento na temperatura corporal a partir de 30 min, com pico em 75 min e finalizando em 210 min. Não foi verificada diferença estatística entre o aumento corporal induzido pela morfina em animais falso-operados quando comparado com animais OVX. O tratamento com veículo i.c.v. tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX não modificou a temperatura corporal dos animais (Figura 20).

No hipotálamo de ratas falso-operadas tratadas com LPS foi observado um aumento na expressão de receptores μ quando comparado com animais tratadas com veículo (Figura 21). Animais OVX tratadas com LPS também apresentaram um aumento na expressão de receptores μ -opióide em neurônios hipotalâmicos quando comparado com cérebro de animais tratados com veículo (Figura 21). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão desses receptores entre animais falso-operados e OVX estimulados com LPS (Figura 21). Em nenhum grupo foi evidenciada co-localização dos receptores com astrócitos. (Figuras 22).

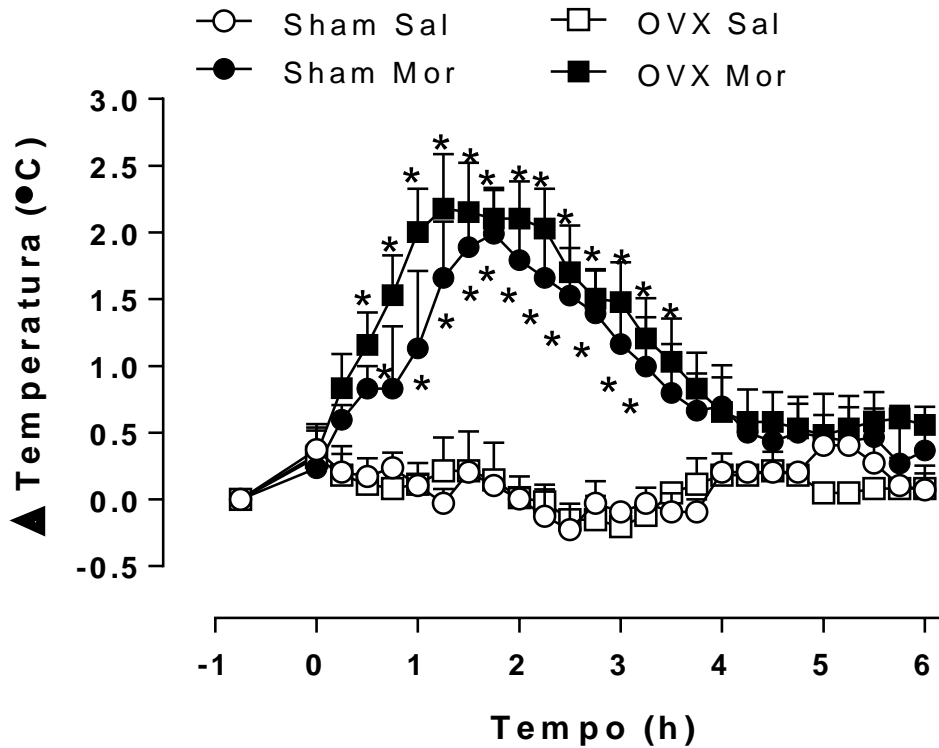


Figura 20- Resposta febril induzida por morfina em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam morfina (morfina, 10 μ g, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=4-7). *p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo salina.

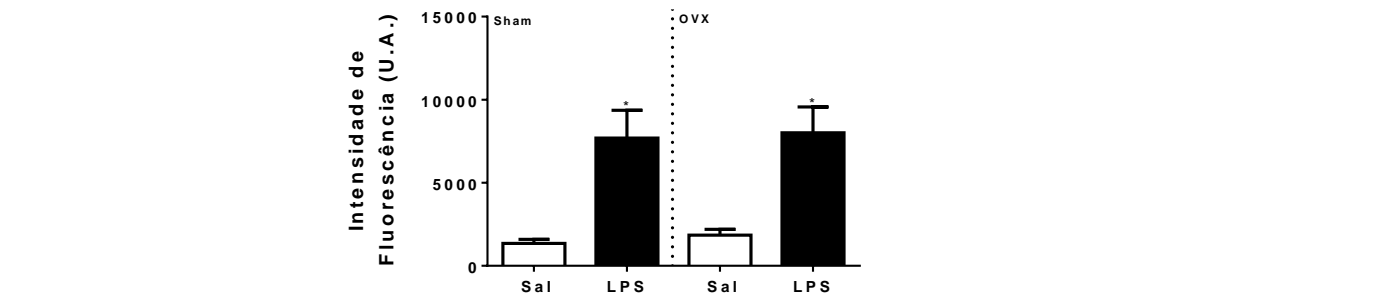
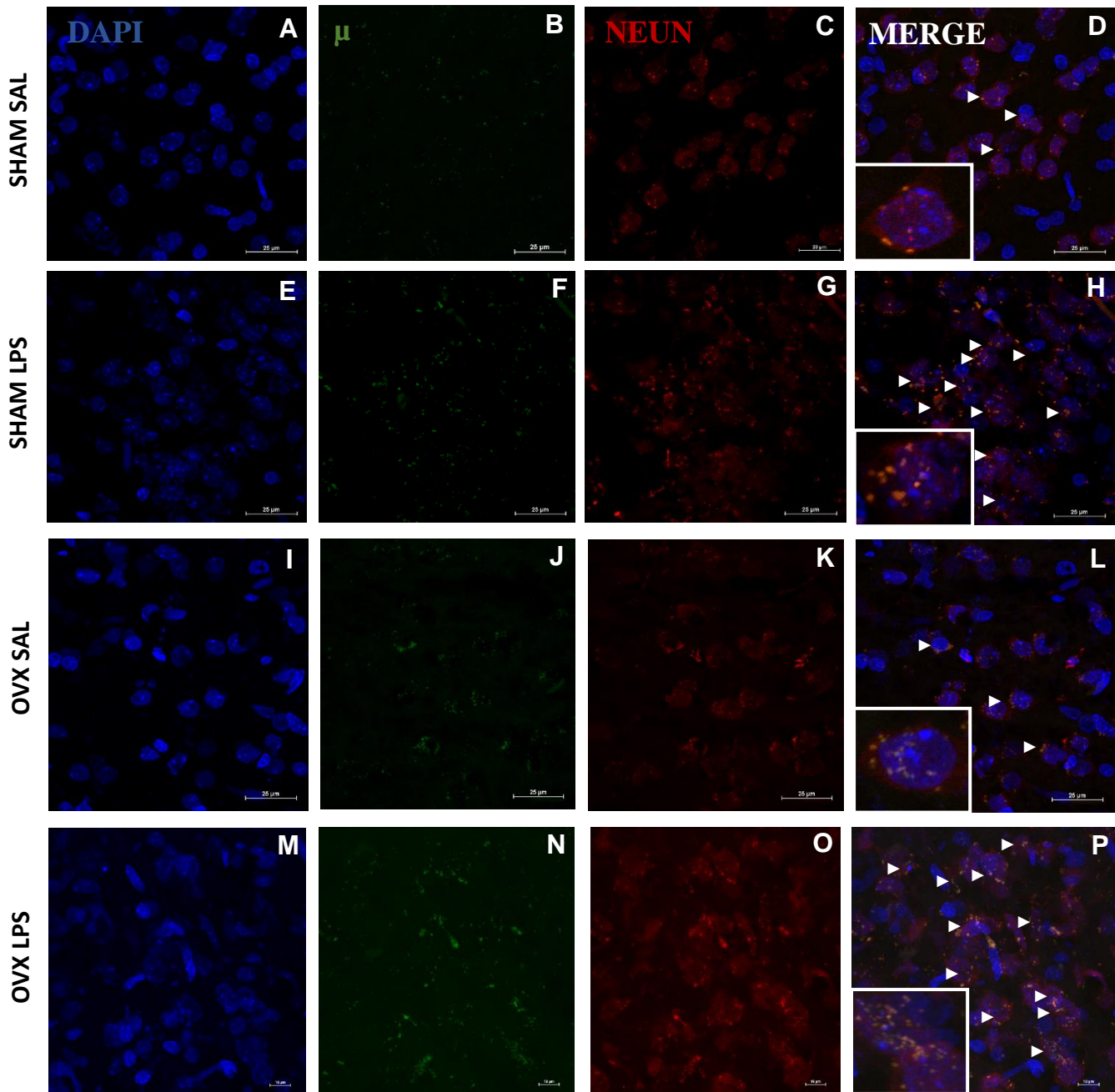


Figura 21- Receptores μ -opióide são expressos em neurônios hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham ou OVX tratadas com LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina (aumento 100x). Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,F,J e N para receptores μ (verde), C,G,K e O para neurônio (NEUN,vermelho) e D,H,L e P a sobreposição das imagens (merge). As setas indicam áreas de co-localização (amarelo). Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela media \pm e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). *p < 0.05 quando comparado com os respectivos grupos salina.

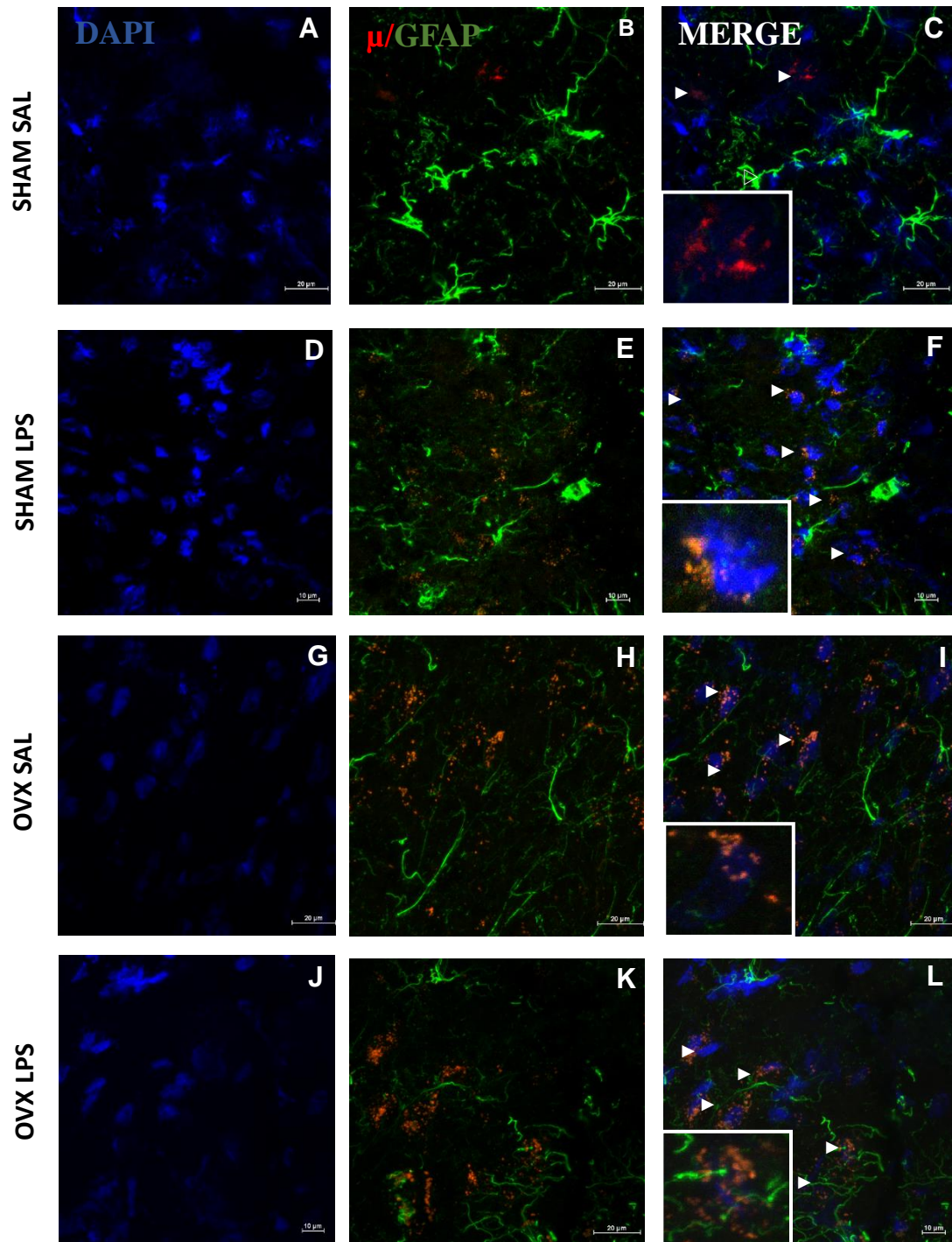


Figura 22- Receptores μ -opióide não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS (50 μ g/kg) ou salina (aumento 100x). Os painéis A,D,G e I mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para receptor μ (vermelho) e astrócitos (GFAP,verde), C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge), com áreas indicadas pela setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a falta de co-localização em detalhe.

4.10 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SUBSTÂNCIA P E DISTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES NK_1 NO HIPOTÁLAMO EM RATAS FALSO-OPERADAS E OVARIECTOMIZADAS

A administração i.c.v. de SP em animais falso-operados promoveu um aumento da temperatura corporal com início em 145 min, atingindo o pico no final do experimento (Figura 23). Diferentemente, a administração de SP em animais OVX não desencadeou uma alteração na temperatura corporal dos animais. (Figura 23). O tratamento com veículo i.c.v. tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX não modificou a temperatura corporal dos animais (Figura 23).

No hipotálamo de animais falso-operadas tratadas com LPS foi observado um aumento na expressão de receptores NK_1 quando comparado com animais tratadas com veículo. Animais OVX tratadas com LPS apresentaram um aumento na expressão de receptores NK_1 em neurônios hipotalâmicos quando comparado com cérebro de animais tratados com veículo. Foi verificado que animais OVX tratados com LPS apresentaram uma maior expressão de receptores NK_1 em neurônios quando comparado com animais falso-operados sob o mesmo tratamento, além de uma aglomeração (clusterização) do receptor. Em nenhum grupo foi verificado co-localização dos receptores com astrócitos. (Figuras 24 e 25).

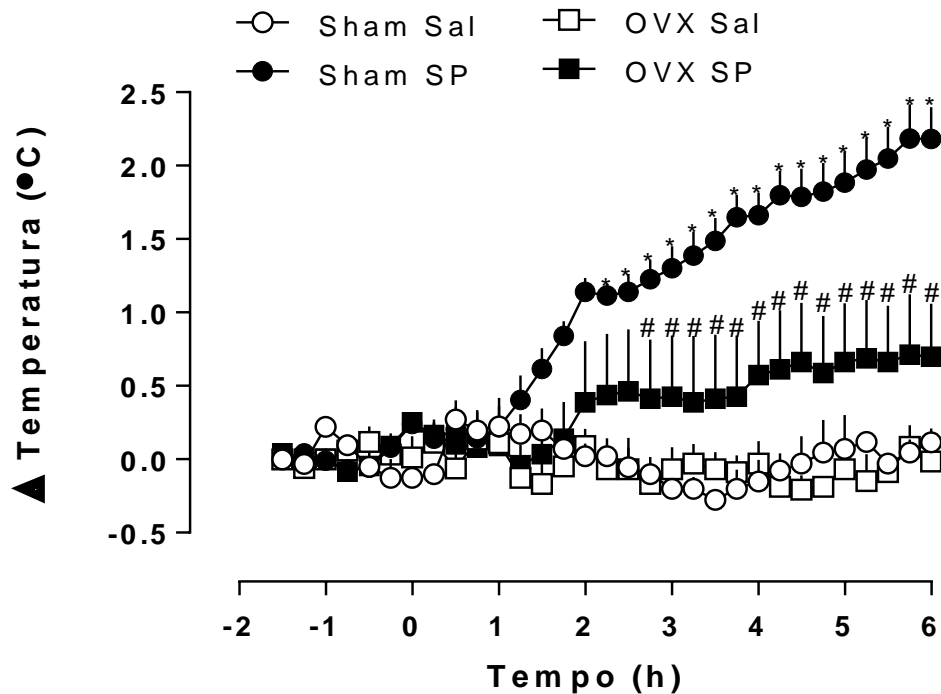


Figura 23- Resposta febril induzida por Substância P em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram pré-tratados com captopril (5 µg/2µl, i.c.v.) e logo em seguida, após 30 minutos, Substância P foi administrada no mesmo sítio (SP, 500 ng, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal) e a resposta febril foi avaliada por 6 h. Os pontos representam As barras representam a média ± e.p.m. da variação da temperatura (°C) (n=4-7). *p<0.05 quando comparado com o respectivo grupo salina, #p<0.05 quando comparado com o grupo Sham SP.

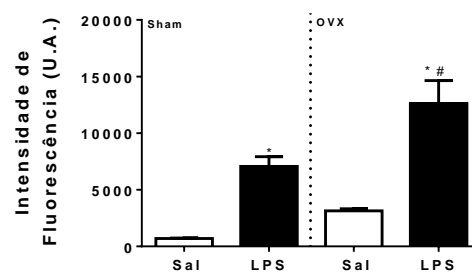
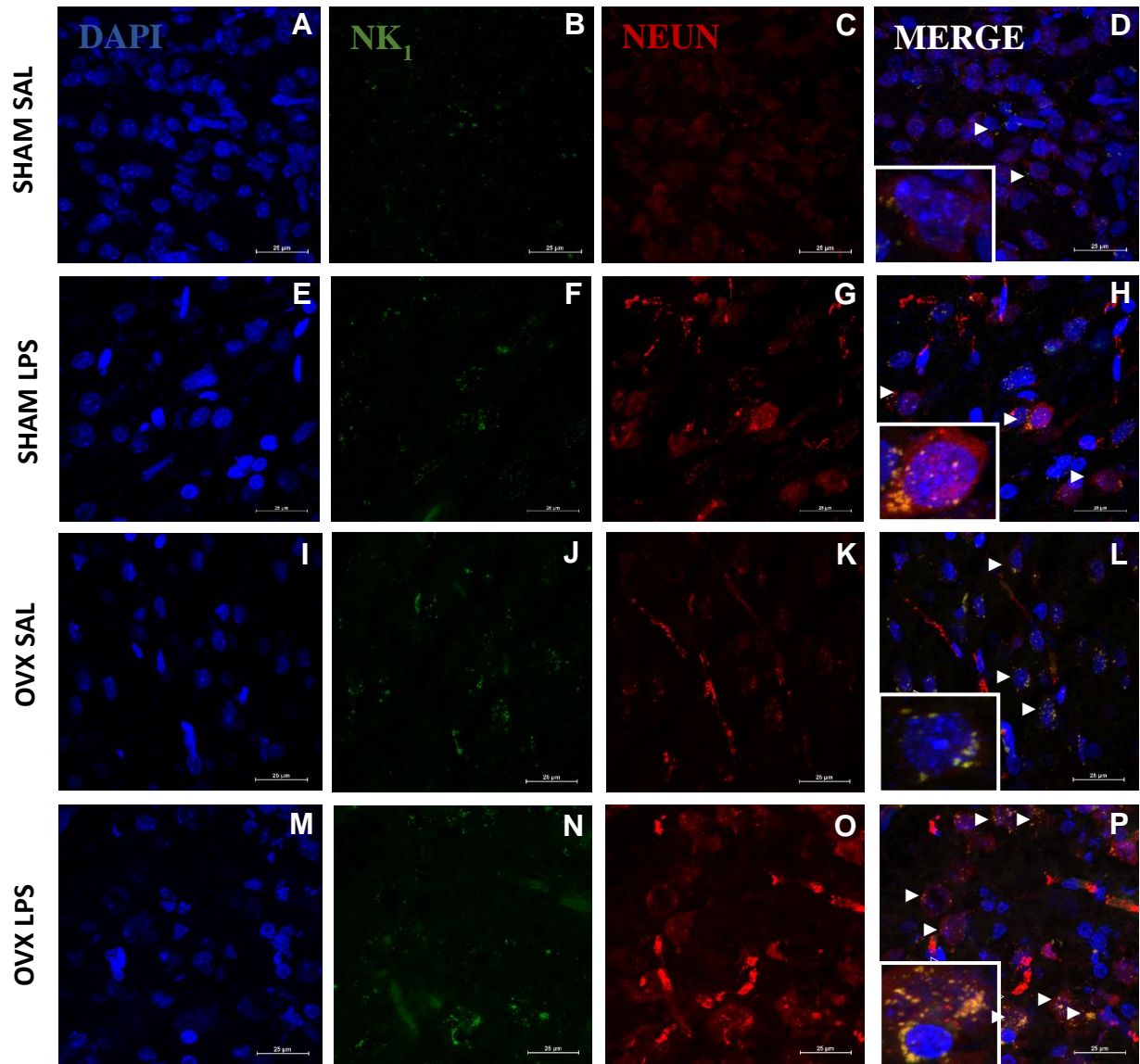


Figura 24- Receptores NK₁ são expressos em neurônios hipotálamicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens são representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS 50μg/kg,i.p. ou salina (Aumento 100x) .Os painéis A, E, I e M mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,F,J e N para receptores NK₁ (verde), C,G,K e O para neurônio (NEUN,vermelho) e D,H,L e P para sobreposição das imagens (merge), com áreas indicativas pela setas de co-localização (amarelo). Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a co-localização em detalhe. O gráfico abaixo das imagens mostra a quantificação das imunomarcações representadas pela média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). *p<0.05 quando comparado com os respectivos grupo salina; # quando comparado com Sham LPS

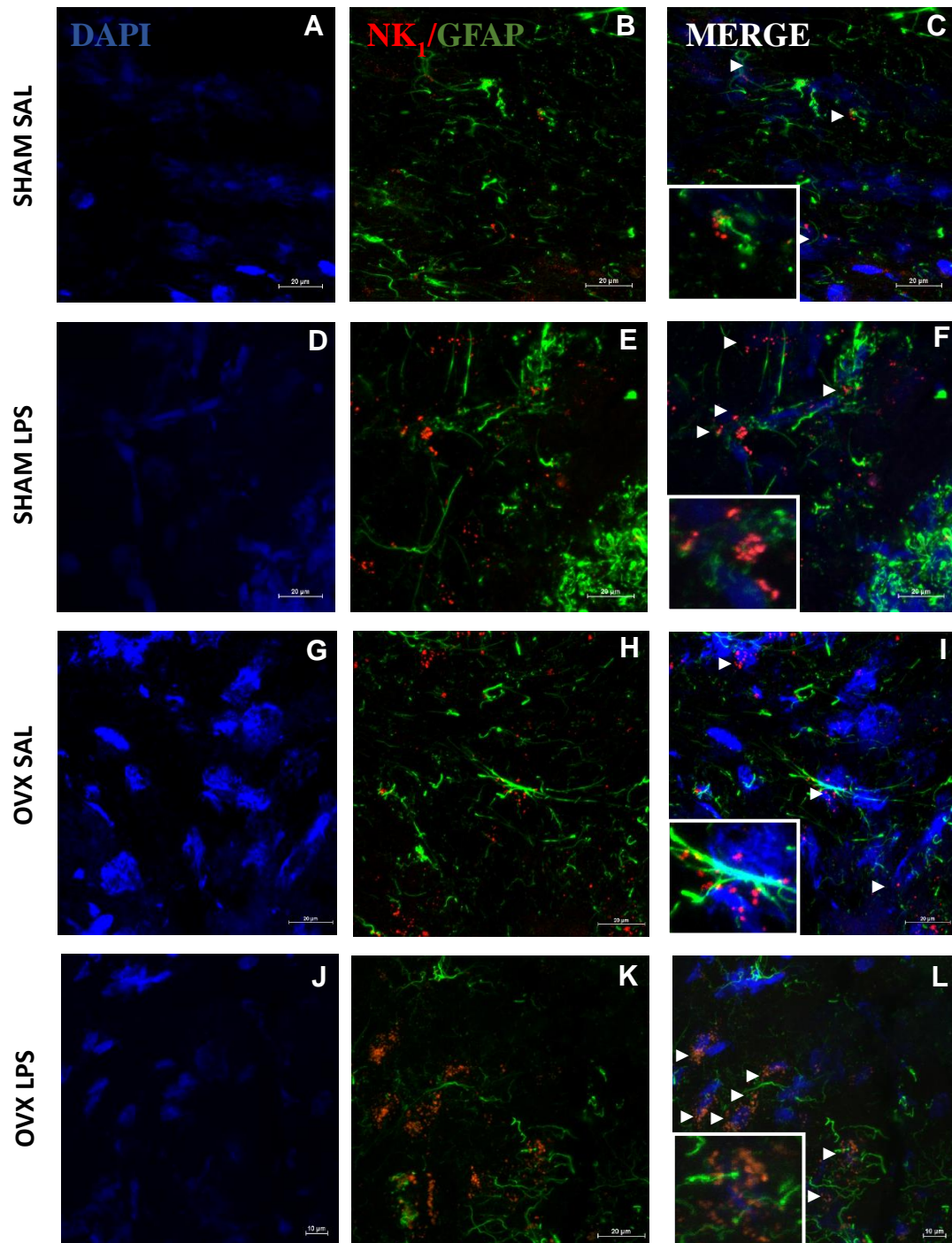


Figura 25- Receptores NK_1 não são expressos em astrócitos hipotalâmicos de ratas tratadas com LPS. Os cérebros de fêmeas falso-operadas (Sham) ou OVX foram removidos, processados para imunofluorescência e as imagens visualizadas por microscopia confocal. As imagens representativas da secção de cérebros de animais Sham e OVX tratadas com LPS ($50\mu\text{g}/\text{kg}$) ou salina (aumento 100x). Os painéis A,D,G e I mostram imunoreatividade para núcleo (DAPI, azul), B,E,H e K para receptor NK_1 (vermelho) e astrócitos (GFAP,verde), C,F,I e L a sobreposição das imagens (merge), com áreas indicadas pela setas do marcador sem co-localização. Os respectivos tratamentos encontram-se representados na vertical. As inserções nos cantos inferiores dos painéis de sobreposição mostram a falta de co-localização em detalhe.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que a resposta febril induzida pelo LPS em ratas falso-operadas é reduzida quando comparada àquela induzida em machos e que a ovariectomia reverte este fenômeno. O tratamento subcrônico com estradiol, por sua vez, reverte os efeitos da ovariectomia sobre a febre em fêmeas. A resposta febril em ratas é dependente da síntese de prostaglandinas, sejam elas falso-operadas ou OVX. No entanto, a administração de LPS aumentou a expressão de COX-2 e de receptores EP₃ no hipotálamo e os níveis de PGE₂ no fluido cerebrospinal em ratas OVX a níveis significativamente superiores do que aqueles observados em ratas falso-operadas. A ovariectomia também aumentou a febre induzida pela PGE₂, reduziu a febre induzida por TNF- α , CCL3/MIP-1 α , CRF, ET-1 e SP, mas não modificou a resposta febril induzida por IL-1 β e morfina. A administração de LPS em animais OVX aumentou a expressão de receptores NK₁ e ET_B, reduziu a expressão de receptores RANK em neurônios hipotalâmicos e não modificou a expressão de CRF/II e μ em relação aos animais falso-operados.

5.1 Influência dos hormônios sexuais na resposta febril induzida pelo LPS

Inicialmente, avaliou-se se a ovariectomia poderia alterar o ritmo circadiano da temperatura corporal de ratas. Não foram encontradas diferenças significativas na temperatura corporal de ratas falso-operadas e OVX. Ambos os grupos tiveram temperaturas mais baixas na fase clara e temperaturas mais elevadas na fase escura. No entanto, a temperatura basal média dos animais OVX, mesmo estando dentro dos níveis considerados normais (entre 37,0 e 37,4°C), foram significativamente mais altas do que a temperatura basal de animais falso-operados, confirmando observações anteriores (Ashdown et al., 2007).

A administração de LPS em ratos induziu uma resposta febril semelhante à observada em estudos anteriores (Fabrício et al., 1998; Fraga et al., 2008; Zampronio et al., 1994) que iniciou entre 1-2 h após a administração e rapidamente atingiu a resposta máxima. Contudo, a administração da mesma dose de LPS em ratas falso-operadas induziu uma resposta febril significativamente atenuada. Estas diferenças significativas entre machos e fêmeas falso-operadas foram observadas

principalmente no início da resposta e, em uma fase posterior (entre 3,5 e 4,5 h) após a administração de LPS. A resposta febril em ratas OVX também começou um pouco mais tarde (2,5 h) do que em machos. Na fase tardia da febre (3,5 e 4,5 h), diferenças significativas entre fêmeas falso-operadas e OVX foram observadas. Estes resultados corroboram estudos anteriores mostrando que a resposta febril em fêmeas induzida por LPS é menor que em machos (Ashdown et al, 2007; Murakami e Ono, 1987) mesmo desconsiderando-se em que fase do ciclo estral estas ratas se encontram. Adicionalmente, ainda sugerem que esta diferença na resposta febril está relacionada aos hormônios femininos uma vez que a ovariectomia restaurou a resposta febril em ratas para níveis semelhantes aos observados em machos.

Um estudo recente não observou diferenças na resposta febril induzida pelo LPS administrado perifericamente em ratas falso-operadas e OVX (Iwasa et al., 2014). A ausência de uma diferença neste estudo pode ser decorrente da dose elevada de LPS (500 µg/kg) utilizada. No entanto, apontando para a mesma direção do presente estudo e dos estudos anteriores, Iwasa et al. observaram que administração i.c.v. de LPS induziu uma resposta febril menos intensa em ratas falsa-operadas quando comparadas com animais OVX. É possível, portanto, que a alta dose de LPS utilizada perifericamente tenha produzido respostas supra-máximas em ambos os grupos dificultando a observação de diferenças nestas respostas.

Em termos gerais, podemos sugerir que as áreas centrais relacionadas com a febre em fêmeas sejam mais responsivas ao LPS após a ovariectomia. Diferenças morfológicas no hipotálamo nestas condições já foram relatadas. Sheehan & Kovacs (1966) já descreveram diferenças profundas na morfologia neuronal hipotalâmica, onde relataram um aumento no tamanho de neurônios na pós-menopausa quando comparados com mulheres na pré-menopausa, associando essas mudanças à perda da secreção de estrogênio ovariano.

Para fundamentar ainda mais a influência dos hormônios femininos na resposta febril, ratas OVX foram tratadas subcronicamente com estradiol, um esquema de tratamento utilizado nos estudos de menopausa em animais de experimentação. Este tratamento reduziu a resposta febril induzida por LPS em ratas OVX sugerindo que este hormônio pode ser, pelo menos em parte, responsável pela resposta febril reduzida observada em fêmeas falso-operadas. Vegeto et al. (2008) já relataram as ações anti-inflamatórias de estrogênios, que parecem agir

promovendo a localização persistente da subunidade p65 no citoplasma das células gliais e, por conseguinte, reduzindo a disponibilidade nuclear de NF- κ B (Vegeto et al., 2008).

Mouihate e Pittman (2003) observaram que o tratamento agudo de ratas OVX com estrogênio e progesterona, mas não só com estrogênio, também reduziu a resposta febril induzida por LPS. Além disso, Iwasa et al. (2014) mostraram que o tratamento agudo com estrogênio e progesterona não alterou a expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no hipotálamo. Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento subcrônico, mas não a administração aguda, de estrogênio pode reverter as alterações da resposta febril observadas após a ovariectomia. De fato, em um estudo clínico realizado, onde foram administradas baixas doses de LPS (2-3 ng/kg) por via intravenosa em mulheres na pós-menopausa com ou sem a reposição hormonal com estrogênio, foi verificado que o estrogênio reduziu a liberação de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α) e de respostas de ativação ao eixo HPA, como o aumento de ACTH e o cortisol (Puder et al., 2001).

No que diz respeito à progesterona, suas ações antiinflamatórias ocorreriam não somente via receptores de progesterona, mas também, como agonista de receptores de glucocorticóides. A ligação da progesterona a esses receptores, reduziria a expressão de receptores TLR-3 e TLR-4, diminuindo a produção de IL-6. Já a redução de IL-12, ocorreria via ligação da progesterona com ambos os receptores, para glicocorticóides e para progesterona (Jones et al., 2010; Jones et al., 2008).

Como esperado, a ovariectomia reduziu significativamente os níveis plasmáticos de estradiol quando comparados aos animais com ovários preservados. Embora, tenha-se evidenciado que a resposta febril não influencia os níveis hormonais de estradiol em nenhum dos grupos, diversos estudos sugerem um *cross-talk* entre receptores TLR-4 e receptores para estrogênio. Calippe et al. (2010) verificaram, utilizando a estratégia genética de CreLoxP no qual deletaram o receptor ER $_{2\alpha}$ da membrana de macrófagos peritoneais, uma ausência de mediadores inflamatórios quando os animais eram estimulados com tioglicolato. Experimentos *in vitro* sugerem que o estradiol exerce suas ações anti-inflamatórias, via TLR4, em linhagens de monócitos e macrófagos, uma vez estimuladas por LPS (Vegeto et al., 2004).

Por outro lado, os níveis de testosterona não foram afetados pela ovariectomia, mas a administração de LPS aumentou significativamente os níveis desses hormônios em ambos os animais falso-operados e OVX. Alguns estudos têm demonstrado o efeito da testosterona em mediar respostas nociceptivas, uma vez que dores crônicas apresentam maior prevalência em mulheres que em homens (Greenspan et al., 2007). Sorge et al. (2011) verificaram que em modelos de dor inflamatória e neuropática o comportamento nociceptivo em machos é dependente da ativação de receptores do tipo TLR4 enquanto que em fêmeas isso não ocorre. E essa diferença é atribuída à testosterona, como foi verificado através de gonadectomia e reposição hormonal.

Em machos, a resposta febril pode ser bifásica com uma fase de indução (primeira hora) e uma resposta sustentada mais tardia (Romanovsky et al., 1997). As citocinas parecem exercer um papel importante nesta fase mais tardia (Roth e de Souza, 2001). A IL-1 β e o TNF- α estão entre as citocinas pirogênicas mais estudadas (Dinarello, 1984; Kluger, 1991; Roth e de Souza, 2001). Mouihate et al. (1998) mostraram diferenças na resposta febril induzida por IL-1 β administrada por via intraperitoneal entre ratos machos e fêmeas. No presente estudo, a injeção i.c.v. de IL-1 β induziu uma resposta febril semelhante em ratas falso-operadas e OVX. Estes dados sugerem que a resposta febril induzida por IL-1 β não é modulada por hormônios gonadais. No entanto, foram relatados níveis hipotalâmicos elevados desta citocina após à injeção de LPS, i.c.v. ou i.p., em animais OVX e animais falso-operados (Iwasa et al., 2014).

Em contraste, a ovariectomia aboliu a resposta febril induzida pelo TNF- α sugerindo que a resposta ao TNF- α é afetada pelos hormônios sexuais femininos. A contribuição exata de cada receptor de TNF- α para a resposta febril induzida por LPS é ainda pouco clara. Nadeau & Rivest mostrou a presença de ambos os receptores no cérebro de ratos e que a expressão destes receptores, especialmente TNFR1, é aumentada após o desafio com LPS (Nadeau e Rivest, 1999). Os níveis de RNAm para receptores TNFR2 em neurônios hipotalâmicos após o tratamento com LPS e IFN- γ se mostraram elevados (Caruso et al., 2010). No entanto, os animais nocaute para TNFR1 desenvolveram uma resposta febril semelhante a animais de tipo selvagem após septicemia, sugerindo que este receptor não é importante para a resposta febril nesta condição (Leon et al., 1998). Deve notar-se que, particularmente em sepse a resposta febril depende de uma liberação maciça de

vários mediadores (Figueiredo et al., 2012) que podem compensar a falta de sinalização de TNF- α . Alternativamente, Roby et al. mostraram que a ovariectomia reduziu o RNAm para TNF-RI em células epiteliais e do miométrio (Roby et al., 1996). Embora não tenhamos avaliado, é possível, portanto, que a ovariectomia tenha afetado também os níveis deste receptor no sistema nervoso central e particularmente no hipotálamo. No entanto, mesmo que os níveis de receptores para TNF- α não tenham sido modificados, esta citocina não induz diretamente a resposta, mas atua através da liberação de mediadores centrais, os quais poderiam estar alterados após a ovariectomia como discutiremos mais adiante.

Citocinas como a IL-1 β e o TNF- α induzem uma resposta febril dependente da síntese e liberação de prostaglandinas (Dinarello et al, 1988; Morimoto et al, 1988), enquanto que a CCL3 induz febre independente da síntese destes prostanoídeos (Miñano et al., 1996; Soares et al, 2008). No presente estudo mostramos que a ovariectomia também suprime a febre induzida por esta quimiocina de forma semelhante ao observado para o TNF- α . Foi verificado um aumento dos níveis de citocinas e de quimiocinas durante modelos de neuroinflamação em animais OVX e que o tratamento com estradiol reduz esses níveis (Mouihate e Pittman, 2003; Yrmiya et al, 1998; Matejuk et al, 2001). Também tem sido relatado que o estradiol reduz a liberação de CXCL8 e TNF- α produzidos a partir de monócitos estimulados por LPS (Pioli et al., 2007). De maneira similar ao TNF- α , a CCL3 induz febre, embora independente da síntese de prostaglandinas, dependente de outros mediadores centrais que discutiremos mais adiante.

O hipotálamo possui uma função central na resposta febril, assim como no sistema reprodutor, através do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas (HPG) atuando através da regulação de diversos hormônios como o estradiol, progesterona e testosterona. Diversos estudos demonstram que injeções de LPS, IL-1 e TNF- α tanto i.v. quanto i.c.v suprimem a secreção pulsátil de LH (Yoo, Nishihara & Takahashi, 1997). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a febre reduzida do TNF- α e MIP-1 α em animais OVX pode estar relacionada com uma redução da expressão de receptores no cérebro que pode estar sofrendo influência de diversos hormônios do eixo como LH, mas que não parece não afetar o sistema de IL-1 β .

5.2 Efeito do tratamento com OPG na resposta febril induzida pelo LPS

Um estudo conduzido por Hanada et al. (2009) demonstrou que o RANKL participa da resposta febril induzida pelo LPS em ratos machos bem como do controle da fisiológico da temperatura em camundongos fêmeas. Hanada et al. (2009) demonstraram que a administração i.c.v., mas não a administração intraperitoneal, de RANKL resulta em um aumento de temperatura dos animais. Esses experimentos foram todos conduzidos com camundongos machos gerados com deleção específica para RANK no sistema nervoso central. Verificaram também que RANKL é um mediador importante para febre induzida pelo LPS, IL-1 β e TNF- α e que recruta prostaglandinas para exercer seu efeito pirogênico. Em fêmeas, não foi realizado nenhum tratamento farmacológico, somente verificaram que as temperaturas basais eram altas e que ao realizar a OVX, esse aumento era revertido sugerindo que os hormônios sexuais femininos afetam esta resposta.

No entanto estes autores não avaliaram a participação do sistema RANKL/RANK na resposta febril induzida por LPS em ratas. Observamos no presente estudo que o aumento da temperatura corporal induzido pelo LPS não foi abolido pelo tratamento i.c.v. com antagonista para RANK (OPG) em ratas falso-operadas. Porém, o tratamento de animais OVX com OPG reverteu a febre induzida por LPS. É importante enfatizar que embora tenhamos utilizado somente uma dose de OPG, esta foi capaz de reverter a febre nos animais OVX que foi muito mais intensa do que em ratas falso-operadas. No entanto, embora a expressão de receptores RANK no cérebro de animais falso-operados e OVX tratados com LPS tenha sido mais alta quando comparada aos animais tratados com salina, esta expressão no hipotálamo de animais OVX mostrou-se menor do que a observada em animais falso-operado tratados com LPS. Assim, é possível que a maior disponibilidade de receptores em ratas falso-operadas tenha impedido a visualização do efeito do antagonista OPG, o que não ocorreria em animais OVX. Deste modo, em ratas falso-operadas, uma dose maior de antagonista seria necessária para bloquear significativamente um número maior de receptores.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários para compreender em detalhes a participação deste sistema em fêmeas, os dados apresentados em conjunto nos permitem sugerir que o sistema RANK/RANKL é influenciado pelos

hormônios femininos passando a ocupar uma posição importante na indução da febre somente quando estes hormônios são reduzidos como na menopausa.

5.3 Envolvimento das prostaglandinas na resposta febril induzida pelo LPS

A redução da resposta febril em animais falso-operados e OVX por indometacina sugere que prostaglandinas estão envolvidas nesta resposta em fêmeas sejam elas ovariectomizadas ou não. Neste estudo também observamos um aumento na expressão hipotalâmica de COX-2 bem como uma maior quantidade de prostaglandinas no fluido cerebrospinal de ratas OVX quando comparadas à ratas falso-operadas. Assim, a produção central de prostaglandinas durante a resposta febril é importantemente influenciada pelos hormônios ovarianos e esta produção aumentada de prostaglandinas é, pelo menos em parte, responsável pela resposta febril mais intensa ao LPS observada após a ovariectomia.

O aumento da produção de prostaglandinas era esperado, uma vez que Ashdown et al. demonstraram que a expressão de COX-2 é aumentada em machos e fêmeas, após a injeção de LPS (Ashdown et al., 2007), dado confirmado em nosso estudo. Ainda, foi demonstrado que no hipotálamo níveis de RNAm de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em ratas OVX foram mais elevados do que em animais falso-operados após a administração de LPS (Iwasa et al., 2014). É amplamente conhecido que estas citocinas podem aumentar os níveis de COX-2 no hipotálamo e que este aumento está relacionado com a febre (Cao et al., 1996, Cao et al., 1998; Cao et al., 2001). Além disso, os níveis de COX-2 no hipotálamo podem mudar de acordo com as fases de gestação (Mouihate et al., 2002).

Sabe-se que as prostaglandinas são os mediadores que exercem função central na resposta febril e são a base da terapia antipirética. Animais com ausência para o receptor EP₃ de PGE₂ não desenvolveram uma resposta febril após a administração de LPS, PGE₂ ou IL-1 β (Ushikubi et al., 1998; Oka et al., 2003). Em fêmeas, ainda há uma escassez de estudos, até mesmo sobre a distribuição desses e de outros receptores investigados no presente estudo. Rage et al. (1997) observaram que linhagens de astrócitos tratados com estradiol produzem substâncias que aumentam a expressão do RNAm de receptores EP₁ e EP₃. Já Wang et al. (2014) observaram um aumento dos níveis de PGE₂ e a expressão de

receptores EP₃ na substância cinzenta periaquedutal de animais OVX. Esses receptores também podem ser encontrados no útero de ratas OVX e o aumento da sua expressão pode ser regulado pelo estradiol e progesterona (Blesson et al., 2012).

Pittman et al. (1998) administraram PGE₂ i.c.v. no cérebro de ratos fêmeas e machos e observaram que a febre das fêmeas foi maior que em machos. No entanto, estes autores não descrevem em que fase do ciclo estral estas fêmeas se encontraram quando da injeção de PGE₂. No presente estudo, quando foi injetada PGE₂ em ratas OVX, a resposta febril foi significativamente maior quando comparada a animais falso-operados. Como mencionado anteriormente, a PGE₂ atua em receptores EP₃ para induzir febre (Matsumura et al., 1998; Ushikubi et al., 1998; Engblom et al., 2001). Assim é possível que a expressão de receptores EP₃ no hipotálamo varie de acordo com as variações hormonais em fêmeas, mas a maior resposta em animais OVX sugere que este número seja maior neste grupo. De fato, a expressão destes receptores em fêmeas falso-operadas e OVX mostrou-se aumentada em ambos os grupos tratados com LPS, mas a expressão de receptores EP₃ no grupo OVX foi significativamente maior do que aquela observada em animais falso-operados.

Estes dados em conjunto sugerem que os hormônios femininos modulam negativamente a expressão de COX-2 e de receptores EP₃ e que a ovariectomia aumenta a expressão de ambos, o que pode contribuir, pelo menos em parte, para a resposta febril aumentada neste grupo após a administração de LPS. Mais estudos são necessários para saber se estes parâmetros também variam durante cada fase do ciclo estral das ratas.

Deste modo, os hormônios podem controlar a produção e a capacidade de resposta à citocinas e à via COX-2/PGE₂/EP₃ no cérebro. A capacidade de resposta reduzida à algumas citocinas pode ser compensada pela produção aumentada de prostaglandinas no cérebro, que pode por sua vez pode ser, pelo menos em parte, relacionada com a resposta febril aumentada em ratas OVX em resposta ao LPS.

5.4 Resposta febril induzida por CRF, ET-1, morfina e Substância P e expressão de receptores CRF_{I/II}, ET_B, μ -opióide e NK₁ no hipotálamo de ratas induzida pelo LPS

Dentre os mediadores envolvidos nas vias centrais de regulação da resposta febril em machos, além das prostaglandinas discutidas anteriormente, estão CRF, ET-1, opióides endógenos e substância P (para revisão ver Zamprônio et al., 2015). Nosso próximo passo foi analisar se, além do sistema COX-2/PGE₂/EP₃, outros mediadores induzem febre em fêmeas e se esta resposta seria também afetada pelos hormônios sexuais.

Iniciamos com o CRF e verificamos que este induziu uma resposta febril similar em fêmeas ao observado em machos concomitantemente com um aumento na expressão de receptores CRF_{I/II}. A ovariectomia aboliu a resposta febril sem alterar aumento na expressão dos receptores. Estes dados sugerem que o CRF, assim como em machos, pode ser um importante mediador central da febre em fêmeas. A resposta febril induzida pelo CRF em machos ocorre via receptores CRF I, pois o uso do antagonista seletivo para este receptor, antalarmina, reduziu a febre induzida por esse mediador (Figueiredo et al., 2010). Ainda, o CRF parece participar da resposta febril induzida por IL-1 β , mas após a sua liberação não ocorre a síntese de prostaglandinas (Nakamori et al., 1993; Figueiredo et al., 2010). Em fêmeas, observamos que a ausência dos hormônios sexuais reduz a responsividade ao CRF. Considerando que a resposta febril à IL-1 β depende de ambos prostaglandinas e CRF, mas não foi modificada após a ovariectomia e que, enquanto a produção e ação de prostaglandinas é aumentada neste estado a responsividade ao CRF é diminuída, podemos sugerir que a resposta febril induzida por IL-1 β em ratas OVX possivelmente é mais dependente de prostaglandinas do que em machos ou em fêmeas com ciclo hormonal normal.

Os anticorpos utilizados no presente estudo reconhecem ambos os receptores, CRF_I e CRF_{II}. Portanto, não sabemos se há alguma diferença de expressão entre eles. Em machos, o CRF se liga com maior afinidade à receptores CRF_I que se encontram distribuídos no cérebro como um todo, mas também possui uma afinidade relativa para receptores CRF II encontrados mais especificamente, no núcleo dorsal da rafe, septo lateral e hipotálamo (Bale et al., 2004; Van Pett et al., 2000). Lacroix & Rivest (1996) conduziram um estudo em machos no qual

investigaram os receptores para CRF no cérebro de ratos induzindo uma resposta febril com LPS em doses baixas, moderadas e altas. Estes autores verificaram que o RNAm dos receptores CRFI mas não o do CRFII, é mais especificamente regulado no hipotálamo pois a expressão do mesmo aumentou após a administração de LPS nas doses moderadas e altas. Entretanto, parece que a influência das prostaglandinas no aumento da expressão de CRFI depende da intensidade do estímulo, não sendo um mecanismo essencial para este aumento, o que está de acordo com os dados da literatura de febre (Figueiredo et al., 2010).

Estudos anteriores relatam a participação da ET-1 em processos febris, como febre induzida por bactérias gram-negativas e sepse atuando em receptores ET_B (Fabricio et al., 2005; Wanecek et al., 2000). Em machos, este peptídeo possui um papel central na resposta febril induzida pelo LPS e embora o uso de inibidores da COX não reduza a febre induzida por ET-1, os níveis de prostaglandinas se apresentam elevados (Fabricio et al., 1998; Malvar et al., 2011) sugerindo que as prostaglandinas não participam da febre induzida por ET-1. Outro aspecto que também vale a pena mencionar é a quantidade de ET-1 liberada durante a resposta febril em machos. Fabricio et al. (2005) verificaram uma quantidade muito reduzida desse peptídeo tanto plasmático quanto no fluido cerebrospinal no pico da resposta febril induzida por LPS. Esse efeito aparentemente é dependente da dose pois doses maiores de LPS para indução de endotoxemia induziram grandes quantidades deste desse peptídeo no sistema nervoso central (Filep, 2000).

Em machos, o RNAm para receptores ET_B é encontrado na área POA do hipotálamo (Sokolovsky et al., 1992; Yamamoto et al., 1997). Já em fêmeas, diferenças sexuais no sistema de sinalização das endotelinas tem sido descrito em diversos órgãos como rim, vaso, pulmão e fígado (Gabler et al., 2012; Ho et al., 2015; Jin et al., 2013; Stauffer et al., 2010). Gohar et al. (2016) avaliaram a modulação dos hormônios ovarianos na expressão de receptores ET_B em diversos órgãos e verificaram uma variação bastante grande de resultados. No fígado, os animais OVX tratados com estradiol e progesterona tiveram um aumento no RNAm desses receptores. Na medula renal foi observado um aumento de sua expressão em animais OVX, aumento este que foi revertido pelo tratamento com estrogênio e progesterona. Por outro lado, no cortex renal a expressão foi reduzida nos animais OVX e aumentou quando se administrou estrogênio e progesterona. No cérebro, predomina uma escassez de estudos. Receptores ET_B foram encontrados

imunoreativos nos órgãos subfornical e no OVLT e estão associados com fibras imunoreativas à hormônio luteinizante, em fêmeas (Yamamoto et al., 1997).

Com relação à ET-1 verificamos que a injeção deste mediador em animais falso-operados promoveu um aumento de temperatura corporal de maneira controlada que foi abolido pela ovariectomia. Nossos resultados de imunofluorescência focaram somente em receptores ET_B pois foi verificado em estudos prévios, como comentado anteriormente, que a resposta febril induzida pelo LPS e pelo CRF pode ser revertida com o uso de antagonistas ET_B (Fabricio et al., 2006; Fabricio et al., 2005.) Observamos um aumento na expressão de ET_B em animais OVX tratados com LPS quando comparado com todos os demais grupos. Embora tenha sido verificado um discreto aumento da expressão destes receptores em animais falso-operados estimulados com LPS, não houve diferença estatística em relação ao seu respectivo grupo salina. Devido à essa falta de co-localização com astrócitos, a quantificação de receptores pode sido prejudicada devido a um comprometimento na visualização da marcação. A co-localização permitiria uma melhora na detecção da intensidade da fluorescência.

Portanto, de maneira similar ao CRF, estes dados sugerem que a ET-1 pode ser um mediador envolvido na resposta febril em fêmeas intactas, mas não em fêmeas OVX e que esta ausência de efeito não está relacionada à uma redução na expressão de receptores ET_B. É interessante observar que a resposta febril induzida pelo CRF pode ser mediada por ET-1 (Fabricio et al., 2006). Portanto, embora a ovariectomia não afete a expressão dos receptores destes mediadores, CRFI/II e ET_B, esta via parece ser altamente sensível aos hormônios ovarianos e, portanto, está ausente em animais OVX. No presente estudo não foi investigado a presença de receptores ET_B em neurônios. Isso ocorre devido às características do anticorpo para o receptor ET_B, pois estudos anteriores descrevem em seu protocolo que não utilizam o fixador paraformaldeído utilizado em todas as reações de dupla marcação para neurônios. Isso acontece devido à capacidade do paraformaldeído de alterar a conformação de diversos grupamentos de reconhecimento do anticorpo, e como consequência, a imunomarcação fica impossibilitada de ser visualizada.

Em machos, a relação entre opióides endógenos, receptores μ e resposta febril tem sido bastante estudada. Nosso grupo de pesquisa, verificou que a administração de morfina intra-hipotalâmica aumentou a temperatura corporal concomitantemente com uma vasoconstrição periférica, indicando que há ativação

de mecanismos de conservação de calor (Fraga et al., 2008). Os opióides participam das respostas febris induzidas não só pelo LPS, mas por diversos mediadores como TNF- α , IL-6, CCL3, PGF_{2 α} , CRF e ET-1 (Handler et al., 1998; Blatteis et al., 1991; Benamar et al., 2000; Fraga et al., 2008). Entretanto, os opióides endógenos não participam da resposta febril induzida por IL-1 β e PGE₂ e as prostaglandinas não fazem parte dessa resposta pois o uso de inibidor da COX não altera a febre induzida por morfina (Fraga et al., 2008).

Ao contrário do que foi verificado com o CRF e a ET-1, a administração de morfina em animais falso-operados e OVX promoveu uma resposta febril semelhante. Corroborando esses achados, a expressão de receptores μ -opioidérgicos no hipotálamo, embora tenha aumentado em animais tratados com LPS, não foi diferente em ratas falso-operadas e OVX. Deste modo, opióides endógenos podem estar envolvidos na indução de febre em fêmeas mas contrastando com prostaglandinas, CRF e ET-1, os hormônios sexuais não exercem nenhuma modulação nos receptores μ -opioidérgicos ou na resposta febril induzida por morfina.

Alguns estudos sugerem que a expressão de receptores μ -opióide possa ser influenciada pelos hormônios. Eckersell et al. (1998) verificaram que o tratamento com estradiol pode liberar opióides endógenos que ativam esses receptores no hipotálamo promovendo sua internalização. Nossos dados não nos permitem diferenciar se, após a ovariectomia estes receptores apresentam-se ou não internalizados. Já o estradiol e a progesterona podem modular a liberação de hormônio luteinizante através de opióides endógenos em neurônios do núcleo arqueado e na área POA hipotálamo (Pertesen & LaFlamme, 1997). Casulari et al., (1987) demonstraram que a expressão de receptores μ -opióide no cérebro também varia de acordo com a fase do ciclo estral em que a rata se encontra. Houve um aumento na expressão destes receptores especificamente nas fases de proestro e de estro, onde concomitantemente, os níveis de todos os hormônios dosados estavam baixos (hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante e prolactina) e hormônio folículo-estimulante se encontrou levemente aumentado, respectivamente (Casulari et al., 1987). Porém, há carência em estudos que determinem a expressão desses receptores durante a resposta febril.

Assim, a ausência de efeitos observáveis na resposta febril induzida por morfina bem como na expressão de receptores μ após a administração de LPS em

ratas intactas e OVX sugerem que a modulação dos hormônios sexuais ocorre acima deste nível. Como tanto a febre induzida por CCL3 como àquela induzida por CRF e ET-1 dependem de opióides endógenos (Fraga et al, 1998) é possível que a ausência dos hormônios gonadais esteja afetando particularmente estas vias anteriormente a liberação dos opióides. A via de indução de febre por IL-1 β é dependente de prostaglandinas e CRF e seria menos afetada devido a alta produção de PGE₂ após a ovariectomia. Estes dados, no entanto, não nos permitem explicar a ausência de febre após a administração de TNF- α uma vez que a febre induzida por esta citocina envolve a liberação de opióides endógenos e prostaglandinas, vias que não são alteradas ou são moduladas positivamente, respectivamente, após a ovariectomia. Mais estudos serão necessários para esclarecer este ponto.

Embora a substância P ainda não esteja incluída coerentemente nas vias de regulação da resposta febril em machos pois alguns mediadores não foram avaliados, a sua participação na resposta febril é crucial e central (Szelenyi et al., 1997, Brito et al., 2016). Nosso grupo verificou em estudos anteriores realizados em ratos, que somente a substância P liberada no sistema nervoso central está envolvida na resposta febril induzida pelo LPS via receptores NK₁. Ainda, verificamos que esta taquicinina estaria envolvida na resposta febril induzida pelo TNF- α e IL-6, mas não daquela induzida por IL-1 β e MIP-1 α (Reis et al., 2011; Brito et al., 2016). Diferenças de gênero na distribuição, localização e regulação da substância P nos tecidos (mama, útero e cérebro) tem sido reportada em diversos estudos (Brown et al., 1990; Rance et al., 1992). O receptor NK₁ é encontrado em em diversas regiões do cérebro como núcleo caudado putamen, hipocampo, hipotálamo e cortex cerebral (para revisão ver Harrison & Geppetti, 2001) e também em células do sistema immune como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos (Ho et al., 1997; Lai et al., 1998).

Verificamos que a administração i.c.v. de substância P em animais falso-operados aumentou a temperatura corporal, febre esta que foi revertida após a ovariectomia. A expressão de receptores NK₁ em animais tratados com LPS aumentou tanto em animais falso-operados quanto em animais OVX, porém, nesse último grupo, a expressão foi bem maior. Corroborando nossos dados em fêmeas estimuladas com LPS, verificamos em estudo anterior realizado em machos que durante a resposta febril induzida pelo LPS a expressão do receptor NK₁ aumenta e

forma aglomerados (*clusters*) quando comparado ao grupo salina (Brito et al., 2016). Neste estudo, propusemos um circuito autócrino entre a produção de substância P e as prostaglandinas (Brito et al., 2016). Assim, a resposta febril induzida por PGE₂ depende da liberação de substância P e estes eicosanóides promovem a aglomeração dos receptores ao redor do núcleo da célula. Por outro lado, a resposta febril induzida por substância P é revertida por inibidores da COX. Este circuito autócrino já havia sido evidenciado em culturas de células endoteliais do cérebro de ratos por Annunziata et al. (2002) e Cioni et al., (1998) após a estimulação com citocinas como o TNF- α . Assim, é possível que ratos OVX não apresentem febre em resposta ao TNF- α porque a resposta desta citocina, embora dependa da produção de prostaglandinas, depende também da produção de substância P e da ativação de receptores NK₁. No caso do TNF- α , a produção de prostaglandinas estaria intimamente relacionada a um circuito autócrino que envolveria a substância P, o que não ocorre com a IL-1 β . Por outro lado, considerando os mediadores que ativam as vias dependentes de prostaglandinas, estes animais apresentam febre em resposta à IL-1 β pois, diferentemente do TNF- α , a resposta febril induzida por esta citocina depende da síntese de prostaglandinas mas não de substância P e de receptores NK₁.

5.5 Co-localização de receptores em neurônios, mas não em astrócitos hipotalâmicos, durante a resposta febril induzida pelo LPS

Ao longo desse estudo, podemos verificar em nossos resultados que nenhum dos receptores (EP₃, CRF_{I/II}, ET_B, μ , NK₁ e RANK) investigados co-localizou com a marcação de astrócitos e sim com o corpo celular de neurônios hipotalâmicos, independente do tratamento. Receptores EP₃ podem ser encontrados na área pré-óptica do hipotálamo anterior em diversos corpos celulares e dendritos de neurônios. De fato, animais com deleção de receptores EP₃ em neurônios dessa região possuem uma redução na resposta febril induzida pelo LPS e PGE₂ (Oka et al., 2000; Lazarus et al., 2007). No que diz respeito aos receptores CRF I/II, NK₁ e ET_B, todos já foram encontrados tanto em neurônios quanto em astrócitos (Too et al., 1994; Behan et al., 1995; Koyama et al., 2013; Filipovich-Rimon & Fleisher-Berkovich, 2010). Há uma vasta literatura sobre a localização de receptores μ opióides que já foram encontrados em astrócitos, neurônios, microglia e células

endoteliais (Rusicka & Azkil, 1997; Hansson et al., 2008). Estudos *in vitro* sugerem que a morfina pode alterar a função de microglia e astrócitos (Narita et al., 2006). Com relação ao RANK, os estudos ainda são escassos e somente um estudo demonstra a expressão de RANK em astrócitos (Hanada et al., 2009).

É de fundamental importância explicar o termo “co-localização” entre tipos celulares e receptores. O núcleo celular, os astrócitos e os receptores estão em planos focais totalmente diferentes, e por isso, ao sobrepor as imagens não é visualizada nenhuma mudança de cor entre os três marcadores. Portanto, no caso das reações com astrócitos, padronizamos as fotos, focando na visualização dos astrócitos em detrimento da visualização do núcleo e do marcador. Isso não foi necessário para a dupla marcação com neurônios pois como foi verificado a co-localização, os três: núcleo, neurônios e marcadores estavam nos mesmos planos focais, podendo ser visualizado todos simultaneamente, sem haver prejuízo de visualização de nenhum dos três. Conseqüentemente, optamos por realizar a quantificação dos receptores por essa marcação e não pela de astrócitos.

Porém, isso não exclui o envolvimento de astrócitos com os outros receptores. Sabe-se que os astrócitos possuem diversas funções no sistema nervoso central, como regulação extracelular de íons e neurotransmissores, sinalização de cálcio e pH, e dessa maneira podem interagir de maneira indireta. Outra maneira seria se comunicando com os neurônios, através de comunicação glia-para-neurônio (Watkins & Maier, 2003).

Já a confirmação de co-localização dos receptores com os neurônios nesse modelo de febre, abrem portas para que estudos adicionais de mecanismos sejam aprofundados como eletrofisiologia, principalmente no grupo especial de neurônios presentes no hipotálamo que podem ser sensíveis à calor, frio e insensíveis à temperatura e de que maneira os hormônios sexuais poderiam alterar características como amplitude e frequência de disparos desses neurônios durante algumas disfunções termoregulatórias, como febre e fogachos.

A continuação desse estudo também é necessária a fim de verificar a participação ou não de outros tipos celulares como por exemplo, células endoteliais e micróglia. As células endoteliais tem sido alvo de diversas pesquisas principalmente por terem sido observadas que animais com deleção da expressão de COX-2 e MPGES-1 nessas células não desenvolvem febre induzida pelo LPS. Mouihate (2014) verificaram recentemente que a micróglia muda de acordo com o

tratamento hormonal que recebem. Uma única injeção de estrogênio em animais OVX não afeta a ativação microglial induzida pelo LPS, mas o tratamento em conjunto com progesterona apresenta processos de prolongamentos. Sorge et al. (2015) sugere que em modelos de dor neuropática e dor inflamatória, a percepção do estímulo doloroso ocorre via linfócitos T (Sistema imune) e machos recrutam mais micróglia, demonstrando uma possível preferência de vias para o processamento da dor regida pelos hormônios sexuais. Não sabemos se esse efeito também poderia ser verificado na febre. Além disso, sua relevância está em investigarmos as diferenças fisiopatológicas entre homens e mulheres, principalmente, entre as fases da vida da mulher :infância, adulta e menopausa para que possamos compreender melhor essas diferenças e desenvolver fármacos específicos para as mais diversas condições em diferentes estágios da vida da mulher e do homem .

6. CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nossos resultados mostram que:

- ▶ Fêmeas OVX apresentaram uma temperatura corporal basal maior que ratas falso-operadas;
- ▶ A resposta febril induzida por LPS em fêmeas é menor do que em machos e a retirada dos ovários elimina esta diferença.
- ▶ A reposição subcrônica de estrogênio em fêmeas OVX reduz a resposta febril a níveis similares àqueles encontrados em fêmeas falso-operadas.
- ▶ A resposta febril tanto em fêmeas intactas como OVX é dependente da síntese de prostaglandinas.
- ▶ A falta dos hormônios sexuais aumenta a expressão de COX-2, os níveis centrais de PGE₂ e a expressão de receptores EP₃ em neurônios hipotalâmicos. Deste modo, a resposta febril induzida por PGE₂ é aumentada em animais OVX. Esta produção e ação aumentada das prostaglandinas contribui, pelo menos em parte, para a resposta febril aumentada em fêmeas OVX em relação às fêmeas intactas em resposta ao LPS.
- ▶ IL-1 β , TNF- α , CCL3, CRF, ET-1, morfina e SP induzem febre em fêmeas falso-operadas. No entanto, enquanto que a resposta febril induzida por IL-1 β e por opióides não é modificada pela retirada dos hormônios gonadais, a febre induzida por TNF- α , CCL3, CRF, ET-1 e SP é reduzida pela retirada destes hormônios.
- ▶ RANKL exerce um papel importante na resposta febril induzida por LPS em fêmeas OVX.

- ▶ A expressão dos receptores RANK, CRF/II, ET_B, μ e NK₁ no hipotálamo de ratas intactas aumenta após a administração de LPS. A administração de LPS em animais OVX não modifica a expressão de receptores CRF e μ -opioidérgicos, mas há um aumento significativo na expressão de receptores ET_B e NK₁ e uma redução significativa de receptore RANK em animais OVX quando comparados às ratas falso-operadas.
- ▶ A expressão dos receptores CRF/II, ET_B, μ -opióide, NK₁ e RANK co-localizaram com a marcação para neurônios, mas não com a marcação para astrócitos.

6.2 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a resposta febril em ratas é menor do que a observada em machos. Esta diferença está relacionada aos hormônios sexuais uma vez que a ovariectomia a elimina enquanto que a reposição subcrônica de estrogênio em ratas OVX a restaura. Ainda, a resposta febril em fêmeas, assim como em machos é dependente de prostaglandinas. Os hormônios sexuais em fêmeas reduzem a atividade do sistema COX-2/PGE₂/EP₃ e portanto, após a ovariectomia (e possivelmente na menopausa) este sistema está mais ativo e contribui para o aumento da resposta febril em fêmeas. Todos os mediadores avaliados que reconhecidamente induzem febre em machos também induziram febre em fêmeas. Os resultados obtidos com os diferentes PE e mediadores centrais sugerem que dentre as vias independentes de prostaglandinas aquelas induzidas por CCL3, CRF e ET-1 não ocorrem quando os hormônios ovarianos são retirados. Ainda, a via dependente de prostaglandinas e de substância P e ativação de receptores NK₁, ou seja, o circuito autócrino entre prostaglandinas e substância P, também não ocorre após a retirada dos hormônios sexuais. Em conclusão, a resposta febril em fêmeas, embora menor do que em machos, parece envolver os mesmos mediadores. No entanto, esta resposta apresenta-se modificada na ausência dos hormônios gonadais (como na menopausa) apresentando-se mais dependente de prostaglandinas do que de outros mediadores centrais.

APÊNDICE

ESTERILIZAÇÃO

Os materiais utilizados nos experimentos foram adquiridos estéreis ou autoclavados a 127°C por 30 minutos ou esterilizados por calor seco a 180° C por 2 h. As soluções e diluições das citocinas e drogas foram preparadas em condições assépticas.

SOLUÇÕES

- Solução de Azul de pontamida
 - azul de pontamida 1 g
 - salina estéril -.....q.s.p. 100 mL

- Solução Tampão Tris – HCl 0,2 N (dissolução da indometacina)
 - Tris (hidroximetil)-aminometano1 g
 - Água deionizadaq.s.p. 1 L

O pH foi acertado para 8,2 com HCl 1N, a solução foi autoclavada e depois armazenada a 4° C.

- Solução salina tamponada (PBS)
 - Cloreto de sódio80 g
 - Cloreto de Potássio.....2 g
 - Fosfato dibásico de sódio dihidratado14,4 g
 - Fosfato de Potássio2 g

O pH foi acertado para 7,4 e a solução foi armazenada a 4° C.

- Solução Tampão fosfato 0.2 M (para Imunofluorescência)

- Solução A200 mL
- Solução B 800 mL

Estocar solução em geladeira.

- Solução A

- fosfato de sódio monobásico27,6 g
- Tampão fosfato 0.2 M..... q.s.p. 1 L

- Solução B

- fosfato de sódio dibásico.....107,25 g
- Tampão fosfato..... 800 mL

Estocar solução em geladeira.

- Solução de Paraformaldeído 4%,pH 7.4

- Paraformaldeído (PFA).....40g
- Água destilada400 mL
- Tampão fosfato 0.2 M..... q.s.p. 1 L

Solução realizada em capela exaustão. Aquecer 400 mL de água destilada a 60-70°C. Acrescentar o PFA, sob agitação e aquecimento constantes. Acrescentar gotas de NaOH a 0,5 M até a solução se tornar translúcida. Deixar homogeneizando por 30 min. Completar com tampão fosfato 0.2 M. Corrigir pH para 7.4.

- Solução albumina bovina sérica (BSA) 1%

- BSA1g
- Água deionizadaq.s.p. 100 mL

- Solução Sacarose 10%

- Sacarose 100g
- Tampão fosfato 0,1 M..... q.s.p. 1L

- Solução Glicina 1%

- Glicina..... 1g

-Água deionizada..... q.s.p. 1L

REAGENTES E DROGAS

- Acrílico auto-polimerizante Policron - Dencril Ltda., BR
- Cetamina – Fort Dodge, BR
- IL-6 – R&D Systems
- Lidocaína 2% inj. com noradrenalina – Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda., BR
- MIP1- α - R&D Systems, EUA
- Solução salina estéril 0,9% - Halex Istar, BR
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®]) – Pfizer, BR
- TNF- α - R&D Systems, EUA
- IL-1 β - R&D Systems, EUA
- Tween 80 – Merck, BR
- Xilasina 2% s/v - Synthec do Brasil, BR
- PGE₂ - Sigma Chemicals & Co, EUA
- Indometacina - Sigma Chemicals & Co, EUA
- LPS - Sigma Chemicals & Co, EUA
- Kit de EIA para dosagem de PGE₂ -Cayman Chemicals & Co, EUA
- Líquido Autopolimerizante Policron, Dencril Ltda, Brasil
- Halotano – Cristália Prod.Quím.Farma.Ltda, Brasil
- Cetoprofeno – Medley, Brasil
- Glicina - Sigma Chemicals & Co, EUA
- Triton-X 100 - Sigma Chemicals & Co, EUA
- Paraformaldeído – Neon Comercial Ltda.

REFERÊNCIAS

ADAIR, E.R. Skin, preoptic, and core temperatures influence behavioral thermoregulation. **J Appl Physiol**, v. 42, p.559-64, 1977.

AID, S.; BOSETTI, F. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. **Brain Research Bulletin**, v.73, p.108-113, 2007.

ALHEIM, K.; CHAI, Z.; FANTUZZI, G.; HASANVAN, H.; MALINOWSKY, D.; DI SANTO, E.; GHEZZI, P.; DINARELLO, C.A.; BARTFAI, T. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 α and IL-1 β , and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1 β -deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v.94, p.2681-6, 1997.

ANDERSON, C.; NEMEROFF, C.B. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. **Journal of Neuroscience**, v.6, p.2908-22914, 1986.

ANNUNZIATA, P.; CIONI, C.; SANTONINI, R.; PACCAGNINI, E. Substance P antagonist blocks leakage and reduces activation of cytokine-stimulated rat brain endothelium. **J Neuroimmunol**, v. 131, p.41-9, 2002.

AOMATSU, M.; KATO, T.; KASAHARA, E.; KITAGAWA, S. Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . **Biochemical and biophysical research communications**, v. 441, p.220-225, 2013.

ARONOFF, D.M. & NEILSON, E.G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **The American Journal of Medicine**, v. 111, p.304-315, 2001.

ASHDOWN, H.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G.N. Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.292, p.R1667-1674, 2007.

BALE, T.L.; VALE, W.W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p.525-57, 2004.

BANKS, W. A., ORTIZ, L.; PLOTKIN, S.R.; KASTIN, A.J. Human interleukin (IL)-1 α , murine IL-1 β are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, p.988-996, 1991.

BANKS, W. A.; KASTIN, A.J.; GUTIERREZ, E.G. penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. **Neuroscience Letters**, v. 179, n.1-2, p. 53-56, 1994.

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 86, p.485-98, 2008.

BASTOS-PEREIRA, A.L.; LEITE, M.C.; FRAGA, D.; ZAMPRONIO, A.R. Central mediators involved in the febrile response induced by polyinosinic-polycytidylic acid: lack of involvement of endothelins and substance P. **J Neuroimmunol**, v.278, p.100-7, 2015.

BEHAN, D.P.; MACIEJEWSKI, D.; CHALMERS, D.; DE SOUZA, E.B. Corticotropin releasing factor binding protein (CRF-BP) is expressed in neuronal and astrocytic cells. **Brain Research**, v.698, p.259-64, 1995.

BENAMAR, K.; YONDORF, M.; BARRETO, V.T.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Deletion of μ -opioid receptor in mice alters the development of acute neuroinflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, p.990-994, 2007.

BENAMAR, K.; XIN, L.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a mu-opioid receptor-selective antagonist in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 401, p.161-5, 2000.

BENAMAR, K.; GELLER, E.B.; CHUNG, Y.G.; PINTAR, J.E.; ADLER, M.W. Unresponsiveness of mu-opioid receptor knockout mice to lipopolysaccharide-induced fever. **Br J Pharmacol**, v. 144, p.1029-31, 2005.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.840, p.608-618, 1998.

BLATTEIS, C. M.; XIN, L.; QUAN, N., 1994. Neuromodulation of fever: a possible role for substance P. **Annals of New York Academy**, v.741, p.162-173, 1994.

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

BLATTEIS, C.M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Progress in Brain Research**, v.91, p.409-412, 1992.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.S168-S177, 2000.

BLATTEIS, C.M.; XIN, L.; QUAN, N. Neuromodulation of fever: apparent involvement of opioids. **Brain Res Bull**, v.26, p.219-23, 1991.

BLESSON, C.S.; BUTTNER, E.; MASIRONI, C.; SAHLIN, L. Prostaglandin receptors EP and FP are regulated by estradiol and progesterone in the uterus of ovariectomized rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p.1-10, 2012.

BOCZEK-LESZCZYK, E.; STEMPNIAK, B.; JUSZCZAK, M. Vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophysial system: effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), its analogues and melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, p.459-466, 2010.

BOGDAHN, U.; FLEISCHER, B.; HILFENHAUS, J.; ROTHIG, H.J.; KRAUSENECK, P.; MERTENS, H.G.; PRZUNTEK, H. Interferon-beta in patients with low-grade astrocytomas-a phase I study. **J Neurooncol**, v.3, p.125-130, 1985.

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.856, p.108-115, 1998.

BOUMAN, A.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. **Hum Reprod Update**, v. 11, p.411-23, 2005.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v.214, p.149-60, 2008.

BRITO, H.O.; BARBOSA, F.L.; REIS, R.C.; FRAGA, D.; BORGES, B.S.; FRANCO, C.R.; ZAMPRONIO, A.R. Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- α , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. **J Neuroimmunol**, v.15, p.1-7, 2016.

BROUGHAN, T.A.; SOLOWAY, R.D. Acetaminophen hepatotoxicity. **Dig Dis Sci**, v. 45, p.1553-58, 2000.

BROWN, E.R.; HARLAN, R.E.; KRAUSE, J.E. Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. **Endocrinology**, v.126, p.330-340, 1990.

BROWN, E.R.; HARLAN, R.E.; KRAUSE, J.E.; BRUCE-KELLER, A.J.; KEELING, J.L.; KELLER, J.N.; HUANG, F.F.; CAMONDOLA, S.; MATTSO, M.P. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. **Endocrinology**, v.141, p.3646-3656, 2000.

BROWN, E.R.; HARLAN, R.E.; KRAUSE, J.E. Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. **Endocrinology**, v. 126, p.330-40, 1990.

BUÇAY, N.; SAROSI, I.; DUNSTAN, C.R.; MORONY, S.; TARPLEY, J.; CAPPARELLI, C.; SCULLY, S.; TAN, H.L.; XU, W.; LACEY, D.L.; BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.**, v.12, 1260-68, 1998.

CAGNACCI, A.; MELIS, G.B.; SOLDANI, R.; PAOLETTI, A.M.; FIORETTI, P. Effect of sex steroids on body temperature in postmenopausal women: role of endogenous opioids. **Life Sciences**, v. 50, p.515-521, 1992.

CALIPPE, B.; DOUIN-ECHINARD, V.; DELPY, L.; LAFFARGUE, M.; LÉLU, K.; KRUST, A.; PIPY, B.; BAYARD, F.; ARNAL, J.; GUÉRY, J.; GOURDY, P. 17 β -estradiol promotes TL4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor α signaling in macrophages in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 185, p.1169-1176, 2010.

CAO, C.; MATSUMURA K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Cyclooxygenase-2 induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. **Molecular Brain Research**, v.56, p.45-56, 1998.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. **American Journal of Physiology**, v. 272,p. R1712-1725,1996.

CARTMELL, T.; BALL, C.; BRISTOW, A.F.; MITCHELL, D.; POOLE, S. Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and Staphylococcus aureus-induced inflammation in rats. **J Physiol**, v.549, p.653-664, 2003.

CARTMELL, T.; POOLE, S.; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **J Physiol**, v.3,p.653-61,2000.

CARTMELL, T.; POOLE, S; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localized inflammation in rats. **Journal of Physiology**, v. 526, n.3, p. 653-661, 2000.

CARUSO, C.; SANCHEZ, M.; DURAND, D.; PEREZ, MDE. L.; GONZALEZ, P.V.; LASAGA, M.; SCIMONELLI, T.N.; CASPER, R.F.; ALAPIN-RUBILLOVITZ, S. Progestins increase endogenous opioid peptide activity in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.60, p.34-6, 1985.

CARUSO, C.; SANCHEZ, M.; DURAND, D.; PEREZ MDE, L.; GONZALEZ, P.V.; LASAGA, M.; SCIMONELLI, T.N. α -melanocyte-stimulating hormone modulates lipopolysaccharide plus interferon- γ -induced tumor necrosis factor- α expression but not tumor necrosis factor- α receptor expression in cultured hypothalamic neurons. **J Neuroimmunol**, v. 227, p.52-9, 2010.

CASULARI, L.A.; MAGGI, R.; DONDI, D.; LIMONTA, P.; PIVA, F.; MOTTA, M.; MARTINI, L. Effect of oestrus cyclicity on the number of brain opioid um receptors in the rat. **Horm Metab Res.**, v.19, p.549-554, 1987.

CAZANAVE, S.; VADROT, N.; TINEL, M.; BERSON, A.; LETTERON,P.; LAROSCHE, I.; DESCATOIRE, V.;FELDMANN, G;ROBIN, M.A.;PESSAYRE, D. Ibuprofen administration attenuates serum TNF- α levels, hepatic glutathione depletion, hepatic apoptosis and mouse mortality after Fas stimulation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.231, p.336-43, 2008.

CHEN, X.; HIRASAWA, M.; TAKAHASHI, Y.; LANDGRAF, R.; PITTMAN, Q.J. Suppression of PGE(2) fever at near term: reduced thermogenesis but not enhanced vasopressin antipyresis. **Am J Physiol**, v. 277, p.354-61, 1999.

CIONI,C.; RENZI, D.; CALABRO, A.; ANNUNZIATA, P. Enhanced secretion of substance P by cytokine-stimulated rat brain endothelium cultures. **J Neuroimmunol**, v. 84, p.76-85, 1998.

COELHO, M.M.; PELA, I.R.; ROTHWELL, N.J. Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F2 alpha, but not prostaglandin E2. **Eur J Pharmacol**, v.238,p. 391-4,1993.

COHEN, M.R.; COHEN, R.M.; PICARD, D.; MURPHY, D.L.; BUNNEY, W.E. Physiological effects of high dose naloxone administration to normal adults.**Life Sciences**, v. 30, p.2025-32, 1982.

COSTA, S.K.; MORENO, R.A.; ESQUISATTO, L.C.; JULIANO, L.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G; ANTUNES, E. Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by Phoneutria nigriventer spider venom. **Neuroscience Letters**, v.318, p.158-162, 2002.

DALAL, S.; ZHUKOVSKY, D.S. Pathophysiology and management of fever. **J Support Oncol**, v4, p.009-016, 2006.

DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; et al. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, v. 243, p.1066–1068,1989.

DE SOUZA, G.E.;CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.;FABRICIO, A.S.; SILVA, V.M.; LORA, M.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; ERA, G.A.; FERREIRA, S.H.; ZAMPRONIO, A.R. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrone in rats. **Inflammation Research**, v.51, p.24-32, 2002.

DIMICCO, J.A.; ZARETSKY, D.V. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.292, p.R47-R63, 2007.

DINARELLO, C. A. Cytokines as endogenous pyrogens. **Reviews of Infectious Diseases** , v.179, p.S294-304, 1989.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious Diseases**, v.6, p.51-95, 1984.

DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, n. 2, p.S294-304, 1999.

DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p.168-189, 1988.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.; BEAUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A.Jr.; O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v.163, p.1433-1450, 1986.

DINARELLO, C.A.; DEMPSEY, R.A.; ALLEGRETTA, M.; LOPRESTE, G.; DAINIAK, N.; PARKINSON, D.R.; MIER, J.W. Inhibitory effects of elevated temperature on human cytokine production and natural killer activity. **Cancer Research**, v.46, p.6236-6241, 1986.

DJURENDIC-BRENESEL, M.; MIMICA-DUKIC, N.; PILIJA, V.; TASIC, M. Gender-related differences in the pharmacokinetics of opiates. **Forensic Science International**, v. 194, p.28-33, 2010.

ECKERSELL, C.B.; POPPER, P.; MICEVYCH, P.E. Estrogen-induced alteration of mu-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. **J Neurosci**, v. 18, p. 3967-76, 1998.

ECKSERLL, C.B.; POPPER, P.; MICEVYCH, P.E. Estrogen-induced alteration of μ -opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p.3967-3976, 1998.

EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E., KEHRL, J.H., FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v.172, p.1741-1748, 1990.

EK, M.; ENGBLOM, D.; SAHA, S.; BLOMQVIST, A.; JAKOBSSON P.J.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. **Nature**, v. 22, p.410-430, 2001.

ELANDER, L.; ENGSTROM, L.; RUUD, J.; MACKERLOVA, L.; JAKOBSSON, P.J.; ENGBLOM, D.; NILSBERTH, C.; BLOMQVIST, A. Inducible prostaglandin E2 synthesis interacts in a temporally supplementary sequence with constitutive prostaglandin-synthesizing enzymes in creating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to immune challenge. **J Neurosci**, v. 29, p.1404-13, 2009.

ELMQUIST, J.K.; BREDER, C.D.; SHERIN, J.E.; SCAMMELL, T.E.; HICKEY, W.F.; DEWITT, D.; SAPER, C.B. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. **The Journal of Comparative Neurology**, v.381, p.119-129, 1997.

EMOTO, H.; YOKOO, H.; YOSHIDA, M.; TANAKA, M. Corticotropin-releasing factor enhances noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracerebral microdialysis. **Brain Research**, v.601, p.286-268, 1993.

ENGBLOM, D.; SAHA, S.; ENGSTROM, L.; WESTMAN, M.; AUDOLY, L.P.; JAKOBSSON, P.J.; BLOMQVIST, A. Microsomal prostaglandin synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. **Nat Neurosci**, v. 6, p.12137-8, 2003.

ESKILSSON, A.; MIRASEKHIAN, E.; DUFOUR, S.; SCHWANINGER, M.; ENGBLOM, D.; BLOMQVIST, A. Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. **J Neurosci**, v.214, p.16957-61, 2014.

FABRÍCIO, A. S.; RAE, G. A.; ZAMPRONIO, A. R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by pre-formed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **American Journal of Physiology**, 2006.

FABRÍCIO, A.S.; RAE, G.A.; ZAMPRONIO, A.R.; D'ORLEANS- JUSTE, P.; SOUZA, G.E. Central endothelin ET(B) receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed pyrogenic factor and corticotropinreleasing factor in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, p.164-71, 2006.

FABRÍCIO, A.S.; SILVA, C.A.; RAE, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **Br J Pharmacol**, v. 125, p.542-8, 1998.

FABRÍCIO, A.S.; SILVA, C.A.; RAE, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA GE. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.125,p. 542-548,1998.

FABRÍCIO, A.S.C.; ERA, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Research**, v.1066, p.92-100, 2005.

FABRÍCIO, A.S.C.; ERA, G.A.; ZAMPRONIO, A.R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed pyrogenic fator and corticotropin-releasing fator in the rat. **Am J Physiol Integr Comp Physiol**, v.290, p.164-171, 2006.

FABRÍCIO, A.S.C.; VEIGA, F.H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P.; SOUZA, G.E. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 288,p. R671–R677,2005.

FAIRWEATHER, D.; ROSE, N.R. Women and autoimmune diseases. **Emerg Infect Dis**, v. 10, 2005-2011, 2004.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol**, v.13, p.200-240, 1972.

FIGUEIREDO, M.J.; FABRICIO, A.S.; MACHADO, R.R.; MELO, M.C.; SOARES, D.M.; SOUZA, G.E. Increase of core temperature induced by corticotropin-releasing factor and urocortin: a comparative study. **Regul Pept**, v. 165, p.191-9, 2010.

FIGUEIREDO, M.J.; FABRICIO, A.S.C.; MACHADO, R.R.; MELO, M.C.C.; SOARES, D.S.; SOUZA, G.E.P. Increase of core temperature induced by corticotropin-releasing factor and urocortin: A comparative study. **Regulatory peptides**, v. 165, p.191-199, 2010.

FILEP, J.G. Role of endogenous endothelin in the regulation of plasma volume and albumin escape during endotoxin shock in conscious rats. **Br J Pharmacol**, v.129, p.975-983, 2000.

FILIPOVICH-RIMON, T.; FLEISHER-BERKOVICH, S. Glial response to lipopolysaccharide: possible role of endothelins. **Peptides**, v.31, p.2269-2275, 2010.

FISHER, L.; RIVIER, C.; RIVIER, J.; BROWN, M. Differential antagonist activity of α -helical CRF 9-41 in three bioassay systems. **Endocrinology**, v.129, p.1312-6, 1991.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **New England Journal of Medicine**, v.345, p.433-442, 2001.

FORTIER, M.E.; KENT, S.; ASHDOWN, H.; POOLE, S.; LUHESHI, G.N. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.287, p.R759-766, 2004.

FRAGA, D.; MACHADO, R.R.; FERNANDES, L.C.; SOUZA, G.E.; ZAMPRONIO, A.R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 294, p.411-20, 2008.

FRAGA, D.; ZANONI, C.I.; ZAMPRONIO, A.R.; PARADA, C.A.; RAE, G.A.; SOUZA, G.E. Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain Behav Immun**, v.51, p.204-11, 2016.

FRAGA, D.; MACHADO, R.R.; FERNANDES, L.C.; SOUZA, G.E.P.; ZAMPRONIO, A.R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **American Journal of Physiology**, v.294, p. R411-R420, 2008.

FRANCONI, F.; BRUNELLESCHI, S.; STEARDO, L.; CUOMO, V. Gender differences in drug responses. **Pharmacological Research**, v. 55, p.81-95, 2007.

GALLICCHIO, M.; BENETTI, E.; ROSA, A.C.; FANTOZZI, R. Tachykinin receptor modulation of cyclooxygenase-2 expression in human polymorphonuclear leucocytes. **British Journal of Pharmacology**, v.156, p.486-496, 2009.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**, 2a. ed, Raven Press, New York, 1992.

GARBE, E. (2007). Non-chemotherapy drug-induced agranulocytosis. **Expert Opin Drug Saf** , v. 6, p.323-335, 2007.

GARCIA, M.; SAKAMOTO, K.; SHIGEKAWA, M.; NAKANISHI, S.; ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p.1735-1741,1994.

GAVLER, N.B.; FRENCH, B.; STROM, B.L.; LIU, Z.; PALEVSKY, H.I.; TAICHMAN, D.B. et al. Race and sex differences in response to endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v.141, p.20-26, 2012.

GOHAR, E.Y.; YUSUF, C.; POLLOCK, D.M. Ovarian hormones endothelin A and B receptor expression.. **Life Sciences**, v.xx, p.xx, 2016.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiological Reviews**, v. 47, n.5, p.963-991, 1990.

GRASSI, D.; BELLINI, M.J.; ACAZ-FONSECA, E.; PANZICA, G.; GARCIA-SEGURA, L.M. Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression. In SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors- α and $-\beta$. **Neuroendocrinology**, v. 154, p.2092-2100, 2013.

GREENSPAN, J.D.; CRAFT, R.M.; LERESCHE, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BERKLEY, K.J.; FILLINGIM, R.B.; GOLD, M.S.; HOLDCROFT, A.; LAUTENBACHER, S.; MAYER, E.A.; MOGIL, J.S.; MURPHY, A.Z.; TRAUB, R.J. CONSENSUS WORKING GROUP OF THE SEX, GENDER, AND PAIN SIG OF THE IASP. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report.**Pain**, v. 132, p. 26-45, 2007.

GREISMAN, L.A.; MACKOWIAK, P.A. Fever: beneficial and detrimental effects of antipyretics. **Current Opinion in infectious diseases** , v.15, p.241-245, 2002.

HAMBERG, D.A.; SVENSSON, J.; WAKABAYASHI, T.; SAMUELSSON, B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** , v.71, p.345-9, 1974.

HAMMEL, H.T.; HARDY, J.D.; FUSCO, M.M. Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs. **Am J Physiol.** ,v.198,p. 481-6,1960.

HAMMEL, H.T.; JACKSON, D.C.; STOLWIJK, J.A.; HARDY, J.D.; STROMME, S.B. Temperature Regulation by Hypothalamic Proportional Control with an Adjustable Set Point. **J Appl Physiol**, v.18, p.1146-54,1963.

HANADA, R.; HANADA, T.; SIGL, V.; CHRAMEK, D.; PENNINGER, J.M. RANKL/RANK-beyond bones. **J Mol Med**, v.89, p.647-656, 2011.

HANADA, R.; LEIBBRANDT, A.; HANADA, T.; KITAOKA, S.; FURUYASHIKI, T.; FUJIHARA, H.; TRICHEREAU, J.; PAOLINO, M.; QADRI, F.; PLEHM, R.; KLAERE,

S.; KOMNENOVIC, V.; MIMATA, H.; YOSHIMATSU, H.; TAKAHASHI, N.; VON HAESELER, A.; BADER, M.; KILIC, S.S.; UETA, Y.; PIFL, C.; NARUMIYA, S.; PENNINGER, J.M. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**, v.462, p.505-509,2009.

HANDLER, C.M.; PRICE, R.W.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Effect of mu-selective opioid antagonists on MIP-1 b and IL-1 b-induced fever. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p.270-3, 1998.

HANSSON, E.; WESTERLUND, A.; BJORKLUND, U.; OLSSON, T. μ -Opioid agonists inhibit the enhanced intracellular Ca^{2+} responses in inflammatory activated astrocytes co-cultured with brain endothelial cells. **Neuroscience**, v.155, p.1237-49, 2008.

HARRE, E.M.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Attenuation of fever at near term: is interleukin-6-STAT3 signalling altered? **J Neuroendocrinol**, v. 18, p.57-63, 2006.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Review: Substance P. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.33,p. 555-576,2001.

HEDENMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). **Eur J Clin Pharmacol** , v. 58, p.265-74, 2002.

HELLSTROM, B.; HAMMEL, H.T. Some characteristics of temperature regulation in the unanesthetized dog. **Am J Physiol**,v. 213,p. 547-56,1967.

HO, H.L.; LEE, F.Y.; HSU, S.J.; WANG, S.S.; HSIN, I.F.; HUANG, H.C. et al. The ability of 17 betaestradiol to attenuate intrahepatic vasoconstriction to endothelin-1 in female rats is lost in cirrhosis. **Ann Hepatol**, v.14, p.404-413, 2015.

HO, W.Z.; LAI, J.P.; ZHU, X.H.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S.D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. **Journal of Immunology**, v.159, p.5654-5660,1997.

HUANG, Z.L.; SATO, Y.; MOCHIZUKI, T.; OKADA, T.; QU, W.M.; YAMATODANI, A.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Prostaglandin E-2 activates the histaminergic system via the EP4 receptor to induce wakefulness in rats. **J Neurosci**, v. 24, p.719-725, 2001.

HUTCHINSON, M.R.; ZHANG, Y.; SHRIDHAR, M.; EVANS, J.H.; BUCHANAN, M.D.; ZHAO, T.X.; EVANS, J.H.; BUCHANAN, M.M.; SLIVKA, P.F.; COATS, B.D.; REZVANI, N.; WIESELER, J.; HUGHES, T.S.; LANDGRAF, K.E.; CHAN, S.; FONG, S.; PHIPPS, S.; FALKE, J.J.; LEINWAND, L.A.; MAIER, S.F.; YIN, H.; RICE, K.C.; WATKINS, L.R. Evidence that opioids may have toll like receptor 4 and MD-2 effects. **Brain Behav Immun**, v.24, p.83-95, 2010.

IHIMARU, S.; SHICHIRI, M.; MINESHITA, S.; HIRATA, Y. Role of endothelin-1/endothelin receptor system in endotoxin shock rats. **Hyperten Res**, v.24, p.119-126, 2001.

IRIE, A.; SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; HARAZONO, A.; HONDA, A.; WATABE, A.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP₃ subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. **Eur J Biochem**, v.217, p.313-318, 1993.

IWASA, T.; MATSUSAKI, T.; KINOCHI, R.; GERETSETSEG, G.; MASAHIRO, M.; MUNKHZAYA, M.; ALTANKHUU, T.; KUWAHARA, A.; YASUI, T.; IRAHARA, M. Changes in central and peripheral inflammatory responses to lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. **Cytokine**, v.65, p.65-73, 2014a.

IWASA, T.; MATSUSAKI, T.; TUNGALAGSUVD, A.; MUNKHZAYA, M.; KAWAMI, T.; KATO, T.; KUWAHARA, A.; YASUI, T.; IRAHARA, M. Effects of ovariectomy on the inflammatory responses of female rats to the central injection of lipopolysaccharide. **Journal of Neuroimmunology**, v.277, p. 50-56, 2014b.

JAKOBSSON, P.; THORÉN, S.; MORGENSTERN, R.; SAMUELSSON, B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v.96, p.7220-225, 1999.

JIN, C.; SPEED, J.S.; HYNDMAN, K.A.; Ó'CONNOR, P.M.; POLLOCK, D.M. Sex differences in ET-1 receptor expression and Ca²⁺ signaling in the IMCD. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol**, v.305, p.1099-1104, 2013.

JONES, L.A.; ANTHONY, J.P.; HENRIQUEZ, F.L.; LYONS, R.E.; NICKDEL, M.B.; CARTER, K.C.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W. Toll-like receptor 4 mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. **Immunology**, v. 125, p.59-69, 2008.

JONES, L.A.; KREEM, S.; SHWEASH, M.; PAUL, A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W. Differential modulation of TLR3-and TLR4- mediated dendritic cell maturation and function by progesterone. **The Journal of Immunology**, v.185, p.4525-4534, 2010.

KANASHIRO, A.; FIGUEIREDO, M.J.; MALVAR, D.; SOUZA, G.E. Cytokines, but not corticotropin-releasing factor and endothelin-1, participate centrally in the febrile response in zymosan-induced arthritis in rats. **Brain Res**, v. 1610, p.12-9, 2015.

KANASHIRO, A.; FIGUEIREDO, M.J.; MALVAR, D.C.; DE SOUZA, G.E. Cytokines, but not corticotropin-releasing factor and endothelin-1, participate centrally in the febrile response in zymosan-induced arthritis in rats. **Brain Research**, v.1610, p.12-19, 2015.

KANASHIRO, A.; PESSINI, A.C.; MACHADO, R.R.; MALVAR, D.D.; AGUIAR, F.A.; SOARES, D.M.; VALE, M.L.; DE SOUZA, G.E.P. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, p.1631-1640, 2009.

KAPÁS, L.; KRUEGER, J.M. Tumor necrosis factor-beta induces sleep, fever, and anorexia. **Am J Physiol**, v.263, p.703-7, 1992.

KAPÁS, L.; KRUEGER, J.M. Tumor necrosis factor-beta induces sleep, fever, and anorexia. **Am J Physiol**, v.263, p.703-7, 1992.

KIECHL, S.; WITTMANN, J.; GIACCARI, A.; KNOFLACH, M.; WILLEIT, P.; BOZEC, A.; MOSCHEN, A.R.; MUSCOGIURI, G.; SORICE, G.P.; KIREVA, T.; SUMMERER, M.; WIRTZ, S.; LUTHER, J.; MIELENZ, D.; BILLMEIER, U.; EGGER, G.; MAYR, A.; OBERHOLLENZER, F.; KRONENBERG, F.; ORTHOFER, M.; PENNINGER, J.M.; MEIGS, J.B.; BONORA, E.; TILG, H.; WILLEIT, J.; SCHETT, G. Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. **Nat Med.**, v.19, p.358-63, 2013.

KLIR, J.; MCCLELLAN, J.L.; KLUGER, M.J. Interleukin-1 beta causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats. **Am J Physiol**, v.266, p.1845-1848, 1994.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v.71, p.83-127, 1991.

KNORR, C.; HÜBSCHLE, T.; MURGOTT, J.; MÜHLRADT, P.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. **Brain Research**, v.1205, p.36-46, 2008.

KOSHI, T.; EDANO, T.; ARAI, K.; SUZUKI, C.; EHARA, Y.; HIRATA, M.; OHKUCHI, M.; OKABE, T. Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.186, p.1322-1326, 1992.

KOYAMA, Y.; KOTANI, M.; SAWAMURA, T.; KURIBAYASHI, M.; KONISHI, M.; MICHINAGA, S. Different actions of endothelin-1 on chemokine production in rat cultured astrocytes: reduction of CX3CL1/fractalkine and an increase in CCL2/MCP-1 and CXCL1/CINC-1. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p.1-11, 2013.

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J Biol Chem**, v.266, p.12866-72, 1991.

LACEY, D.L.; TIMMS, E.; TAN, H.L.; KELLEY, M.J.; DUNSTAN, C.R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y.X.; KAUFMAN, S.

SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v.93, p.165-76, 1998.

LACROIX, S.; RIVEST, S. Role of cyclo-oxygenase pathways in the stimulatory influence of immune challenge on the transcription of a specific CRF receptor subtype in the rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 10, p.53-71, 1996.

LAI, J.P.; DOUGLAS, S.D.; HO, W.Z. 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v.86, p.80-86, 1998.

LANDGRAF, R.; MALKKINSON, W.L.; VEALE, K.; PITTMAN, Q.J. Vasopressin and oxytocin in the rat brain in response to prostaglandin fever. **Am J Physiol**, v.259, p.1056-1062, 1990.

LASAGA, M.; DEBELJUK, L. Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. **Peptides**, v.32, p.1972-78, 2011.

LAZARUS, M.; YOSHIDA, K.; COPPARI, R.; BASS, C.E.; MOCHIZUKI, T.; LOWELL, B.B.; SAPER, C.B. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nat Neurosci**, v. 10, p.1131-3, 2007.

LeFREUVE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, v.26, p.1217-1221, 1987.

LeMAY, L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. R798-803, 1990.

LEON, C.G.; TORY, R.; JIA, J.; SIVAK, O.; WASAN, K.M. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.1751-1761, 2008.

LEON, L.R.; CONN, C.A.; GLACCUM, M.; KLUGER, M.J. IL-1 type I receptor mediates acute phase response to turpentine, but not lipopolysaccharide, in mice. **Am J Physiol**, v.271, p.1668-75, 1996.

LI, S.; BALLOU, L.R.; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M.; Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 β . **Brain Research**, v.910, p.163-173, 2001.

LI, S.; GOORHA, S.; BALLOU, L.R.; BLATTEIS, C.M. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 β and IL-18: pyrogenic and PGE₂ mediated? **Brain Research**, v.992, p.76-84, 2003.

LI, S.; WANG, Y.; MATSUMURA, K.; BALLOU, L.R.; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. **Brain Res**, v. 825, p.86-94, 1999.

LONG, N.C.; VANDER, A.J.; KUNKEL, S.L.; KLUGER, M.J. Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. **Am J Physiol**, v. 258, p.591-5, 1990.

LOPEZ-VALPUESTA, F.J. & MYERS, R.D. Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. **Neuropharmacology**, v.33, n.8, p.989-994, 1994.

LUHESHI, G.; MILLER, A.J.; BROUWER, S.; DASCOSBE, M.J.; ROTHWELL, N.J.; HOPKINS, S.J. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. **Am J Physiol**, v. 270, p.91-95, 1996.

MAGGI, R.; LIMONTA, P.; DONDI, D.; PIVA, F. Modulation of the binding characteristics of hypothalamic μ opioid receptors in rats by gonadal steroids. **J Steroid Biochem Moelc Biol.**, v.40, p.113-121, 1991.

MALLORY, D.S.; GALLO, R.V. Medial preoptic-anteriorhypothalamic área involviment in the supression of pulsatile LH release by μ -opioid agonist in the ovariectomized rat. **Brain Research Bulletin**, v.25, p.251-57,1990.

MALVAR, D. DO C.; SOARES, D.M.; FABRICIO, A.S.; KANASHIRO, A.; MACHADO, R.R.; FIGUEIREDO, M.J.; ERA, G.A.; DE SOUZA, G.E. The antipyretic effect of dipyrone is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. **Br J Pharmacol**, v. 162, p.1401-9, 2011.

MALVAR, D.DO C.; AGUIAR, F.A.; VAZ ADE L, ASSIS D.C.;DE MELO, M.C.; JABOR, V.A.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, S.H.; CLOSOSKI, G.C.; DE SOUZA, G.E. Dipyrone metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE2 -dependent and -independent fever while 4-AA only blocks PGE2 -dependent fever. **Br J Pharmacol**, v. 171, p.3666-79, 2014.

MANSON, J.E. Pain: sex differences and implications for treatment. **Metabolism**, v. 59, p.16-20, 2010.

MARRIOTT, I.; MASON, M.J.; ELHOFY, A.; BOST, K.L. Substance P activates NF-kappaB independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of neuroimmunology**, v.201, p.163-171,2000.

MARTIN, F.C.; ANTON, P.A.; GORNBEIN, J.A.; SHANAHAAN; F.; MERRILL, J.E. Production of interleukin-1 by microglia in response to substance P: role for a non-classical NK-1 receptor. **Journal of Immunology**, v.42, p.53-60,1993.

MATHISON, J.C.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R.J. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. **J Clin Invest**, v.81, p.1925-37, 1988.

MICHIE, H.R.; SPRIGGS, D.R.; MANOGUE, K.R.; SHERMAN, M.L.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.T.; ARTHUR, K.; DINARELLO, C.A.; CERAMI, A.; WOLFF, S.M., ET AL. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v.104, p.280-286, 1988.

MIER, J.W.; VACHINO, G.; VAN DER MEER, J.W.; NUMEROF, R.P.; ADAMS, S.; CANNON, J.G.; BERNHEIM, H.A.; ATKINS, M.B.; PARKINSON, D.R.; DINARELLO, C.A. Induction of circulating tumor necrosis factor (TNF alpha) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. **J Clin Immunol**, v.8, p.426-36, 1988.

MILTON, A.S. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. **Ann N Y Acad Sci**, v. 559, p.392-410, 1989.

MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R.D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. **Brain Research Bulletin**, v.24, p. 849-852, 1990.

MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. **American Journal of Physiology**, v.254, p.R633-640, 1988.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front Biosc.**, v.16, p.74-104, 2011.

MOUIHATE, A. TLR4-mediated brain inflammation halts neurogenesis: impact of hormonal replacement therapy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.8, p.1-12, 2015.

MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. **Endocrinology**, v.144, p.2454-2460, 2003.

MOUIHATE, A.; CHEN, X.; PITTMAN, Q.J. Interleukin-1beta fever in rats: gender difference and estrous cycle influence. **Am J Physiol.**, v.275, p.1450-4, 1998.

MURAKAMI, M.; NARABA, H.; TANIOKA, T.; SEMMYO, N.; NAKATANI, Y.; KOJIMA, F.; IKEDA, T.; FUEKI, M.; UENO, A.; OH, S.; KUDO, I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, v.275, p.32783-9, 2000.

NADEAU, S.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 58, p.61-77, 1999.

NAIDICH, M.; SHTERNAL, B.; FURMAN, R.; PAWSON, A.; JABBOUR, H.N.; MORGAN, K.; MILLAR, R.P.; JIA, J.; TOMIC, M.; STOKIKOVIC, S.; STERN, N.; NAOR, Z. Elucidation of mechanisms of the reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin receptors. **Neuroendocrinology**, v. 151, p.2700-2712, 2010.

NAKAMORI, T.; MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N. Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 b. **Am J Physiol**, v. 265, p.834-9, 1993.

NARITA, M.; MIYATAKE, M.; NARITA, M.; SHIBASASKI, M.; SHINDO, K.; NAKAMURA, A.; KUZUMAKI, N.; NAGUMO, I.; SUZEJI, T.. Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. **Neuropsychopharmacol**, v.31, p.2476-2488, 2006.

OKA, T.; OKA, K.; OKBAYASHI, T.; ICHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S.; SAPER, C. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP₁ and EP₃ receptors. **J Physiol**, v.551, p.945-954, 2003.

OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T.E.; LEE, C.; KELLY, J.F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J.K.; SAPER, C.B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v.428, p.20-32, 2000.

OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T.E.; LEE, C.; KELLY, J.F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J.K.; SAPER, C.B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v. 428, p.20-32, 2000.

PALMA, C.; GOSO, C.; MANZINI, S. Different susceptibility to neurokinin 1 receptor antagonists of substance P and septide-induced interleukin-6 release from U373 MG human astrocytoma cell line. **Neuroscience Letters**, v. 171, p.221-224, 1994.

PALMA, C.; MINGHETTI, L.; ASTOLFI, M.; AMBROSINI, E.; SILBERSTEIN, F.C.; MANZINI, S.; LEVI, G.; ALOISI, F. Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E₂ production. **Glia**, v.21, p.183-93, 1997.

PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 2a ed., Sydney, Australia, 2005.

PETERSEN, S.L.; LAFLAMME, K.D. Progesterone increases levels of μ -opioid receptor mRNA in the preoptic area and arcuate nucleus of ovariectomized, estradiol-treated female rats. **Molecular Brain Research**, v. 52, p.32-37, 1997.

PETERSEN, S.L.;LAFLAMME, K.D. Progesterone increases levels of mu-opioid receptor mRNA in the preoptic area and arcuate nucleus of ovariectomized, estradiol-treated female rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 52, p. 32-7, 1997.

PINTO, F.M.; AOMESTO, C.P.; MAGRANER, J.; TRUJILLO,M.; MARTIN, J.D.; CANDENAS, M.L. Tachykinin receptor and neutral endopeptidase gene expression in the rat uterus: Characterization and regulation in response to ovarian steroid treatment. **Endocrinology**, v.140, p.2526-2532, 1999.

PITTMAN, Q.J.; CHEN, X.; MOUIHATE, A.; MARTIN, S. Vasopressin-induced antopyresis: Sex- and Experience-dependent febrile response. **Annals NY Academy of Sciences**, p.53-61, 1998.

PUDER, J.J.; FREDA, P.U.; GOLAND, R.S.; WARDLAW, S.L.;QIAN, L.; TAN, K.S.; WEI, S.; WU, H.; XU, Z.; WILSON, B.; LU, R.; HONG, J.; FLOOD, P.M. Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through na opioid receptor-independent reduction of NADPH Oxidase Activity. **The Journal of Immunology**, v.179, p.1198-1209, 2007.

PUDER, J.J.; FREDA, P.U.; GOLAND, R.S.; WARDLAW, S.L. Estrogen modulates the hypothalamic-pituitary-adrenal and inflammatory cytokine responses to endotoxin in women.**J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 2403-8, 2001.

RACINE, M.; TOUSIGNANT-LAFLAMME, Y.; KLODA, L.A.; DION, D.; DUPUIS, G.; CHOINIERE, M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception - part 1: are there really differences between women and men? **Pain**, v. 153, p.602-18, 2012a.

RACINE, M.; TOUSIGNANT-LAFLAMME, Y.; KLODA, L.A.; DION, D.; DUPUIS, G.; CHOINIERE, M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and pain perception - part 2: do biopsychosocial factors alter pain sensitivity differently in women and men? **Pain** , v.153, p.619-35, 2012b.

RAGE, F.; LEE, B.J.; MA, Y.J.; OJEDA, S.R. Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a gli-to-neuron signaling pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 9145-9156, 1997.

RAGE, F.; LEE, B.J.; MA, Y.J.; OJEDA, S.R. Estradiol enhances prostaglandina E2 receptor gene expression. In luteiniz hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 bu activating a gli-to-neuron signaling pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p.9145-56, 1997.

RANCE, N.E. Hormonal influences on morphology and neuropeptide gene expression. In the infundibular nucleus of post-menopausal women. **Prog. Brain Res.**, v.93, p.221-235, 1992.

RANCE, N.E. Menopause and Human Hypothalamus: Evidence for the Role of Kisspeptin/Neurokinin B Neurons in the Regulation of Estrogen Negative Feedback. **Peptides**, v.30, p.111-122, 2009.

RANELS, H. J. & GRIFFIN, J.D. Effects of prostaglandin E2 on the electrical properties of thermally classified neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. **Bio Med Central Neuroscience**, v. 6, p. 1-11, 2005.

RANELS, H.;GRIFFIN, J.D. The effects of prostaglandin E2 on the firing state activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. **Brain Research**, v.964, p.42-50, 2003.

REIS, R.C.; BRITO, H.O.; FRAGA, D.; CABRINI,D.; ZAMPRONIO, A.R. Central substance P NK1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain Research**, v. 384, p.161-169, 2011.

ROBY, K.F.; LAHAM, N.; HUNT, J.S. Cellular localization and steroid hormone regulation of mRNA encoding tumour necrosis factor receptor I in mouse uterus. **J Reprod Fertil**, v. 106, p. 285-90, 1996.

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. VANE, J.R. e FERREIRA, S.H. (eds.), Springer-Verlag, v.50, p.6-25, 1978.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Auton Neurosci**, v.85, p.39-48, 2000.

ROMANOVSKY, A.A.; BLATTEIS, C.M. Biphasic fever: what triggers the second temperature rise? **American Journal of Physiology**, v.269, p.R280-286, 1995.

ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I. ; BERTHOUD, H.R.; KULCHITSKY, V.A. Are vagal efferents involved in the fever response to intraperitoneal lipopolysaccharide? **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.65-70, 2000.

ROMANOVSKY, A.A.; KULCHITSKY, V.A.; SIMONS, C.T.; SUGIMOTO, N. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **Am J Physiol**, v.275, p.332-338, 1998.

ROTH, J.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J.; ZEISBERGER, E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R653-658, 1993.

ROTH, J.; DE SOUZA, G.R. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, p.301-314, 2006.

ROTH, J.V. What is the correct temperature management of the febrile patient? **Anesthesia e Analgesia**, v.103, p.1059-1060, 2006.

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

ROTHWELL, N. J. Mechanisms of pyrogenic action of cytokines. **European Cytokine Network**, v.1,p. 211-213,1990a.

ROTHWELL, N. J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. **Hormone and Metabolic Research**, v.22, p.595-596, 1990b.

ROTHWELL, N.J. Central actions of CRF on energy expenditure and body weight regulation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.14, p.263-271, 1990c.

ROTHWELL, N.J. Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. **Hormone and Metabolic Research**, v.22, p.616-618, 1990d.

ROTHWELL, N.J. Central effects of TNF alpha on thermogenesis and fever in the rat. **Bioscience Reports**, v.8, p.345-352, 1988.

ROTHWELL, N.J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Science**, v.12, p.430-436, 1991.

ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; LeFEUVRE, R.A.; HARDWICK, A.J.; GAULDIE, J.; HOPKINS, S.J. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 69, p. 1465-1469, 1991.

RUDAYA, A.Y.; STEINER, A.A.; ROBBINS, J.R.; DRAGIC, A.S.; ROMANOVSKY A.A. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.289, p.R1244-52,2005.

RUUD, J.; NILSSON, A.; ENGSTROM, R.; WANG, W.; NILSBERTH, C.; IRESJO, BM.; LUNDHOLM, K.; ENGBLOM, D.; BLOMQVIST, A. Cancer-induced anorexia in tumor-bearing mice is dependent on cyclooxygenase-1. **Brain Behav Immun**, v.29, 124-135, 2013.

RUZICKA, B.B.; AKIL, H. The interleukin-1beta-mediated regulation of proenkephalin and opioid receptor messenger RNA in primary astrocyte-enriched cultures. **Neuroscience**,v.79, p.517-24, 1997.

RUZICKA, B.B.; AKIL, H.The interleukin-1beta-mediated regulation of proenkephalin and opioid receptor messenger RNA in primary astrocyte-enriched cultures. **Neuroscience**, v. 79, p.517-24, 1997.

SANCHEZ-BORGES,M.; CAPRILES-BEHRENS, E.; CABALLERO-FONSECA, F. Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs in childhood. **Pediatr Allergy Immunol**, v.15, p.376-80,2004.

SCAMMELL,T. E.; ELMQUIST, J.K., GRIFFIN, J.D., SAPER, C.B. Ventromedial Preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. **The Journal of Neuroscience**, v.16, p.6246-6254,1996.

SEDGWICK, A.D. ; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of the inflammatory response
SERRANO, G.E.; LELUTIU, N.; ROJAS, A.; COCHI, S.; SHAW, C.D.; MAKINSON, C.D.; WANG, D.; FITZGERALD, G.A.; DINGLELINE, R. Ablation of Cyclooxygenase-2 in Forebrain Neurons is Neuroprotective and Dampens Brain Inflammation after Status Epilepticus. **J Neurosci**, v.31, p.14850-14860, 2011.

SHANAHAN, F. Food allergy: fact, fiction, and fatality. **Gastroenterology**, v.104, p.1229-1231, 1993.

SHEEHAN, H.L.; KOVÁCS, K.The subventricular nucleus of the human hypothalamus. **Brain**, v. 89, p. 589-614, 1966.

SHERRY, B.; TEKAMP-OLSON, P.; GALLEGOS, C.; BAUER, D.; DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; MASIARZ, F.; COIT, D.; CERAMI A. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 b. **J Exp Med**, v. 168, p.2251-9, 1988.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **J Pediatr**,v. 83, p.22-25, 2007.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization.**Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p.1-19, 2000.

SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides**, v.25, p.521-525,2004.

SMITH, J.; DAS, A.; BUTLER, J.; RAY, S.; BANIK,N. Estrogen or Estrogen Receptor Agonist Inhibits Lipopolysaccharide Induced Microglial Activation and Death. **Neurochem Res**, v.36, p.1587-93, 2011.

SMITH, W.L.; URADE, Y.; JAKOBSSON, P.J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis.**Chem Rev**, v.111, p.5821-65,2011.

SOARES, D.M.; MACHADO, R.R.; YAMASHIRO, L.H.; MELO, M.C.;SOUZA, G.E. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. **Brain Research**, v.1233, p.79-88,2008.

SOARES, D.M.;FIGUEIREDO, M.J.;MARTINS, J.M.; MACHADO, R.R.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.; PESSINI, A.C.; ROTH, J.; SOUZA, G.E. CCL3/MIP-1

alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. **Brain Research**, v.1260, p.54-60,2009.

SOKOLOVSKY, M.; AMBAR, I.; GALRON, R. A novel subtype of endothelin receptor. **J Biol Chem**, v.267, p.20551-20554, 1992.

SORGE, R.E.; MAPPLEBECK, J.C.; ROSEN, S.; BEGGS, S.; TAVES, S.; ALEXANDER, J.K.; MARTIN, L.J.; AUSTIN, J.; SOTOCINAL, S.G.; CHEN, D.; YANG, M.; SHI, X.Q.; HUANG, H.; PILLON, N.J.; BILAN, P.J.; TU, Y.; KLIP, A.; JI, R.; SALTER, M.W.; MOGIL, J.S. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v.18, p.1084, 2015.

SOUZA, G.E.P.; CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.C.; et al. Comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. **Inflammation Research**, v. 51,p. 24–32,2002.

STAUFFER, B.L.; WESTBY, C.M.; GREINER, J.J.; VAN GUILDER, G.P.; DESOUSA, C.A. Sex differences in endothelin-1-mediated vasoconstrictor tone in middle-aged and older adults. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 298, p.261-265, 2010.

STEVENS, C.W.; ARAVIND, S.; DAS, S.; DAVIS, R.L. Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, p.1421-1429, 2013.

STRIJBOS, P.J.; HARDWICK, A.J.; RELTON, J.K.; CAREY, F.; ROTHWELL NJ. Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF. **American Journal of Physiology**, v.263, p.E632-E636,1992.

SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; HONDA, A.; HAYASHI, Y.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. **J Biol Chem**, v. 267, p.6463-6466, 1992.

SUNDGREN-ANDERSSON, A.K.; ÖSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF- α -induced fever. **American Journal of Physiology**, v.275, p.R2028-2034, 1998.

SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M.; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Multiple neural mechanisms of fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinic**, v. 85,p. 78-82,2000.

SZELENYI, Z.; SZEKELY, M.; BALASKO, M. Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. **Ann N Y Acad Sci**, v.813, p.316-23, 1997.

TAKAHASHI, K.; GHATEI, M.A.; JONES, P.M.; MURPHY, J.K.; LAM, H.C.; O'HALLORAN, D.J.; BLOMM, S.R. Endothelin in human brain and pituitary gland:

comparison with rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17 (7), p. S101-S103, 1991.

TATRO, J.B. Endogenous antipyretics. **Clin Infect Dis**, v. 31, p.S190-201, 2000.

TAVARES, E. & MIÑANO, F.J. RANTES: A new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2505-2513, 2000.

TAVARES, E.; MINANO, F.J. Macrophage inflammatory protein-1beta induces dexamethasone-unresponsive fever in rats. **Neuroreport**, v.9, p.19-22, 1998.

TILDERS, F.J.; DERIJK, R.H.; VAN DAM, A.M.; VINCENT, V.A.; SCHOTANUS, K.; PERSOONS, J.H. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. **Psychoneuroendocrinology**, v.19, p.209-232, 1994.

TOO,H.; MARRIOTT, D.R.; WILKIN, G.P. Preprotachykinin-A and substance P receptor (NK1) gene expression in rat astrocytes in vitro. **Neuroscience Letters**, v.182, p.185-187, 1994.

TRAN, C.; KNOWLES, S.R.; LIU, B.A.; SHEAR, N.H. Gender differences in adverse drug reactions. **J Clin Pharmacol**, v.38, p.1003-9, 1998.

TRANSLAVINA, G.A.; FRANCI, C.R. The CRH-R₁ receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. **Brain Research**, v. 1421, p.11-19, 2011.

TSAFRIRI, A.; KOCH, Y.; LINDNER, H.R. Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E₂. **Prostaglandins**, v. 3, p.461-7, 1973.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C. Corticotropin-releasing factor, vasopressin, and prostaglandins mediate, and nitric oxide restrains, the hypothalamic-pituitary-adrenal response to acute local inflammation in the rat. **Endocrinology**, v137, p.455-463, 1996.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.;MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; HIZAKI, H.; TUBOI, K.;KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, A.; TANAKA,T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E₂ receptor subtype EP₃. **Nature**, v.395, p.281-284,1998.

VAN PETT, K.; VIAU, V.; BITTENCOURT, J.C.; CHAN, R.K.; LI, H.Y.; ARIAS, C.; PRINS, G.S; PERRIN, M.; VALE, W.; SAWCHENKO, P.E. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J Comp Neurol**, v. 428, p.191-212, 2000.

VEGETO, E.; GHISLETTI, S.; MEDA, C.; ETTERI, S.; BELCREDITO, S.; MAGGI, A. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17 β -estradiol in macrophage cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 91, p.59-66, 2004.

VEGETO, E.; BENEDESI, V.; MAGGI, A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, p.507-19, 2008.

VILLABRANCA, A.C.; HANLEY, M.R. 17 β -estradiol stimulates substance P receptor gene expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 135, p.109-117, 1997.

WALSH, M.C.; KIM, N.; KADONO, Y.; RHO, J.; LEE, S.Y.; LORENZO, J.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. **Annu Rev Immunol**, v.24, p.33-63, 2006.

WANECEK, M.; WEITZBERG, E.; RUDEHILL, A.; OLDNER, A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **Eur J Pharmacol**, v. 407, p.1-15, 2000.

WANG, D.; ZHAO, J.; WANG, J.; LI, J.; YU, S.; GUO, X. Deficiency of female sex hormones augments PGE₂ and CGRP levels within midbrain periaqueductal gray. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 346, p.107-111, 2014.

WANG, X.; MARVIZÓN, J.C. Time-course of the internalization and recycling of neurokinin 1 receptors in rat dorsal horn neurons. **Brain Research**, v.944, p.239-247, 2002.

WATANABE, K.; NEMOTO, T.; AKIRA, S.; TAKESHITA, T.; SHIBASAKI, T. Estrogens downregulate urocortin 2 expression in rat uterus. **Journal of Endocrinology**, v. 219, p.269-278, 2013.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: A novel drug Discovery target for clinical pain. **Nature Reviews**, v. 2, p.973-985, 2003.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; & GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, v.63, p.289-302, 1995.

WELCH, W.H. The Cartwright lectures on the general pathology of fever. **Medical News**, v. 52, p. 365-568, 1888.

WENK, G.L.; HARRINGTON, C.A.; TUCKER, D.A.; RANCE, N.E.; WALKER, L.C. Basal forebrain neurons and memory: a biochemical, histological, and behavioral study of differential vulnerability to ibotenate and quisqualate. **Behav Neurosci.**, v. 106, p.909-23, 1992.

WERNER, M.F.; FRAGA, D.; MELO, M.C.; SOUZA, G.E.; ZAMPRONIO, A.R. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflammation Research**, v.52, p.291-296, 2003.

WERNER, M.F.; SOUZA, G.E.; ZAMPRONIO AR. Nimesulide induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase- dependent and independent mechanisms. **Eur J Pharmacol**, v.543, p.181-9, 2006.

WERNER, M.F.;SOUZA, G.E.;ZAMPRONIO, A.R. Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.543, p.181-189,2006.

WILHELMS, D.B.; KIRILOV, M.; MIRRASEKHIAN, E.; ESKILSSON, A.; KUGELBERG, U.O.; KLAR, C.; RIDDER, D.A.; HERSCHMAN, H.R.; SCHWANINGER, M.; BLOMQVIST, A. et al. Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. **J Neurosci**, v. 34, p.11684-90, 2014.

WONG, B.R.; JOSIEN, R.; LEE, S.Y.; SAUTER, B.; LI, H.L.; STEINMAN, R.M.; CHOI, Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. **J Exp Med**, v.186, p.2075-80, 1997.

YAMAMOTO, T.; SUZUKIN, H.; UEMURA, H. Endothelin B receptor-like immunoreactivity is associated with LHRH-immunoreactive fibers in the rat hypothalamus. **Neurosci Lett**, v.223, p.117-120,1997.

YAMAMOTO, T.; UEMURA, H.J. Distribution of endothelin-B receptor-like immunoreactivity in rat brain, kidney, and pancreas. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.31, p.207-211, 1998.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; TOMOYASU, A.; YANO, K.; GOTO, M.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p.3597-602, 1998.

YOO, M.; NISHIHARA, M.; TAKAHASHI, M. Tumor necrosis factor- α mediates endotoxin induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rat. **Endocrine Journal**, v. 44, p.141-148, 1997.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.; SILVA, C.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E..A pre-formed Pyrogenic Factor Released by Lipopolysaccharide Stimulated Macrophages. **Mediators Inflamm.**, v.3,p.365-73,1994.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor. **Inflammation Research**, v. 49,p. 473–479,2000.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ,I.R.; HOPKINS, S.; SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v.3, p.365-373,1994b.

ZAMPRONIO, A.R.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; PELÁ, I.R.; SOUZA, G.E. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. **Am J Physiol**, v.269, p.1469-74,1995.

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

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism.**Am J Physiol**, v. 266,p.1670-4,1994.

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.;FERREIRA, S.H.Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **American Journal of Physiology**,v. 266, p.R1670–R1674,1994.

ZAMPRONIO, A.R.;SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.;FERREIRA, S.H.;PELÁ, I.R.; SOUZA,G.E. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. **American Journal of Physiology**, v.269, p.1469-1474, 1995.

ZEISBERGER, E.From humoral fever to neuroimmunological control f fever. **J Therm Biol**, v.24, p.287-326, 1999.