

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA COSTA MASTRANGELO COELHO

FEBRE INDUZIDA POR ZIMOSAN E ÁCIDO POLI-INOSÍNICO:
POLICITIDÍLICO EM FÊMEAS: INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS SEXUAIS E
PARTICIPAÇÃO DE ENDOTELINA-1



CURITIBA

2020

LETICIA COSTA MASTRANGELO COELHO

FEBRE INDUZIDA POR ZIMOSAN E ÁCIDO POLI-INOSÍNICO:
POLICITIDÍLICO EM FÊMEAS: INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS SEXUAIS E
PARTICIPAÇÃO DE ENDOTELINA-1

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zampronio.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Coelho, Leticia Costa Mastrangelo.

Febre induzida por Zimosan e ácido poli-inosínico: policitidílico em fêmeas: influência de hormônios sexuais e participação de endotelina-1. / Leticia Costa Mastrangelo Coelho. – Curitiba, 2020.

80 f. : il.

Orientador: Aleksander R. Zampronio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Endotelinas. 2. Estrogênios. 3. Hormônios - Imunologia. 4. Hormônios sexuais. 5. Febre. I. Título. II. Zampronio, Aleksander R. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 617.22



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
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 de dissertação de Mestrado de LETICIA COSTA MASTRANGELO COELHO intitulada: **FEBRE INDUZIDA POR ZIMOSAN E ÁCIDO POLIINOSÍNICO: POLICITIDILICO EM FÊMEAS: INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS SEXUAIS E PARTICIPAÇÃO DE ENDOTELINA-1**, sob orientação do Prof. Dr. ALEXSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Julho de 2020.

Assinatura Eletrônica

31/07/2020 11:10:40.0

ALEXSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/07/2020 13:21:17.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/08/2020 10:28:55.0

AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pglfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Criado e autenticado pelo SIOA-UFPR, com a seguinte identificação única: 48284

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 48284

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me permitir crescer e evoluir aprendendo com erros e acertos, com sua compreensão e tolerância.

À minha família, em especial meus pais, Carlos e Gláucia, meus avós Marlene e Amadeo e minha irmã Nathália, por todo amor e carinho, suporte, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, compreensão e abdicção durante toda a minha vida. Sem vocês a vida não teria sentido.

Ao Hernane, meu namorado, amigo, companheiro, pela paciência, amor, incentivo, conselhos e principalmente apoio durante a execução desse projeto, me ajudando, inclusive com a execução de alguns experimentos.

A todos os meus amigos da época do ensino médio e graduação, com um agradecimento especial à Thaís, minha melhor amiga, pela nossa amizade desde a nossa adolescência, por sempre estar ao meu lado me apoiando nos momentos felizes e tristes da vida. Nossa amizade é eterna, tenho certeza disso.

Aos meus parceiros de laboratório, Juliana, Isabela, Mariane e Luís, pelos ensinamentos, pelo suporte, pela ajuda. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Às minhas amigas Manuela e Heloísa, pelo auxílio e companheirismo nessa trajetória, por me incentivarem a não desistir.

Ao meu orientador Aleksander, pela oportunidade de execução desse trabalho, pelas ideias, pelo incentivo e pela confiança em dividir tantos ensinamentos.

À banca examinadora que aceitou participar e colaborar com o aprimoramento desse trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia e aos professores pesquisadores pelos ensinamentos.

À UFPR, pela formação primorosa tanto na graduação quanto na pós-graduação, por me permitir evoluir intelectualmente.

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos que de alguma maneira contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota d’água no mar. Mas, o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

(Madre Teresa de Caucatá)

RESUMO

É bem estabelecido, em dados de literatura, que os hormônios sexuais podem afetar as respostas inflamatória e imune. Mulheres geralmente demonstram ter maior reatividade imunológica quando comparadas a homens, uma vez que elas apresentam maior número circulante de linfócitos T e imunoglobulinas, são menos suscetíveis a infecções de origem bacteriana e parasitária. Porém, são as que mais sofrem de doenças relacionadas ao sistema imunológico, como doenças autoimunes e dores crônicas. As diferenças sexuais também podem afetar a resposta febril. Alguns estudos já demonstraram a influência dos hormônios sexuais sobre a resposta febril utilizando endotoxina bacteriana, denominado lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, como modelo de indução de febre em animais de laboratório. Contudo, pouco se sabe a respeito da influência hormonal sobre as respostas febris induzidas por outros padrões associados a patógenos (PAMPs), tais como o zimosan A (Zym) e o ácido poli-inosínico:policitidílico (Poli I:C) que representariam estímulos de origem fúngica e viral, respectivamente. Além disso, alguns estudos já demonstraram, em machos, que existem diferenças nas respostas febris induzidas por esses PAMPs em relação à liberação de citocinas e mediadores centrais. Entre estas diferenças, a endotelina-1 (ET-1) atua como mediador na resposta febril induzida por LPS e Zym, mas não por Poli I:C em machos. O objetivo desse estudo é investigar se os hormônios sexuais afetam a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C e o envolvimento de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por LPS, Zym e Poli I:C em ratas Wistar fêmeas. Os resultados revelaram que, semelhantemente ao LPS, a resposta febril induzida por Zym (3 mg/kg, i.p.) e Poli I:C (300 µg/kg, i.p.) é significativamente maior em fêmeas OVX quando comparadas à fêmeas falso-operadas. A suplementação estrogênica (17β-estradiol, 10 µg/kg, 5 d, s.c.) em ratas OVX reduziu as respostas febris induzidas por Zym e Poli I:C. Ainda, a administração do antagonista de receptor ET_B, BQ788 (3 pmol, 2 µL), diminuiu a resposta febril induzida por LPS (50 µg/kg, i.p.) somente em fêmeas com ciclo estral normal, mas não em fêmeas OVX. A injeção de BQ788 também não alterou as respostas febris induzidas por Zym e Poli I:C tanto em fêmeas falso-operadas quanto em OVX. Esses resultados sugerem que os hormônios sexuais, particularmente o estrogênio, reduzem a intensidade da febre induzida por Zym e Poli I:C, igualmente ao que também já foi relatado com a febre induzida por LPS em fêmeas. A ET-1, assim como em machos, participa como mediador na resposta febril por LPS somente em fêmeas falso-operadas, mas não na resposta febril induzida por Zym ou Poli I:C, independentemente da condição hormonal. Esses resultados reforçam a existência da influência dos hormônios sexuais femininos que possivelmente modulam a resposta febril e demonstram que a resposta febril envolve diferentes mediadores dependendo do agente patológico que a esteja causando bem como da condição hormonal do indivíduo em que ela ocorre.

Palavras-chave: endotelina-1, estrogênio, diferenças sexuais, resposta imune

ABSTRACT

It is well established that sex hormones can affect the immune and inflammatory response. Women generally show greater immunological reactivity when compared to men, as they have a larger number of circulating T lymphocytes and immunoglobulins, are less vulnerable to bacterial and parasitic infections. However, they have a superior prevalence of autoimmune diseases and chronic pain. These sex differences in immune response can also affect the febrile response. Several studies have already demonstrated the influence of sex hormones on the febrile response using bacterial endotoxin, such as lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria, as a model for inducing fever in laboratory animals. However, little is known about the hormonal influence on the febrile response induced by other pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as zymosan A (Zym) and polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) that would represent stimuli of fungal and viral origin, respectively. In addition, some studies have been shown, in males, that there are differences in the febrile response induced by these PAMPs in relation to the release of cytokines and even central mediators. For instance, endothelin-1 (ET-1), an important central mediator of LPS- and Zym-induced fever, do not participate in the febrile response induced by Poly I:C in males. The purpose of this study was to investigate if female sex hormones affect the febrile response induced by Zym and Poly I:C and the involvement of ET-1 as a mediator on fever induced by these PAMPs in females. The results revealed that, similarly to LPS, the febrile response induced by Zym (3 mg/kg, i.p.) and Poly I:C (300 µg/kg, i.p.) is significantly higher in ovariectomized (OVX) female rats compared to sham-operated female rats. Estrogen replacement (17β-estradiol, 10 µg/kg, 5 d, s.c.) in OVX females reduced Zym and Poly I:C-induced fever. In addition, the administration of the ET_B receptor antagonist BQ788 (3 pmol, 2 µL) reversed the febrile response induced by LPS (50 µg/kg, i.p.) in cycling females but not in OVX females. BQ788 did not change the febrile response induced by Zym or Poly I:C in both cycling and OVX females. These findings suggest that female sex hormones, and particularly estrogen, reduce the intensity of fever induced by Zym and Poly I:C, similarly as described to LPS. ET-1, as well as in males, participates of the febrile response induced by LPS in cycling females but not by LPS in OVX females, but not in the febrile response induced by Zym or Poly I:C, regardless of hormonal condition. These results reinforce the influence of female sex hormones in modulating the febrile response and show that the febrile response in females can involve different mediators depending on the agent that is causing it.

Keywords: endothelin-1, estrogen, sex differences, immune response

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Vias centrais relacionadas à resposta febril.....	20
FIGURA 2: Linha do tempo referente à primeira etapa dos experimentos.....	27
FIGURA 3: Linha do tempo referente ao tratamento persistente por 17 β -estradiol.....	27
FIGURA 4: Linha do tempo referente ao tratamento prévio utilizando BQ788.....	28
FIGURA 5: Ganho de massa corporal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	29
FIGURA 6: Temperatura corporal basal de ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	30
FIGURA 7: Resposta febril induzida por zimosan em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	31
FIGURA 8: Resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidílico em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	32
FIGURA 9: Efeito do tratamento persistente por 17 β -estradiol sobre a resposta febril induzida por zimosan em ratas ovariectomizadas.....	33
FIGURA 10: Efeito do tratamento persistente por 17 β -estradiol sobre a resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidílico em ratas ovariectomizadas.....	34
FIGURA 11: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	36
FIGURA 12: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por zimosan em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	38
FIGURA 13: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidílico em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – Anti-inflamatório não esteroidal
CINC – Fator quimiotático para neutrófilos
CCL3 – Proteína inflamatória de macrófago-1 α
COX – Ciclo-oxigenase
CRF – Fator liberador de corticotrofina
CXCL1 – Fator quimiotático para neutrófilos
DMH – Hipotálamo dorso medial
ET-1 – Endotelina-1
i.a. – intra-articular
i.c.v. – intracerebroventricular
IFN- γ – Interferon- γ
IL-1 α – Interleucina-1 α
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
IL-10 – Interleucina-10
i.m. – intramuscular
i.p. – intraperitoneal
L-PGDS – Lipocaína sintase
LPS – Lipopolissacarídeo
MnPO – Núcleo pré-óptico mediano
mPGES-1 – Prostaglandina E sintase-1
OVLT – Órgão vascular da lâmina terminal
OVX - Ovariectomizada
PAF – Fator de agregação plaquetária
PAMP – Padrão molecular associado a patógeno
PFPF – Fator pirogênico pré formado por macrófago
PG - Prostaglandina
PO/HA – Área pré-óptica do hipotálamo anterior
Poli I:C – Ácido poli-inosínico:policitidílico
PRR – Receptores de reconhecimento padrão
RANKL – Ligante do receptor-ativado de NF- κ B

RMR – Rafe bulbar rostral

s.c. - subcutâneo

SP – Substância P

TLR – Receptor do tipo *Toll*

TLR2 – Receptor do tipo *Toll* 2

TLR3 – Receptor do tipo *Toll* 3

TLR4 – Receptor do tipo *Toll* 4

TLR6 – Receptor do tipo *Toll* 6

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

Zym – Zimosan A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais	23
3.2. Drogas	23
3.3. Ovariectomia	23
3.4. Implante do registrador remoto de temperatura e avaliação da temperatura abdominal	24
3.5. Implante de cânula intracerebroventricular	25
3.6. Protocolos experimentais	26
3.7. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Avaliação de ganho de massa corporal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas	29
4.2. Avaliação da temperatura corporal basal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas	30
4.3. Avaliação da resposta febril induzida por Zym e Poli I:C entre ratas falso- operadas e ovariectomizadas	31
4.4. Efeito do tratamento persistente por 17 β -estradiol sobre a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em ratas falso-operadas e ovariectomizadas....	33
4.5. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas.....	35
4.6. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por Zym entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas	37
4.7. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por Poli I:C em ratas falso-operadas e ovarietomizadas.....	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Diferenças sexuais e influências hormonais sobre o sistema imunológico são bem conhecidas. Em comparação aos homens, mulheres apresentam uma resposta imune celular e humoral mais intensa, possuem maior número de linfócitos T circulantes, maiores níveis séricos de imunoglobulinas e são mais resilientes a infecções causadas por bactérias e parasitas. Possivelmente, essa maior reatividade do sistema imune feminino seja responsável pelo fato das mulheres apresentarem os maiores índices de doenças autoimunes, tais como, artrite reumatoide, *miastenia gravis*, esclerose múltipla e lúpus eritematoso. No caso do lúpus, a proporção é a mais desigual entre os sexos, de nove casos da doença em pacientes do sexo feminino para cada caso em pacientes do sexo masculino (NGO *et al.*, 2014; BOUMAN *et al.*, 2005; PENNEL *et al.*, 2012; OERTELT-PRIGIONE, 2011). Além disso, outros parâmetros relacionados ao sistema imunológico também diferem entre os sexos. No caso da dor, por exemplo, o processamento e a percepção parecem diferir entre homens e mulheres (MOGIL, 2020). Sorge e colaboradores (2015) demonstraram em estudos conduzidos em camundongos, que a participação de células do sistema imunológico na sinalização do estímulo doloroso difere entre os sexos. Enquanto em machos o processamento de dor parece depender de micróglia, em fêmeas há a participação de linfócitos T a fim de desenvolver hiperalgesia mecânica (SORGE *et al.*, 2015). Essa diferença pode, em partes, justificar o fato de que as mulheres são mais sensíveis e menos tolerantes à dor e são as que mais sofrem de dores crônicas relacionadas a fatores imunológicos, como fibromialgia e migrânea (SORGE E TOSTCH, 2017; DOYLE E MURPHY, 2017).

De mesmo modo, diferenças sexuais também afetam o controle da temperatura corporal e resposta febril. A temperatura corporal de mulheres pode variar de 0,3 a 0,5°C dependendo da fase do ciclo menstrual. Além disso, a ativação de mecanismos de perda de calor parece ser diferente entre homens e mulheres, uma vez que mulheres expostas ao calor, por exemplo, demoram mais tempo para iniciar o processo de sudorese e apresentam uma quantidade menor de suor em comparação aos homens. Ademais, mulheres após menopausa geralmente demonstram transtornos relacionados à

termorregulação, denominados ondas de calor que consistem em vasodilatação abrupta, suor e sensação intensa de calor (KACIUBA-USCILKO E GRUCZA, 2001). Em relação à resposta febril, alguns estudos em animais já demonstraram que a febre induzida por endotoxina bacteriana é diferente entre os sexos, sendo que fêmeas apresentaram uma resposta febril significativamente menor em comparação aos machos (MURAKAMI E ONO, 1987; TAYLOR *et al.*, 2005; ASHDOWN *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2016). Também foi relatado que fêmeas apresentaram menor tempo de duração de sintomas relacionados à resposta febril, como letargia, ptose, encolhimento corporal e piloereção, menores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e maiores níveis circulantes de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina(IL-)10 e elevados níveis séricos de glicocorticoides em comparação aos machos, após desafio imunológico (CAI *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2005). Todas essas diferenças sexuais citadas até o presente momento são justificadas pela influência dos hormônios sexuais. Brito e colaboradores (2016) demonstraram que ratas ovariectomizadas (OVX) possuem uma resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) mais intensa em comparação a ratas falso-operadas com ciclo estral normal (BRITO *et al.*, 2016). Além disso, esses autores demonstraram que ratas OVX que receberam tratamento persistente por 17β -estradiol tiveram redução significativa da resposta febril, demonstrando que existe uma possível regulação hormonal sobre a febre e que o estrogênio parece desempenhar um importante papel sobre essa redução na resposta febril (BRITO *et al.*, 2016). A influência hormonal também já foi relatada em ratas prenhas, que após a administração de LPS, apresentaram supressão de febre (MARTIN *et al.*, 1995; ASHDOWN *et al.*, 2006; FOFIE E FEWELL, 2003).

A resposta febril é definida como um aumento controlado da temperatura corporal, iniciado a partir da elevação do ponto de regulação da temperatura corporal localizado no hipotálamo, mais precisamente na área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA), em resposta a uma inflamação ou processo infeccioso (KLUGER, 1991; ROTH E DE SOUZA, 2001; CANNON, 2011). Esta resposta tem como objetivo estimular mecanismos de defesa do hospedeiro através da redução de replicação e eliminação de micro-organismos invasores

e também através do aumento da efetividade de células imunes (CANNON, 2011). Sua estimulação e manutenção envolvem uma interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central (CANNON, 2001; EVANS *et al.*, 2015). A administração de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* em animais de laboratório é considerada um dos modelos clássicos de indução de resposta febril a fim de mimetizar o que ocorre em processos infecciosos de origem bacteriana. A detecção de um processo infeccioso por células imunes inicia-se a partir da ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) a receptores de reconhecimento de padrão (PRR) denominados receptores do tipo *Toll* (TLR). Os receptores TLR reconhecem componentes estruturais de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e vírus com o propósito de sinalização e ativação de respostas inflamatórias. Podem estar localizados na membrana plasmática ou em compartimentos intracelulares dependendo do tipo de receptor TLR recrutado (MILLER *et al.*, 2005). O LPS estimula receptores do tipo TLR4 em células da imunidade inata, especialmente macrófagos, iniciando uma via de transdução de sinal através de cascata de quinases que leva a ativação transcripcional do fator nuclear (NF- κ B) e conseqüentemente a indução da síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias que atuam levando a mensagem do local de inflamação/infecção à área PO/HA culminando na promoção de resposta febril (GAY *et al.*, 2006; KLUGER, 1991). Dentre as citocinas identificadas que atuam sobre a resposta febril encontram-se as IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , interferons β e γ , fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas 1 (CINC-1 ou quimiocina CXCL1), ligante do receptor-ativador de NF- κ B (RANKL), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α (quimiocina CCL3) e MIP-1 β (quimiocina CCL4) e fator de agregação plaquetária (PAF) (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; DINARELLO *et al.*, 1988; HANADA *et al.*, 2009; KLUGER, 1991; MINANO *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 2008; STEINER E ROMANOVSKY, 2015; ZAMPRONIO *et al.*, 2015; ZAMPRONIO *et al.*, 1994), sendo que algumas delas parecem ser geradas diretamente no sistema nervoso central (RANKL, CXCL1, CCL3) enquanto outras podem ser geradas periféricamente. Uma vez geradas, essas citocinas levariam a síntese/liberação de mediadores pirogênicos centrais como prostaglandinas E₂, D₂ e F_{2 α} (COELHO *et al.*, 1993; GAO *et al.*, 2009; MILTON, 1989), fator liberador de corticotrofina (CRF) (ROTHWELL, 1989), opióides

endógenos (FRAGA *et al.*, 2008), substância P (SP) (REIS *et al.*, 2011), endotelina-1 (ET-1) (FABRICIO *et al.*, 1998) e endocanabinóides endógenos (FRAGA *et al.*, 2016) resultando em um reajuste do termostato hipotalâmico que passaria a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5 – 37°C. Esse aumento de temperatura corporal se deve à desinibição de regiões caudais hipotalâmicas responsáveis pela indução de mecanismos de produção e retenção de calor, tais como vasoconstrição periférica, ativação de tecido adiposo marrom e tremor muscular (CANNON, 2011).

Como mencionado anteriormente, o modelo mais utilizado para o estudo da resposta febril em animais é a administração intraperitoneal de LPS. Porém, existem outros modelos de indução de resposta febril menos explorados, como a administração de Zimosan A (Zym) e de ácido poli-inosínico: policitidílico (Poli I:C) nos quais quando comparados ao LPS, os mediadores centrais e mecanismos relacionados à resposta febril são menos conhecidos, especialmente quando se trata de fêmeas. O Zym é um complexo proteína-carboidrato derivado de parede celular de fungo (*Saccharomyces cerevisiae*) grandemente utilizado como ferramenta laboratorial em experimentação animal na indução de condições inflamatórias como, por exemplo, artrite. O Zym é reconhecido por células de defesa do hospedeiro através de sua ligação a receptores TLR2, que se dimeriza com receptores TLR6, sendo também utilizado em menores proporções, para fins de mimetizar uma indução de resposta febril de origem fúngica (KANASHIRO *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2013; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017). Por sua vez, o Poli I:C é um análogo sintético de RNA de dupla cadeia, estrutura conhecida como sendo exclusivamente viral, reconhecida por células da imunidade inata por receptores TLR3 e bastante utilizada como modelo em animais a fim de mimetizar uma infecção aguda por vírus e indução de resposta febril de origem viral (GUHA-THAKURTA E MAJDE, 1997; TRAYNOR *et al.*, 2004; MEYLAN E TSCHOOP, 2006; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; FLANNERY *et al.*, 2018). A importância de se estudar outros tipos de PAMPs, além do LPS, se deve a particularidade das respostas inflamatórias induzida por eles. Nosso grupo demonstrou recentemente, em ratos machos, que a administração de LPS, Zym e Poli I:C possui similaridades na indução da liberação de determinadas citocinas

inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, porém, o padrão de liberação e o tempo em que ocorrem após a injeção do PAMP pode ser diferente. Além disso, a resposta febril induzida por LPS aparenta ser mais intensa, e também, a liberação de determinados tipos de citocinas, como INF- γ , e a participação de determinados tipos de mediadores centrais também é diversa, culminando em diferentes perfis de respostas febris induzidos nos animais (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015).

Em relação aos mediadores centrais envolvidos na resposta febril, as prostaglandinas desempenham um papel principal na participação da indução de febre, sendo as mais estudadas e mais importantes sobre esse aspecto, consideradas como principal alvo terapêutico dos medicamentos antitérmicos. São derivadas a partir do ácido araquidônico (advindo de fosfolípidos de membrana celular) e sintetizadas através da ação da enzima ciclooxigenase (COX). A enzima COX possui duas isoformas, sendo a COX1 considerada constitutivamente expressa em vários tipos de células em diferentes tecidos, enquanto a COX2 é constitutivamente expressa em certas regiões e sua expressão é induzida por condições inflamatórias e câncer. Além da COX, existem outras enzimas que participam na formação de prostaglandinas, entre elas a PGE sintase 1 (mPGES-1), responsável pela formação de PGE₂ e a lipocalina sintase PGD (L-PGDS) formando PGD₂. Ambas, COX2 e mPGES-1, expressas em células endoteliais cerebrais são importantes para indução da resposta febril, por sintetizarem prostaglandinas a nível cerebral, entretanto, sabe-se que prostaglandinas formadas periféricamente também podem induzir febre, através do órgão vascular da lâmina terminal (OLVT), uma região mais permeável da barreira hemato-encefálica e envolvida na geração de febre (MITCHELL E KIRKBY, 2019; ENGBLOM *et al.*, 2003; LAZARUS *et al.*, 2007; USHIKUBI *et al.*, 1998; SIMM *et al.*, 2016). A participação de PGE₂ e do receptor EP₃ são essenciais para a indução de febre. O receptor EP₃ é expresso no núcleo pré-óptico mediano (MnPO), considerada a área hipotalâmica mais sensível às ações pirogênicas de PGE₂ (LAZARUS *et al.*, 2007; SCAMMELL *et al.*, 1996). Os neurônios que expressam receptores EP₃ no MnPO são neurônios inibitórios gabaérgicos que inibem vias descendentes responsáveis pelo aumento da temperatura corporal. Ao serem ativados, os

receptores EP₃ que são acoplados à proteína Gi, inibem neurônios gabaérgicos, promovendo desinibição de vias descendentes, tais como o hipotálamo dorso medial (DMH) e rafe bulbar rostral (RMR), estimulando respostas de produção e retenção de calor através de vasoconstrição cutânea e ativação de tecido adiposo marrom (NAKAMURA, 2011). Dados referentes a outros mediadores centrais que participam da resposta febril como a ET-1, por exemplo, são mais escassos.

A ET-1 é o principal membro da família das endotelinas, formada a partir da clivagem de pré-pró-endotelina, que posteriormente origina um peptídeo intermediário denominado pró-endotelina. A ET-1 é sintetizada pela ação da enzima conversora de endotelina sobre a pró-endotelina (STELLA, 1997). Conhecida por sua potente ação vasoconstritora, também atua como importante mediador inflamatório por aumentar permeabilidade vascular, aumentar a expressão de moléculas de adesão ao endotélio, bem como induzir degranulação celular. Exerce suas funções através de sua ligação com receptores acoplados à proteína G, denominados ET_A e ET_B. Ambos receptores induzem aumento de Ca²⁺ intracelular, advindo primariamente do meio extracelular, através de mecanismos voltagem-independente por canais de cálcio operado por receptores (receptor-operated channels) e canais de cálcio operados por reserva (store-operated channels). Além disso, ET-1 induz sinalização através da ativação (ET_A) ou inibição (ET_B) de via adenilato ciclase. ET_A medeia principalmente vasoconstrição arterial, enquanto ET_B pode induzir vasodilatação de artérias ou vasoconstrição de vasos. A vasoconstrição via ET_B parece ser mais proeminente em veias (YANAGISAWA *et al.*, 1988; HOUDE *et al.*, 2016). ET-1 tem importante relação com a patogênese de doenças que envolvam processos inflamatórios, como asma, sepse e hipertensão pulmonar. Além disso, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α (FABRICIO *et al.*, 1998). Em 1998, Fabricio e colaboradores identificaram, pela primeira vez, a participação de ET-1 como mediador central sobre resposta febril, uma vez que além do fato de que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de ET-1 induzir, *per se*, febre, a resposta febril induzida por LPS, em machos, foi atenuada após injeção i.c.v. do antagonista de receptor ET_B, BQ788, e não foi reduzida após administração

do antagonista de receptor ET_A , BQ123, demonstrando que, possivelmente, somente o receptor ET_B estaria envolvido na geração de resposta febril (FABRICIO *et al.*, 1998). Estudos posteriores demonstraram que, apesar de ET-1 aumentar os níveis de prostaglandinas a nível central, o tratamento com inibidores de COX não alterou a resposta febril induzida por ET-1, sugerindo que a indução de febre por ET-1 é independente da ação de prostaglandinas (FABRICIO *et al.*, 2006). Outros estudos também evidenciaram a atividade pirogênica de ET-1 (FRAGA *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2008; FRAGA *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2020). Portanto, compilando dados reportados em literatura, baseados em estudos conduzidos em machos, sobre regulação da resposta febril, sugere-se que haja duas vias importantes na indução de febre, sendo elas: as vias dependente e independente da produção de prostaglandinas. A via dependente de produção de prostaglandinas seria ativada após a síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e quimiocinas que estimulariam a síntese/liberação de PGE $_2$, PGF $_{2\alpha}$ e CRF. Por sua vez, a via independente de produção de prostaglandina estaria relacionada com a síntese/liberação do fator pirogênico pré formado por macrófagos (PFPP) e quimiocinas que estimulariam a síntese/liberação de ET-1 e opióides endógenos, conforme demonstrado na Figura 1.

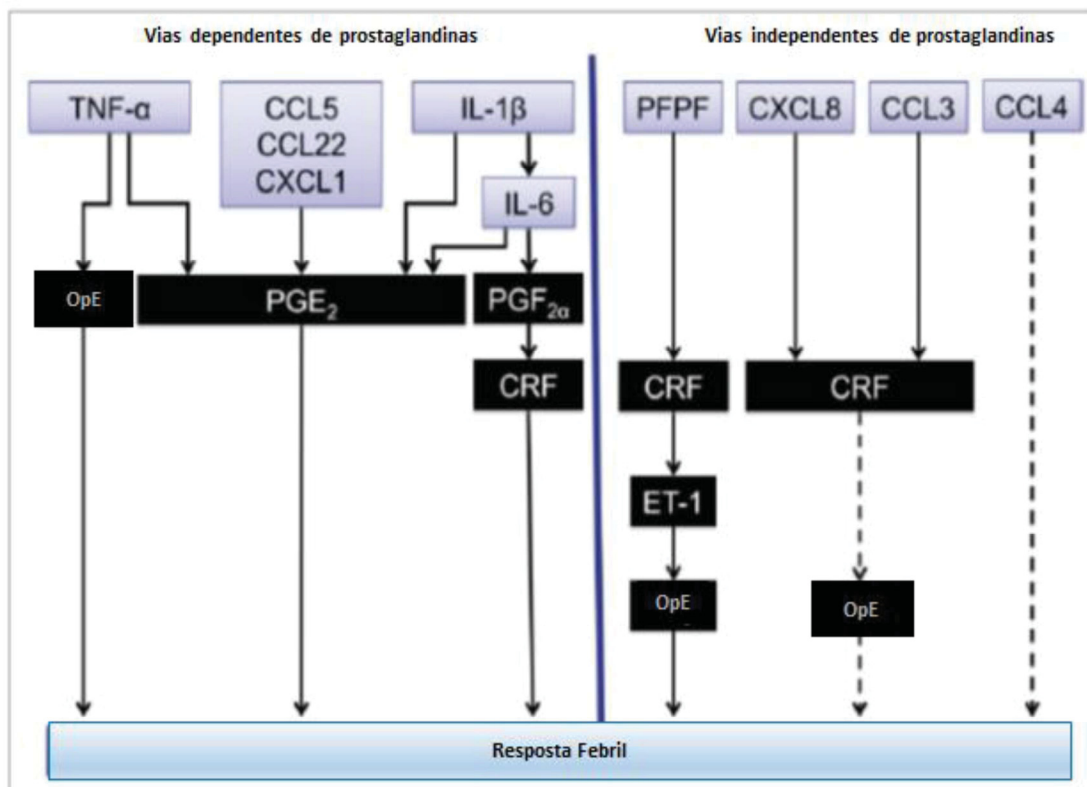


Figura 1: Vias centrais relacionadas à indução de resposta febril. O lado esquerdo da figura demonstra a via dependente de produção de prostaglandinas, iniciada a partir da síntese/liberação de IL-1 β , IL-6, TNF- α e quimiocinas (CCL5, CCL22 e CXCL1) com posterior estimulação da liberação de PGE₂, PGF_{2 α} e CRF. O lado direito da figura demonstra a via independente da produção de prostaglandinas, iniciada a partir da síntese/liberação de PFPP e quimiocinas (CXCL8, CCL3 e CCL4) que levariam a síntese/liberação de ET-1 e opióides endógenos. As linhas tracejadas representam as vias que não foram investigadas. (Adaptado de Zampronio et al., 2015)

Bastos-Pereira e colaboradores demonstraram recentemente, em machos, que ET-1 participa como mediador central na resposta induzida por Zym, assim como ocorre com a indução de resposta febril por LPS, e não participa da resposta febril induzida por Poli I:C, uma vez que a administração i.c.v. de BQ788 não foi capaz de reduzir a temperatura febril dos animais (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017). Assim, fica claro que diferentes tipos de PAMPs, utilizados com o propósito de mimetizar diferentes origens de patógenos, podem produzir diferentes mediadores e, portanto, diferentes respostas febris.

O estudo das vias envolvidas em respostas febris induzidas por diferentes PAMPs é importante porque além de nos proporcionar o melhor entendimento dos mecanismos complexos que estão relacionados à indução da resposta febril, pode nos permitir controlá-la de maneira mais eficaz dependendo da origem do processo infeccioso e também ajudar no desenvolvimento de novas terapias medicamentosas antipiréticas, uma vez que os antipiréticos utilizados são majoritariamente drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES) que atuam sobre a enzima COX a fim de inibir a síntese de prostaglandinas. Essa abordagem terapêutica, apesar de bastante eficaz, possui suas limitações dependendo da origem da condição patológica, como no caso de doenças negligenciadas, tais como dengue e malária, por exemplo. Além disso, a maior parte dos estudos sobre resposta febril é executada em machos. Uma vez que os hormônios sexuais podem influenciar aspectos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos, mulheres são as que mais sofrem com reações adversas de medicamentos por quase não serem incluídas em estudos clínicos e pré-clínicos (FRANCONI *et al.*, 2007).

Assim, o presente estudo tem o objetivo de investigar se os hormônios sexuais femininos, especialmente o estrogênio, influenciam a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em fêmeas. Também, considerando a distinção do envolvimento de ET-1 na participação da resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em machos, avaliamos a participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por LPS, Zym e Poli I:C em fêmeas e se essa participação pode estar sob influência dos hormônios sexuais femininos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em ratas falso-operadas e OVX a fim de verificar possíveis influências hormonais (estrogênicas) sobre essas respostas e também avaliar a participação de endotelina-1 como mediador central na resposta febril induzida pelos PAMPs: LPS, Zym e Poli I:C.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as respostas febris induzidas por Zym e Poli I:C em ratas falso-operadas e OVX.
- Avaliar se o tratamento persistente por 17β -estradiol em ratas OVX modifica as respostas febris induzidas por Zimosan e Poli I:C.
- Avaliar a participação de ET-1 como mediador central nas respostas febris induzidas por LPS, Zym e Poli I:C em fêmeas falso-operadas e OVX.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, fêmeas com 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro: 12 h), com livre acesso à ração e água e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. O número (n) amostral de animais utilizados para a execução deste trabalho foi obtido através de cálculo estatístico pelo programa GPower. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) sob o número de aprovação 1192 e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Drogas

- 17 β -estradiol-3-benzoato (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c., Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Ácido poli-inosínico: policitidílico (Poli I:C) (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., Sigma Aldrich, St Louis, EUA).
- BQ-788 (3 pmol/2 μL i.c.v, Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Cetamina (90 mg/kg i.p, Syntec, São Paulo, BR);
- Cetoprofeno (10 mg/kg i.p., Medley, São Paulo, BR);
- Isoflurano (BioChimico Ind. Farm, LTDA., Rio de Janeiro, BR);
- Lipopolissacarídeo (LPS) (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Oxitetraciclina (400 mg/kg i.m., Pfizer, São Paulo, BR);
- Solução injetável de lidocaína a 2% e noradrenalina 1:50000 (Cristália Prod. Quim. Farm. LTDA, São Paulo, BR);
- Xilazina (10 mg/kg i.p., Syntec, São Paulo, BR);
- Zimosan A (Zym) (3 mg/kg i.p., Sigma Aldrich, St Louis, EUA);

3.3. Ovariectomia

A fim de estudar as influências hormonais, realizamos o procedimento de retirada dos ovários dos animais (ovariectomia) com o propósito de indução

de menopausa (redução de níveis séricos de hormônios sexuais femininos), de acordo com Iwasa e colaboradores (2014). Para tanto, os animais foram pesados e anestesiados com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.). A seguir, os procedimentos de tricotomia e assepsia foram realizados na região ventral desses animais, para posterior laparotomia de aproximadamente dois centímetros na linha mediada. As trompas foram atreladas a um fio de sutura, os ovários foram isolados e retirados após ligadura, e por fim, a incisão foi suturada. As fêmeas falso-operadas passaram pelo mesmo procedimento de laparotomia na região ventral, porém, suas trompas e ovários não foram manuseados. Os animais receberam oxitetraciclina (400 mg/kg, i.m.) durante a execução do procedimento cirúrgico como profilaxia e cetoprofeno (10 mg/kg, i.p.) durante e após um dia do procedimento a fim de minimizar desconfortos. Três semanas depois, foi realizado o procedimento de lavagem vaginal, de acordo com Marcondes e colaboradores (2002), em fêmeas ovariectomizadas a fim de comprovação do anestro (ausência de hormônios sexuais femininos) e também nas fêmeas falso-operadas para comprovação de que permaneceram com ciclo estral normal. O lavado vaginal foi efetuado através da utilização de uma pipeta com ponteira de plástico contendo 10 µL de solução salina (cloreto de sódio a 0,9%). A ponteira foi introduzida no orifício vaginal e a solução foi injetada, aspirada e depositada sobre lâmina para microscópio para posterior visualização e análise. A avaliação do lavado vaginal foi realizada em todas as fêmeas, com antecedência de três dias do experimento consecutivamente, e após a realização do experimento. As fêmeas ovariectomizadas que apresentaram alteração de seu lavado vaginal, ou fêmeas falso-operadas que não apresentaram ciclo estral normal (estagnação em uma fase determinada do ciclo) foram excluídas desse estudo.

3.4. Implante do registrador remoto de temperatura e avaliação da temperatura abdominal

Com antecedência de uma semana dos experimentos, fêmeas falso-operadas e ovariectomizadas foram anestesiadas com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.) para implantação dos registradores remotos de medida de temperatura corpórea (Subcue Dataloggers, Calgary, Canadá). A implantação consistiu em tricotomia e assepsia de pele e posterior incisão de pele e de

musculatura para inserção desses registradores (DE SOUZA *et al.*, 2002). Os registradores foram previamente programados para iniciar as respectivas leituras de temperatura corpórea dos animais no dia do experimento, começando sempre às 7h da manhã e finalizando 6h após a injeção do pirógeno exógeno. Para implantação, os registradores obtiveram seus pontos de conexão com o computador vedados com silicone biocompatível e passaram por processo de assepsia, sendo imersos em água sanitária 10% por no mínimo uma hora antes da execução da cirurgia nos animais. Posteriormente, foram imersos em solução salina estéril imediatamente a implantação na cavidade abdominal dos animais. Após colocação dos registradores, os animais receberam oxitetraciclina (400 mg/kg, i.m.) durante a execução do procedimento cirúrgico como profilaxia e cetoprofeno (10 mg/kg, i.p.) durante e um dia após a cirurgia para minimização de desconforto proveniente do processo cirúrgico.

3.5. Implante de cânula intracerebroventricular

A cirurgia de implante de cânula para injeção intracerebroventricular foi realizada com o propósito de administração do antagonista de receptores ET_B, BQ788. Executada sob mesmo procedimento anestésico descrito acima e realizada juntamente com a cirurgia de implante de registradores remotos de medição de temperatura, cânulas de aço inoxidável, preparadas a partir de agulhas descartáveis foram moldadas em dimensões de 0,8 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento e implantadas estereotaxicamente no ventrículo lateral direito dos animais de acordo com as coordenadas de 1,6 mm lateral à linha média, 1,5 mm posterior ao bregma e 2,5 mm sob a superfície do cérebro, com barra incisal à 3,3 mm abaixo do zero horizontal (PAXINOS E WATSON, 2006).

Para tanto, após tricotomia e assepsia de pele, os animais foram imobilizados no aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900 – EUA) e receberam 0,1 mL de solução de lidocaína com noradrenalina, aplicada por via subcutânea na parte superior do crânio, a fim de diminuição de sangramento local. Em seguida, foi realizada uma incisão resultando na exposição da calota craniana, remoção do periósteo e localização do bregma. A partir do bregma, a

cânula foi implantada de acordo com as coordenadas anteriormente citadas. Após instalação da cânula, sua fixação foi realizada utilizando prótese de acrílico auto-polimerizável, com auxílio de um parafuso de aço inoxidável implantados na calota craniana. E após secagem do acrílico, um mandrão foi introduzido na cânula para evitar seu entupimento, sendo retirado às 7h da manhã, no dia do experimento. Os animais que apresentaram entupimento de cânula e conseqüentemente, não obtiveram o recebimento da droga, foram excluídos desse estudo.

3.6. Protocolos experimentais

O ganho de massa corporal de fêmeas falso-operadas e OVX foi calculado a partir da diferença de massa apresentada por fêmeas no dia da execução da cirurgia de ovariectomia e da massa apresentada por fêmeas um dia antes do experimento de febre. A determinação de variação de temperatura consistiu em, no dia anterior ao experimento, colocar os animais numa sala aclimatada na temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, considerada temperatura de termoneutralidade para ratos (GORDON, 1990) e mantê-los nessa temperatura até o fim do experimento. Entre as 9 e 11h da manhã, após duas horas do início dos registros de temperatura, os animais receberam por via intraperitoneal, os estímulos pirogênicos Zym (*Saccharomyces cerevisiae*, 3 mg/kg, i.p.), Poli I:C (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou LPS (*Escherichia coli*, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) e animais controle receberam somente salina. As dosagens administradas foram escolhidas de acordo com estudos anteriores em nosso laboratório, utilizando as doses capazes de induzir respostas febris sub-máximas (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2016). Após 6h, os animais foram eutanasiados com isoflurano, os registradores foram retirados da cavidade abdominal e os dados coletados no computador. A média das temperaturas basais dos animais foi calculada através da medida de quatro temperaturas anteriores à aplicação de qualquer estímulo pirogênico e utilizada com o propósito de calcular a variação de temperatura dos animais durante o experimento. Animais que apresentaram temperaturas corporais basais inferiores a $36,7^{\circ}\text{C}$ ou superiores a $37,5^{\circ}\text{C}$ foram excluídos desse estudo. O delineamento experimental referente a essa etapa foi realizado conforme Figura 1.

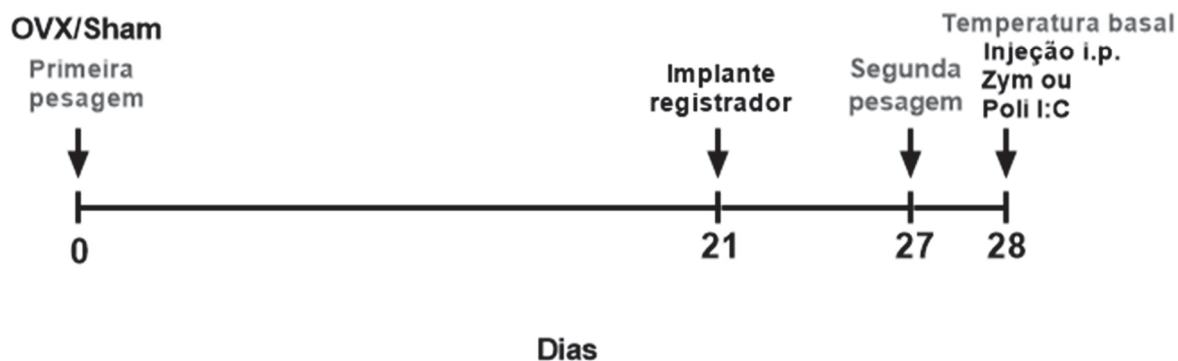


Figura 2: Linha do tempo referente à primeira etapa dos experimentos.

Em uma segunda etapa, conforme demonstrado na Figura 2, a fim de avaliarmos a influência do estrogênio sobre a resposta febril, fêmeas OVX receberam tratamento persistente por 17 β -estradiol (10 μ g/kg, s.c., por dia) durante 5 dias antes do experimento e animais controle receberam somente o veículo (óleo de amendoim). Foi realizado lavado vaginal para comprovação de que ratas suplementadas estavam com níveis elevados de estrogênio. Após o tratamento, as fêmeas foram submetidas ao experimento de indução de resposta febril e receberam as mesmas doses de Zym e Poli I:C descritas anteriormente ou o mesmo volume de salina via intraperitoneal e a temperatura corporal foi avaliada durante 6h.

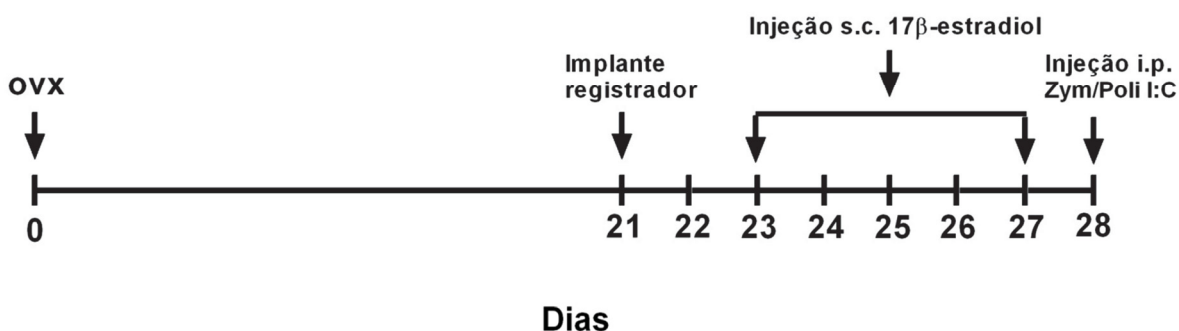


Figura 3: Linha do tempo referente ao tratamento persistente por 17 β -estradiol.

Posteriormente, conforme Figura 3, avaliamos a participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por Zym, Poli I:C e LPS em fêmeas falso-operadas e OVX. Ratas receberam um tratamento prévio com antagonista de receptores ET_B, BQ788 (3 pmol, 2 μ L, i.c.v.) ou o mesmo volume

de salina e após 30 minutos receberam os estímulos pirogênicos: Zym, Poli I:C, LPS ou veículo via intraperitoneal e a resposta febril foi avaliada por 6h.

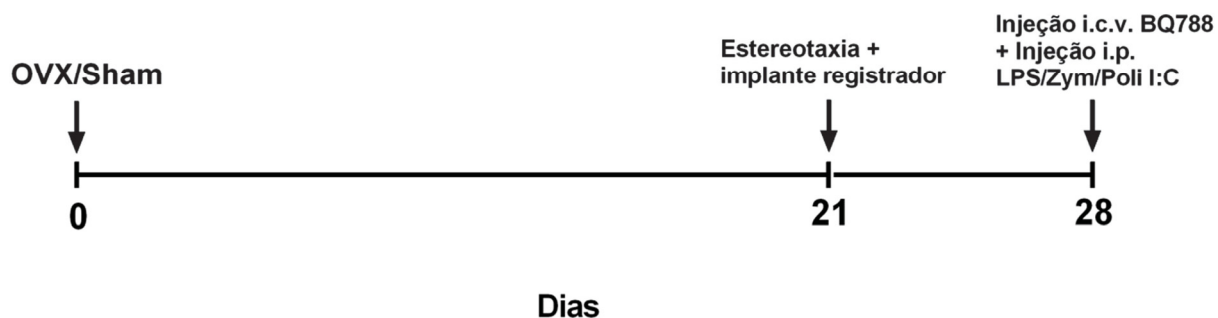


Figura 4: Linha do tempo referente ao tratamento prévio utilizando BQ788.

3.7. Análise estatística

Dados referentes à temperatura corporal basal e ganho de massa corporal foram analisados por teste t de Student. Por sua vez, dados referentes à resposta febril foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas por duas vias (Two-way) seguida de teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Todos os resultados foram expressos utilizando-se média \pm desvio padrão da média, analisados pelo programa GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA) e o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de ganho de massa corporal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A Figura 4 apresenta a comparação do ganho de massa corporal entre fêmeas falso-operadas (sham) e ovariectomizadas (OVX). Conforme demonstrado, ratas OVX obtiveram um ganho de massa superior às ratas sham, três semanas após a execução da cirurgia de ovariectomia. A média do ganho de massa de ratas sham foi de $9,543 \pm 1,296$ g enquanto a média do ganho de massa de ratas OVX foi de $32,24 \pm 2,216$ g. Houve diferenças significativas por teste t de Student ($F_{29,29} = 2,925$, $p < 0,0001$).

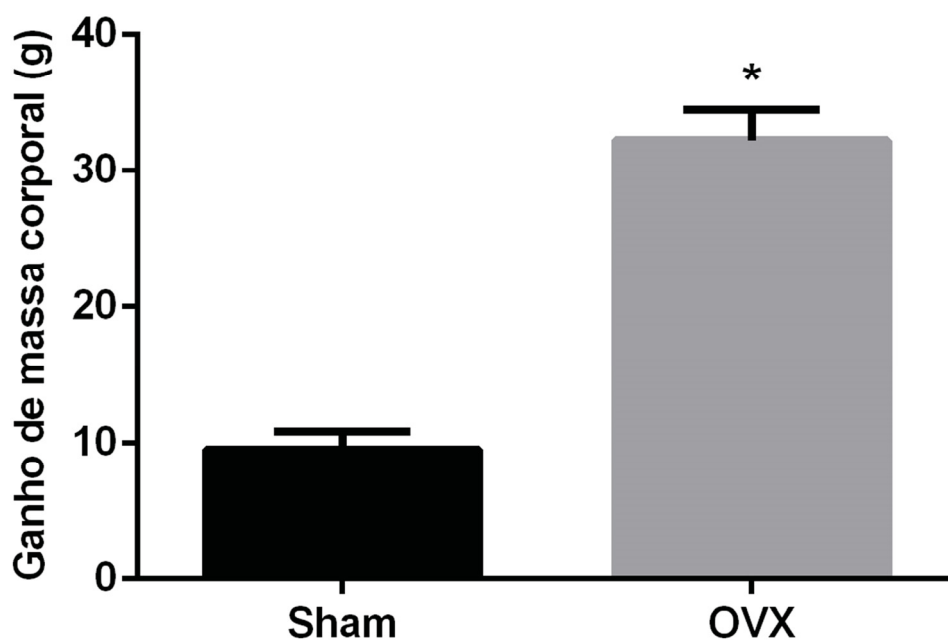


Figura 5: Ganho de massa corporal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram pesados anteriormente à execução da cirurgia de ovariectomia e um dia antes da realização do experimento de febre ($n = 30$). Os dados estão representados como média \pm e.p. da média do ganho de peso (g). * diferença em relação ao grupo falso-operado (sham), considerando $p \leq 0,05$.

4.2. Avaliação da temperatura corporal basal entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A avaliação da temperatura corporal basal dos animais foi realizada de acordo com a Figura 5. O gráfico de dispersão apresentado demonstra a diferença nas temperaturas basais, ou seja, a média de quatro medições de temperaturas (intervalos de 15 min) antes da realização de qualquer tratamento, de ratas falso-operadas (sham) e ratas OVX. Apesar das temperaturas estarem dentro da faixa de temperatura considerada normal (36,7 a 37,5°C), ratas OVX obtiveram temperaturas basais mais elevadas em comparação às ratas falso-operadas, antes da execução dos experimentos. A média das temperaturas basais dos animais sham foi de $37,14 \pm 0,03^\circ\text{C}$ e dos animais OVX foi de $37,30 \pm 0,02^\circ\text{C}$. Houve diferenças significativas por teste t de Student ($F_{69,69} = 1,627$, $p < 0,0001$).

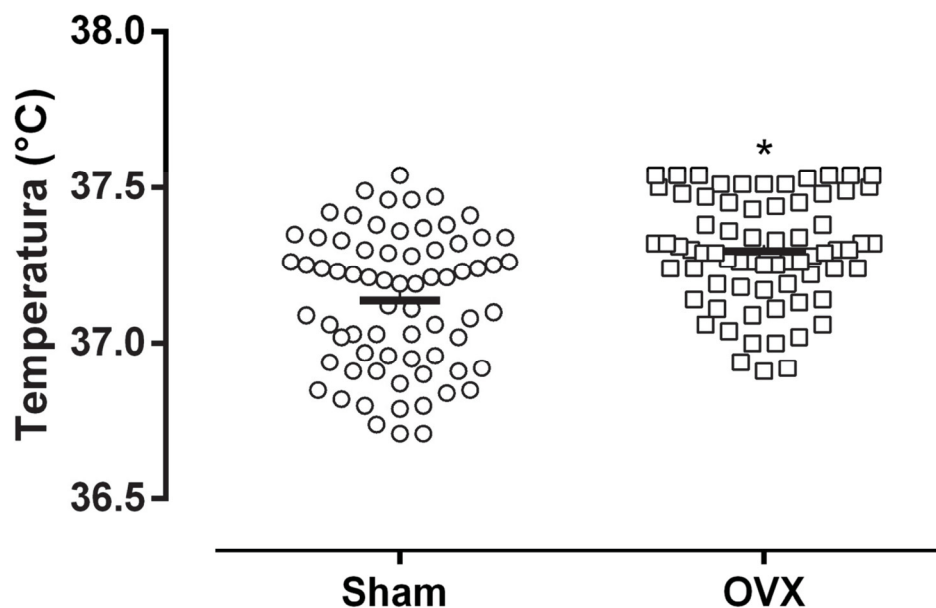


Figura 6: Temperatura corporal basal de ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram submetidos à cirurgia de implante de registradores de temperatura três semanas após a cirurgia de ovariectomia. Os registradores foram programados para iniciarem a leitura das temperaturas corporais dos animais uma semana após a cirurgia de implantação, às 7h da manhã. A temperatura basal dos animais foi avaliada durante 1h, em intervalos de 15 min, antes da administração de qualquer estímulo pirógeno. Os dados representam a dispersão da média de quatro temperaturas basais (°C) de cada um dos animais (n= 70). * diferença ao grupo falso-operado (sham) considerando $p \leq 0,05$.

4.3. Avaliação da resposta febril induzida por Zym e Poli I:C entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A injeção intraperitoneal de salina não alterou a temperatura corporal dos animais. Por sua vez, a administração de Zym provocou resposta febril em ambos os grupos (sham e OVX). A resposta febril induzida por Zym em ratas falso-operadas teve início em 1h e 45 min após a administração do PAMP, atingiu valores máximos em 3h e teve duração até 5,5h. Entretanto, a administração da mesma dosagem de Zym em ratas OVX induziu uma resposta febril mais intensa nesses animais, que também se iniciou em 1h e 45 min após injeção do PAMP, atingiu valores máximos em 3h, porém teve duração até o fim do experimento (6h). Diferenças significativas entre as respostas febris de sham e OVX foram observadas no pico das respostas, ou seja, entre 2h e 40 min a 3h e 45 min (Figura 6), com efeitos significativos para a interação por ANOVA ($F_{72,1152} = 17.15$, $p < 0.0001$).

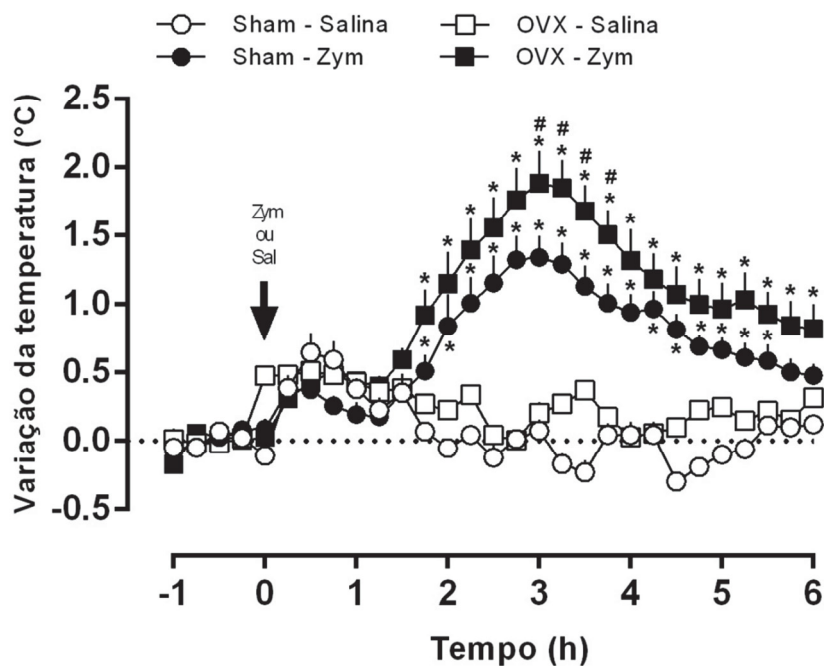


Figura 7: Resposta febril induzida por zimosan em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam Zym (3 mg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina (animais controle) e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=10-12$). *diferença aos respectivos grupos controle salina considerando $p \leq 0,05$. #diferença em relação ao grupo controle Sham-Zym considerando $p \leq 0,05$.

Em relação ao Poli I:C, sua administração via i.p. induziu resposta febril em ambos os grupos, sendo que ratas sham obtiveram uma resposta febril que se iniciou em 1h e 15 min e duração de 5h. Por sua vez, ratas OVX obtiveram uma resposta febril mais elevada em comparação às ratas sham, que também se iniciou em 1h e 15 min, atingiu níveis máximos em 3h, porém teve duração até o final do experimento (6h). ANOVA relevou efeitos significativos para a interação ($F_{72,792} = 4.149$, $p < 0.0001$) e as diferenças significativas entre as respostas febris apresentadas pelos grupos foram observadas comparando os picos das respostas, ou seja, nos tempos de 2,5h a 4h após injeção do PAMP (Figura 7).

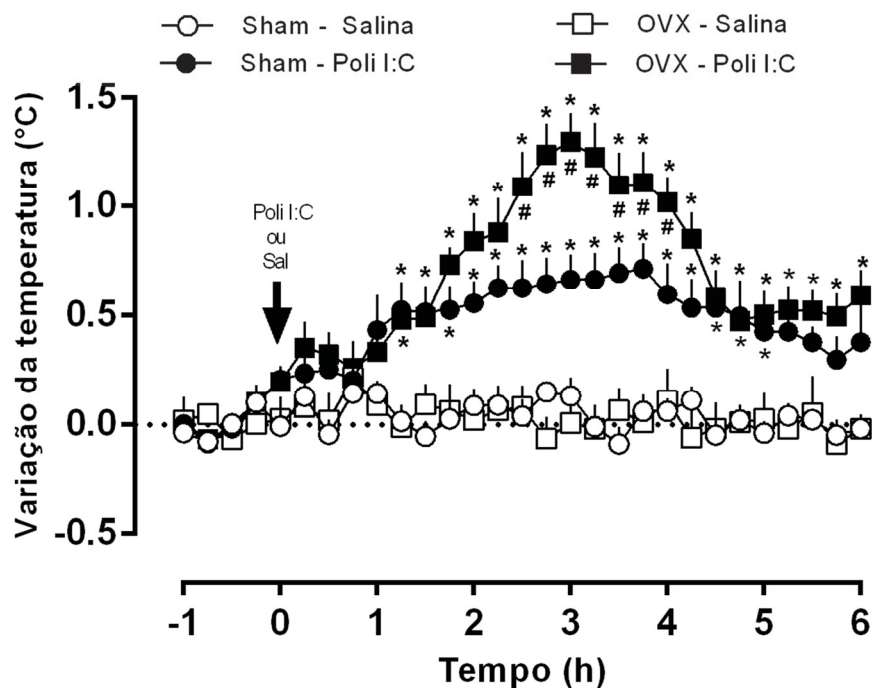


Figura 8: Resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidílico em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais receberam Poli I:C (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou o mesmo volume de salina (animais controle) e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=10-12$). *diferença aos respectivos grupos controle salina considerando $p \leq 0,05$. #diferença em relação ao grupo controle Sham-Poli I:C considerando $p \leq 0,05$.

4.4. Efeito do tratamento persistente por 17β -estradiol sobre a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A administração de ambos os veículos, óleo de amendoim e salina, não foram capazes de alterar a temperatura corporal dos animais. O tratamento persistente por 17β -estradiol, *per se*, não alterou a temperatura basal dos animais (dados demonstrados por estudos anteriores realizados pelo nosso grupo). A injeção i.p. de Zym provocou resposta febril em ambos os grupos. Fêmeas OVX tratadas com o veículo (óleo de amendoim) apresentaram resposta febril com início de 2h após a aplicação do PAMP, atingindo níveis máximos às 3h e com duração de até 6h. O tratamento persistente por 17β -estradiol reduziu a resposta febril de ratas OVX, que também iniciou-se em 2h, porém teve duração de somente 4h e 45 min após a aplicação de Zym. ANOVA revelou efeitos significativos para a interação ($F_{48,744} = 7.736$, $p < 0.0001$). As respostas febris apresentadas pelos grupos diferiram nos tempos de 2h e 45 min à 5h e 15 min (Figura 8).

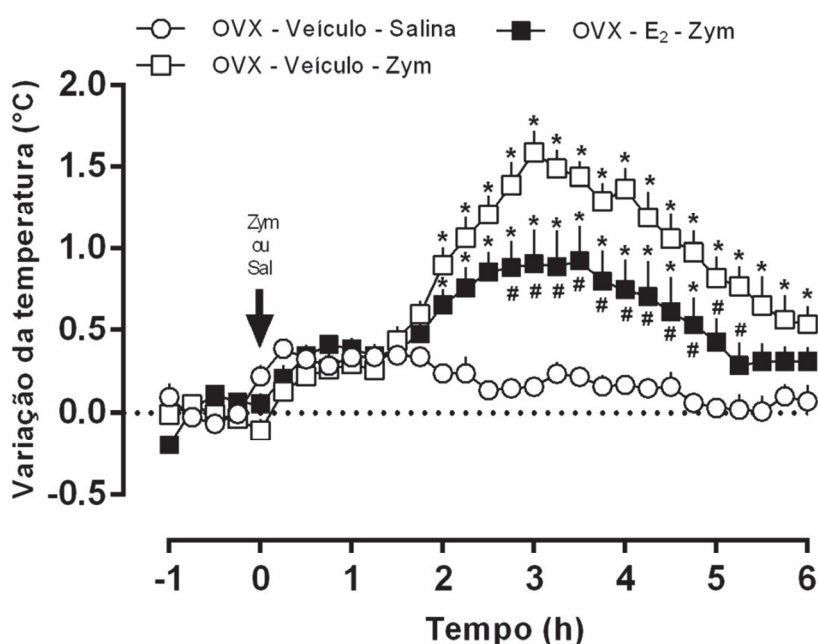


Figura 9: Efeito do tratamento persistente por 17β -estradiol sobre a resposta febril induzida por zimosan em ratas ovariectomizadas. Os animais OVX foram submetidos ao tratamento persistente utilizando 17β -estradiol (E_2 , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) ou o mesmo volume de veículo (óleo de amendoim) durante cinco dias. Um dia após o término do tratamento, os animais receberam Zym (3 mg/kg , i.p.) ou o mesmo volume de salina (animais controle) e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da

variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=10-12$). *diferença ao grupo controle (veículo-salina) considerando $p\leq 0,05$. #diferença em relação ao grupo OVX-Veículo-Zym considerando $p\leq 0,05$.

Em relação ao Poli I:C, sua administração também foi capaz de induzir resposta febril em ambos os grupos. Fêmeas OVX tratadas com veículo (óleo de amendoim) obtiveram uma resposta febril que teve início 1h e 45 min após injeção do PAMP e com duração de 6h. O tratamento persistente por 17β -estradiol foi capaz de reduzir a resposta febril apresentada por OVX, uma vez que apesar de iniciarem ao mesmo tempo, a duração foi de somente 5h e 15 min. ANOVA revelou efeitos significativos para a interação ($F_{48,744}= 7.314$, $p<0.0001$). As respostas febris entre os grupos diferiram nos tempos de 2h e 45 min à 4h após injeção de Poli I:C (Figura 9).

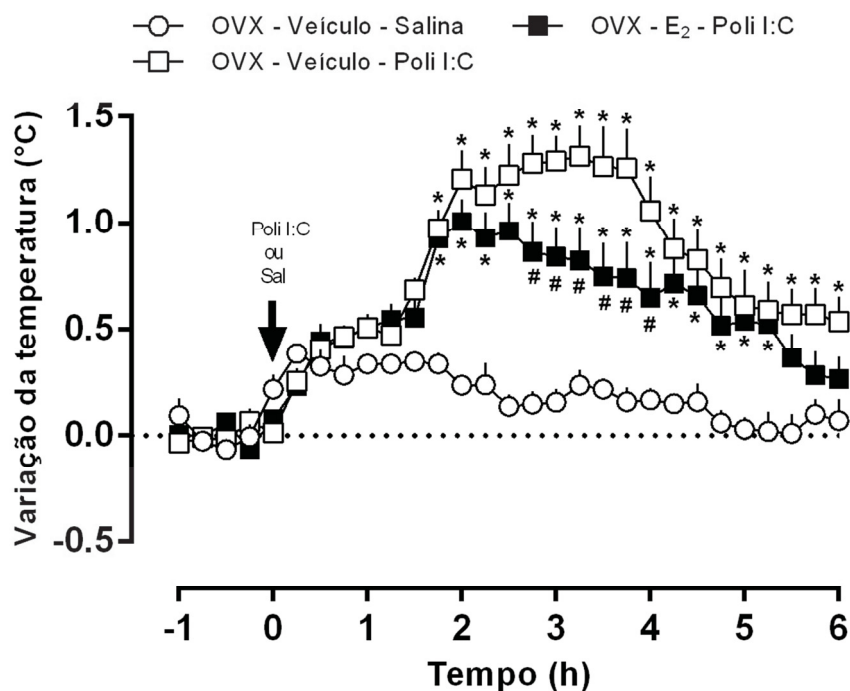


Figura 10: Efeito do tratamento persistente por 17β -estradiol sobre a resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidílico em ratas ovariectomizadas. Os animais OVX foram submetidos ao tratamento persistente utilizando 17β -estradiol (E_2 , $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) ou o mesmo volume de veículo (óleo de amendoim) durante cinco dias. Um dia após o término do tratamento, os animais receberam Poli I:C ($300 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou o mesmo volume de salina (animais controle) e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=10-12$). *diferença ao grupo controle (veículo-salina) considerando $p\leq 0,05$. #diferença em relação ao grupo OVX-Veículo-Poli I:C considerando $p\leq 0,05$.

4.5. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por LPS em ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A figura 10 apresenta o efeito da injeção i.c.v. do antagonista de receptor ET_B , BQ788, na resposta febril induzida por LPS em ratas falso-operadas (sham) e OVX. A administração per se de BQ788, não foi capaz de alterar a temperatura corporal dos animais. A aplicação i.p. de LPS induziu resposta febril em ambos os grupos, sendo que fêmeas sham apresentaram uma resposta febril que se iniciou em 2h, com duração até o final do experimento (6h), enquanto ratas OVX obtiveram uma resposta febril que se iniciou em 1h e 45 min, com duração de 6h. Como esperado, a resposta febril provocada por LPS foi mais elevada em ratas OVX quando comparadas com ratas sham. O pré-tratamento utilizando BQ788 foi capaz de reduzir a resposta febril, somente, de ratas sham (Figura 10A). ANOVA revelou efeitos significativos para a interação ($F_{48,504} = 6.334$, $p < 0.0001$). Diferenças significativas nas respostas febris entre fêmeas sham que receberam veículo ou BQ788 foram observadas nos tempos de 3h e 15 min e entre 4,5h e 5h e 45min. Por sua vez, o pré-tratamento utilizando BQ788 não foi capaz de surtir efeito sobre a resposta febril induzida por LPS em ratas OVX (Figura 10B). ANOVA revelou efeitos significativos para a interação ($F_{48,744} = 14.43$, $p < 0.0001$).

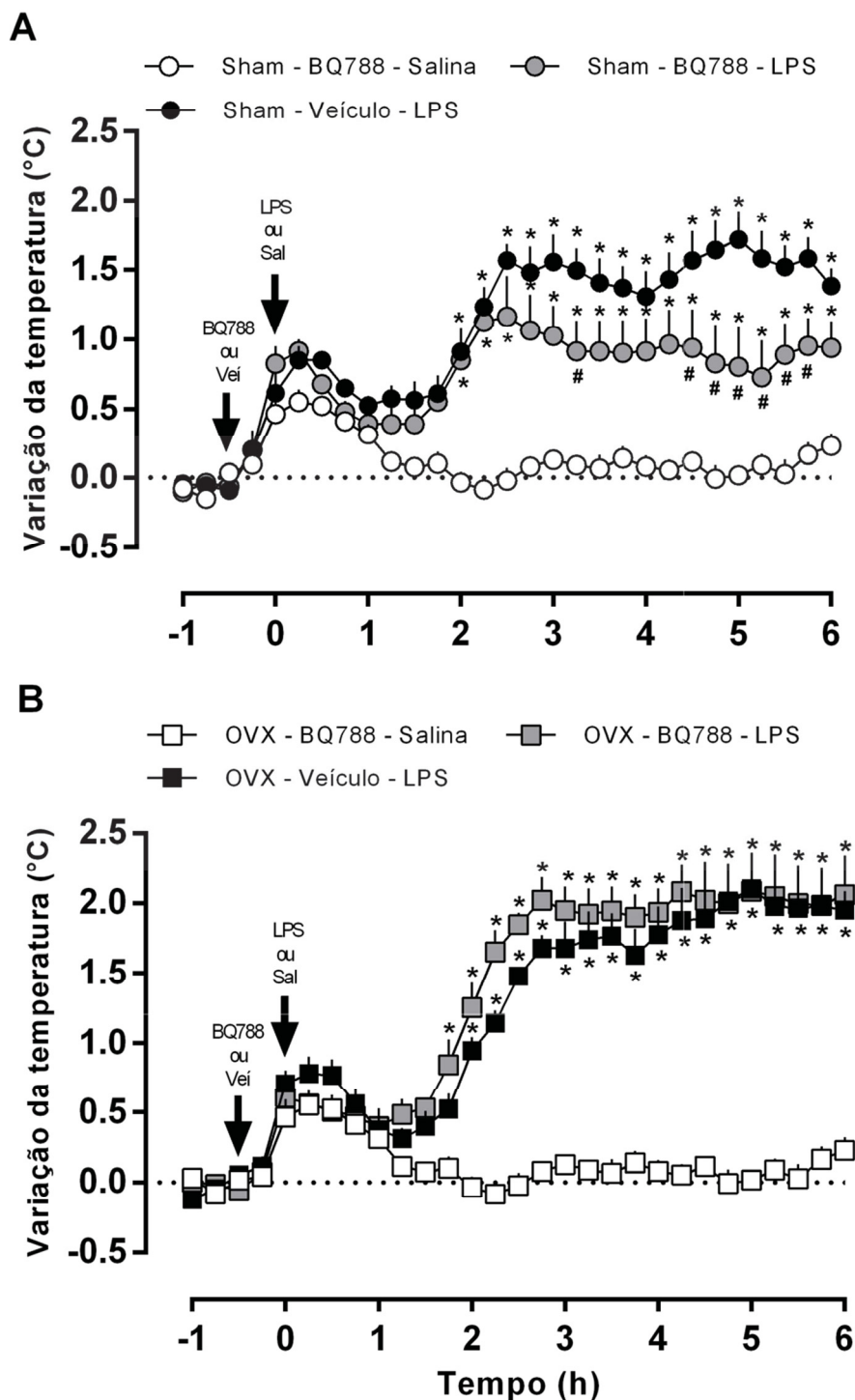


Figura 11: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram submetidos à injeção i.c.v. de BQ788 (3pmol/ 2 μ L) ou o mesmo volume de salina. Após 30 minutos, os animais receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=8). *diferença em relação ao grupo controle considerando $p \leq 0,05$. #diferença em relação ao grupo Sham-Veículo-LPS considerando $p \leq 0,05$.

4.6. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por Zym entre ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A Figura 11 demonstra o efeito da administração do antagonista de receptor ET_B , BQ788, sobre a resposta febril induzida por Zym em ratas falso-operadas (sham) e OVX. A injeção i.c.v. de BQ788 não foi capaz de alterar a temperatura corporal dos animais. Como esperado, a aplicação i.p. de Zym foi capaz de induzir resposta febril em ambos os grupos, sendo que ratas OVX obtiveram uma resposta febril mais elevada em comparação às ratas sham. O pré-tratamento com BQ788 não foi capaz de reduzir a resposta febril tanto de ratas sham (Figura 11A) quanto de ratas OVX (Figura 11B). ANOVA revelou efeitos significativos para a interação no experimento de fêmeas sham ($F_{48,552} = 2.827$, $p < 0.0001$) e também no experimento de fêmeas OVX ($F_{48,504} = 6.139$, $p < 0.0001$).

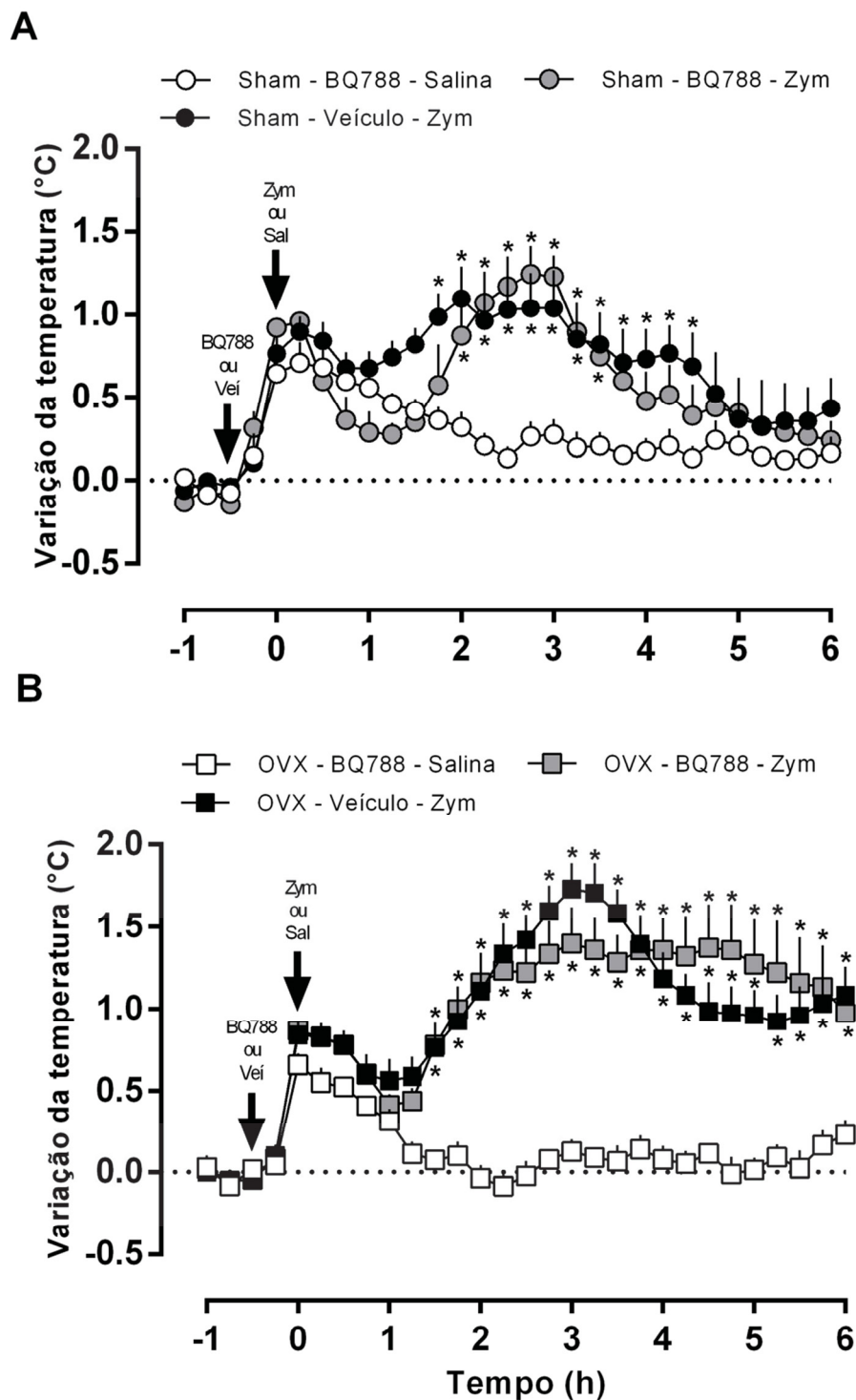


Figura 12: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por zimosan em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram submetidos à injeção i.c.v. de BQ788 (3pmol/ 2 μ L) ou o mesmo volume de salina. Após 30 minutos, os animais receberam Zym (3 mg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=8). *diferença em relação ao grupo controle considerando $p \leq 0,05$.

4.7. Participação de ET-1 como mediador central na resposta febril induzida por Poli I:C em ratas falso-operadas e ovariectomizadas

A Figura 12 apresenta o efeito da administração do antagonista de receptor ET_B , BQ788, sobre a resposta febril induzida por Poli I:C em ratas falso-operadas (sham) e OVX. A injeção i.c.v. de BQ788 per se não alterou a temperatura corporal dos animais. A aplicação i.p. de Poli I:C culminou em resposta febril em ambos os grupos. O pré-tratamento utilizando BQ788 não foi capaz de reverter a resposta febril tanto de ratas sham (Figura 12A) quanto de ratas OVX (Figura 12B). ANOVA revelou efeitos significativos para a interação no experimento de fêmeas sham ($F_{48,504} = 2.802$, $p < 0.0001$) e também no experimento de ratas OVX ($F_{48,504} = 4.444$, $p < 0.0001$).

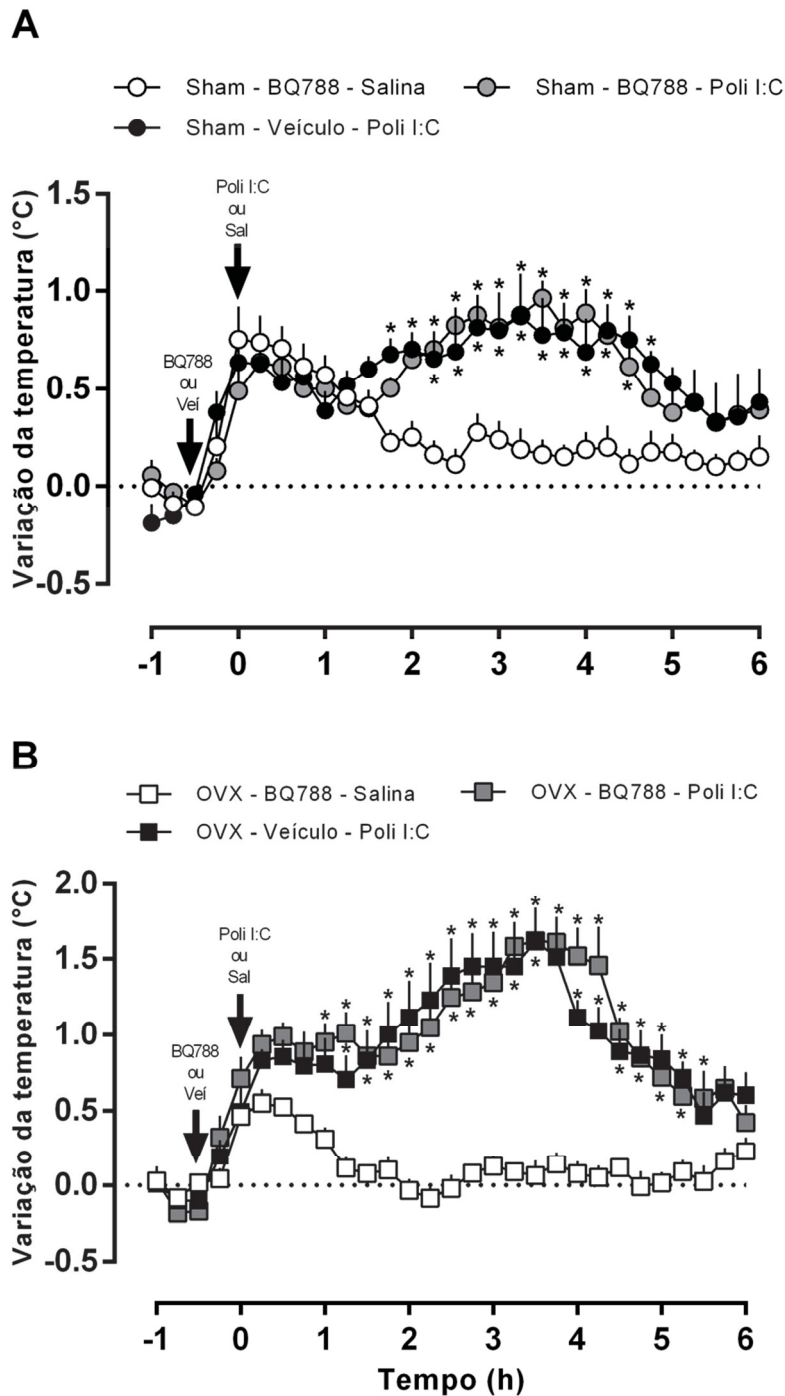


Figura 13: Efeito do tratamento por BQ788 sobre a resposta febril induzida por ácido poli-inosínico: policitidilíco em ratas falso-operadas e ovariectomizadas. Os animais foram submetidos à injeção i.c.v. de BQ788 (3pmol/ 2 μ L) ou o mesmo volume de salina. Após 30 minutos, os animais receberam Poli I:C (300 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina e a temperatura foi avaliada por 6h. Os dados estão representados como média \pm e.p. da média da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=8). *diferença em relação ao grupo controle considerando $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C é significativamente maior em ratas OVX quando comparadas com ratas ciclando randomicamente e esse aumento na temperatura febril pode estar sob influência de hormônios sexuais femininos, especialmente o estrogênio. Além disso, também demonstramos que ET-1 participa como mediador da resposta febril induzida por LPS somente em ratas falso-operadas ciclando randomicamente, mas não em ratas OVX. ET-1 não participa como mediador central na resposta febril induzida por Zym e por Poli I:C, tanto em ratas falso-operadas quanto em ratas OVX. Primeiramente, avaliamos se a ovariectomia alterou parâmetros como temperatura corporal basal e ganho de massa. A cirurgia de ovariectomia é uma técnica utilizada como modelo experimental de indução de menopausa, consistindo na interrupção da liberação dos hormônios sexuais femininos, tais como o estrogênio e a progesterona. Sabe-se que os hormônios sexuais estão envolvidos na regulação do metabolismo, apetite, homeostase energética, peso corporal e distribuição de tecido adiposo, portanto, a menopausa acarreta alterações fisiológicas que podem impactar negativamente a qualidade de vida de mulheres (IWASA *et al.*, 2018). Além de provocar os chamados “calorões” que são caracterizados por vasodilatação transitória, suor, palpitações e sensações de forte calor, o período pós-menopausa (climatério) também pode levar a um aumento de ganho de massa e o surgimento de condições patológicas como a osteoporose (OPAS *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2019; IWASA *et al.*, 2018). A ovariectomia induziu um maior ganho de massa corporal nos animais e também levou a um aumento da temperatura basal de fêmeas. Esses resultados validam que a execução do modelo de menopausa foi realmente efetiva. Alguns estudos já demonstraram que ratas OVX obtêm maior ganho de massa (IWASA *et al.*, 2018; MABA, 2018) e que realmente há aumento da temperatura basal de fêmeas após ovariectomia, mesmo dentro da faixa de temperatura considerada normal (36,5 – 37,5°C) (BRITO *et al.*, 2016; OPAS *et al.*, 2004). Por conta disso, os resultados comparando as temperaturas febris dos animais após desafio imunológico são expressos em diferença de

temperatura, a fim de evitar a influência da temperatura basal dos animais sobre a avaliação da temperatura febril.

O perfil de resposta febril induzida por Zym e Poli I:C é relativamente bem descrito em estudos anteriores, porém, pouco se sabe sobre a resposta febril induzida por esses PAMPs em fêmeas (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017; DANGEREMBIZI *et al.*, 2018; FLANNERY *et al.*, 2017). Bastos-Pereira e colaboradores realizaram, em machos, estudos para determinar a curva de dose de Zym e Poli I:C a fim de determinar qual seria a menor dosagem que culminasse em uma resposta febril efetiva. As doses utilizadas neste trabalho estão de acordo com os dados reportados por Bastos-Pereira e colaboradores, que determinaram as dosagens de 3 mg/kg e 300 µg/kg para Zym e Poli I:C, respectivamente. Os autores ainda verificaram que a febre induzida por Zym em machos iniciou-se em 2h, com pico de temperatura febril de 1,5°C às 3h e duração de 4h após a administração do PAMP. Em relação ao Poli I:C, a resposta febril iniciou-se às 2h, teve seu pico de 1,2°C às 3h e duração de 4h após sua administração via i.p.. Os resultados são bastante semelhantes, inclusive em relação aos perfis das respostas febris, comparando-se machos e fêmeas.

Alguns estudos, utilizando LPS como modelo de indução de febre, verificaram que a resposta febril de fêmeas ciclando é reduzida comparando-se com machos (MURAKAMI E ONO, 1987; ASHDOWN *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2016). Além disso, a ovariectomia foi capaz de causar aumento da resposta febril em fêmeas após a injeção de LPS tanto por vias de administração i.p. (BRITO *et al.*, 2016) quanto por i.c.v. (IWASA *et al.*, 2013; IWASA *et al.*, 2014). Brito e colaboradores ainda verificaram que a resposta febril induzida por LPS em ratas OVX é semelhante a resposta febril induzida por LPS em machos. Esses dados sugerem que a febre está sob influência dos hormônios sexuais e que os hormônios sexuais femininos podem ser responsáveis pela redução da febre em fêmeas ciclando. Como mencionado anteriormente, demonstramos que as injeções i.p. de Zym e Poli I:C em fêmeas ciclando randomicamente causaram perfis similares de respostas febris apresentados por machos. Comparando-se efetivamente os

dados reportados por Bastos-Pereira e colaboradores e os dados obtidos neste trabalho, verificamos que a resposta febril induzida por Zym obteve uma menor duração em machos (2h) em relação às fêmeas (3h e 45 min), porém, o pico da resposta febril foi maior em machos (1,5°C) em comparação a fêmeas (1,3°C). Da mesma forma, a resposta febril induzida por Poli I:C também demonstrou redução na permanência do estado febril em machos (2h) em relação a fêmeas (3h e 45 min), porém atingindo pico de temperatura febril menor em fêmeas (0,7 °C) em comparação aos machos (1,2°C). Dessa forma, sugerimos que a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C também parece ser menor em fêmeas, assim como ocorre com a indução de febre por LPS.

Além disso, de forma semelhante ao que foi observado em estudos prévios por Brito e colaboradores, a ovariectomia aumentou a intensidade da resposta febril em fêmeas. Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que demonstra diferenças entre as respostas febris induzidas por Zym e Poli I:C em fêmeas falso-operadas e ovariectomizadas. Esses resultados mostram que, igualmente ao que ocorre com a resposta febril de origem bacteriana (induzida por LPS), a resposta febril de origem fúngica e de origem viral também são reduzidas em fêmeas falso-operadas em comparação a fêmeas ovariectomizadas. Esses resultados sugerem que essas diferenças na intensidade dessas respostas podem estar relacionadas com a ausência de hormônios sexuais femininos que ocorrem em fêmeas OVX. Esse é um dado importante, uma vez que aumenta as possíveis evidências de que os hormônios sexuais femininos modulam negativamente a resposta febril induzida por qualquer tipo de PAMP, e que ainda, há a possibilidade de que a intensidade de febre seja maior em mulheres durante a menopausa. As consequências de temperaturas febris mais elevadas em mulheres na menopausa precisam ser melhor estudadas.

Dando continuidade, alguns estudos demonstraram que fêmeas OVX apresentam maiores níveis hipotalâmicos de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (IWASA *et al.*, 2013), maior expressão de COX-2 e aumento na síntese de prostaglandinas quando comparadas com fêmeas falso-operadas (BRITO *et al.*, 2016). O aumento dos níveis hipotalâmicos de prostaglandinas é provavelmente considerado a principal razão pela qual

fêmeas OVX apresentem maiores temperaturas febris. Estudos já demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias citadas acima e prostaglandinas estão envolvidas na resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em machos (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2014; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017). Por essa razão, é plausível sugerir que, similarmente ao que ocorre com a indução de resposta febril por LPS, a síntese e liberação desses mediadores estão sob controle de hormônios sexuais independentemente do estímulo ser de origem bacteriana (LPS), fúngica (Zym) ou viral (Poli I:C).

Porém, um estudo conduzido por Flannery e colaboradores (2017) não observou diferenças entre as respostas inflamatórias entre machos e fêmeas ao avaliar a expressão de RNAm de TNF- α e interferons no hipotálamo e em relação a intensidade da resposta febril. Esses resultados são opostos aos que esse trabalho propõe, uma vez que sugerem que os hormônios sexuais femininos não interferem na síntese/liberação de mediadores ou citocinas na resposta febril induzida por Poli I:C. Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que a dose utilizada por Flannery *et al.*, (2017) é muito maior que a dose que utilizamos para esse estudo, o que poderia produzir respostas supra máximas. É necessária a execução de mais estudos que comparem efetivamente as respostas febris induzidas por Poli I:C entre machos e fêmeas para esclarecer melhor esses achados. A dificuldade de encontrar estudos em literatura que discutam melhor as diferenças sexuais sobre as respostas febris se deve ao fato de que a maior parte dos estudos pré-clínicos é executada em machos, com a justificativa de que o ciclo estral de fêmeas pode trazer variabilidade de resultados indesejada. Porém, uma série de estudos e análises vem demonstrando que essa hipótese não é uma justificativa plausível, uma vez que machos também apresentam fontes específicas de variabilidade, como comportamentos de dominância e agressividade. Levando essa questão em consideração, órgãos de financiamento governamentais internacionais implementaram políticas específicas que exigem a integração de fêmeas e estudos que levem em consideração diferenças sexuais na execução de estudos pré-clínicos em países como Canadá, Estados Unidos e alguns países europeus (MOGIL, 2020; ZUCKER E BUCKER, 2010).

Com o intuito de confirmar a possível influência hormonal sobre a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C, fêmeas OVX receberam tratamento persistente por 17β -estradiol durante 5 dias. De acordo com o que esperávamos, o tratamento foi capaz de reduzir a resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em fêmeas OVX. Esses resultados sugerem que há participação de estrogênio na redução da resposta febril induzida por Zym e Poli I:C que foi verificada em fêmeas ciclando, assim como foi observado por Brito e colaboradores utilizando LPS. Alguns estudos já demonstraram que a suplementação hormonal pode levar a diferenças na resposta imune de fêmeas OVX. Mouihate e Pittman (2003) verificaram que ratas OVX que receberam tratamento utilizando estrogênio e progesterona apresentaram temperaturas febris menores em comparação com fêmeas que receberam somente o veículo. Outro estudo que teve por objetivo avaliar se a exposição neonatal por LPS alteraria a resposta febril de fêmeas adultas e se os hormônios sexuais femininos estariam envolvidos nessas possíveis alterações, os autores verificaram que fêmeas OVX que receberam suplementação hormonal estrogênica tiveram redução na resposta febril após serem novamente expostas ao desafio imunológico por LPS (SAIA *et al.*, 2011). Dados sobre suplementação hormonal influenciando a febre induzida por Zym e Poli I:C são escassos. Porém, corroborando com os resultados apresentados por esse trabalho, Schneider *et al.* (2019) demonstrou que a suplementação estrogênica em fêmeas OVX que receberam injeção intra-articular de Zym com o intuito de induzir inflamação articular (modelo animal de indução de artrite) obtiveram redução na formação de edema, no recrutamento de neutrófilos e também redução dos níveis de TNF- α local. Robinson *et al.*, (2011) verificou que fêmeas OVX que receberam tratamento com estrogênio tiveram diminuição de hipotermia e índices de mortalidade após administração de PR8/H1N1 (influenza A) quando comparadas com fêmeas falso-operadas e OVX. A influência do estrogênio sobre o sistema imunológico é bem estabelecida na literatura. Em baixas doses, o estrogênio pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e respostas do tipo Th1 (relacionadas com indução de proliferação de linfócitos TCD4 e TCD8 e também com o aumento da capacidade citotóxica de TCD8), enquanto em doses mais elevadas, o estrogênio pode estimular respostas anti-inflamatórias, reduzindo a produção

de citocinas pró-inflamatórias e estimulando respostas do tipo Th2 (favorecendo a produção de anticorpos e estimulando a ativação de eosinófilos) (STRAUB, 2007; MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010). Além disso, as ações anti-inflamatórias do estrogênio, mediadas por receptores nucleares denominados ER α e ER β (MORANI, WARNER E GUSTAFSSON, 2008) são capazes de inibir a atividade transcripcional de NF-kB e suas respostas inflamatórias (BISWAS *et al.*, 2005). Entretanto, alguns estudos não detectaram diferenças entre as respostas febris de fêmeas OVX e fêmeas falso-operadas e tampouco alterações após suplementação estrogênica de ratas OVX (IWASA *et al.*, 2013; IWASA *et al.*, 2014; FINLEY *et al.*, 2015). Em relação aos estudos de Iwasa e colaboradores (2013, 2014) essa discrepância pode estar relacionada à duração do tratamento, uma vez que os autores avaliaram a resposta febril de ratas OVX após uma ou duas injeções de 17 β -estradiol. Por sua vez, no estudo conduzido por Finley *et al.* (2015) o tratamento com 17 β -estradiol foi realizado na mesma dose que utilizamos nesse trabalho, porém com um tempo de duração menor (4 dias) e por via i.p., o que pode ter acarretado em diferenças farmacocinéticas sobre a atuação do hormônio. Esses resultados sugerem que a duração do tratamento, a dosagem administrada e a via de administração podem influenciar diretamente sobre os efeitos desse hormônio sobre suas respostas.

Assim, nossos resultados sugerem que independentemente da origem do estímulo (bacteriano, fúngico ou viral) e a ativação de diferentes tipos de TLR, a resposta febril de fêmeas ciclando é sempre menor que a resposta febril de fêmeas OVX e que os hormônios sexuais, especialmente o estrogênio, são responsáveis pela redução da temperatura febril desses animais.

Fabricio e colaboradores (1998) demonstraram pela primeira vez que ET-1 poderia atuar como mediador central na resposta induzida por LPS, em machos, através de sua ligação a receptores do tipo ET_B e não a receptores do tipo ET_A. Alguns estudos posteriores corroboraram com os dados encontrados por Fabricio *et al.* (1998) (FABRICIO *et al.*, 2006; FRAGA *et al.*, 2016). Em machos, ET-1 também foi capaz de atuar como mediador central na resposta febril induzida por Zym, porém, não foi verificada sua atuação na resposta febril induzida por Poli I:C, uma vez que o tratamento prévio, via i.c.v, dos animais

com o antagonista de receptor ET_B , BQ788, não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida por esse PAMP em machos (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015). No presente estudo, um dos objetivos do trabalho foi avaliar se ET-1 também poderia participar como mediador central, através de sua ligação ao receptor ET_B , na resposta febril induzida por LPS, em fêmeas. Demonstramos que a administração i.c.v. do antagonista de receptor ET_B , BQ788, foi eficaz em reduzir a resposta febril induzida por LPS somente em fêmeas falso-operadas ciclando randomicamente, mas não afetou a resposta febril em fêmeas OVX. Esse resultado não foi completamente inesperado, pelo fato de que estudos de nosso grupo já haviam demonstrado que a injeção i.c.v de ET-1 era capaz de produzir resposta febril somente em fêmeas falso-operadas, mas não em ratas OVX (BRITO *et al.*, 2020). Esses resultados sugerem que mesmo que ET-1 participe da resposta febril induzida por LPS em machos e fêmeas, o sistema endotelinérgico pode sofrer influências dos hormônios sexuais.

Estudos prévios que tiveram por objetivo avaliar o sistema endotelinérgico de mulheres corroboram com nossos resultados. Polderman *et al.*, (1993) verificou que os níveis séricos de ET-1 em homens é significativamente maior que em mulheres, e ainda menor em mulheres grávidas. Além disso, o tratamento hormonal em indivíduos transexuais na transição de homens para mulheres foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de ET-1 enquanto o tratamento hormonal na transição de mulheres para homens foi capaz de aumentar os níveis séricos desse peptídeo. Ylikorkala *et al.*, (1995) mostrou que a suplementação hormonal em mulheres pós-menopausa foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de ET-1. Dessa forma, fica evidente que os hormônios sexuais estão envolvidos no controle da síntese de ET-1. A maneira pela qual os hormônios podem atuar sobre a síntese de ET-1 ainda não é suficientemente conhecida e necessita de mais estudos. Além da influência dos hormônios sexuais sobre a síntese de ET-1, existem estudos relatando sua influência sobre a expressão dos receptores endotelinérgicos. Ergul *et al.*, (1998) demonstrou que a proporção de expressão dos receptores ET_A e ET_B em veia safena é diferente entre homens e mulheres. Adiante, Kellogg *et al.* (2001) verificaram que a atividade do receptor ET_B , em mulheres jovens,

parece mediar respostas relacionadas à vasodilatação através da estimulação de produção de óxido nítrico, enquanto em homens, esse receptor tem ação, predominantemente, de vasoconstrição venosa. Outros estudos conduzidos em humanos verificaram que existe uma alteração na intensidade de vasodilatação mediada pelo receptor ET_B dependendo da fase do ciclo menstrual e que há uma possível diminuição na atividade de vasodilatação mediada por ET_B em mulheres na pós-menopausa (SEBZA *et al.*, 2018; WENNER *et al.*, 2016). Assim, pode-se concluir que a expressão do receptor ET_B está sobre regulação hormonal em mulheres. Este receptor também está envolvido na participação de ET-1 como mediador na resposta febril, conforme descrito por Fabricio *et al.*, (1998). Recentemente, Gohar *et al.* (2016) apresentaram dados, em ratos, referentes a expressão dos receptores endotelinérgicos, ET_A e ET_B , que poderiam ser moduladas pelos hormônios sexuais e que essa modulação poderia variar de acordo com o órgão avaliado. Nesse estudo, a ovariectomia não foi capaz de alterar a expressão desses receptores no pulmão, porém reduziu a expressão dos mesmos no córtex renal e aumentou a expressão na medula renal, em comparação com fêmeas falso-operadas. Além disso, a suplementação hormonal de ratas OVX foi capaz de reverter as alterações de expressão de receptores que a ovariectomia causou nesses animais. Não existem muitos dados referentes a expressão dos receptores endotelinérgicos no hipotálamo. A expressão desses receptores parece não sofrer alteração após execução da cirurgia de ovariectomia em animais que receberam salina comparando-se com fêmeas ciclando (BRITO *et al.*, 2020). Porém, após desafio imunológico por LPS, a expressão dos receptores ET_B aumenta substancialmente em fêmeas falso-operadas e em fêmeas OVX, sendo que em fêmeas OVX esse aumento é significativamente maior em comparação à fêmeas ciclando (BRITO *et al.*, 2020). Esses resultados sugerem que a ausência de efeito de BQ788 na resposta febril induzida por LPS em fêmeas OVX não está relacionada com mudanças na expressão do receptor. A exposição crônica de fêmeas OVX ao estrogênio aumentou os níveis de RNAm de ET-1 no núcleo paraventricular hipotalâmico e no bulbo ventrolateral rostral (SUBRAMANIAN *et al.*, 2017). Assim, é plausível presumir que a ausência de hormônios sexuais em fêmeas OVX reduz os níveis de ET-1 a nível cerebral, explicando a falta de atividade de BQ788 em fêmeas OVX.

A administração i.c.v. do antagonista de receptor ET_B , BQ788, não alterou a resposta febril induzida por outros estímulos como o Zym e Poli I:C em ratas falso-operadas e OVX. A ausência de efeito do tratamento prévio de BQ788 na resposta febril induzida por Poli I:C em fêmeas era esperada, uma vez que ET-1 não possui participação como mediador central na febre induzida por Poli I:C em machos (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2015). Apesar de alguns estudos demonstrarem que há indução da liberação de ET-1 periférica após desafio imunológico por Poli I:C (FARINA *et al.*, 2011; LENNA *et al.*, 2013), não foram encontrados estudos que verificassem uma possível liberação central de ET-1 após injeção de Poli I:C. Dessa forma, possivelmente não haja indução da produção central desse peptídeo por Poli I:C, justificando a ausência da participação de ET-1 na resposta febril induzida por Poli I:C, tanto em machos quanto em fêmeas, independentemente do status hormonal desses animais.

Não obstante, os resultados obtidos por Zym foram inesperados uma vez que ET-1 participa da resposta febril induzida por esse PAMP em machos (BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2017). A síntese de ET-1 estimulada por Zym, localmente, já foi demonstrada por Conte e colaboradores (2010), a partir da detecção do aumento da síntese do precursor de ET-1 ou pela utilização de antagonistas de receptor de ET-1 em alguns fenômenos inflamatórios (CONTE *et al.*, 2008). Não foram encontrados dados na literatura referentes a maneira como que o desafio imunológico por Zym induziria a produção de ET-1 e como essa produção poderia ser modulada por hormônios sexuais femininos, especialmente pelo estrogênio. Esse seria um tópico para futuras investigações.

Vale ressaltar que estudamos a participação de ET-1 na resposta febril em fêmeas pressupondo que somente o receptor ET_B possui influência sobre a resposta febril (dados publicados em estudos realizados em machos) (FABRICIO *et al.*, 1998). Porém, levando em consideração que o sistema endotelinérgico pode estar sob influência dos hormônios sexuais tanto em relação à síntese/liberação de ET-1 quando à expressão de seus receptores, pode-se sugerir que a participação de ET-1 nas respostas febris induzidas pelos PAMPs utilizados nesse trabalho, em fêmeas, possivelmente estejam relacionadas à sua ligação a receptores ET_A e não somente a receptores ET_B .

Essa possível participação do receptor ET_A na resposta febril em fêmeas também seria um interessante tópico a ser estudado.

6. CONCLUSÃO

Como conclusão, os resultados demonstrados por esse trabalho revelaram que fêmeas ciclando randomicamente possuem uma resposta febril induzida por Zym e Poli I:C reduzida em comparação à fêmeas OVX. Essa redução pode ser justificada, em partes, por influências hormonais, especialmente acarretadas pelo estrogênio, uma vez que o tratamento persistente de ratas OVX utilizando 17β -estradiol conseguiu reverter as altas temperaturas febris apresentadas por fêmeas OVX.

Também revelamos que ET-1 parece participar como mediador central na resposta febril induzida por LPS somente em fêmeas ciclando randomicamente, mas não em fêmeas OVX. Ademais, ET-1 parece não participar, na dosagem utilizada nesse trabalho, como mediador central na resposta febril induzida por Zym e Poli I:C em fêmeas.

Os resultados apresentados demonstram algumas similaridades (perfil de resposta febril) e diferenças (participação de mediadores centrais) entre as respostas febris de machos e fêmeas dependendo da origem do PAMP que origina a febre (bacteriana, fúngica ou viral). Verificamos também que os diferentes status hormonais em fêmeas (ciclando randomicamente ou OVX) podem influenciar a participação de mediadores centrais envolvidos na promoção de resposta febril. A melhor compreensão dos mecanismos que levam a indução da resposta febril poderia levar a uma melhor estratégia no desenvolvimento de novas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G. N. (2006). 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 Physiology**, 292(4), R1667-R1674.
- Bastos-Pereira, A. L., Fraga, D., Ott, D., Simm, B., Murgott, J., Roth, J., Zamprônio, A. R. (2014). Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. **Journal of Applied Physiology**, 116(9), 1220-1229.
- Bastos-Pereira, A. L., Fraga, D., Dreifuss, A. A., Zamprônio, A. R. (2017). Central mediators of the zymosan-induced febrile response. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, 28(6), 555-562.
- Bastos-Pereira, A. L., Leite, M. C. G., Fraga, D., Zamprônio, A. R. (2015) Central mediators involved in the febrile response induced by polyinosinic–polycytidylic acid: Lack of involvement of endothelins and substance P. **Journal of neuroimmunology**, 278, 100-107.
- Biswas, D. K., Singh, S., Shi, Q., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2005). Crossroads of estrogen receptor and NF- κ B signaling. **Sci. STKE**, 2005(288), pe27-pe27.
- Bouman, A., Heineman, M. J., Faas, M. M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. **Human reproduction update**, 11(4), 411-423.
- Brito, H. O., Radulski, D. R., Wilhelms, D. B., Stojakovic, A., Brito, L. M. O., Engblom, D., Franco, C.R.C., Zamprônio, A. R. (2016). Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1 β in Rats. **Journal of neuroendocrinology**, 28(10).
- Brito, H. O., Radulski, D., Wilhelms, D. B., Stojakovic, A., Brito, L. M. O., da Costa, R. M. G., Trindade, E., Engblom, D, Franco, C.R.C., Zamprônio, A. R. (2020). Immune-mediated febrile response in female rats: Role of central hypothalamic mediators. **Scientific Reports**, 10(1), 1-13.
- Cai, K. C., van Mil, S., Murray, E., Mallet, J. F., Matar, C., Ismail, N. (2016). Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. **Brain, behavior, and immunity**, 58, 327-337.
- Cannon, J. G. (2011). Perspective on fever: the basic science and conventional medicine. **Complementary therapies in medicine**, 21, S54-S60.

Coelho, M.M., Pela, I.R., Rothwell, N.J. (1993) Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F2 alpha, but not prostaglandin E2. **Eur J Pharmacol**, 238(2-3), 391-394.

Conte, F. D. P., Barja-Fidalgo, C., Verri Jr, W. A., Cunha, F. Q., Rae, G. A., Penido, C., & Henriques, M. D. G. M. (2008). Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF- α , and CXCL-1. **Journal of leukocyte biology**, 84(3), 652-660.

Conte, F. P., Menezes-de-Lima Jr, O., Verri Jr, W. A., Cunha, F. Q., Penido, C., & Henriques, M. G. (2010). Lipoxin A4 attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **British journal of pharmacology**, 161(4), 911-924.

Dangarembizi, R., Rummel, C. D., Roth, J., Erlwanger, K. H., Madziva, M. T., & Harden, L. M. (2018). Pyrogenic and neuroinflammatory properties of zymosan and its potential as an alternative to live yeast in antipyretic drug testing. **Facets**, 4(1), 162-182.

De Souza, G. E. P., Cardoso, R. A., Melo, M. C. C., Fabrício, A. S. C., Silva, V. M. S., Lora, M., De Brum-Fernandes, A.J., Rae, G.A., Ferreira, S.H, Zampronio, A. R. (2002). A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyronne in rats. **Inflammation Research**, 51(1), 24-32.

Dinarello, C. A., Cannon, J. G., & Wolff, S. M. (1988). New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of infectious diseases**, 168-189.

Doyle, H. H., Murphy, A. Z. (2017). Sex differences in innate immunity and its impact on opioid pharmacology. **Journal of neuroscience research**, 95(1-2), 487-499.

Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.J., Blomqvist, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. **Nature Neuroscience**, 6(11), 1137-1138

Ergul, A., Shoemaker, K., Puett, D., & Tackett, R. L. (1998). Gender differences in the expression of endothelin receptors in human saphenous veins in vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 285(2), 511-517.

Evans, S. S., Repasky, E. A., & Fisher, D. T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nature Reviews Immunology**, 15(6), 335.

Fabricio, A. S., Rae, G. A., Zampronio, A. R., D'Orléans-Juste, P., & Souza, G. E. (2006). Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed

pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 290(1), R164-R171.

Fabricio, A.S., Silva, C.A., Rae, G.A., D'Orleans-Juste, P., Souza, G.E. (1998). Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **Br J Pharmacol** 125(3), 542-548

Farina, G., York, M., Collins, C., & Lafyatis, R. (2011). dsRNA activation of endothelin-1 and markers of vascular activation in endothelial cells and fibroblasts. **Annals of the rheumatic diseases**, 70(3), 544-550.

Finley, C., Zhang, C., & Fewell, J. E. (2015). Sex steroid levels near the term of pregnancy do not alter lipopolysaccharide-induced fever in oophorectomized rats. **Experimental physiology**, 100(3), 323-330.

Flannery, L. E., Kerr, D. M., Finn, D. P., Roche, M. (2018). FAAH inhibition attenuates TLR3-mediated hyperthermia, nociceptive-and anxiety-like behaviour in female rats. **Behavioural brain research**, 353, 11-20.

Fraga, D., Machado, R.R., Fernandes, L.C., Souza, G.E., Zampronio, A.R. (2008). Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 294(2), R411-420

Fraga, D., Zanoni, C.I., Zampronio, A.R., Parada, C.A., Rae, G.A., Souza, G.E. (2016). Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain Behav Immun** 51, 204-211.

Franconi, F., Brunelleschi, S., Steardo, L., & Cuomo, V. (2007). Gender differences in drug responses. **Pharmacological Research**, 55(2), 81-95.

Fofie, A. E., Fewell, J. E. (2003). Influence of pregnancy on plasma cytokines and the febrile response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats. **Experimental physiology**, 88(6), 747-754.

Gay, N. J., Gangloff, M., Weber, A. N. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. **Nature Reviews Immunology**, 6(9), 693.

Gao, W., Schmidtko, A., Wobst, I., Lu, R., Angioni, C., Geisslinger, G. (2009). Prostaglandin D2 produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever. **J Physiol Pharmacol**, 60(2), 145-150.

Gohar, E. Y., Yusuf, C., & Pollock, D. M. (2016). Ovarian hormones modulate endothelin A and B receptor expression. **Life sciences**, 159, 148-152.

Guha-Thakurta, N., Majde, J. A. (1997). Early induction of proinflammatory cytokine and type I interferon mRNAs following Newcastle disease virus, poly [rI: rC], or low-dose LPS challenge of the mouse. **Journal of interferon & cytokine research**, 17(4), 197-204.

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. Klaere, S. (2009). Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**, 462(7272), 505-509.

Houde, M., Desbiens, L., & D'Orléans-Juste, P. (2016). Endothelin-1: biosynthesis, signaling and vasoreactivity. **Advances in Pharmacology** (Vol. 77, pp. 143-175). Academic Press.

Iwasa, T., Matsuzaki, T., Tungalagsuvd, A., Munkhzaya, M., Kawami, T., Kato, T., Kuwahara, A.; Toshiyuki, Y.; Irahara, M. (2014). Effects of ovariectomy on the inflammatory responses of female rats to the central injection of lipopolysaccharide. **Journal of neuroimmunology**, 277(1-2), 50-56.

Iwasa, T., Matsuzaki, T., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Murakami, M., Munkhzaya, M., Altankhuu, T., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, M. (2013). Changes in central and peripheral inflammatory responses to lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. **Cytokine**, 65(1), 65-73

Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Yiliyasi, M., Kuwahara, A., Matsui, S., & Irahara, M. (2018). Effects of chronic testosterone administration on the degree of preference for a high-fat diet and body weight in gonadal-intact and ovariectomized female rats. **Behavioural brain research**, 349, 102-108.

Jiang, L. I., Sternweis, P. C., & Wang, J. E. (2013). Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation. **Molecular immunology**, 54(1), 14-22

Jones, H., Bailey, T. G., Barr, D. A., France, M., Lucas, R. A., Crandall, C. G., Low, D. A. (2019). Is core temperature the trigger of a menopausal hot flush?. **Menopause**, 26(9), 1016-1023.

Kaciuba-Uscilko, H., Grucza, R. (2001). Gender differences in thermoregulation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, 4(6), 533-536.

Kanashiro, A., Pessini, A. C., Machado, R. R., Malvar, D. D. C., Aguiar, F. A., Soares, D. M., do Vale, M. L., de Souza, G. E. P. (2009). Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 296(5), R1631-R1640.

Kellogg Jr, D. L., Liu, Y., & Pergola, P. E. (2001). Selected contribution: gender differences in the endothelin-B receptor contribution to basal cutaneous vascular tone in humans. **Journal of Applied Physiology**, *91*(5), 2407-2411.

Kluger, M. J (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological reviews**, *71*(1), 93-127.

Lenna, S., Chrobak, I., Farina, G. A., Rodriguez-Pascual, F., Lamas, S., Lafyatis, R., Scorza, R., Trojanowska, M. (2013). HLA-B35 and dsRNA induce endothelin-1 via activation of ATF4 in human microvascular endothelial cells. **PLoS One**, *8*(2).

Lazarus, M., Yoshida, K., Coppari, R., Bass, C. E., Mochizuki, T., Lowell, B. B., & Saper, C. B. (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nature neuroscience**, *10*(9), 1131-1133.

Maba, I. K. (2018). Mudança na sinalização de prostaglandina E2 durante a hiperalgesia na síndrome de doenças após ovariectomia em ratas. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PR.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, *62*(4A), 609-614.

Martin, S. M., Malkinson, T. J., Veale, W. L., Pittman, Q. J. (1995). Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, *268*(4), R919-R923.

Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Cruvinel, W. D. M., Andrade, L. E. C., & Silva, N. P. D. (2010). Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, *50*(5), 552-580.

Meylan, E., Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. **Molecular cell**, *22*(5), 561-569.

Miller, S. I., Ernst, R. K., Bader, M. W. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, *3*(1), 36-46.

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

Minano, F. J., Fernandez-Alonso, A., Myers, R. D., & Sancibrian, M. (1996). Hypothalamic interaction between macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in rats: a new level for fever control?. **The Journal of physiology**, *491*(1), 209-217.

Mitchell, J. A., Kirkby, N. S. (2019). Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *British journal of pharmacology*, 176(8), 1038-1050.

Mogil, J. S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. **Nature Reviews Neuroscience**, 1-13.

Morani, A., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2008). Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. **Journal of internal medicine**, 264(2), 128-142.

Mouihate, A., Pittman, Q. J. (2003). Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. **Endocrinology**, 144(6), 2454-2460.

Murakami, N., Ono, T. (1987). Sex-related differences in fever development of rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 252(2), R284-R289.

Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. **American journal of Physiology-Regulatory, integrative and comparative Physiology**, 301(5), R1207-R1228.

Ngo, S. T., Steyn, F. J., McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, 35(3), 347-369.

Oertelt-Prigione, S. (2011). The influence of sex and gender on the immune response. **Autoimmunity reviews**, 11(6-7), A479-A485.

Opas, E. E., Rutledge, S. J., Vogel, R. L., Rodan, G. A., Schmidt, A. (2004). Rat tail skin temperature regulation by estrogen, phytoestrogens and tamoxifen. **Maturitas**, 48(4), 463-471.

Paxinos, G., & Watson, C. (2006). **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. Elsevier.

Pennell, L. M., Galligan, C. L., Fish, E. (2012). Sex affects immunity. **Journal of autoimmunity**, 38(2-3), J282-J291.

Polderman, K. H., Stehouwer, C. D., van Kamp, G. J., Dekker, G. A., Verheugt, F. W., & Gooren, L. J. (1993). Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. **Annals of Internal Medicine**, 118(6), 429-432.

Reis, R.C., Brito, H.O., Fraga, D., Cabrini, D.A., Zampronio, A.R. (2011). Central substance P NK receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1beta and CCL3/MIP-1alpha in rats. **Brain Res** 1384, 161-169

Robinson, D. P., Lorenzo, M. E., Jian, W., & Klein, S. L. (2011). Elevated 17 β -estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. **PLoS pathogens**, 7(7).

Roth, J.; De Souza, G. E. P. (2001). Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 34, n. 3, p. 301-314.

Rothwell, N.J. (1989). CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat. **Am J Physiol**, 256(1 Pt 1), E111-115

Saia, R. S., Bertozzi, G., Cunha, F. D. Q., & Cárnio, E. C. (2011). Estradiol and thermoregulation in adult endotoxemic rats exposed to lipopolysaccharide in neonatal life. **Acta Physiologica**, 203(4), 429-439.

Scammell, T. E., Elmquist, J. K., Griffin, J. D., & Saper, C. B. (1996). Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. **Journal of Neuroscience**, 16(19), 6246-6254.

Schneider, A. H., Kanashiro, A., Dutra, S. G. V., de Souza, R. D. N., Veras, F. P., de Queiroz Cunha, F., Ulloa, L., Mecawi, A.S, Reis, L.C, Malvar, D. C. (2019). Estradiol replacement therapy regulates innate immune response in ovariectomized arthritic mice. **International immunopharmacology**, 72, 504-510.

Sebzda, K. N., Kuczmarski, A. V., Pohlig, R. T., Lennon, S. L., Edwards, D. G., & Wenner, M. M. (2018). Ovarian hormones modulate endothelin-1 receptor responses in young women. **Microcirculation**, 25(7), e12490.

Simm, B., Ott, D., Pollatzek, E., Murgott, J., Gerstberger, R., Rummel, C., & Roth, J. (2016). Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. **Neuroscience**, 313, 23-35.

Soares, D.M., Machado, R.R., Yamashiro, L.H., Melo, M.C., Souza, G.E. (2008). Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. **Brain Res** 1233, 79-88

Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., Martin, L. J., Austin J. S., Sotocinal, S. G., Chen, D., Yang, M., Shi, X. Q., Huang, H., Pellon, N. J., Bilan, P.J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R., Zhang, J., Salter, M. W., Mogil, J.S. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature neuroscience**, 18(8), 1081-1083.

Sorge, R. E., Totsch, S. K.. Sex differences in pain. **Journal of neuroscience research** (2017), 95(6), 1271-1281.

Steiner, A. A., Romanovsky, A. A. (2015). Platelet-activating factor is a potent pyrogen and cryogen, but it does not mediate lipopolysaccharide fever or hypothermia. **Temperature**, 2(4), 535-542.

Stella, H. J. (1997). Caracterização farmacologica dos receptores de endotelina na circulação portal de fígado isolado de cão. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP.

Straub, R. H. (2007). The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine reviews**, 28(5), 521-574.

Subramanian, M., MohanKumar, S. M., Balasubramanian, P., Northcott, C. A., Garver, H., Fink, G. D., & MohanKumar, P. S. (2017). Chronic exposure to low doses of estradiol-17 β increases blood pressure in young female rats: A possible role for central Endothelin-1. **Scientific reports**, 7(1), 1-9.

Taylor, A. N., Tio, D. L., Romeo, H. E. (2005). The febrile response to intraperitoneal lipopolysaccharide: strain and gender differences in rats. **Journal of neuroimmunology**, 158(1-2), 86-93.

Traynor, T. R., Majde, J. A., Bohnet, S. G., Krueger, J. M. (2004). Intratracheal double-stranded RNA plus interferon- γ : A model for analysis of the acute phase response to respiratory viral infections. **Life sciences**, 74(20), 2563-2576.

Wenner, M. M., Sebzda, K. N., Kuczmarski, A. V., Pohlig, R. T., & Edwards, D. G. (2017). ETB receptor contribution to vascular dysfunction in postmenopausal women. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 313(1), R51-R57.

Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP 3. **Nature**, 395(6699), 281-284.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yasaki, Y., Goto, K., Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332(6163), 411-415.

Ylikorkala, O., Orpana, A., Puolakka, J., Pyörälä, T., & Viinikka, L. (1995). Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 80(11), 3384-3387.

Zamprônio, A. R., Soares, D. M., & Souza, G. E. (2015). Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. **Temperature**, 2(4), 506-521.

Zamprônio, A. R., Souza, G. E., Silva, C. A., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (1994). Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 266(5), R1670-R1674.

Zucker, I., Beery, A. K. (2010). Males still dominate animal studies. **Nature**, 465(7299), 690-690.