

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA

**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR
DIFERENTES PADRÕES MOLECULARES
ASSOCIADOS A PATÓGENOS EM RATOS**

CURITIBA
2014

Amanda Leite Bastos Pereira

**RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR DIFERENTES PADRÕES
MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zampronio

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR DIFERENTES PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS À PATÓGENOS EM RATOS”, de autoria da pós-graduanda **AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA**, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e banca composta por: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Glória Emilia Petto de Souza (Física e Química – USP), Prof.^a Dr.^a Maria Camila Almeida (Ciências Naturais e Humanas - UFABC) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 18 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Presidente – Farmacologia – UFPR)

Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)

Prof.^a Dr.^a Glória Emilia Petto de Souza (Física e Química – USP)

Prof.^a Dr.^a Maria Camila Almeida (Ciências Naturais e Humanas - UFABC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR)



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 27ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

2 Ao décimo oitavo dia do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze, às treze horas e
3 trinta minutos, no Auditório do Departamento de Farmacologia, do Anexo I, do Setor de
4 Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão
5 Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de
6 autoria da pós-graduanda **AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA**, intitulada
7 “RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR DIFERENTES PADRÕES MOLECULARES
8 ASSOCIADOS À PATÓGENOS EM RATOS”, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander
9 Roberto Zampronio e banca composta por: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
10 (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR),
11 Prof.^a Dr.^a Glória Emilia Petto de Souza (Física e Química – USP), Prof.^a Dr.^a Maria
12 Camila Almeida (Ciências Naturais e Humanas - UFABC) e Prof. Dr. Roberto Andreatini
13 (Farmacologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve
14 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida
15 durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para
16 responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte
17 parecer: APROVADA. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as
18 modificações sugeridas que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a
19 tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será
20 assinada pelo Presidente e pelos demais membros da Comissão Examinadora, em Curitiba,
21 18 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Presidente – Farmacologia – UFPR)

Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)

Prof.^a Dr.^a Glória Emilia Petto de Souza (Física e Química – USP)

Prof.^a Dr.^a Maria Camila Almeida (Ciências Naturais e Humanas - UFABC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR)

“E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos
demasiado certos de nossas certezas.”

Paulo Freire

*Ao meu esposo Arturo, o melhor presente que a vida me deu;
Aos meus pais, Benedito e Reni, meu alicerce, minha força;
Aos meus irmãos Walkyria e Alysson e suas lindas famílias, meu tesouro.*

Com muito amor lhes dedico esse trabalho!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Zampronio, pela oportunidade e dedicação ao projeto e demais etapas desse doutorado; pela confiança em dividir da sua experiência e conhecimento e por me permitir evoluir como pessoa e profissional.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, que de várias formas auxiliaram na caminhada. Um agradecimento especial à Prof^a Dr^a Alexandra Acco, por confiar na minha participação em colaborações do seu laboratório.

Aos professores componentes das bancas de qualificação e de defesa, pelo tempo, disponibilidade e contribuição dedicados ao nosso trabalho.

Aos servidores do Departamento de Farmacologia da UFPR e do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e funcionários do Biotério Central da PUC-PR pelo apoio e auxílio técnico.

Ao Prof. Dr. Joachim Roth, pela chance de crescimento profissional e pela amistosa acolhida durante a sua supervisão no doutorado-sanduíche, na Universidade Justus-Liebig, de Giessen, Alemanha. Aos colaboradores, funcionários e também aos amigos que fiz nessa jornada, em especial Daniela, Björn, Eric, Christoph, Julia, Lisa, Rüdiger, Jolanta, o meu sincero agradecimento e o desejo de lhes encontrar novamente.

Ao meu esposo Arturo, por ser uma pessoa formidável, o homem da minha vida. Meu grande companheiro, que saiu de seu país para ficarmos juntos e nos casarmos, me acompanhou e auxiliou em vários experimentos em noites e fins-de-semana, e cuidou de nosso lar quando eu fui para o estágio-sanduíche. Obrigada meu amor, por sempre se orgulhar de mim, e por ser o meu orgulho! “Bem sei da tua dificuldade na terra, farei o possível pra morar contigo na pedra”.

À minha família: meus pais Alfredo Benedito e Reni, meus irmãos Walkyria e Alysson, meus cunhados Itamar e Elizangela e meus sobrinhos Gustavo, Nathalia, Lucas e Gabriela, por todo o apoio, amor e companhia. Vocês são luz na minha vida, meus melhores amigos, e eu lhes agradeço por tudo que sou e que tenho! Obrigada por todos os fins de semana de “Mafraterapia”, onde eu recarregava as energias com

vocês. Um grande abraço também ao meu avô, tios, tias e demais primos e primas, em especial minhas madrinhas Wilma e Sonia e minha prima Lia!

Aos meus sogros Daniel e Olinda, meus cunhados Cristina e Pablo pela satisfação de fazer parte de sua linda família e pelo apoio e carinho em vários momentos. Também lhes agradeço pelo lindo presente, o nosso sobrinho Joaquín. À querida “Oma” Virgínia, muito obrigada por me receber tão bem e por me permitir voltar a sentir o lindo amor que somente uma avó nos proporciona. Um agradecimento também aos tios Harry e Eva, pela acolhida, passeios e pelo divertido carnaval alemão; e aos demais familiares!

Aos amigos de ontem, hoje e sempre. À minha querida amiga de infância Fabiane, que foi passar suas férias comigo na Alemanha, onde vivemos lindos momentos. Aos muitos amigos da graduação, de aulas, do mestrado ou doutorado, pelos inúmeros momentos inesquecíveis e por fazerem a caminhada mais fácil e divertida: André, Stéfani, Diego, Deborah, Bárbara, Adriana, Samanta, Lea, Juliane, Ana Paula, Graça, Fernanda, Heloísa, Claudia, Gleci, Anabella, Bruninha, entre outros. Aos companheiros de laboratório, Suellen, Geórgea, Mariane, Luís, pela convivência diária e ajuda em experimentos, e em especial ao amigo Daniel Fraga, que tornou possível a realização de grande parte desse trabalho. Ao Alex Sandro, que me ensinou técnicas no início do doutorado, sempre tão gentil, e fez muita falta durante o decorrer do curso. À Romina, Giuliana e família, Maria Angelica e Andres, por nos receberem em suas casas durante o nosso “mochilão”. Aos nossos vizinhos e amigos Cíntia, Erika e Christian, por cuidarem do nosso gatinho Pisco em nossas ausências.

Aos animais utilizados nos experimentos, dedico o meu profundo respeito e agradecimento a cada vida. Vocês são os nossos heróis! Aos meus animais de estimação, Pisco, Ceviche, Chaplin, por serem parte tão importante de mim.

A Deus, por nos proporcionar toda essa dádiva, com saúde, perseverância e apoio de quem nos quer bem, a Nossa Senhora, por interceder por nós e manter a nossa fé inabalável. Aos anjos que nos protegem, em especial meus amados avós Arthur, Marina e Yolanda, por ainda serem presentes em minha vida.

À CAPES, REUNI, CNPq e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiii |
| RESUMO | xvii |
| ABSTRACT | xx |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Definição de febre e breve histórico dos estudos de resposta febril | 2 |
| 1.2 Receptores tipo Toll e Padrões moleculares associados a patógenos | 7 |
| 1.3 Pirogênios exógenos | 14 |
| 1.3.1 <i>Lipopolissacarídeo</i> | 14 |
| 1.3.2 <i>Zimosan</i> | 15 |
| 1.3.3 <i>Ácido Poliinosínico: Policitidílico</i> | 16 |
| 1.4 Pirogênios endógenos | 18 |
| 1.5 Mediadores Centrais da Resposta Febril | 25 |
| 1.5.1 <i>Prostaglandinas</i> | 25 |
| 1.5.2 <i>Endotelina</i> | 27 |
| 1.5.3 <i>Opioides</i> | 28 |
| 1.5.4 <i>Substância P</i> | 29 |
| 1.5.5 <i>Outras substâncias</i> | 30 |
| 1.6 Regiões cerebrais e Circuitos neurais envolvidos na Resposta Febril | 32 |
| 1.7 Justificativa | 38 |
| 2. OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 Objetivo Geral | 40 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 40 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 Animais | 42 |
| 3.2 Esterilização | 42 |
| 3.3 Soluções | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Reagentes, drogas e doses | 45 |
| 3.5 Avaliação da temperatura corporal abdominal | 47 |
| 3.6 Avaliação da indução de aumento da temperatura corporal dos animais pelos diferentes PAMPs através de curvas dose-resposta | 48 |
| 3.7 Avaliação da temperatura da cauda e cálculo do HLI | 48 |
| 3.8 Implante da cânula no ventrículo lateral | 49 |
| 3.9 Avaliação da participação de IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2, ET-1, opióides e substância P na resposta febril induzida pelos diferentes PAMPs utilizando antagonistas e anticorpos específicos | 50 |
| 3.10 Avaliação complementar da participação de alguns mediadores por ELISA | 51 |
| 3.11 Coleta de plasma | 51 |
| 3.12 Coleta de CSF | 51 |
| 3.13 Preparação de microcultivos da OVLT e da MnPO | 52 |
| 3.14 Medidas de Cálcio intracelular dos cultivos de OVLT e MnPO | 53 |
| 3.15 Caracterização imunocitoquímica das células submetidas ao experimento de medida de cálcio intracelular | 54 |
| 3.16 Medidas de citocinas em cultivos de OVLT e MnPO | 56 |
| 3.17 Análise Estatística | 56 |
| 4. RESULTADOS | 58 |
| 4.1 Efeito da administração intraperitoneal de Zimosan ou Poli I:C sobre a temperatura corporal | 59 |
| 4.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpo anti-TNF α por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 63 |
| 4.3 Efeito do pré-tratamento com IL1-RA por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 65 |
| 4.4 Efeito do pré-tratamento com anticorpo anti-IL-6 por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 67 |

| | |
|--|-----|
| 4.5 Efeito do pré-tratamento com anticorpo Anti-IFN γ por via intracerebroventricular sobre a resposta febril induzida por Poli I:C | 69 |
| 4.6 Avaliação das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em CSF e plasma após administração de LPS, Zimosan e Poli I:C | 71 |
| 4.7 Efeito do pré-tratamento com indometacina ou celecoxibe, sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 73 |
| 4.8 Medidas das concentrações de PGE $_2$ em CSF, após administração intraperitoneal de LPS, Zimosan e Poli I:C e mediante pré-tratamento sistêmico com indometacina | 76 |
| 4.9 Efeito do pré-tratamento com BQ788 por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 78 |
| 4.10 Efeito do pré-tratamento com SR140333B por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 80 |
| 4.11 Efeito do pré-tratamento com CTAP por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C | 82 |
| 4.12 Efeito da administração <i>in bolus</i> de Zimosan, sobre a concentração intracelular de cálcio, em cultivos primários neurogliais, na OVLT e MnPO | 84 |
| 4.13 Concentrações de TNF α e IL-6, após estímulo <i>in bolus</i> de Zimosan, em cultivos primários neurogliais, na OVLT e MnPO | 87 |
| 4.14 Efeito da administração <i>in bolus</i> de Poli I:C, sobre a concentração intracelular de cálcio, em cultivos primários neurogliais, na MnPO | 89 |
| 5. DISCUSSÃO | 91 |
| 5.1 Curvas de resposta febril induzidas pelo Zimosan e pelo Poli:IC | 92 |
| 5.2 Papel das citocinas nas respostas febris induzidas pelo Zimosan e pelo Poli I:C | 95 |
| 5.3 Papel das Prostaglandinas e dos outros mediadores centrais na resposta febril induzida por Zimosan e Poli I:C, comparadas com a resposta febril induzida pelo LPS: | 101 |
| 5.4 Responsividade do Zimosan e do Poli I:C e expressão de citocinas inflamatórias em sobrenadantes estimulados com Zimosan, em células de cultivo neuroglial de ratos | 105 |
| 6. CONCLUSÕES | 108 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 111 |
| 8. ARTIGOS | 129 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Sinalização e regulação de TLRs | 13 |
| Figura 2 | Principais mediadores da resposta febril. | 31 |
| Figura 3 | Esquema conceitual do sistema termorregulatório. | 35 |
| Figura 4 | Fotomicrografias da OVLT e da MnPO em ratos. | 37 |
| Figura 5 | Exemplo de comparação de imagens de células de cultivo primário neuroglia | 55 |
| Figura 6 | Efeito do Zimosan nas temperaturas abdominal e caudal em ratos. | 60 |
| Figura 7 | Efeito do Ácido Poliinosínico: Policidílico (Poli I:C) nas temperaturas abdominal e caudal em ratos. | 62 |
| Figura 8 | Efeito do Anti-TNF- α na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 64 |
| Figura 9 | Efeito do IL-1RA na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 66 |
| Figura 10 | Efeito do Anti IL-6 na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 68 |
| Figura 11 | Efeito do Anti IFN γ na resposta febril induzida pelo Poli I:C. | 70 |
| Figura 12 | Valores de TNF- α , IL1 β e IL-6 no plasma e valores de IL1 β e IL-6 em CSF em ratos submetidos à administração de Veículo, LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 72 |
| Figura 13 | Efeito da Indometacina na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 74 |
| Figura 14 | Efeito do Celecoxibe na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 75 |
| Figura 15 | Níveis de PGE2 no CSF após a administração de LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 77 |
| Figura 16 | Efeito do BQ788 na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 79 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figura 17 | Efeito do SR140333B na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 81 |
| Figura 18 | Efeito do CTAP na resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. | 83 |
| Figura 19 | Respostas a uma aplicação de Zimosan em cultivo primário neuroglial de ratos. | 86 |
| Figura 20 | Liberação de TNF- α e IL-6 após aplicação de Zimosan ou PBS, em microculturas de OVLT ou MnPO. | 88 |
| Figura 21 | Respostas a uma aplicação de Poli I:C em cultivo primário neuroglial de ratos. | 90 |
| Figura 22 | Resumo dos resultados obtidos. | 110 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido araquidônico
AcP - Proteína acessória
AMPc - Adenosina monofostato cíclico
ANOVA - Análise de variância
AP - Área prostrema
AP-1 - Proteína de ativação 1
ATP – Trifosfato de Adenosina
BHE - Barreira Hematoencefálica
CEUA - Comissão de Ética em Uso Animal
CINC - Quimioatraente neutrofílico induzido por citocina
CLR - *C-type lectin receptor*
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX - Cicloxigenase
CpG - Citosina-fosfato-guanina
CREB - Proteína de ligação do elemento de resposta AMPc
CRF - Fator liberador de corticotrofina
CRH - Hormônio liberador de corticotrofina
CSF - Fluido cerebroespinal
CTAP - D-Phe-Cys-D-Try-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ cíclico
CVO - Órgão circunventricular
CYLD - Gene da cilindromatose
DAMP - Padrão molecular associado a dano
DC - Célula dendrítica
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dsRNA - RNA de cadeia dupla
EIA - *Enzyme Immunoassay*
EIK-1 - Proteína que contém o domínio ETS
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ET - Endotelina
FHV - Febre hemorrágica viral
HLI - Índice de perda de calor
HMGB1 - Proteína B1 do grupo de alta mobilidade
HSP - Proteína do choque térmico
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
i.a.- Intra-articular
ICE - Enzima conversora de interleucina-1 β
i.c.v - intracerebroventricular

IFN – Interferon
IFNGR - receptor de IFN funcional
IKK - IK β quinase
IL- Interleucina
IL-1RA - Antagonista de receptor de interleucina-1
i.m. - Intramuscular
i.p. - Intraperitoneal
IRAK - Quinase associada a receptor de interleucina
IRF - Fator regulatório de interferon
JAK - Janus quinase
JNK - Quinase Jun N-terminal
LBP - Proteína solúvel de ligação a lipídeos
LPS - Lipopolissacarídeo
LRR - Repetições ricas em leucina
MAL - Molécula Adaptadora do Tipo MYD88
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MD2 - Proteína de diferenciação mielóide
MIP - Proteína inflamatória derivada de macrófagos
MnPO - Área pré-óptica mediana
MPO - Área pré-óptica medial
MYD88 - Fator de diferenciação mielóide (gene) 88
NF-K β - Fator nuclear kappa B
NLR - Receptores tipo NOD
ODN - Oligodeoxinucleotídeos
OVL - Órgão vascular da lâmina terminal
PAMP - Padrão molecular associado a patógenos
PG - Prostaglandina
PFPF - Fator pirogênico pré-formado derivado de macrófagos
PLA₂ - Fosfolipase A₂
PO/HA - Área pré-óptica do Hipotálamo Anterior
Poli I:C - Ácido poliinosínico:policitidílico
PRR - Receptores de reconhecimento padrão
RIP-1 - Serino-treonina quinase de interação com o receptor-1
RLR - Receptores do tipo RIG-I
SARM - *Sterile alpha and Armadillo motif protein*
s.c - Subcutâneo
SFO - Órgão subfornical
SHP - *Small heterodimer partner*

SIGIRR - Receptor relacionado à imunoglobulina única de IL-1
SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNC - Sistema nervoso central
SOCS - Supressor de sinalização de citocinas
STAT - Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição
sMYD88 - MYD88 curto
sTLR - Receptor tipo Toll solúvel
TAM - Tecido adiposo marrom
TBK-1 - Quinase de ligação a TANK-1
TIR - Domínio do receptor interleucina- toll
TIRAP - Proteína adaptadora contendo TIR
TLR - Receptor tipo Toll
TNF - Fator de necrose tumoral
TOLLIP - Proteína de interação de Toll
TRAF - Fator associado a receptor TNF
TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
TRAM - Proteína de membrana associada a translocação
TRIF - Adaptador induzido por IFN- β que contém o domínio TIR

RESUMO

A febre é um sinal comum em diversas doenças, sendo definida como um aumento controlado da temperatura corporal decorrente de uma alteração no controle térmico exercido pelo hipotálamo. A resposta febril é induzida por mediadores produzidos durante uma inflamação ou processo infeccioso. O modelo clássico de indução de febre é a administração de lipopolissacarídeo (LPS), proveniente da parede celular de bactérias gram-negativas, a animais de laboratório. Esse modelo está bem estabelecido no que diz respeito aos pirogênicos endógenos envolvidos no processo, dentre eles fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, proteína inflamatória de macrófago (MIP) 1 α e β , interferon (IFN) β e γ e o quimioatraente neutrofílico induzido por citocinas (CINC)-1. A participação de mediadores centrais também está em grande parte estabelecida nesse modelo, e elementos tais como as prostaglandinas (PGs), sistemas opioide e canabinoide, substância P, endotelina (ET)-1 e fator liberador de corticotrofina (CRF) também estão envolvidos. O que não se sabe ao certo é se os mediadores envolvidos na resposta febril induzida por LPS também estão envolvidos na indução de febre em outros estados patológicos, pois há evidências de moléculas que induzem febre e não participam da resposta febril induzida pelo LPS.

Assim, esse trabalho propôs a utilização de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que estimulam uma resposta orgânica a partir da interação com receptores tipo Toll (TLR), a fim de estabelecer modelos de resposta febril em ratos, comparando-o com o LPS (que reconhece TLR4). Os PAMPs utilizados foram o Zimosan (agonista TLR2/6) e o Ácido Poliinosínico:Policitidílico (Poli I:C) (agonista TLR3).

A participação das seguintes citocinas e mediadores centrais na resposta febril induzida por estes PAMPs foi avaliada: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ (somente para Poli I:C), PGs, ET-1, substância P e opioides. Adicionalmente, investigamos se esses PAMPs ativariam importantes regiões cerebrais relacionadas à febre, a partir de cultivos primários neurogliais do Órgão Vascular da Lâmina Terminal (OVLT) (somente para o Zimosan) e do Núcleo Pré-Óptico Mediano (MnPO). Também avaliamos se o estímulo com Zimosan levaria à produção de TNF- α e IL-6 em sobrenadantes desses cultivos celulares.

As injeções intraperitoneais (i.p.) de Zimosan (1, 3 e 10 mg/kg) e de Poli I:C (3, 30 e 300 μ g/kg) levaram a um aumento na temperatura abdominal dose-dependente e coincidente com a diminuição na temperatura da pele desses animais, sugerindo a ativação de mecanismos de conservação de calor, presentes numa resposta febril. A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos contra TNF- α (2,5 μ g), IL-6 (10 μ g), IFN- γ (2,5 μ g) ou o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA, 160 ng) reduziram as respostas febris induzidas por ambos os PAMPs. A injeção i.p. de Zimosan aumentou os níveis plasmáticos de IL-6 3 h após o estímulo, mas não os de TNF- α (após 1 h) ou IL-1 β (após 2 h) no plasma ou das três citocinas no fluido cerebrospinal (CSF). A injeção de Poli I:C não alterou os níveis de citocinas no plasma ou CSF dos animais, nesses mesmos tempos de coleta. O tratamentos com inibidores da síntese de PGs, indometacina (2 mg/kg, i.p.) ou celecoxibe (5 mg/kg, via oral) reduziram as respostas febris induzidas pelos dois PAMPs. A injeção i.p. de Zimosan ou Poli I:C aumentou os níveis de PGE₂ no CSF dos animais, que foi reduzido nos grupos pré-tratados com Indometacina. O antagonista do receptor opioide μ , CTAP (1 μ g), também

reduziu as respostas febris induzidas pelo Zimosan e pelo Poli I:C. No entanto, o antagonista de receptores ET_B, BQ788 (3 pmol) e o antagonista de receptores NK₁, SR 140333B (3 µg) reduziram somente a resposta febril induzida pelo Zimosan. Esses agentes não modificaram a resposta febril induzida por Poli I:C. O Zimosan, na concentração de 100 µg/mL, aumentou a concentração intracelular de cálcio na OVLT e na MnPO de cultivos primários neurogliais, bem como aumentou a liberação de TNF-α e IL-6 nos sobrenadantes desses cultivos. O Poli I:C, na mesma concentração, aumentou a concentração intracelular de cálcio na MnPO.

Esses dados sugerem a participação de TNF-α, IL-1β, IL-6, PGs e opioides, nas respostas febris induzidas por Zimosan e por Poli I:C, no cérebro. As endotelinas e a substância P parecem participar da resposta febril induzida pelo Zimosan, porém não pelo Poli I:C. A citocina IFN-γ também parece estar envolvida na resposta febril do Poli I:C. Adicionalmente, esses PAMPs podem diretamente ativar áreas cerebrais relacionadas a febre, conforme dados obtidos nos experimentos com cultivo primário neuroglial.

Desse modo, existem diferenças na resposta febril induzida por LPS, comparada com o modelo de indução de febre viral (Poli I:C), pois alguns mediadores centrais não estão envolvidos na resposta febril desta. No que se diz respeito à resposta febril induzida pelo modelo de indução de febre fúngica, o Zimosan provavelmente compartilha mecanismos semelhantes ao da febre induzida por LPS, porém o tempo de liberação das citocinas após o estímulo com o Zimosan parece ser distinto.

Como conclusão, chegamos a dois modelos de indução de resposta febril, distintos do modelo clássico, o induzido por LPS. Estes modelos poderão ser mais bem investigados, com relação aos demais mediadores de resposta febril. Futuramente, essas substâncias poderão servir como instrumentos de pesquisa para mecanismos fisiopatológicos de enfermidades e possíveis alvos terapêuticos.

ABSTRACT

Fever is a common signal in several diseases, defined as a controlled increase in body temperature, with thermal control localized in the hypothalamus. Fever is induced by molecules which are produced during an inflammation or infection. The classical model of fever is the injection of lipopolysaccharide (LPS), derived from gram-negative bacteria, in laboratory animals. This model is well established, concerning endogenous pyrogens related to this process, such as Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α e β , interferon (IFN) β e γ and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1. The participation of central mediators is well elucidated in this model, and elements such as prostaglandins (PGs), opiodergic and cannabinoid systems, substance P, endothelin (ET)-1 and CRF seem to be present in this process. What is still unknown is whether LPS is valid as a fever-inducing model in other pathologic states, because there is some evidence of molecules which induce fever and do not participate in the LPS model.

Hence, this work aimed to use pathogen-associated molecule patterns (PAMPs), which stimulate an organic response from their interaction with Toll-like receptors (TLRs), in order to establish febrile response models in rats, and then comparing them to LPS (which recongnizes TLR4). The chosen PAMPs were Zymosan (a TLR2/6 agonist) and Polyinosinic:Policitidilic acid (Poly I:C) (a TLR3 agonist).

The role of the following cytokines and central mediators in these PAMPs-induced febrile responses was assessed: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ (only Poly I:C), PGs, ET-1, substance P and opioids. We also investigated if these PAMPs were able to activate fever-related brain regions, from primary neuroglial cultures of the vascular organ of the laminae terminalis (OVLT) (only Zymosan) and the median preoptic nucleus (MnPO). We also studied if Zymosan was capable to stimulate the production of TNF- α and IL-6 in supernadants from the same cellular cultures.

Intraperitoneal (i.p.) injection of Zymosan (1, 3 and 10 mg/kg) and Poly I:C (3, 30 and 300 μ g/kg) led to an increase in core temperature, coincident to a decrease in skin temperature, suggesting heat conservation mechanisms, which are present in a febrile response. The intracerebroventricular (i.c.v.) administration of antibodies against TNF- α (2.5 μ g), IL-6 (10 μ g), IFN- γ (2.5 μ g) or the IL-1 antagonist receptor (IL-1RA, 160 ng) reduced both PAMPs-induced febrile responses. The Zymosan i.p. injection increased IL-6 plasmatic levels 3 hours after the stimulous, but not those of TNF- α (after 1 hour) nor IL-1 β (after 2 hours). None of these cytokines had their CSF levels altered. The Poly I:C injection did not change these cytokines levels in CSF and plasma, at the same time collect points. The treatment with the PGs synthesis inhibitors, indometachin (2 mg/kg, i.p.) and celecoxib (5 mg/kg, by oral route) reduced the two PAMPs- induced febrile responses. The i.p. injection of both substances led to increases of PGE₂ in the cerebrospinal fluid (CSF) of the animals, and these increases were reduced in the Indomethacin pre-treated groups. The μ opioid receptor antagonist, CTAP (1 μ g), reduced Zymosan and Poly I:C – induced febrile responses, as well. However, the ET_B receptor antagonist, BQ788 (3 pmol) and the NK₁ receptor antagonist, SR 140333B (3 μ g) were able to reduce only the Zymosan-induced febrile response. These substances did not change the Poly I:C-induced febrile response. Zymosan, in a 100 μ g/mL concentration, augmented the intracelular calcium signals in OVLT and MnPO from primary neuroglial cultures, as well as increased the TNF- α and IL-6 release from supernadants of these cultures. Poly I:C, at the same concentration, increased intracelular calcium signals in MnPO.

Summarized, these data suggest the TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGs and opioids participation in the Zymosan and Poly I:C-induced febrile responses, in the brain. The ETs and substance P seem to participate only of the Zymosan fever, although not the Poly I:C one. Additionally, these PAMPs may directly activate brain regions related to fever, as shown during primary neuroglial culture experiments.

Thereby, there are significant differences in the LPS-induced febrile response, compared to the viral fever model (Poly I:C), because some central mediators are not involved in the last febrile response. Concerning the fungal model of febrile response induction, Zymosan probably shares similar mechanisms with LPS fever, although the cytokines time release seems to be different.

As conclusion, we have now two models of febrile response induction, which are distinct from the classical model. These models can be better investigated, concerning the other febrile response central mediators. In the future, these substances can act as research tools to study pathophysiological mechanisms and possible therapeutic targets.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Definição de febre e breve histórico dos estudos de resposta febril

A febre é um sinal clínico presente em diversas enfermidades, e conhecido como um marcador de infecção (DINARELLO, 2004). De maneira poética, Thomas Sydenham, médico inglês do século XVII, definiu a febre como *um poderoso motor que a natureza traz para o mundo para a conquista de seus inimigos* (ATKINS, 1982).

Essa manifestação clínica tem sido descrita, estudada e discutida ao longo da história da humanidade. Papiros egípcios que datam de cerca de 5000 anos atrás, relatam a formação de pus em um processo patológico, muitas vezes acompanhada por febre (CARTMELL; MITCHELL, 2005). Inscrições acadianas datadas do século VI a.C., derivadas de um pictograma sumérico anterior, mostram um brasão flamejante, simbolizando a febre e o calor local da inflamação (ATKINS, 1982). Médicos militares romanos escreveram a respeito da resolução da febre em soldados após a drenagem de pús, demonstrando que há muito tempo a febre tem sido relacionada a infiltrados leucocitários (apud DINARELLO, 2004).

Segundo as revisões de Atkins (1982) e Mackowiak (1998), na Grécia Antiga, os escritos de Hipócrates possuem descrições de doenças febris: as febres sustentadas da pneumonia, as febres intermitentes da malária e o aumento gradual na temperatura com os primeiros sintomas da febre tifoide estão todos descritos corretamente, embora não se saiba como tais observações foram feitas antes do advento do termômetro clínico, no século XVIII (ATKINS, 1982; MACKOWIAK, 1998). O legado de Hipócrates era composto da doutrina dos quatro humores: sangue, flegma, bile negra e bile amarela, os quais se encaixavam aos quatro elementos correspondentes – ar, água, terra e fogo – e suas quatro qualidades - molhado, frio, seco e quente. Assim, a doença, em termos hipocráticos, resultava de um desbalanço destes humores, com a febre devido a um excesso de bile amarela que, como o fogo, era quente e seca (ATKINS, 1982).

Durante a Idade Média, as possessões demoníacas foram adicionadas à lista dos possíveis mecanismos responsáveis pela febre. Por volta do século XVII, as descobertas de Harvey, a respeito da circulação do sangue, além do nascimento da microbiologia, levaram os estudiosos da época a hipotetizar, alternativamente, que o

calor corporal e a febre resultam de uma fricção associada ao fluxo sanguíneo através do sistema vascular e a partir de fermentação e putrefação no sangue e intestinos (ATKINS, 1982; MACKOWIAK, 1998).

O médico francês Broussais, no século XVIII, tentou correlacionar as diferentes manifestações da doença febril com mudanças correspondentes nos tecidos, vistas em necropsias. Ao postular um agente irritante (ou inflamatório) como o causador inicial das mudanças patológicas, ele sugeriu, em conclusão, que a febre pode ter um efeito benéfico, ao destruir microrganismos ou pelo aumento na resistência do hospedeiro à infecção (MACKOWIAK, 1998). O fisiologista francês Claude Bernard, em fins do século XIX, reconheceu os processos metabólicos do organismo como fonte do calor corporal. Trabalhos subsequentes estabeleceram que a temperatura corporal seria fortemente controlada dentro de uma estreita variação, por mecanismos que regulam o grau de dissipação do calor (ATKINS, 1982).

Como mencionado anteriormente, foi no século XIX que as primeiras hipóteses a respeito da fisiopatologia da febre surgiram. William Welch, em 1888, associou febre com infecção, e indagou se agentes microbianos produziam febre através da liberação de “fermentos” (que poderiam ser as citocinas) possivelmente por leucócitos, e que esses “fermentos” agiriam no cérebro, para iniciar as mudanças responsáveis pelo aumento da temperatura corporal (apud CARTMELL; MITCHELL, 2005). A estes fermentos, Welch deu o nome de pirogênios endógenos, enquanto que os pirogênios exógenos seriam as substâncias ou agentes capazes de produzi-los.

Estudos mais contemporâneos na patogênese da febre se originaram há 70 anos, com as observações independentes de Menkin, e mais tarde por Bennet e Beeson de que um material pirogênico poderia ser extraído de exsudatos inflamatórios estéreis (ATKINS, 1982; MACKOWIAK, 1998). Estes últimos, por exemplo, estabeleceram claramente em um estudo utilizando coelhos, que leucócitos derivados de exsudatos, sangue, ou lesões inflamatórias variadas, eram fontes de pirogênios endógenos (MACKOWIAK, 1998). A primeira demonstração experimental de que um material protéico livre de endotoxina e derivado de leucócitos era um pirogênio, foi descrito em 1948 por Paul Beeson (apud DINARELLO, 2004).

A administração de lipopolissacarídeo (LPS) (proveniente de parede celular de bactérias Gram-negativas) a animais de laboratório representa um dos modelos clássicos de indução da resposta febril, mimetizando o que ocorre naturalmente em processos infecciosos por este tipo de bactéria (ROTH; DE SOUZA, 2001). É a ferramenta farmacológica mais estudada como modelo de resposta febril e cujos componentes envolvidos são mais conhecidos. Descoberto em 1892 por Pfeiffer (apud CARTMELL; MITCHELL, 2005), o LPS começou a ser associado com estudos de resposta febril a partir dos anos 60 do século XX em coelhos, ovelhas e humanos. Nos anos 70, a descoberta das citocinas e o início do entendimento de seu papel também colaboraram grandemente para os avanços da pesquisa na área (apud DINARELLO, 2004). A partir desses últimos avanços, podemos dizer que chegamos aos atuais estudos da resposta febril e seus mecanismos, com os relatos e descobertas que serão revisados nos próximos tópicos.

Atualmente, pode-se definir febre como um aumento controlado da temperatura corporal, ocasionado por uma elevação do ponto de regulação da temperatura corporal (KLUGER, 1986). Importante comentar que, durante a febre, não ocorre uma desregulação nos mecanismos de controle de temperatura. Pelo contrário, o sistema de controle termorregulatório está ajustado para aumentar a temperatura corporal a fim de equiparar a um ponto de regulação mais alto (ROTH et al., 2009). O ponto de regulação da temperatura corporal está localizado no hipotálamo e, especificamente, a área pré-óptica no hipotálamo anterior (PO/HA) exerce um controle integrativo sobre as respostas termorregulatórias e febril (BOULANT, 2006), como veremos adiante nessa revisão.

Essa alteração hipotalâmica ocorre após uma infecção ou um dano inflamatório. Como comentado anteriormente, uma forte associação entre febre e infecção foi reconhecida há muito tempo. Por isso a febre é frequentemente considerada um marcador de infecção (ROTH et al., 2009). A manifestação da febre, no entanto, não está restrita às doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, protozoários, fungos, entre outros. A febre também é observada em resposta a danos, como em cirurgia, traumas, tratamentos com medicamentos ou insultos térmicos. Ainda, mecanismos endógenos como as respostas autoimunes (por exemplo, artrite reumatoide) e os

tumores frequentemente estão acompanhados de febre (MACKOWIAK, 1998; KANASHIRO et al., 2009).

Um grande avanço no estudo da febre se deve à descoberta dos Receptores Tipo-Toll (TLRs – *Toll like receptors*) e a sua importância no desencadeamento dos fatores que levam às alterações hipotalâmicas referentes à resposta febril (DINARELLO, 2004). O LPS, por exemplo, estimula receptores do tipo TLR4 em células fagocíticas (particularmente em macrófagos) (ADEREM; ULEVITCH, 2000), induzindo a liberação de citocinas, que por sua vez ativam mediadores centrais que levam a mensagem à área PO/HA para indução de febre (KLUGER et al., 1998), em eventos que comentaremos adiante.

Para que a temperatura corporal se mantenha em níveis mais elevados, o organismo desencadeia mecanismos de produção e retenção de calor, como vasoconstrição periférica, termogênese induzida por tremores e aumento da taxa metabólica no tecido adiposo marrom (KLUGER et al., 1998; DINARELLO, 2004), assim como ativa respostas comportamentais, como a busca por ambientes mais quentes (FLOREZ-DUQUET et al., 2001). Esses detalhes serão revistos na sequência.

Os eventos acima descritos para a resposta febril, bem como os alvos deste estudo, são referentes principalmente a animais endotérmicos, ou seja, àqueles que possuem um centro termorregulatório localizado no hipotálamo, e que não dependem inteiramente da temperatura ambiental para regular a sua temperatura corporal. No entanto, a febre está presente em todas as espécies animais, incluindo os invertebrados e vertebrados ectotérmicos (KLUGER et al., 1998; BOLTAÑA et al., 2013). Esses indivíduos, em geral, controlam a sua temperatura corporal através de meios comportamentais, o que inclui a escolha de uma temperatura ambiental apropriada. Animais ectotérmicos não possuem termogênese intrínseca e assim, podem se deslocar para lugares mais quentes ou mais frios para modificar a sua temperatura corporal (KLUGER, 1986; KLUGER et al., 1998; BOLTAÑA et al., 2013). Mudanças nesse comportamento podem ocorrer quando o animal apresenta infecção, em um fenômeno denominado febre comportamental (BOLTAÑA et al., 2013). Essa resposta tem sido bastante estudada e evidências da participação de regiões do hipotálamo

nesse comportamento febril como, por exemplo, a área pré-óptica, têm sido reportadas em espécies ectotérmicas (BICEGO; BRANCO, 2002).

Em face aos conceitos e fatos apresentados, resta ainda esclarecer que os eventos térmicos na resposta febril são apenas um dos componentes de uma reação do hospedeiro a um insulto, conhecida como resposta de fase aguda. Esse evento envolve a ativação de sistemas fisiológicos, endócrinos e imunológicos. Além da febre, outros componentes identificados nessa resposta incluem, por exemplo, o comportamento de doença, a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e síntese de proteínas de fase aguda (CARTMELL; MITCHELL, 2005).

Em um cenário mais complexo de resposta fisiopatológica a um insulto, a febre é um critério diagnóstico na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Essa síndrome, por sua vez, quando acompanhada de infecção, é definida como sepse. A febre é um marcador importante no quadro de SIRS, podendo cursar com outros sinais clínicos, tais como mudanças no estado mental do paciente, taquipnéia, taquicardia, hipotensão, leucocitose, trombocitopenia e anormalidades de coagulação sanguínea (DEJONG et al., 2010; BALK, 2014).

A função benéfica da febre como componente de reação a um dano ainda é controversa (HASDAY et al., 2000). O que parece evidente é que febres moderadas podem ser favoráveis em combater uma infecção. Sabe-se que a febre fornece um ambiente favorável para o recrutamento das defesas do hospedeiro contra microorganismos, reduzindo a viabilidade dos patógenos (NAKAMURA; MORRISON, 2011). Estudos conduzidos em animais demonstraram os efeitos positivos da manifestação da febre na sobrevivência do hospedeiro (SU et al., 2005). Estudos retrospectivos em indivíduos hospitalizados com infecção bacteriana reportaram um aumento na taxa de mortalidade nos pacientes que não desenvolviam febre (HASDAY et al., 2000).

Em pacientes graves, o uso de antipiréticos ainda é objeto de estudo. Enquanto algumas opiniões defendem que febres mais altas podem ser sinais de um dano exagerado e prejudicial e, portanto, devem ser combatidas com agentes antipiréticos (KLUGER et al., 1998) revisões a partir de dados retrospectivos em unidades de tratamento intensivo não encontraram informações consistentes entre a relação do

combate terapêutico da febre e um aumento na sobrevivência do indivíduo (NIVEN et al., 2013; KIEKKAS et al., 2013). Um estudo conduzido em 2012 sugeriu que essa relação pode ser diferente se a origem da enfermidade é infecciosa ou não, visto que foi encontrada uma maior taxa de sobrevivência somente em pacientes críticos que apresentavam sepse submetidos a tratamento antipirético (LEE et al., 2012). Desse modo, este continua sendo um campo importante de investigação, e os componentes moleculares envolvidos nesse processo são de fundamental auxílio no esclarecimento desses fatos.

1.2 Receptores tipo Toll e padrões moleculares associados a patógenos

Quando um organismo é infectado, células hospedeiras expressam muitos receptores de reconhecimento padrão (PRR - *Pattern recognition receptors*), responsáveis por distinguir uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern* – Padrão molecular associado a Patógeno). Estes PAMPs são, por sua vez, advindos de lipídeos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos. Evidências mais recentes indicam que os PRRs são também responsáveis pelo reconhecimento de moléculas endógenas, liberadas de células danificadas. A essas moléculas dá-se o termo DAMP (*Damage-associated molecular pattern* - Padrão molecular associado a dano) (KAWAI; AKIRA, 2007; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O reconhecimento de PAMPs /DAMPs através de PRRs ativa vias de sinalização intracelulares que culminam na indução de citocinas inflamatórias, quimiocinas, interferons (IFNs), além da regulação positiva de moléculas co-estimulatórias (KAWAI; AKIRA, 2007), estando esses receptores portanto, envolvidos em processos inflamatórios e/ou infecciosos.

Com seu nome derivado dos receptores Toll em insetos, os TLRs tiveram a sua identificação em mamíferos em 1997 (ANWAR et al., 2013). Possuem papel importantíssimo na ligação das imunidades inata e adaptativa, através das ações em células T e particularmente através de ações em células dendríticas (DCs) (PARKER et al., 2007). Uma resposta imune inata que é mediada através da sinalização de TLR

gera respostas de fase aguda, caracterizada pela produção de citocinas e respostas sistêmicas subsequentes, como a febre (GAY et al., 2006).

São exemplos de células que expressam TLRs os monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T, astrócitos, células epiteliais e células endoteliais (ZHANG; SCHLUESENER, 2006).

Com relação à estrutura desses receptores, três fatores são de fundamental importância: a) o domínio citoplasmático Toll / Interleucina (IL)-1, também conhecido como TIR, cujo nome se deve a sua semelhança com a família de receptores de IL-1, b) o domínio transmembrana curto (cisteína) e c) o domínio de ligação com repetições ricas em leucina (LRR). Cada LRR consiste de filamentos β e α -hélices, conectados por alças. Costuma-se associar a estrutura do domínio LRR com o de uma ferradura, com a região de ligação ao ligante na superfície côncava (UEMATSU; AKIRA, 2008).

De acordo com a localização celular, os TLRs podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 que estão presentes na membrana plasmática e predominantemente, mas não exclusivamente, reconhecem produtos bacterianos. O segundo grupo inclui TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13, que se localizam em compartimentos intracelulares, como endossomos, e se especializaram na detecção viral ou no reconhecimento de ácidos nucléicos (PARKER et al., 2007; KAWAI; AKIRA, 2007; BROZ; MONACK, 2013).

Os ligantes de TLRs são, na sua maioria, produtos microbianos conservados entre uma variedade de patógenos, sendo que os TLRs podem reconhecer muitos ligantes estruturalmente não relacionados. Os TLRs ligam-se diretamente aos seus ligantes, discriminando suas estruturas, e induzindo respostas de defesa quando necessário (ZHANG; SCHLUESENER, 2006).

De todos os 13 TLRs reconhecidos na atualidade, o mais estudado com certeza é TLR4, que reconhece o LPS (UEMATSU; AKIRA, 2008; PIRAS; SELVARAJOO, 2014). O LPS, através de TLR4, requer o correceptor MD2 (proteína de diferenciação mielóide), que se liga a lipídeos, fortemente associada ao ectodomínio de TLR4, e ativados quando do LPS opsonizado. Inicialmente, o LPS se encontra ligado a proteínas solúveis de ligação a lipídeos (LBP). O LPS presente no complexo LPS/LBP é então transferido a CD14, uma proteína de membrana encontrada na superfície de

muitas células do sistema imune, e em seguida à MD2, assim, ativando TLR4 (GAY et al., 2006), que ativa uma cascata de quinases na sequência.

Além do TLR4, outros receptores possuem alguns dos seus ligantes já identificados. O TLR2 reconhece alguns componentes de bactérias, micoplasmas, fungos e vírus, incluindo lipoproteínas e micoplasma, ao formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6. Esses complexos diméricos, por sua vez, são responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas bacterianas, fúngicas e lipopeptídeos (OZINSKY et al., 2000; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O TLR3 tem sido reconhecido como o receptor principal nas respostas imunes inatas mediadas por vírus, pois esse receptor reconhece RNA de cadeia dupla (dsRNA, *double stranded RNA*), um intermediário gerado durante muitas replicações virais, iniciando vias de sinalização antivirais em macrófagos, incluindo a produção de interferon (IFN) α e β . Um ligante sintético, o ácido poliinosínico:policitidílico (Poli I:C), pode também mediar respostas imunes através da ativação de TLR3 (ZHOU et al., 2010).

O TLR8 humano, que tem grande homologia ao TLR7, participa do reconhecimento de imidazoquinolinas. O TLR9 reconhece fragmentos de DNA presentes em genomas bacterianos e virais, bem como ácidos não-nucleicos como a hemozoína, do parasita da malária (KAWAI; AKIRA, 2007; UEMATSU; AKIRA, 2008). Da mesma forma que as lipoproteínas, o DNA bacteriano pode iniciar uma resposta imune inata via receptor TLR9.

Acredita-se que o TLR10 humano se heterodimeriza com TLR2 e TLR1, embora um ligante para estes heterodímeros continue desconhecido. TLR5 e TLR11 reconhecem ligantes protéicos. O TLR11 reconhece flagelinas de bactérias uropatogênicas, assim como uma proteína do *Toxoplasma gondii* (UEMATSU; AKIRA, 2008; BROZ; MONACK, 2013). O TLR13, pouco conhecido, parece detectar RNA bacteriano (ANWAR et al., 2013).

Com relação aos seus ligantes endógenos, ou DAMPs, são exemplos os produtos de degradação de macromoléculas e de cascatas proteolíticas, componentes intracelulares da ruptura de células e produtos de genes que são ativados pela inflamação. Em certas condições, como lesão tecidual ou deficiência na limpeza de

células apoptóticas, ácidos nucleicos derivados do indivíduo podem se tornar disponíveis para alguns TLRs e servem como ligantes endógenos (ZHANG; SCHLUESENER, 2006).

O mecanismo básico de sinalização pelos TLRs parece envolver ligantes induzidos por dimerização ou oligomerização (GAY et al., 2006), como comentado acima, ao exemplificarmos os ligantes e seus TLRs. O reconhecimento de ligante é determinado pela LRR no domínio extracelular no receptor. Alguns TLRs provavelmente reconhecem seus ligantes numa associação de outros TLRs, ou comoléculas, formando complexos de ativação na membrana (PARKER et al., 2007; KAWAI; AKIRA, 2007). A via de sinalização desses receptores inclui a ativação de vias de transdução intracelulares que levam à indução de citocinas inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , Interleucina (IL)-6, IL-1 β e IL-12, logo após o reconhecimento do receptor ao PAMP. Muitos TLRs são capazes de induzir IFN tipo I, promovendo respostas antivirais (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

De acordo com o tipo celular, ligante e outros fatores, TLRs ativam diferentes vias de sinalização através de cofatores e moléculas de adaptação, disparando respostas imunes específicas. A via-protótipo é a dependente do gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88), utilizada por todos os receptores dessa classe, com exceção de TLR3, e requer a Molécula Adaptadora do Tipo MYD88 (Mal), também conhecida como Proteína Adaptadora que contém o domínio TIR (TIRAP), para a sinalização de TLR2 e TLR4 (PARKER et al., 2007; PIRAS; SELVARAJOO, 2014). Outra via é a da TRIF (adaptador induzido por IFN- β que contém o domínio TIR), também conhecida como a via independente de MYD88. Ambas participam na ativação de uma cascata de quinases, entre elas a IK β quinase (IKK), a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), serino-treonina quinase de interação com o receptor-1 (RIP-1) e a quinase de ligação a TANK-1 (TBK-1). Essas vias tem como resultado comum a regulação principalmente do fator nuclear κ B (NF κ B). Além dele, outros fatores de transcrição podem ser regulados, como a proteína de ativação 1 (AP-1), a proteína que contém o domínio ETS (EIK-1), proteína de ligação do elemento de resposta AMPc (CREB), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), e o fator regulatório de interferon (IRF)-3 (AKIRA; SATO, 2003; VOGEL et al., 2003; ANDREAKOS et al.,

2004). O MYD88 ocupa o domínio TIR na porção C-terminal, ativa uma quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK) através de interações no domínio final em ambas as moléculas. A molécula IRAK é ativada através de fosforilação e então associada aos fatores associados ao receptor de TNF (TRAF), levando ao acionamento de duas vias de sinalização, e finalmente à ativação de quinases terminais C-jun (JNK) e NF- κ B. (HEMMI et al., 2000; PARKER et al., 2007; BEUTLER, 2009). Um quinto adaptador, SARM (*sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein*), ainda não tem função definida como adaptador de TLR (BEUTLER, 2009), mas sabe-se que é predominantemente expresso em células T e no cérebro, e não em macrófagos, como a maioria dos outros adaptadores (PANNEERSELVAM et al., 2013).

Todas essas vias regulam a transcrição, estabilidade de RNA mensageiro e tradução de uma miríade de genes proinflamatórios. O resultado disso é a produção de citocinas proinflamatórias, quimiocinas e enzimas (BROZ; MONACK, 2013; PIRAS; SELVARAJOO, 2014).

A regulação das vias desses receptores envolve principalmente a limitação da inflamação, por meio de *down-regulation* da expressão de TLRs, sequestro de moléculas sinalizadoras, degradação de alvos protéicos e inibição da transcrição (AKIRA; SATO, 2003). As vias dos PRRs são controladas por moléculas intra e extracelulares, com o intuito de prevenir a superexpressão desses receptores. Entre as moléculas, incluem-se receptores tipo Toll solúveis (sTLR); proteínas transmembrana, como os marcadores ST2 e CD-180, o receptor relacionado à imunoglobulina única de IL-1 (SIGIRR) e o ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL); e inibidores intracelulares, por exemplo os supressores de sinalização de citocinas (SOCS) 1 e 3, o MYD88 curto (sMYD88), a proteína de interação de Toll (TOLLIP), o IRAK-M (proteína IRAK exclusiva de monócitos / macrófagos, a superexpressão da proteína SARM que comentamos anteriormente, a proteína de dedos de zinco A20, a β -arrestina, o gene da cilindromatose (CYLD), e o receptor nuclear SHP (*small heterodimer partner*). Essas moléculas mantêm o balanço entre a ativação da inibição dos TLRs e garantem o equilíbrio entre os efeitos benéficos e adversos quando do reconhecimento de antígeno (ANWAR et al., 2013) Grande parte dessa via de ativação e regulação dos TLRs está esquematizada na Figura 01.

Além dos TLRs, mais três famílias de PRRs tem sido identificadas. Entre elas, outra família de receptores primariamente transmembrana, como os CLR (C-type lectin receptors), além das proteínas citoplasmáticas NLRs (receptores tipo NOD) e RLRs (receptores do tipo RIG-I) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Até o momento, os TLRs são os PRRs mais conhecidos e estudados, provavelmente por terem sido também os primeiros a serem caracterizados (BROZ; MONACK, 2013).

As particularidades envolvendo a localização e seletividade de diferentes TLRs, bem como as diferentes vias ativadas dependendo do receptor, foram um grande estímulo para esse trabalho, nos levando a formular hipóteses que relacionariam a ativação de vias TLR com os mediadores que levam a uma resposta febril. Desse modo, a resposta febril induzida por diferentes agonistas de TLRs (também designados pirogênios exógenos, como veremos adiante) poderia induzir a síntese de distintas citocinas pirogênicas e mediadores centrais, ou liberar essas moléculas em diferentes quantidades, quando comparadas a uma resposta febril mais conhecida. Em consequência, é possível que estas diferenças resultem na ativação diferenciada de mecanismos fisiopatológicos. Em última análise, o entendimento desta ativação diferenciada poderia contribuir para o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais adequadas para controlar a resposta febril, em indivíduos acometidos por febres decorrentes de doenças causadas por diferentes agonistas de TLRs.

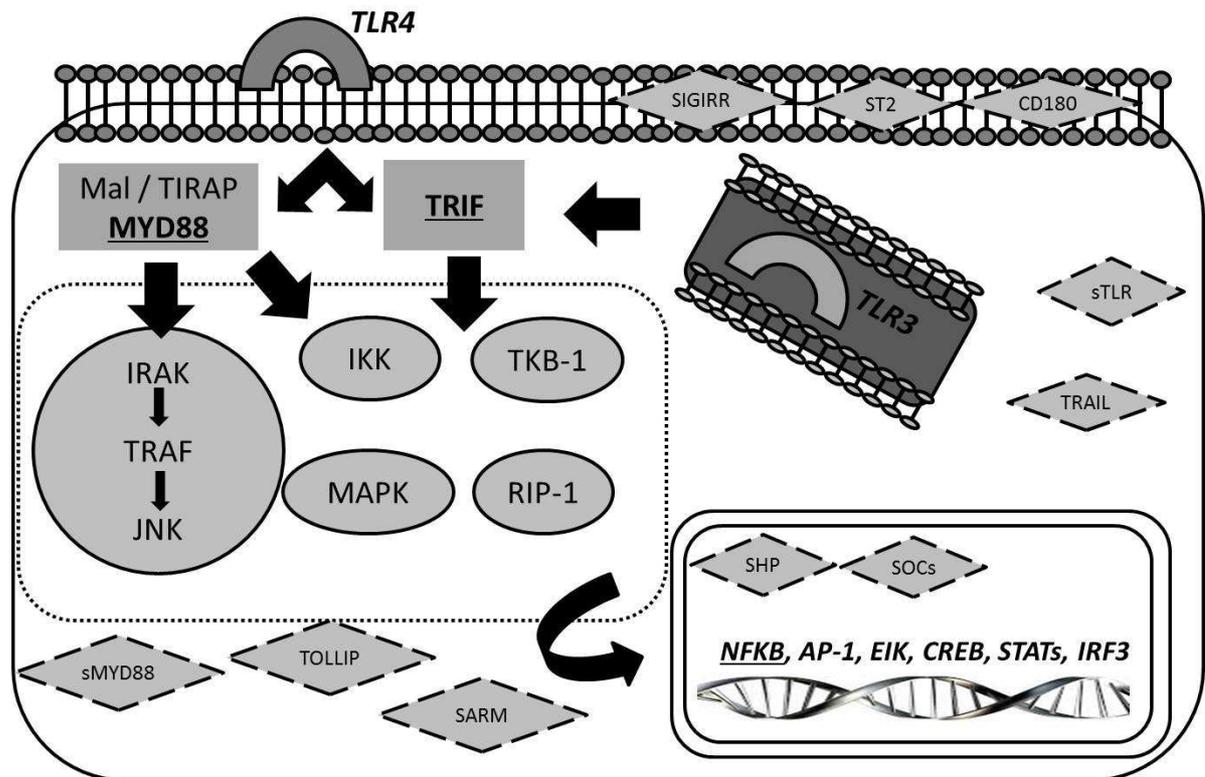


Figura 01: Sinalização e regulação de TLRs. O TLR4, que reconhece endotoxina bacteriana, por exemplo, é uma proteína transmembrana cuja ativação leva à indução de duas vias de transdução de sinais: a que envolve a molécula MYD88 e a correspondente à proteína adaptadora TRIF. Já o TLR3, localizado no endossoma, reconhece componentes virais como o RNA de dupla cadeia, e irá ativar somente a via TRIF. Ambas as vias promovem a ativação de cascatas de quinases (IRAK/TRAF/JNK, IKK, TBK-1, MAPK, RIP-1), que por sua vez culminam na ativação de fatores de transcrição nucleares, especialmente o NFkB, além de AP-1, EIK, CREB, STATs e IRF3. SIGIRR, ST2, CD180, sTLR, TRAIL, sMYD88, TOLLIP e SARM, representados em losangos vasados, são exemplos de proteínas de regulação e controle dessas vias.

1.3 Pirogênios exógenos

Os pirogênios são substâncias que podem induzir uma resposta febril, podendo ser diferenciados em exógenos e endógenos. Essa distinção é fundamental para entender a febre como uma resposta comum a diferentes estímulos e enfatiza a importância dos estudos das vias de sinalização de TLRs. Essas vias fornecem uma ligação molecular entre o grande número de pirogênios exógenos e endógenos (DINARELLO, 2004; BEUTLER, 2009).

Os pirogênios exógenos são essencialmente, microrganismos – inteiros ou seus fragmentos – ou ainda produtos desses microrganismos, como as toxinas (OGOINA, 2011). Como já revisamos anteriormente, esses produtos microbianos ativam vias inflamatórias através de sinalização via TLRs, podendo levar à febre. Consequentemente, podemos concluir que os pirogênios exógenos são PAMPs ou DAMPs que vão ativar vias inflamatórias e induzir uma resposta febril.

Os pirogênios exógenos podem induzir a produção de pirogênios endógenos, através da ativação da sinalização de vias Toll, e as duas classes de pirogênios podem levar à indução de mediadores centrais, onde as prostaglandinas são o exemplo mais comum (DINARELLO, 2004).

1.3.1 Lipopolissacarídeo

O LPS, componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, continua sendo o pirogênio exógeno mais amplamente estudado, e a grande parte dos dados atuais referentes à resposta febril são baseados em estudos em que o LPS foi utilizado como agente pirogênico.

Já está bem demonstrado que citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α participam da resposta febril induzida por LPS através de estudos utilizando anticorpos e antagonistas específicos (LONG et al., 1990; OPP; KRUEGER, 1991) ou animais *knock-out* (KOZAK et al., 1995; CHAI et al., 1996; LEON et al., 1997) e que a administração sistêmica de LPS induz um aumento no sistema nervoso central destas citocinas (SCHÖBITZ et al., 1993; QUAN et al., 1994; GIVALOIS et al., 1994; LENCZOWSKI et al., 1997). A participação de prostaglandinas, do fator de liberação de corticotrofina (CRF), da

endotelina (ET)-1 e dos opióides na resposta febril induzida por LPS também já está bem documentada (MILTON, 1989; ROTHWELL, 1989, 1990; COELHO et al., 1993; ZAMPRONIO et al., 1994, 2000; USHIKUBI et al., 1998; FABRICIO et al., 2006; FRAGA et al., 2008).

Com relação à sua estrutura, três regiões são destacadas: lipídeo A, um núcleo de açúcar que consiste de porções de KDO e o antígeno O, formado por unidades repetidas de oligossacarídeos. Destas, o lipídeo A recebe especial atenção, pois várias evidências indicam essa estrutura como a determinante nas propriedades tóxicas e pirogênicas das endotoxinas. É o lipídeo A que se liga ao receptor TLR4, e desencadeia a via de sinalização, descrita anteriormente, que culmina na ativação da resposta febril (MAESHIMA; FERNANDEZ, 2013).

No entanto, não sabemos claramente se as vias estabelecidas focalizando o LPS (portanto, infecções com bactérias Gram-negativas) ocorrem também em outras situações clínicas. Soares e colaboradores, em 2009, demonstraram que a proteína inflamatória derivada de macrófagos (MIP)-1 α pode induzir febre, mas não participa da resposta febril induzida por LPS (SOARES et al., 2009). Este resultado, bem como outras evidências que não foram entendidas completamente há alguns anos atrás, podem estar relacionadas ao fato de que o modelo laboratorial para indução de febre nos estudos científicos é o LPS, enquanto diversas doenças (de origem infecciosa ou não) apresentam esta resposta. Portanto, este modelo pode não ser válido para indução de febre em outros estados patológicos. Na tentativa de definir modelos de resposta febril associada a outros PAMPs é que propusemos esse trabalho, que focou em duas outras moléculas: o Zimosan e o Poli I:C, comparados ao LPS.

1.3.2 Zimosan

A incidência de doenças fúngicas tem aumentado em todo o mundo (NUCCI et al., 2010). Em epidemias e tratamentos crônicos que levam à imunossupressão, o risco de doença fúngica invasiva é maior, levando a maiores taxas de morbidade, mortalidade e conseqüentemente maiores custos hospitalares. (LASS-FLÖRL, 2009; NUCCI et al., 2010; DRGONA et al., 2014). No entanto, os mecanismos envolvidos na sua patogenicidade ainda não estão completamente elucidados. As diretrizes

disponíveis para prevenção e/ou tratamento de doenças fúngicas invasivas são normalmente baseadas em ações empíricas (DIMOPOULOS et al., 2013; DRGONA et al., 2014). Por essas razões, estudos experimentais tendo como foco a fisiopatologia das doenças fúngicas, incluindo os mecanismos de indução da resposta febril, são de fundamental importância para a pesquisa de abordagens terapêuticas mais específicas e efetivas.

O Zimosan é um PAMP derivado de fungos, principalmente composto de polissacarídeos (DICARLO; FIORE, 1958; ROEDER et al., 2004). É conhecido por agir através de TLR2 e TLR6 (OZINSKY et al., 2000). Como ferramenta laboratorial, tem sido usado para induzir artrite (GEGOUT et al., 1994, 1995) e outras condições inflamatórias, como edema de orelha, peritonite e choque (NAVARRO-XAVIER et al., 2010; HARTOG et al., 2013; HAN et al., 2013). Foi também demonstrado que o Zimosan pode diretamente estimular células inflamatórias (SORENSEN et al., 1998). Em alguns desses casos, sua associação com a síntese de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi reportada (SORENSEN et al., 1998; NAVARRO-XAVIER et al., 2010; HARTOG et al., 2013). O Zimosan também já foi utilizado para induzir febre em animais de laboratório (KOBAYASHI; FRIEDMAN, 1964; HÜBSCHLE et al., 2007; KANASHIRO et al., 2009). Em comparação ao LPS, os mediadores e mecanismos envolvidos na resposta febril induzida pelo Zimosan são em grande parte desconhecidos.

1.3.3 Ácido Poliinosínico:Policitidílico

A infecção por diversas viroses pode levar a uma disfunção sistêmica em coagulação e fibrinólise e, em casos mais extremos, ao desenvolvimento de síndrome de febres hemorrágicas virais (FHV). As viroses causadoras de FHV incluem vírus Ebola, Dengue e o próprio vírus da influenza (TRAYNOR et al., 2004; HENSLEY; GEISBERT, 2005; JIANG et al., 2007). A FHV é uma doença que leva a falência múltipla de órgãos, hemorragia, hipotensão e choque, com alto nível de mortalidade (SCHNITTLER; FELDMANN, 2003). Muitas das mudanças associadas à FHV resultam

do aumento de mediadores inflamatórios como IL-6, IFN- γ e TNF- α (RESTREPO et al.; 2008; CHEN et al., 2008).

A resposta do hospedeiro à infecção viral é parcialmente regulada pelos receptores que reconhecem ácidos nucléicos virais como marcadores de infecção (MEYLAN; TSCHOPP, 2006). Diferentes receptores de reconhecimento de padrão como os TLR estão envolvidos nesta resposta, mas acredita-se que a maioria das viroses produza dsRNA como um intermediário de replicação no seu ciclo de vida, alguns dos quais são retidos nas células ou liberados após a lise celular (MAJDE, 2000).

Os efeitos do dsRNA viral em numerosos testes *in vitro* e *in vivo* pode ser mimetizado pelo Poli I:C. Este padrão molecular aumenta a expressão de citocinas e moléculas de adesão, influencia a temperatura corporal e a pressão arterial (DOUKAS et al., 1994; MAJDE, 2000; GANDHI et al., 2007; LUNDBERG et al., 2007). Já foi demonstrado que os efeitos do Poli I:C foram comparáveis àqueles induzidos por LPS no que diz respeito a coagulação intravascular disseminada, mas estes estiveram ausentes em camundongos deficientes de TLR-3, sugerindo que este receptor está envolvido nos efeitos deste PAMP (SHIBAMIYA et al., 2009).

No que diz respeito à resposta febril, mais informações estão disponíveis quando se trata do Poli I:C (MAJDE, 2000; FORTIER et al., 2004; VOSS et al., 2007; HOPWOOD et al., 2009), comparado ao Zimosan. Seu efeito pirogênico é reportado há algum tempo, e o envolvimento de citocinas como TNF- α (VOSS et al., 2007), IL-1 (FORTIER et al., 2004) e IL-6 (VOSS et al., 2006), bem como das prostaglandinas (VOSS et al., 2007), também já foi observado.

Recentemente, em um trabalho com camundongos, com alguns resultados de temperatura corporal, foi sugerida uma diferença significativa na indução da enzima cicloxigenase (COX)-2 (e outros PAMPs) (KIRKBY et al., 2013), onde o Poli I:C exerceu um aumento na expressão de COX-2 mais sutil, comparada ao LPS. Ainda em comparação ao LPS, já foi relatado que o Poli I:C parece induzir uma resposta febril mais branda e com menores sinais de fadiga e anorexia (HOPWOOD et al., 2009). Mesmo assim, a administração de Poli I:C foi sugerida como modelo de fadiga induzida por infecção viral, visto que essa substância diminuiu a atividade espontânea em ratos,

e este fato foi correlacionado a uma maior expressão gênica de interferon- α em algumas regiões cerebrais (KATAFUCHI et al., 2003).

O trabalho de Gandhi *et al.*(2007) relatou o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e de norepinefrina no hipocampo em camundongos submetidos a administração desse PAMP, porém a temperatura corporal e as áreas relacionadas à resposta febril não foram estudadas (GANDHI et al., 2007). O envolvimento de outras citocinas e mediadores centrais na resposta febril induzida pelo Poli I:C é ainda desconhecido, sendo o seu estudo justificado.

1.4 Pirogênios endógenos

Presume-se que a febre, induzida por um pirogênio exógeno, tanto patologicamente quanto através de uma intervenção experimental, é mediada por citocinas pirogênicas endógenas, liberadas por sua vez de fagócitos sistêmicos mononucleares quando essas células interagem com o pirogênio exógeno (CARTMELL; MITCHELL, 2005).

As citocinas são polipeptídeos não-estruturais, com uma média de peso molecular entre 10 e 30 kDa. Possuem uma potente atividade biológica, e são frequentemente produzidas após um desafio antigênico, sendo liberadas e agindo localmente. São moléculas essenciais para um sistema imune funcional. Existem sugestões de que algumas citocinas podem agir como mediadores de funções fisiológicas normais ou que podem agir como hormônios endócrinos, tendo efeitos em locais distantes (ROTHWELL et al., 1996; DINARELLO, 2004).

Classificadas em proinflamatórias (por exemplo, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-18) e antiinflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, entre outras), cada citocina é o produto de um gene em separado e ativa células através de receptores de superfície específicos. Esses receptores são expressos na maioria das células, o que explica seu papel em vários processos biológicos e patológicos (CARTMELL; MITCHELL, 2005).

Os pirogênios endógenos hoje reconhecidos são a IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-8, MIP-1 α e β , IFN β e γ e o quimioatraente neutrofílico induzido por citocinas (CINC)-1 (KLUGER, 1991; ZAMPRONIO et al., 1994; MIÑANO et al., 1996; KLUGER et al., 1998;

SOARES et al., 2008; KANASHIRO et al., 2009). As citocinas pró-inflamatórias clássicas – TNF α , IL-1 β e IL-6 – parecem ser as principais citocinas envolvidas na origem da febre (KLUGER, 1991). Dependendo da dose e da via de administração de LPS, o TNF- α é a primeira citocina que aparece na circulação, seguida de traços da IL-1 β , e altas quantidades de IL-6, IL-8 e das demais (ROTH; SOUZA, 2001). Dentre as citocinas pirogênicas citadas, algumas como a IL-8 e o MIP-1 α parecem ser geradas diretamente no sistema nervoso central (ZAMPRONIO et al., 1994; MIÑANO et al., 1996), enquanto as outras poderiam ser geradas periféricamente.

O TNF α é uma citocina sintetizada como proteína de membrana não-glicosilada, com uma região intracelular N-terminal e outra grande região C-terminal, sendo exposto na membrana como um homotrímero. Pode interagir com dois receptores de sinalização transmembrana, tipos I e II. Um terceiro receptor, solúvel, age como antagonista da atividade de TNF α , sendo inclusive utilizado como ferramenta farmacológica. A interação do TNF α com seus receptores transmembrana ativam algumas vias de transdução de sinais, que desencadeiam uma série de eventos intracelulares, resultando na ativação também de NF-kB, além do c-Jun. Sabe-se que esses fatores de transcrição são responsáveis pela expressão de importantes genes relacionados, inclusive, à resposta febril (CHEN; GOEDDEL, 2002).

O TNF- α é considerado o principal mediador de inflamação aguda em resposta a bactérias Gram-negativas, e o papel dessa citocina na resposta febril induzida pelo LPS é documentado (CONTI et al., 2004). Devido ao fato da injeção de TNF α ser seguida de febre e de ser essa a primeira citocina que aparece em quantidades mensuráveis na circulação após diferentes estímulos pirogênicos, a sua ação pirogênica e seu papel na indução da resposta febril tem sido sugeridos (CONTI et al., 2004; ROTH, 2006). A indução de IL-1 β pelo TNF α também é reportada (DINARELLO et al., 1986), com os autores sugerindo ser esse um de seus mecanismos pirogênicos.

A família da IL-1 modula a proliferação celular e inclui três genes: IL-1 α , IL-1 β e o IL-1RA (antagonista do receptor de IL-1 β). Os agonistas, IL-1 α e IL-1 β , parecem exercer funções pró-inflamatórias semelhantes, ligando-se ao receptor transmembrana IL-1RI, que por sua vez requer a presença de uma proteína acessória (AcP) para a transdução de sinais. O IL-1RA é um antagonista competitivo altamente seletivo, que se

liga também ao IL-1RI, mas não ativa a associação com a AcP, bloqueando assim todas as ações de IL-1 α e IL-1 β . Todos os ligantes de IL-1 são formados como precursores, dos quais a pro-IL-1 α e a pro-IL-1RA são biologicamente ativas. A pro-IL-1 β é inativa e necessita ser clivada pela enzima conversora de interleucina-1 β (ICE), uma cisteína-protease da família das caspases (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). A ligação dos agonistas de IL-1 ao seu receptor induz o recrutamento de MYD88 ou seus análogos, iniciando a ativação da via IRAK/TRAF, que por sua vez leva à ativação de NK- κ B e subsequente estimulação transcricional de múltiplos genes, que incluem aqueles relacionados a mediadores inflamatórios como COX-2, além da autoindução de IL-1 β (CONTI et al., 2004).

A IL-1 β tem a capacidade de induzir outras citocinas, bem como agir como um pirogênio endógeno (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). Os níveis de IL-1 β estão elevados no plasma e no fluido cerebrospinal (CSF) de várias espécies, após a aplicação periférica de LPS e outras substâncias, levando a febre. A injeção de IL-1 β induz febre em roedores, coelhos e humanos (CONTI et al., 2004), e essa febre pode ser bloqueada pela administração central de anticorpo Anti IL-1 (LI et al., 2001). A IL-1 está também envolvida na manifestação de convulsões febris (YU et al., 2012).

Há relatos de aumento de IL-1RA endógeno durante a inflamação, e esse fato dá suporte à hipótese de que essa substância age *in vivo* para limitar respostas inflamatórias, incluindo a febre, ao inibir a ação biológica da IL-1 β (ROTH, 2006). O pré-tratamento ou a superexpressão de IL-1RA reduzem a febre induzida por IL-1 β (LUHESHI et al., 1997; LUNDKVIST et al., 1999), por isso o IL-1RA é considerado uma ferramenta experimental muito válida como um inibidor endógeno da IL-1. Com esta função, o IL-1RA possui inclusive uso terapêutico (ROTHWELL; LUHESHI, 2000).

Como um importante mediador de resposta do hospedeiro, a IL-6 é prontamente sintetizada quando da presença de um dano tecidual, tendo as suas funções iniciadas através da ligação a seu receptor (CONTI et al., 2004). O IL-6R é composto 468 aminoácidos, repartidos em duas cadeias polipeptídicas: um receptor de IL-6 de 80 kDa e uma glicoproteína transdutora do sinal de 130 kDa (gp130). O receptor de 80 kDa tem 2 variantes: a forma transmembrana e a forma solúvel (sIL-6R), essa última presente no soro e fluidos teciduais (TANAKA; KISHIMOTO, 2014). Com relação

à via de transdução relacionada a IL-6, a ativação de gp130 desencadeia a ativação das vias Janus quinase (JAK)-STAT3 e JAK-SH2-MAPK. A indução de uma série de genes responsivos a IL-6 conta com a ativação de STAT3, que também estimula a ativação de genes supressores de citocinas (NAKA et al., 1997; RUMMEL et al., 2004).

Junto com a IL-1 β , a IL-6 é considerada um dos principais pirogênicos endógenos (CONTI et al., 2004). Dentre todas as citocinas implicadas na febre, apenas a IL-6 está consistentemente aumentada no plasma e frequentemente elevada no cérebro, em muitas condições acompanhadas de uma resposta febril. A IL-6 tem sido apontada como uma importante citocina para as fases finais da resposta febril (ROTH et al., 2004). A injeção de LPS em um *air pouch* subcutâneo levou a um aumento da concentração de IL-6 no plasma (MILLER et al., 1997) e uma elevação na temperatura corporal, bloqueada pelo pré-tratamento com anticorpo Anti IL-6 (CARTMELL et al., 2000).

Com essas observações e muitas outras existentes na literatura, ainda é importante mencionar que as citocinas podem regular a produção uma da outra: a IL-1 β é um dos mais importantes indutores de TNF- α , assim como o IL-6 e o TNF- α são importantes estimuladores da produção de IL-1 β , e tanto o IL-1 β quanto o TNF- α induzem IL-6 (CONTI et al., 2004). A IL-1 β pode regular a resposta febril através da modulação da produção de outras citocinas, pirogênicas ou antipiréticas (ROTH; SOUZA, 2001). Em camundongos nocautes para IL-6, nem a administração intraperitoneal de LPS ou IL-1 β , nem a administração i.c.v. de IL-1 β , induziram uma resposta febril (CHAI et al., 1996).

Outra citocina que vamos abordar é o IFN, porque mesmo que essa substância não esteja na lista das principais citocinas pirogênicas, ela é peça fundamental na fisiopatologia da doença viral, objeto de parte de nosso estudo. O IFN- γ é uma molécula cuja produção parece estar controlada por outras interleucinas, como a IL-12 e a IL-18. Suas ações dependem de sua ligação ao receptor de IFN funcional (IFNGR), composto de duas cadeias de ligação, associado a duas cadeias de transdução de sinais. A resposta biológica mediada pela interação do IFN ao seu receptor é mediada pela cascata de fosforilações via JAK-STAT (SCHRODER et al., 2004).

No caso de viroses, citocinas similares às das infecções bacterianas são liberadas, somadas a quantidades substanciais de IFN, e o melhor candidato a indutor de citocinas em uma infecção viral é o dsRNA (MAJDE, 2000), representado em nosso trabalho pelo Poli I:C. Há muito tempo menciona-se que esse PAMP induz a produção de interferons (WILLIAMS et al., 1982). Mais recentemente, encontramos dados na literatura que sugerem a indução de IFN tipo I (α e β) e tipo II (γ) pelo Poli I:C, em modelos de doença viral tanto *in vitro* (WU et al., 2007) e *in vivo* (WU et al., 2014). Sabe-se que alguns tipos de IFN podem causar febre (DINARELLO, 2004), porém não há dados de uma relação direta entre a produção de IFN e o efeito pirogênico causado pelo dsRNA.

As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos, além de estimular a produção de novas citocinas e auxiliar em diferenciações celulares (PEASE; WILLIAMS, 2006). Algumas delas comprovadamente exercem papel na resposta febril, dentre as quais podemos citar a IL-8 (ZAMPRONIO et al., 1994) e sua versão análoga em roedores (CINC-1) (SOARES et al., 2008), além do CCL3 /MIP-1 α (SOARES et al., 2009, 2013) e o CCL5/RANTES (TAVARES; MIÑANO, 2000). Esses estudos sugerem a síntese central dessas substâncias, em mecanismos dependentes (TAVARES; MIÑANO, 2000; SOARES et al., 2008) ou independentes (ZAMPRONIO et al., 1994; SOARES et al., 2009) de prostaglandinas. Interessantemente, o CCL3/MIP-1 α não está envolvido na resposta febril induzida pelo LPS (SOARES et al., 2009), fato que será comentado na sequência.

Existem várias hipóteses que tentam explicar como as citocinas pirogênicas, quando geradas periféricamente, modificam a atividade neuronal dentro da PO/HA no processo de indução da resposta febril. A primeira destas hipóteses, é que esta tradução ocorre em alguma região de contato estreito entre o sangue e as células neuronais. O órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) é um possível candidato, pois esta região apresenta a barreira hematoencefálica mais permeável e está próxima à PO/HA (BLATTEIS, 1992). Assim, estas citocinas poderiam adentrar o sistema nervoso central através da OVLT e atuar diretamente na PO/HA.

Essa primeira hipótese é aceita em partes: as evidências apontam para a importância dos órgãos circumventriculares, em especial a OVLT, na transmissão central da resposta febril. No entanto, grande parte dos experimentos que levaram a essas conclusões se baseiam em lesões nessa área, que atenuam a resposta febril induzida por LPS. Esses resultados fornecem informações para a importância dessa região na fisiopatologia da febre, porém não dá suporte à hipótese de que as citocinas periféricas chegam ao SNC através desses órgãos. Além disso, as lesões nos órgãos circumventriculares promovem efeitos colaterais nos animais como inapetência e desidratação, fatores que poderiam afetar os mecanismos de resposta febril. Assim, essa primeira hipótese parece lógica, porém, recebeu pouco suporte experimental (apud DINARELLO, 2004).

Outro possível mecanismo seria a ligação de citocinas ao endotélio vascular cerebral, gerando mediadores centrais. A ligação de IL-1 β em receptores nas células endoteliais poderia resultar na liberação de substâncias neuroativas (por exemplo, as prostaglandinas, PGs) na porção interna da barreira hematoencefálica gerando posteriormente a resposta febril (CAO et al., 1996). Neste caso, as citocinas necessariamente não atravessariam a barreira hematoencefálica.

Essa hipótese tem ganhado forças nos últimos anos, considerando ainda as atualizações a respeito das definições e funções da barreira hematoencefálica (BHE) que, mais do que uma barreira, tem sido vista como um transdutor de sinais especializado (ROMANOVSKY, 2007). Os tipos celulares envolvidos na comunicação através da BHE têm sido também estudados, e as células perivasculares (ELMQUIST et al., 1997) ou as endoteliais (YAMAGATA et al., 2001) são apontadas como as principais produtoras de PGE₂. Outros estudos demonstram que ambos os tipos celulares estão envolvidos, e que seu envolvimento depende da natureza do estímulo envolvido, da dose e do tempo pós-administração (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2002; KONSMAN et al., 2004).

A terceira hipótese considera a existência de um transporte das citocinas através da barreira hematoencefálica mediado por carreadores específicos. Banks e colaboradores examinaram sistematicamente o transporte de várias citocinas para o cérebro e, utilizando um procedimento de análise de regressão altamente sensível,

demonstraram que IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α são transportados através da barreira hematoencefálica por carreadores específicos e saturáveis (BANKS et al., 1991, 1994; PAN et al., 1996). Embora existam evidências da existência destes transportadores, sua natureza não é conhecida.

Embora a lista de citocinas que utilizam o transporte por carreadores tenha aumentado substancialmente (BANKS et al., 2003), a significância fisiológica deste mecanismo também é difícil de ser provada. Uma derivação dessa hipótese tem sido a proposta que as citocinas podem alcançar o tecido cerebral através de difusão pela lâmina basal (MERCIER et al., 2003).

Há também evidências da participação de nervos aferentes periféricos na comunicação entre o sistema imune e o hipotálamo. A vagotomia subdiafragmática foi capaz de bloquear a resposta febril induzida pela administração intraperitoneal de IL-1 β e LPS (WATKINS et al., 1995; WERNER et al., 2003). A febre induzida por baixas doses de LPS em uma bolsa de ar subcutânea foi atenuada pelo uso do anestésico local ropivacaína, nessa mesma câmara, provendo mais evidências da participação parcial de nervos aferentes na manifestação de algumas respostas febris (ROSS et al., 2000).

A divisão hepática do nervo vago parece estar envolvida neste processo, sugerindo que pirogênios endógenos produzidos no fígado não precisariam chegar ao sistema nervoso central através da circulação sanguínea, mas que estimulariam aferentes vagais que, uma vez estimulados, levariam a mensagem até o sistema nervoso central (SIMONS et al., 1998). Essa suspeita foi reforçada por uma grande quantidade de dados, que incluem a demonstração da indução inicial, pelo LPS, da síntese hepática de PGE₂. Foi também mostrado que a infusão intraportal de IL-1 aumenta o grau de descargas de nervos aferentes vagais e que receptores de IL-1 e de PG estão presentes nos paragânglios vagais (GOEHLER et al., 1998). No entanto, vale reforçar que, ao que tudo indica, esse mecanismo é mais importante em febres monofásicas (ROMANOVSKY, 2007) e pode também depender de outros fatores, como a via de administração do pirogênio exógeno (BLATTEIS et al., 2005).

Qualquer que seja a via de comunicação com a área PO/HA, os eventos podem levar à síntese e liberação de mediadores centrais, entre eles: PGE₂, PGF_{2 α} e PGD₂

(MILTON, 1989; COELHO et al., 1993; GAO et al., 2009), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (ROTHWELL, 1989), opióides endógenos (BLATTEIS et al., 1991; FRAGA et al., 2008), substância P (BLATTEIS et al., 1994; REIS et al., 2011), ET-1 (FABRICIO et al., 1998) e canabinoides endógenos (FRAGA et al., 2009). A liberação dos mediadores centrais resulta em um reajuste do termostato hipotalâmico, que passaria a controlar a temperatura corporal a níveis acima dos valores normais para cada espécie.

1.5 Mediadores Centrais da Resposta Febril

1.5.1 Prostaglandinas

Até agora, revisamos que os pirogênios exógenos podem induzir a produção de pirogênios endógenos, através da ativação da sinalização de TLR. Tanto os pirogênios exógenos quanto os endógenos podem estimular a síntese de PGs, como veremos adiante. O papel das PGs, particularmente da PGE₂, em mediar a febre, está bem documentado, com uma grande quantidade de dados na literatura que investigou a ação da PGE₂ após administração central ou periférica, bem como a sua liberação endógena durante a febre (BARTFAI; CONTI, 2011). A resposta febril induzida por IL-1 e IL-6 pode ser suprimida pela inibição da atividade de COX-2 (CAO et al., 2001). Além disso, células da microvasculatura cerebral estimuladas por IL-6 podem induzir a via da COX-2 em áreas relacionadas à resposta febril (RUMMEL et al., 2006).

A síntese das prostaglandinas consiste basicamente de três etapas de reações, catalisadas por Fosfolipases A₂ (PLA₂) secretórias e citosólicas, COXs e PG sintetases (PGES)(apud IVANOV; ROMANOVSKY, 2004). Inicialmente, o ácido araquidônico (AA) é liberado dos fosfolípidos de membrana através da ação da PLA₂. Em seguida, ele é convertido a PGG₂ e então a PGH₂ pela COX. Na sequência, a PGH₂ sofre isomerização para PGE₂ pela PGES terminal. Cada passo dessa sequência pode ser catalizado por muitas enzimas não-homólogas e/ou múltiplas isoformas da mesma enzima. Com detalhes, Ivanov e Romanovsky revisaram que a febre induzida pelo LPS é acompanhada pela *up-regulation* de quatro enzimas de síntese de PGE₂ (PLA₂

secretória, PLA₂ citosólica, COX-2 e PGES microssomal), além da *down-regulation* de todos os carreadores de PGE₂ e enzimas desidrogenases, em diferentes fases da resposta febril, e sugerem inclusive que todas essas enzimas podem ser futuros alvos para terapêutica antipirética (IVANOV; ROMANOVSKY, 2004).

Existem pelo menos quatro tipos de receptores de PGE₂, EP₁ a EP₄, expressos no hipotálamo. Todos eles pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (OKA, 2004). A ligação de PGE₂ ao seu receptor ativa uma proteína G que inibe a atividade da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc aumenta a sensibilidade térmica de neurônios sensíveis ao calor, portanto a sua redução pode levar ao aumento do ponto de regulação da temperatura corporal (STEINER et al., 2002).

Em relação à febre e PGE₂, estudos mostraram que o papel principal é desempenhado pelo receptor EP₃ e, em menor grau, pelo EP₁ (IVANOV; ROMANOVSKY, 2004). No entanto, como a PGE₂ muda o termostato regulatório levando à resposta febril, ainda é objeto de estudos. As informações mais relevantes dizem respeito a estudos eletrofisiológicos que demonstram que a PGE₂ aumentou a termossensibilidade de neurônios sensíveis ao calor, via receptores EP₃ (BOULANT, 1998). Também existem evidências eletrofisiológicas (MATSUDA et al., 1992; RANELS; GRIFFIN, 2003, 2005) e de microinjeções (SCAMMELL et al., 1996) que corroboram o efeito desta PG sobre estas estruturas. Ainda, diferentes populações de neurônios pré-ópticos que expressam receptores EP₃ projetam para duas regiões cerebrais simpatoexcitatórias que, envolvidas com a resposta febril, refletem diferentes mecanismos de controle para a termogênese no tecido adiposo marrom (importante para febre em roedores e recém-nascidos humanos) e para a vasoconstrição (TANAKA et al., 2009; NAKAMURA et al., 2010).

A PGF_{2α} também parece exercer um papel relevante na indução da resposta febril, pois a sua administração por via i.c.v. promove aumento da temperatura corporal em ratos e coelhos (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990). A administração i.p. de LPS também parece aumentar os níveis dessa prostaglandina no CSF de animais (COELHO et al., 1993). Outra prostaglandina, a PGD₂, tem sido envolvida na produção da febre induzida por LPS, sendo esta sintetizada pela PGD sintetase hematopoiética.

No entanto, desconhece-se qual dos pirogênios endógenos conhecidos é capaz de ativar sua síntese (GAO et al., 2009).

Embora a via clássica de indução da febre envolva a indução de mediadores centrais via citocinas pirogênicas, algumas inconsistências referentes ao tempo de pico de citocinas e aumento da temperatura corporal tem levado a suspeita de vias diretas de indução de PGs. Blatteis e colaboradores (2005) fazem uma revisão interessante sobre esse tema, postulando vias de liberação rápida de PGE₂, independentes dos níveis de citocinas na circulação (BLATTEIS et al., 2005).

1.5.2 Endotelina

A ET-1 é o membro predominante da família das endotelinas. É um peptídeo conhecido como um potente vasoconstritor derivado de células endoteliais, e com funções importantes em vários sistemas biológicos, como o músculo cardíaco, rins, pulmões e cérebro, entre outros. Exerce suas funções através da ligação a receptores acoplados a proteína G, denominados ET_A e ET_B (BARTON; YANAGISAWA, 2008). A ET-1 também possui propriedades pirogênicas, como demonstrado por Fabricio e colaboradores (FABRICIO et al., 1998, 2006). A administração de Bosentan, antagonista não seletivo de receptores para ET-1, reduziu a resposta febril induzida por LPS em ratos. Além disso, através da administração de antagonistas específicos, verificou-se que o receptor ET_B é responsável pelas ações deste peptídeo na febre (FABRICIO et al., 1998).

Quanto à participação da ET-1 como mediador central da resposta febril, foi observado que o antagonista de receptor ET_B, denominado BQ788, reduziu a febre induzida pelo CRF e pelo fator pirogênico pré-formado em macrófagos (PFPF) (ZAMPRONIO et al., 2000) (que interessantemente, assim como IL-8, MIP-1 α e a própria ET-1 induz febre independente da síntese de PGs), mas não modificou a febre induzida por IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 ou pelas prostaglandinas (FABRICIO et al., 2006), sugerindo uma relação direta na ativação da endotelina com os primeiros, porém não com os últimos agentes citados. Malvar e colaboradores reportaram aumentos nas concentrações de PGE₂ no CSF e no hipotálamo de ratos submetidos à administração de ET-1, mesmo que o aumento nas concentrações de PGE₂ não pareça desempenhar

algum papel na resposta febril induzida por essa substância, visto que os autores corroboraram o fato da febre promovida por esse peptídeo ser independente de prostaglandinas. (MALVAR et al., 2011).

1.5.3 Opioides

Os opioides exógenos são conhecidos há séculos pelas suas propriedades analgésicas, muito tempo antes do advento dos estudos que caracterizaram os receptores opioides e os peptídeos opioides endógenos, estes por sua vez datados a partir da segunda metade do século XX. Outros efeitos caracterizam essa classe de fármacos, com ações nos sistemas respiratório, imune e gastrintestinal, entre outros. As ações dos opioides exógenos e dos peptídeos opioides endógenos no organismo, bem como as diferentes interações com os receptores opioides os efeitos no organismo ainda são ponto de pesquisa e discussão (MCDONALD; LAMBERT, 2005).

Atualmente são considerados receptores opioides o MOP (μ), KOP (κ), DOP (δ) e NOP (orfanina FQ). Todos eles são receptores acoplados a proteína G inibitória. Outros subtipos de receptores foram sugeridos, como o receptor sigma (σ), porém foram destituídos baseados na falta de sensibilidade ao antagonista naloxona (ALEXANDER et al., 2013).

As ações dos opioides na termorregulação são governadas pelos receptores κ , δ e μ . A ativação dos dois primeiros parece exercer função hipotérmica, enquanto o receptor μ está mais envolvido numa resposta de aumento da temperatura corporal (RAWLS; BENAMAR, 2014).

Importantes publicações a respeito do envolvimento do sistema opiodérgico em mecanismos da resposta febril foram feitos nos anos 80 do século passado, com as publicações de Nakashima e colaboradores (NAKASHIMA et al., 1987, 1988), que avaliaram a capacidade da naloxona em bloquear efeitos estimulatórios promovidos pelo IFN- α em neurônios termossensíveis do hipotálamo. Anos mais tarde, Blatteis e colegas observaram que esse mesmo antagonista opióide era capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS em cobaias (BLATTEIS et al., 1991). Esses autores sugeriram que o receptor envolvido nesse processo era o receptor μ , pois, mesmo

sendo a naloxona considerada um antagonista não-seletivo, sua maior afinidade é por esse receptor. A sugestão foi confirmada por Benamar e colegas, que utilizaram o CTAP, antagonista μ opioide, em pré-tratamento por via hipotalâmica, em ratos, para reduzir a resposta febril induzida periféricamente pelo LPS (BENAMAR et al., 2000).

Em 2008, Fraga e colaboradores demonstraram que os opióides endógenos, através da ativação de receptores μ , participam da resposta febril induzida pelo LPS e outros agentes pirogênicos, como o TNF- α , IL-6, ET-1 e CRF, porém não por IL-1 β e por prostaglandinas (FRAGA et al., 2008). É importante salientar que se explica neste estudo que, mesmo a administração de morfina, um agonista μ -opióide sintético, produz uma resposta febril efetiva, com alteração dos mecanismos de conservação de calor do organismo, induzindo vasoconstrição periférica. Portanto, o efeito deste conhecido analgésico não se trata de uma hipertermia (elevação da temperatura corporal sem alteração do ponto de regulação de temperatura no hipotálamo) o que promoveria vasodilatação e não vasoconstrição periférica.

1.5.4 Substância P

O peptídeo taquicinérgico Substância P é conhecido principalmente por suas ações na transmissão do estímulo nocivo. A sua presença em células inflamatórias também é reportada, e suas funções no sistema imune, estudadas. Seus efeitos em eventos inflamatórios são exercidos especialmente pelos receptores metabotrópicos NK1, sendo a substância P o principal agonista desse receptor, seguido das neurocininas A e B. Os efeitos da ligação da substância P ao seu receptor envolvem a transdução de sinais via proteína Gq, e podem envolver a modulação das respostas estimuladas por citocinas, quimiotaxia de macrófagos e a regulação de replicação viral, como do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (TULUC et al., 2009).

Alguns autores observaram que a administração central de substância P causa aumento no índice metabólico, uma diminuição na perda de calor e, conseqüentemente, uma elevação regulada da temperatura corporal (BLATTEIS et al., 1994). Ainda, alguns estudos demonstraram que a substância P participa da resposta febril induzida por LPS (SZELENYI et al., 1997). Foi demonstrado ainda que a administração central do antagonista de receptores NK₁, SR140333, reverteu a resposta febril induzida por LPS,

TNF- α , IL-6 e PGE₂, mas não aquela induzida por IL-1 β e MIP-1 α (BRITO, 2011; REIS et al., 2011).

1.5.5 Outras substâncias

Os pirogênios endógenos e mediadores centrais discutidos acima possuem uma atividade bem descrita. No entanto, existem outros pirogênios e mediadores cuja participação na resposta febril foi descrita. Dessa maneira, estudos que digam respeito às interrelações destes mediadores com outros ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

Rothwell e colaboradores sugeriram que os efeitos pirogênicos de citocinas como IL-1 α e IL-6 e da PGF_{2 α} são mediados pelo CRF, visto que o antagonista deste peptídeo (CRF₉₋₄₁) foi capaz de reverter o aumento da temperatura corporal, induzido por essas substâncias (ROTHWELL, 1989, 1990; STRIJBOS et al., 1992). Posteriormente, Harden e colaboradores demonstraram que IL-1 e IL-6 agem sinergisticamente para induzir febre e comportamento de doença (*sickness behaviour*) (HARDEN et al., 2008). No entanto, a indução de febre ocorre em doses menores e independentemente da indução de comportamento de doença. Por outro lado, a resposta febril induzida por IL-1 α e por TNF- α não foi modificada por antagonista do CRF, demonstrando que estas citocinas não dependem deste mediador (STRIJBOS et al., 1992), mas dependem da síntese de PGs, particularmente PGE₂, visto que a resposta febril pode ser inibida por indometacina (WATANABE, 1992; KAGIWADA et al., 2004; WERNER et al., 2006). Este mesmo efeito do CRF₉₋₄₁ foi observado por Zamprônio e colaboradores na resposta febril induzida pela IL-8, que, assim como MIP-1 α induz uma resposta febril independente de prostaglandinas (ZAMPRONIO et al., 1994, 2000; MIÑANO et al., 1996).

Outro sistema que parece exercer funções na resposta febril é o canabinoide. Em 2009, Fraga e colaboradores induziram uma resposta febril com administrações centrais do endocanabinoide Anandamida. Essa resposta febril parece ser mediada por receptores CB1. Ainda, o pré-tratamento com o mesmo antagonista seletivo para receptores canabinoides CB1 atenuou a febre induzida por LPS (FRAGA et al., 2009).

Um esquema das principais substâncias envolvidas na resposta febril induzida pelo LPS pode ser observado na Figura 02.

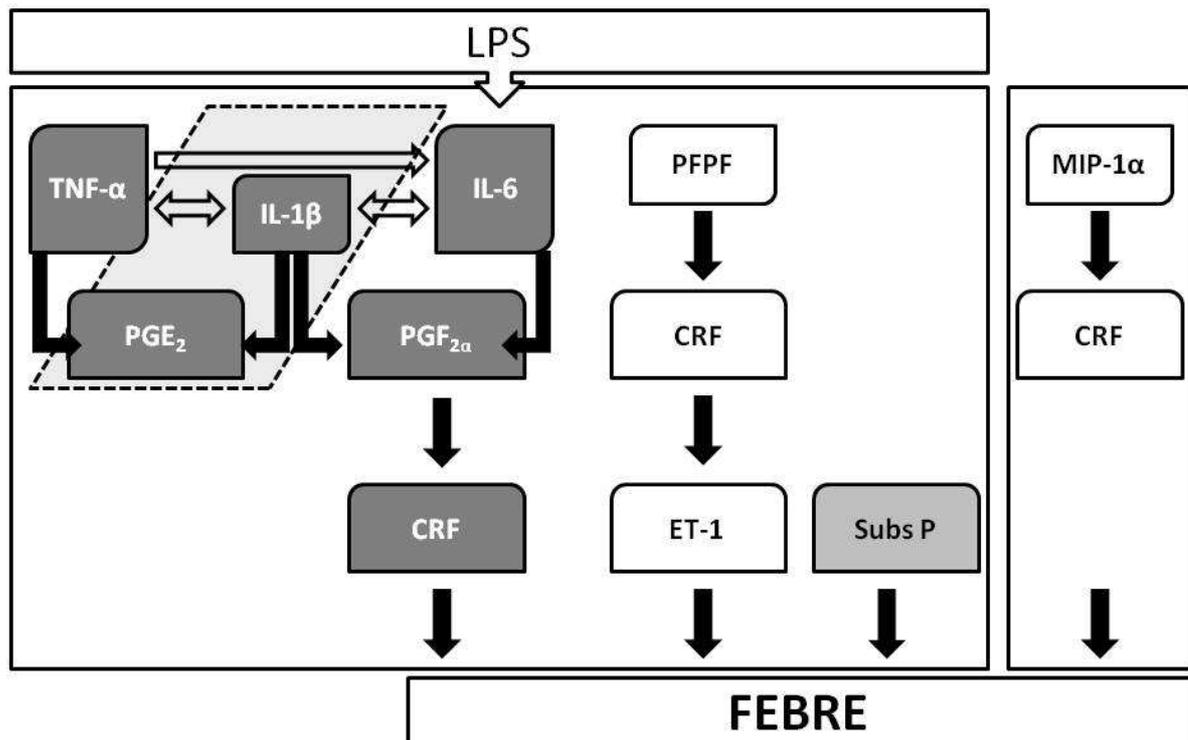


Figura 2: Principais mediadores da resposta febril. O lipopolissacarídeo (LPS) estimula a liberação de citocinas pirogênicas, em especial TNF- α , IL-1 β e IL-6, que por sua vez levam a ativação de mediadores centrais, numa via dependente de prostaglandinas (PGE₂ e PGF_{2 α}) e que também pode envolver o fator de liberação de corticotrofina (CRF). As citocinas pirogênicas podem também regular a produção uma da outra. A via dependente de prostaglandinas está representada pelos quadros mais escuros. Uma via independente de prostaglandinas (quadros brancos) também pode ser ativada após a administração de LPS, envolvendo o fator pirogênico pré-formado (PFPF), derivado de macrófagos. Essa via tem a participação do CRF e endotelina-1 (ET-1). Sabe-se que a substância P (Subs P) está envolvida na febre do LPS, porém sua cascata de eventos ainda não está completamente elucidada. Todas as vias do LPS parecem envolver a participação de opioides, com exceção da região representada pelo losango com traços. O sistema canabinoide também parece desempenhar importante papel em alguns passos dessas vias. O MIP-1 α é uma citocina pirogênica que não parece estar envolvida na resposta febril induzida pelo LPS, porém promove resposta febril através da ativação de CRF. Adaptado de FRAGA, 2004.

1.6 Regiões cerebrais e Circuitos neurais envolvidos na Resposta Febril

Os circuitos centrais neurais que comandam as funções relacionadas à manutenção da temperatura corporal durante as mudanças na temperatura ambiente são os mesmos responsáveis pelas alterações na temperatura corporal durante a resposta inflamatória (MORRISON; NAKAMURA, 2011). Desse modo, ao mesmo tempo em que estudamos febre, necessitamos de uma revisão concernente aos comandos termorregulatórios dos organismos endotérmicos.

Desde os primeiros modelos de termorregulação propostos por Hammel nos anos 60 do século passado, sabe-se que a região cerebral envolvida nesse processo é a PO/HA (BOULANT, 2006). Embora os neurônios responsivos a uma mudança de temperatura possam ser encontrados em vários lugares do SNC, aqueles existentes na PO/HA e em outras sub-regiões do hipotálamo anterior têm sido os mais estudados porque a maioria das respostas termorregulatórias é dependente da integridade dos neurônios dessa região (ROMANOVSKY, 2007).

Dessa maneira, o centro termorregulatório central recebe informações através de vias neuronais aferentes sensoriais: temperaturas do ambiente a partir de termorreceptores na pele, temperaturas viscerais a partir de fibras termossensoriais na cavidade abdominal e temperaturas centrais a partir de neurônios termossensíveis no cérebro de medula espinal (CLIFFER et al., 1991; MORRISON, NAKAMURA, 2011; NAKAMURA, 2011). No caso de infecção, sinais imunes emitidos para o cérebro liberam a produção local de mediadores pirogênicos, que por sua vez são então percebidos pelo centro termorregulatório (NAKAMURA, 2011). A figura 3 representa um esquema simplificado da estrutura termorregulatória.

Os termorreceptores da pele estão situados estrategicamente para detectar mudanças na temperatura ambiental. Apesar das suas características moleculares ainda não estarem totalmente elucidadas, sabe-se que a família dos canais de cátions do receptor de potencial transiente (TRP) é necessária na sensação de temperatura. Entre os receptores dessa família, o TRPM8 é ativado após resfriamento (temperaturas menores que 27°C) e distribuído nos terminais periféricos livres de fibras somatossensoriais do tipo C na pele. Ainda, receptores TRPV3 e TRPV4 são os canais

TRP ativados por calor inócuo, e estão abundantemente expressos na epiderme, além de estarem em menor quantidade em gânglios somatossensoriais (NAKAMURA, 2011).

Também existem sensores periféricos mais profundos no organismo, que respondem à temperatura corporal interna, localizados em algumas vísceras e grandes vasos, entre as fibras aferentes dos nervos vago e esplâncnicos, distribuídas pelo abdome (CLIFFER et al., 1991; MORRISON; NAKAMURA, 2011; NAKAMURA, 2011). Vários canais TRP, incluindo os já citados, estão expressos em neurônios aferentes vagais (NAKAMURA, 2011).

Na PO/HA e regiões, são encontradas diferentes populações de neurônios envolvidas na manutenção da temperatura corporal a partir do seu termostato regulatório (*set point*): neurônios sensíveis ao calor, neurônios insensíveis à temperatura, neurônios efetores de perda de calor e neurônios efetores de produção de calor. Os neurônios insensíveis à temperatura correspondem à grande maioria da população, cerca de 70%. (BOULANT, 2006).

Os neurônios sensíveis ao calor apresentam despolarização de membrana espontânea e são considerados como marca-passos (ZHAO; BOULANT, 2005). São eles os principais responsáveis pelas respostas de defesa autonômicas tanto contra o frio quanto contra o calor (ROMANOVSKY, 2007).

Durante a febre, a PGE₂ age como um poderoso mediador pirogênico endógeno na POA, como já comentado anteriormente. Esses dados foram refinados quando nanoinjeções de PGE₂ dentro da POA revelaram que os locais responsivos eram a área pré-óptica média (MPO) e a área pré-óptica mediana (MnPO) (SCAMMELL et al., 1996). Nessas regiões, o subtipo EP3 de receptor de PG está localizado em muitos corpos celulares e dendritos de neurônios (NAKAMURA et al., 2000). Além disso, a deleção genética do receptor EP3 especificamente em neurônios distribuídos na MnPO e na MPO suprimiram grande parte da resposta febril induzida por PGE₂ ou endotoxina (LAZARUS et al., 2007).

Neurônios na MnPO e MPO que expressam o receptor EP3, potencialmente a população de neurônios sensíveis ao calor descritos acima, normalmente mantêm uma inibição tônica gabaérgica dos neurônios termogênicos. Durante a resposta febril, a PGE₂, produzida local ou sistemicamente, se liga ao receptor EP3 e atenua a atividade

tônica de disparos através da redução dos níveis de AMPc intracelulares que, por sua vez, levam a desinibição de neurônios termogênicos e ativação de efetores termorregulatórios a fim de aumentar a produção de calor e reduzir a perda de calor (MORRISON; NAKAMURA, 2011).

Ainda segundo o modelo de Hammel, neurônios sensíveis ao calor e insensíveis à temperatura enviam impulsos sinápticos para neurônios efetores, que vão por sua vez controlar respostas termorregulatórias (BOULANT, 2006). A informação de temperaturas periférica e central, sinais imunes, dentre outros parâmetros homeostáticos, liberada para o centro termorregulatório, é integrada e então, o centro provê sinais de comando para efetores periféricos através de vias eferentes neuroendócrinas e neurais (NAKAMURA, 2011), também representados na Figura 3.

A comunicação entre periferia e SNC envolve pelo menos duas vias ascendentes importantes: a via espinotalamocortical (de sensação e percepção térmica cutânea, e que será responsável pelas respostas comportamentais de termorregulação), e a espino-parabraquio-préoptica (essa última responsável pela ativação de respostas de termorregulação autonômicas) (ROMANOVSKY, 2007; MORRISON; NAKAMURA, 2011).

Os mecanismos efetores para a defesa ao frio incluem o comportamento termorregulatório para reduzir a perda de calor, vasoconstrição cutânea para conservar o calor no interior do corpo, piloereção, termogênese sem calafrios (*non-shivering*) através do tecido adiposo marrom (TAM) e termogênese com calafrios (*shivering*) no músculo esquelético. Mecanismos de defesa contra o calor excessivo incluem o comportamento termorregulatório para aumentar a perda de calor, vasodilatação cutânea a fim de facilitar a perda do calor, evaporação através do suor, saliva ou respiração ofegante, empregados em diferentes graus, dependendo da espécie animal (MORRISON; NAKAMURA, 2011).

Essas vias efetoras dependem de controles através de gânglios simpáticos medulares, que recebem impulsos diretos de células localizadas primariamente na área peripiramidal / rafe da medula, que por sua vez estão sob o controle de neurônios hipotalâmicos (núcleos dorsomedial e paraventricular), do tronco cerebral (substância cinzenta periaquedutal e área tegumental ventral) e da ponte (*locus coeruleus*)

(ROMANOVSKY, 2007; MORRISON; NAKAMURA, 2011). A população de neurônios da PO/HA que expressam receptores EP3 inerva diretamente o hipotálamo dorsomedial e a região da rafe medular rostral. Essas regiões contêm neurônios cuja ativação leva a termogênese, vasoconstrição cutânea e taquicardia (Figura 3) (NAKAMURA, 2011).

Em um resumo simplificado, receptores periféricos enviam respostas de calor ou frio aos neurônios sensíveis a calor. Se a resposta for de calor, o estímulo levará a um aumento nos disparos dos neurônios sensíveis ao calor, e inibirá os disparos dos neurônios insensíveis à temperatura, levando à ativação de neurônios efetores de calor, que levam a respostas de perda de calor. Se a resposta for de frio, os disparos serão mais espaçados e a frequência de disparos dos neurônios sensíveis ao calor diminuirá (inibição), o que resulta numa resposta de produção de calor.

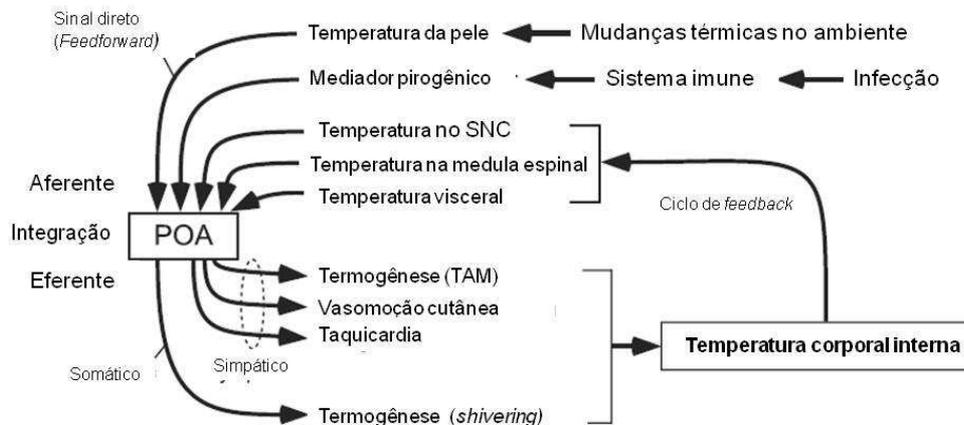


Figura 3: Esquema conceitual do sistema termorregulatório. O sistema aferente é ativado por termorreceptores localizados na pele, vísceras ou SNC, ou ainda através de moléculas pirogênicas. Sinais são integrados no centro termorregulatório, bem como alterações orgânicas são requeridas através da via eferente, com o intuito de coordenar a homeostase térmica. Adaptado de NAKAMURA, 2011.

Outras regiões cerebrais que ganham destaque nos estudos da resposta febril são os chamados órgãos circunventriculares (CVOs). Estes órgãos são estruturas cerebrais dotadas de uma vascularização intensa, células em contato direto com o sistema cerebrovascular, e ausência de uma função de barreira hematoencefálica clássica. Similaridades funcionais e estruturais são observadas em um subgrupo dessas estruturas: o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), o órgão subfornical (SFO) e a área postrema (AP) (JOHNSON; GROSS, 1993). Esses CVOs possuem capilares com um endotélio fenestrado, envolto por espaços perivasculares, e o parênquima dessas estruturas é composto por células da glia e corpos de neurônios, processos dendríticos e axonais e terminais que revelam conectividades múltiplas recíprocas com outros núcleos hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos (TANAKA et al., 2009).

Devido a essas propriedades, a SFO, a OVLT e a AP podem agir como sensores de mensageiros químicos circulantes, incluindo os pirogênicos endógenos, e por esse motivo são utilizados com frequência em estudos da resposta febril. As primeiras evidências experimentais dos CVOs na manifestação da febre foi através de lesões nessas estruturas, o que resultava em uma menor responsividade eletrolítica após estimulação sistêmica com pirogênicos (BLATTEIS, 1992; TAKAHASHI et al, 1997). Mais tarde, Romanovsky e colegas, em uma reavaliação desses experimentos, confirmaram a perda da resposta febril induzida por IL-1 β em ratos com lesão na OVLT. No entanto, esses autores salientaram alguns efeitos colaterais induzidos por essas lesões, como uma pronunciada hipertermia de longa duração, o que pode interferir significativamente nos experimentos. Dessa forma, foi sugerido que técnicas não-invasivas poderiam ser mais úteis para fornecer evidências de um papel da OVLT e demais estruturas como sensores de pirogênicos circulantes (ROMANOVSKI et al., 2003).

A expressão tanto de receptores para citocinas pirogênicas quanto de TLRs (apud OTT et al., 2010), deu suporte para as evidências de que pirogênicos endógenos e exógenos podem ser detectados pelos CVOs sensoriais, induzindo respostas celulares diretas, contribuindo assim para a manifestação de sintomas centrais relacionados à resposta febril (OTT et al., 2010).

A ativação de células nas estruturas acima citadas, em resposta a um estímulo com moléculas inflamatórias, pode ser caracterizada por eletrofisiologia ou pela demonstração, nessas estruturas especializadas, da translocação nuclear de fatores de transcrição, como o NFκB e STAT-3 (DEESEN, FERGUSON, 2003; ROTH et al., 2004, RUMMEL et al., 2006). Ainda, mudanças na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) podem ser medidas em cultivos de células nervosas para elucidar a sinalização de cálcio mediada por LPS ou outros pirogênicos exógenos (WUCHERT et al., 2008; OTT et al., 2012), sendo esse experimento realizado no presente estudo. A Figura 4 mostra imagens de fotomicrografias das duas regiões utilizadas em nossos experimentos, OVLT (Fig.4-A) e MnPO (Fig.4-B).

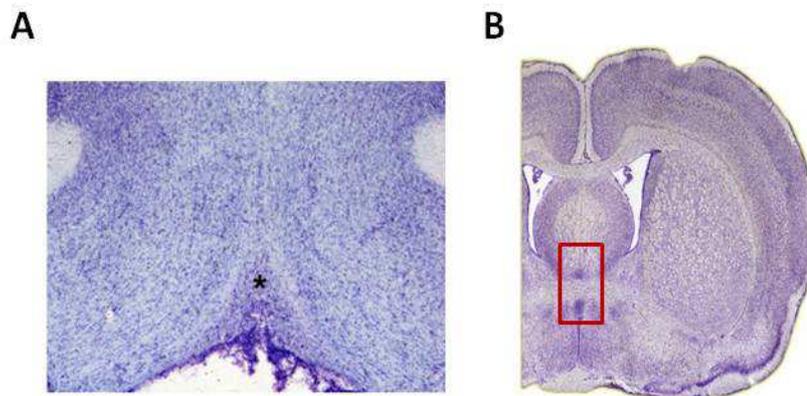


Figura 4: Fotomicrografias da OVLT e da MnPO em ratos. A imagem (A) representa a OVLT intacta, assinalada pelo asterisco. Fonte: COLLISTER et. al, 2013. A imagem (B) representa a MnPO, em torno do traçado vermelho. Fonte: imagem gentilmente cedida por Daniela Ott (arquivo pessoal).

1.7 Justificativa

Todas estas vias de indução de febre descritas acima, desde a síntese de pirogênios endógenos até a efetivação de resposta de produção e retenção de calor, são bastante complexas. A compreensão dos detalhes de sua indução, interação com diversos sistemas, novas moléculas pirogênicas e de como estas moléculas interagem dentro do sistema, bem como novas maneiras de bloquear o sistema, são úteis não somente para se entender a febre *per se* (e conseqüentemente como controlá-la mais adequadamente durante processos inflamatórios e infecciosos), mas também para se entender como se processa a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central. No entanto, não sabemos claramente se estas vias, especialmente estabelecidas utilizando como estímulo pirogênico o LPS (portanto, infecções com bactérias Gram-negativas) ocorrem também em outras situações clínicas. Esta é a razão pela qual esse trabalho foi proposto. Propusemo-nos elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na indução de resposta febril por PAMPs que interagem com outros TLRs que não o TLR4, como o LPS. Nossos estudos enfocaram o Zimosan, agonista TLR2 de origem fúngica, e o Poli I:C, agonista TLR3 de origem viral, com o propósito de entender melhor a resposta febril induzida por essas substâncias e, em consequência, estabelecer modelos mais claros de doenças fúngicas ou virais. Uma vez detectadas diferenças entre os modelos de resposta febril, seria possível determinar alvos farmacológicos mais específicos para determinadas respostas febris, dependendo da sua origem. Ainda, poderíamos compreender melhor como a ativação de diferentes respostas periféricas afeta o sistema nervoso central, particularmente com relação à febre, mas que poderiam abrir caminho para o entendimento destas interações em outras condições patológicas como depressão e doenças degenerativas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar se na resposta febril induzida pelos PAMPs Poli I:C e Zimosan os mediadores envolvidos são os mesmos da resposta febril induzida pelo LPS e, se estes ativam células provenientes de áreas cerebrais relacionadas à febre.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar as doses efetivas de Zimosan e Poli I:C para indução de aumento da temperatura corporal e se, na dose selecionada, esta resposta é acompanhada por vasoconstrição periférica.
- 2.2.2 Avaliar a participação de IL-1 β , TNF- α e IL-6 na resposta febril induzida pelos diferentes PAMPs, utilizando antagonistas e anticorpos específicos.
- 2.2.3. Avaliar a participação de mediadores centrais como PGE₂, ET-1, opióides e substância P, utilizando inibidores de síntese e antagonistas específicos.
- 2.2.4. Avaliar a presença de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE₂ no plasma e CSF de animais submetidos a doses pirogênicas dos PAMPs avaliados, através de ensaios imunológicos.
- 2.2.5. Verificar se tais PAMPs ativam células provenientes de áreas cerebrais relacionadas à febre, através do aumento do cálcio intracelular, em cultivo primário neuroglial.
- 2.2.6. Avaliar a capacidade desses PAMPs em aumentar a síntese de TNF- α e IL-6 por estas células.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos de resposta febril e coleta de plasma e CSF, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, com peso entre 180 e 220 gramas. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, luzes acesas às 7 h da manhã), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com aprovação sob o número 621 e estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os experimentos de microcultivo, realizados no Instituto de Bioquímica e Fisiologia Veterinária da Universidade Justus-Liebig (Giessen, Alemanha), utilizaram ratos Wistar, de ambos os sexos, com idade aproximada de uma semana de vida. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética do estado de Hessen, Alemanha.

3.2 Esterilização

Os materiais utilizados nos experimentos foram adquiridos estéreis, autoclavados a 127°C por 30 minutos ou esterilizados por calor seco a 180°C .

Quando necessário, as soluções foram preparadas em condições assépticas.

3.3 Soluções

3.3.1 Solução Tampão Tris-HCl 0,2M

- Tris (hidroximetil)-aminometano (Vetec do Brasil) : 24,22 g
- Água deionizada q.s.p. 1,00 L

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

3.3.2 Solução de PBS (para experimentos *in vivo*)

- Cloreto de sódio: 80 g
- Cloreto de Potássio: 2 g
- Fosfato dibásico de sódio dihidratado: 14,4 g
- Fosfato de potássio: 2g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

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

Procedência dos sais: Vetec do Brasil

3.3.3 Solução de corante Azul de Evans

- Azul de Evans (Merck): 2,5 g
- Água deionizada q.s.p. 100 mL

A solução foi filtrada em filtros Whatman nº2.

3.3.4 Solução Salina Balanceada de Gey (GBSS)

- Glicose 0,5%: 5 mL
- GBSS finalizada: 500 mL

3.3.5 Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS)

- HEPES sódico 20 mM, pH 7,4: 1,6 mL
- HBSS finalizada: 40 mL

3.3.6 Meio Neuro-Basal A para cultivo neuroglial primário

- B27 2%: 2 mL
- Penicilina / Streptomicina 100 U/mL: 1 mL
- Glutamina 2mM: 1 mL
- Meio Neuro-Basal A: 100 mL

3.3.7 Tampão de Cálcio

- HEPES: 1,3 g

- Cloreto de Sódio: 7,6 g
- Glicose: 1,98 g
- Cloreto de Potássio: 0,373 g
- Cloreto de Magnésio: 0,203 g
- Cloreto de Cálcio Dihidratado: 0,084 g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

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

3.3.8 Solução de PBS (para imunocitoquímica)

Solução Estoque I

- Fosfato dibásico de sódio: 20,9 g
- Cloreto de sódio: 128,6 g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

Solução Estoque II

- Fosfato monobásico de sódio: 13,8 g
- Cloreto de sódio: 42,9 g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

Solução Final de Uso

- Solução estoque I: 55 mL
- Solução estoque II: 11,6 mL
- Água miliqué q.s.p.: 1 L

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

3.3.9 Fosfato monobásico de sódio 200 mM

- Fosfato monobásico de sódio: 27,6 g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

3.3.10 Fosfato dibásico de sódio 200 mM

- Fosfato dibásico de sódio: 28,4 g
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

3.3.11 Tampão Fosfato 100 mM

- Fosfato monobásico de sódio 200 mM: 140 mL
- Fosfato dibásico de sódio 200 mM: 360 mL
- Água deionizada q.s.p.: 1 L

O pH foi acertado para 7,4 e a solução utilizada para o preparo de Paraformaldeído 4%.

3.3.12 Paraformaldeído 4%

- Tampão Fosfato 100 mM: 100 mL
- Paraformaldeído: 4 g

A solução foi aquecida a 60 °C com agitação. Uma vez que a solução se tornou límpida, foi filtrada e armazenada a 4 °C.

3.3.11 PBS-T

- PBS – Solução Final de Uso: 1 L
- Triton-X-100: 0,5 mL

3.3.12 Tampão de Bloqueio

- Soro Fetal Bovino: 10 mL
- PBS-T: 90 mL

3.4 Reagentes, drogas e doses:

- Acrílico Autopolimerizante Policron (Dencril Ltda, Brasil);
- Anticorpo Anti- IFN γ (2,5 μ g/2 μ L i.c.v, R&D Systems, Minneapolis, EUA);
- Anticorpo Anti IL-6 (10 μ g/2 μ L i.c.v, R&D Systems, Minneapolis, EUA);

- Anticorpo Anti-TNF- α (2,5 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ i.c.v., R&D Systems, Minneapolis, EUA);
- B27 (Invitrogen, Carlsband, EUA);
- BQ788 (3 pmol/2 μL i.c.v Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Celecoxibe (5 mg/kg v.o.; Sigma Chemicals & Co., EUA);
- Cetamina (90 mg/kg i.p., Vetnil, Brasil);
- Cetoprofeno (10 mg/kg v.o., Medley, Brasil);
- CTAP (3 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ i.c.v, Sigma Chemicals & Co., EUA);
- DAPI (MoBiTec, Göttingen, Alemanha);
- D-glicose (Sigma Aldrich, Munique, Alemanha);
- Dispase (2U/mL, Roche, Mannheim, Alemanha);
- EDTA (1nM/L, Sigma Aldrich, Munique, Alemanha);
- Fura-2AM (MoBiTec, Göttingen, Alemanha);
- GBSS (Biotrend, Colônia, Alemanha);
- Glutamina (Biochrom, Berlim, Alemanha);
- Halotano (Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda, Brasil);
- HBSS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} (Biochrom, Berlim, Alemanha);
- Hapes (Sigma Aldrich, Berlim, Alemanha);
- IL-1RA (160 ng/2 μL i.c.v., R&D Systems, Minneapolis, EUA);
- Indometacina (2 mg/kg i.p.; Sigma Chemicals & Co., EUA);
- Kit de EIA para dosagem de PGE_2 (Cayman Chemicals & Co, EUA);
- Kit de Elisa para dosagem de IL-1 β (EBioscience, San Diego, EUA);
- Kit de Elisa para dosagem de IL-6 (Thermo Scientific, Rockford, EUA);
- Kit de Elisa para dosagem de TNF- α (EBioscience, San Diego, EUA);
- Líquido Autopolimerizante Policron (Dencril Ltda, Brasil);
- LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., Sigma Chemicals & Co., EUA);
- Meio Neurobasal A (Invitrogen, Carlsband, EUA);
- Oxitetraciclina (400 mg/kg i.m., Pfizer, Brasil);
- Penicilina/Streptomicina (Biochrom, Berlim, Alemanha);
- Poli I:C (3-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., Sigma Aldrich, St Louis, EUA);

- Poli-L-lisina (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha);
- Solução de lidocaína injetável com noradrenalina a 2% (Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda, Brasil);
- Solução salina estéril (Halex Istar, Brasil);
- SR140333B (3 µg/2µL i.c.v Sanofi- Aventis, França – *doação*);
- Xilazina (10 mg/kg i.p., Syntec, Brasil);
- Zimosan (1-10 mg/kg i.p., Sigma Aldrich, St Louis, EUA);

3.5 Avaliação da temperatura corporal abdominal

Registradores remotos de temperatura (Subcue Datalogger, Calgary, Canadá) foram programados antes de serem implantados na cavidade peritoneal dos animais, para que iniciassem o registro de temperatura no dia do experimento. O ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biocompatível. Os registradores foram mantidos em álcool 70% para assepsia antes do implante.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e xilazina (SILVA et al., 2010). Foi realizada uma incisão na pele, com posterior incisão das camadas muscular e peritoneal, para colocação do registrador na cavidade abdominal. As camadas foram então suturadas separadamente e os animais receberam oxitetraciclina (FRAGA et al., 2008). A analgesia foi mantida através de cetoprofeno, 10 mg/kg por via oral, nos dois primeiros dias após o procedimento cirúrgico (ROUGHAN; FLECKNELL, 2001).

Os experimentos foram conduzidos cinco a sete dias mais tarde, na zona termoneutra para ratos Wistar (ROMANOVSKY et al., 2002), em uma sala com temperatura controlada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. No dia do experimento, a temperatura abdominal foi continuamente monitorada em intervalos de 15 min por pelo menos 2 h antes até 6 h após o estímulo pirogênico.

3.6 Avaliação da indução de aumento da temperatura corporal dos animais pelos diferentes PAMPs através de curvas dose-resposta

Cinco a sete dias após o implante dos transmissores de temperatura, os animais foram transportados para a sala de experimentação e mantidos à temperatura de termoneutralidade. No dia seguinte, entre 09 e 11 h, foram administrados por via i.p. os estímulos pirogênicos, ou seja, o LPS (50 µg/kg), Zimosan (1, 3 e 10 mg/kg) ou Poli I:C (3, 30 e 300 µg/kg). Animais controle receberam o mesmo volume de veículo (salina estéril). A temperatura corporal dos animais foi monitorada conforme descrito no item 3.5

3.7 Avaliação da temperatura da cauda e cálculo do HLI

Selecionada uma dose dos PAMPs que produziu uma resposta febril submáxima, adequada e padronizada para seguir os experimentos, a temperatura da pele dos animais foi avaliada concomitantemente à temperatura abdominal.

Para isso, o mesmo tipo de registrador foi utilizado, sendo inserido em um aparato de proteção (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). No dia anterior ao experimento, animais que haviam sido submetidos ao implante de registradores por via intraperitoneal como descrito no item 3.5 foram anestesiados com halotano, e o aparato contendo outro registrador foi afixado a 4 cm da base da cauda do animal (na superfície ventral), com o auxílio de fita micropore (WILLIAMS et al., 2010).

Esses registradores foram programados para medir a temperatura da pele nos mesmos intervalos correspondentes àqueles que foram implantados por via i.p. Um registrador adicionalmente foi programado e permaneceu dentro de uma caixa vazia contendo cepilho, a fim de medir a temperatura ambiente da sala de experimentação, nos mesmos intervalos de tempo.

A fim de avaliar as mudanças no tônus vasomotor, o índice de perda de calor (HLI, do inglês *heat loss index*) foi calculado para eliminar influências diretas da temperatura ambiente (T_a) e da temperatura abdominal (T_{abd}) na temperatura pele (T_p), de acordo com a seguinte fórmula: **$HLI = (T_p - T_a) / (T_{abd} - T_a)$** . O valor de HLI

varia de zero (completa vasoconstrição) a 1 (completa vasodilatação) (ROMANOVSKY et al., 2002).

3.8 Implante da cânula no ventrículo lateral

Durante a mesma anestesia descrita para o implante de transmissores remotos de temperatura e quando se fez necessário o implante de cânulas no ventrículo lateral, as cabeças dos ratos foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico.

Foi administrada por via s.c., 0,2 mL de lidocaína contendo 2% de noradrenalina, na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana. Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral foram de -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, sendo a inclinação da barra incisal de -3,3 mm.

As cânulas esterilizadas, constituídas de um segmento de agulhas hipodérmicas, com 12 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, foram introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas foram determinadas com base no atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 2006). Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando-se uma prótese de acrílico auto-polimerizável, com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana.

Após o experimento, os animais foram anestesiados e receberam uma microinjeção no ventrículo do mesmo volume de solução de azul de Evans. Os cérebros foram então removidos e a verificação da injeção do corante no local correto (ventrículo lateral) foi avaliada macroscopicamente. Animais que apresentaram injeções fora do ventrículo lateral, deslocamento ou obstrução da cânula no momento da injeção, ou mesmo alguma alteração no padrão de ganho de peso após a cirurgia, foram excluídos do estudo.

3.9 Avaliação da participação de IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2, ET-1, opióides e substância P na resposta febril induzida pelos diferentes PAMPs utilizando antagonistas e anticorpos específicos

Uma vez que foi confirmado que os diferentes PAMPs podem produzir febre, avaliamos a participação de diferentes mediadores na resposta febril induzida por estes PAMPs. Foram utilizados os seguintes antagonistas inibidores e anticorpos:

- 3.9.1 Participação de IL-1 β :** antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) – 9,1 pmol (ou 160 ng), i.c.v. (FABRICIO et al., 1998);
- 3.9.2 Participação de TNF- α :** anticorpo anti-TNF- α , 2,5 μ g, i.c.v.;
- 3.9.3 Participação de IL-6:** anticorpo anti-IL-6, 10 μ g, i.c.v. (SOARES et al., 2012);
- 3.9.4 Participação de IFN γ :** anticorpo anti IFN γ , 2,5 μ g, i.c.v.;
- 3.9.5 Participação de prostaglandinas:** indometacina (2mg/kg, i.p.) (FRAGA et al., 2008); e celecoxibe (5 mg/kg, via oral) (SOARES et al., 2009);
- 3.9.6 Participação de ET-1:** BQ788 (antagonista de receptores ETB), 3 pmol, i.c.v.; (FABRICIO et al., 1998);
- 3.9.7 Participação de opióides endógenos:** CTAP (antagonista de receptores μ), 1 μ g, i.c.v. (FRAGA et al., 2008);
- 3.9.8 Participação de Substância P:** SR140333B (antagonista de receptores NK1), 3 μ g, i.c.v. (REIS et al., 2011);

Para a indometacina e o celecoxibe, os tratamentos foram feitos por via i.p. ou oral, respectivamente, 30 min antes da administração dos diferentes PAMPs. Para os demais tratamentos, estes foram feitos por via i.c.v., 30 min antes da injeção periférica dos diferentes PAMPs nas doses selecionadas. As injeções i.c.v. foram administradas sob condições assépticas, utilizando uma agulha de 30G, que estava conectada a um tubo de polietileno (PE-10). A agulha se projetava 2 mm além da ponta da cânula, e um volume de 2 μ L era lentamente injetado, através do uso de uma seringa de Hamilton de 25 μ L.

3.10 Avaliação complementar da participação de mediadores por ELISA

Uma vez avaliados os mediadores que participam das respostas febris induzidas pelos diferentes PAMPs utilizando antagonistas, inibidores e anticorpos, foi confirmada a participação de alguns mediadores através da análise da síntese e/ou expressão destes mediadores através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou EIA (*Enzyme Immunoassay*).

Os níveis de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram avaliados através de ELISA no plasma e no fluido cerebrospinal, e os níveis de PGE₂ no fluido cerebrospinal através de EIA, conforme descrito em estudos anteriores (Zampronio *et al.*, 2000c; Werner *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2008) e/ou de acordo com as instruções do fabricante do kits.

3. 11 Coleta de plasma

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com halotano após 1, 2 ou 3 h da administração i.p. de PAMP ou veículo, e as amostras de sangue foram coletadas da veia cava abdominal (3 mL) utilizando seringas heparinizadas. As amostras foram coletadas 1 h após a administração do PAMP para as análises de TNF α , 2 h para análise de IL-1 β e 3 h após para IL-6. Essas amostras foram imediatamente refrigeradas após a coleta e então foram centrifugadas a 1200 g por 15 min, a 4°C. O plasma foi separado e as amostras armazenadas a -80°C até que as análises fossem feitas.

3.12 Coleta de CSF

Para a coleta de CSF, os mesmos animais submetidos à coleta de sangue foram utilizados e nos mesmos intervalos de tempo. Os animais anestesiados com halotano foram então posicionados em aparelho estereotáxico de modo a permitir a visualização da cisterna magna. Foram aspirados 50 a 100 μ L de fluido cerebrospinal diretamente da cisterna magna utilizando-se um escalpe tamanho 27. As amostras foram transferidas imediatamente para tubos plásticos, centrifugadas a 1000 g, 4°C por 10 min e armazenadas a -80°C para posterior análise.

Para a dosagem de PGE₂, a coleta foi feita 3 h após as administrações i.p. dos PAMPs ou veículo em animais tratados ou não com indometacina conforme descrito no item 3.9.5. Nesse caso, 2 µL de indometacina (2,5 µg.µL⁻¹) foram acrescentados a cada tubo com o intuito de evitar a formação posterior *in vitro* destes eicosanóides, a partir de moléculas precursoras, alterando os dados a serem medidos. Para essas mesmas amostras, os tubos foram protegidos com papel alumínio, visto que as prostaglandinas são fotossensíveis e podem oxidar-se em presença de luminosidade.

3.13 Preparação e estimulação de microcultivos da OVLT e da MnPO:

Os microcultivos primários da OVLT e da MnPO de ratos foram estabelecidos topograficamente, a partir de tecido cerebral retirado de ratos Wistar de 5 a 6 dias de idade. Cuidadosamente, os animais foram decapitados e seus cérebros removidos em condições estéreis e transferidos para pequenas placas de Petri contendo GBSS. Os cérebros foram posicionados num vibrátomo (725 M, Vibroslice, Berlim, Alemanha) que continha GBSS oxigenada e em gelo. Assim, cortes seriados de 400 µM foram obtidos da região hipotalâmica. Tendo como pontos de referência anatômica a comissura anterior, o quiasma óptico e o terceiro ventrículo cerebral, a OVLT e a MnPO foram microdissecadas com tesouras oftálmicas finas, sob controle estereomicroscópico (SMZ-U, Nikon, Dusseldorf, Alemanha).

Fragmentos teciduais isolados foram então coletados em placas de Petri que continham HBSS/Hepes. Após remover o sobrenadante, as preparações foram tratadas com dispase em HBSS/Hepes oxigenada, por 45 min a 37 °C. Os fragmentos de OVLT e MnPO tratados enzimaticamente foram então lavados duas vezes com HBSS contendo EDTA 1nM/L, para inativar a enzima. Após três lavagens com meio, as preparações foram submetidas a trituração suave, utilizando uma pipeta de Pasteur estéril.

As células dissociadas foram semeadas em lamínulas de vidro pré-aquecidas e cobertas previamente com poli-L-lisina, formando assim o fundo de um poço reutilizável de 6 mm de diâmetro, feito de *Flexiperm*, um material semelhante a silicone (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha). As células foram mantidas em ambiente umidificado com 5% de CO₂, a 37°C. O meio foi trocado a cada 2 dias durante o tempo de cultivo.

As células foram empregadas em medidas de cálcio intracelular com subsequente caracterização imunocitoquímica ou os sobrenadantes foram utilizados para a determinação das citocinas.

3.14 Medidas de Cálcio intracelular dos cultivos de OVLT e MnPO

Passados 5 a 6 dias de manutenção de cultivo celular, as células de OVLT ou MnPO foram incubadas com 2 μ L do corante fluorescente de cálcio Fura-2AM diluído em meio Neurobasal A completo, por 30 min, 5% de CO₂, 37°C. O *Flexiperm* era retirado e as lamínulas eram colocadas em um microscópio invertido de fluorescência (IMT-2, Olympus Optical, Hamburgo, Alemanha), em uma câmara de cultivo de Teflon especialmente desenvolvida para esse propósito, sob perfusão com tampão de Cálcio. As medidas de fluorescência foram feitas utilizando-se um sistema de excitação baseada em diferentes filtros, e analisadas com o programa de *software* MetaFluor 4.5 (Visitron, Puchheim, Alemanha).

Utilizando o *software* já mencionado, as regiões de interesse foram visualizadas e definidas, e então as emissões de fluorescência (340 e 380 nm) foram registradas em um curso de tempo a 0,2 Hz, utilizando uma câmera de fluorescência. As razões entre os dois comprimentos de onda, proporcionais à concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) foram computadas e analisadas.

O Zimosan ou o Poli I:C foram ambos diluídos em PBS, em concentrações de 1 mg/mL, e adicionados à câmara de perfusão *in bolus*, com capacidade de 1000 μ L, em um volume de 100 μ L que, somado ao volume de 900 μ L que passava através da perfusão, alcançava uma concentração final de 100 μ g/mL. Aplicações *in bolus* de PBS foram realizadas antes da estimulação com os PAMPs. Ao final do experimento, as células foram expostas a uma solução contendo alta concentração de cloreto de potássio 50 mM, que serviu como um teste de vitalidade, especialmente para neurônios.

3.15 Caracterização imunocitoquímica das células submetidas ao experimento de medida de cálcio intracelular

A identificação fenotípica dos neurônios, astrócitos e células microgliais foi confirmada por marcação imune com anticorpos direcionados contra proteínas específicas para cada tipo celular: anti-GFAP para astrócitos, anti-ED-1 para micróglia e anti-MAP_{2a+2b} para neurônios.

Após o experimento de medida de cálcio intracelular, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas por 60 min em Tampão de Bloqueio. Na sequência, as células foram submetidas à incubação com os anticorpos primários diluídos em Tampão de Bloqueio, por 48 h, 4°C, em uma câmara umidificada. Anticorpos não ligados foram removidos através de 3 lavagens de 5 min cada utilizando PBS-Triton. As células foram então incubadas com anticorpo secundário (Alexa-350, Alexa-488 ou Cy3) por 2 h à temperatura ambiente. Após outras 3 lavagens de 5 min cada, as lamínulas foram embebidas em solução de glicerol/PBS (*Citifluor*). Os núcleos das células foram então submetidos à coloração com o DAPI, diluído em PBS, por 8 min. O DAPI foi removido após 3 lavagens em PBS e por conseguinte a reação de coloração foi interrompida.

Posteriormente, as células foram examinadas e fotografadas em um padrão apropriado de filtros, utilizando um microscópio equipado a uma câmera fotográfica (Nikon, Japão). As células foram identificadas e marcadas utilizando-se as ferramentas do programa de software específico (MetaFluor 4.5) já mencionado. Na Figura 05, temos a exemplificação de uma imagem obtida no momento do experimento de sinalização de cálcio (Figura 5A), comparada com a imagem da imunocitoquímica (Figura 5B), para identificação das células que foram analisadas e seus fenótipos.

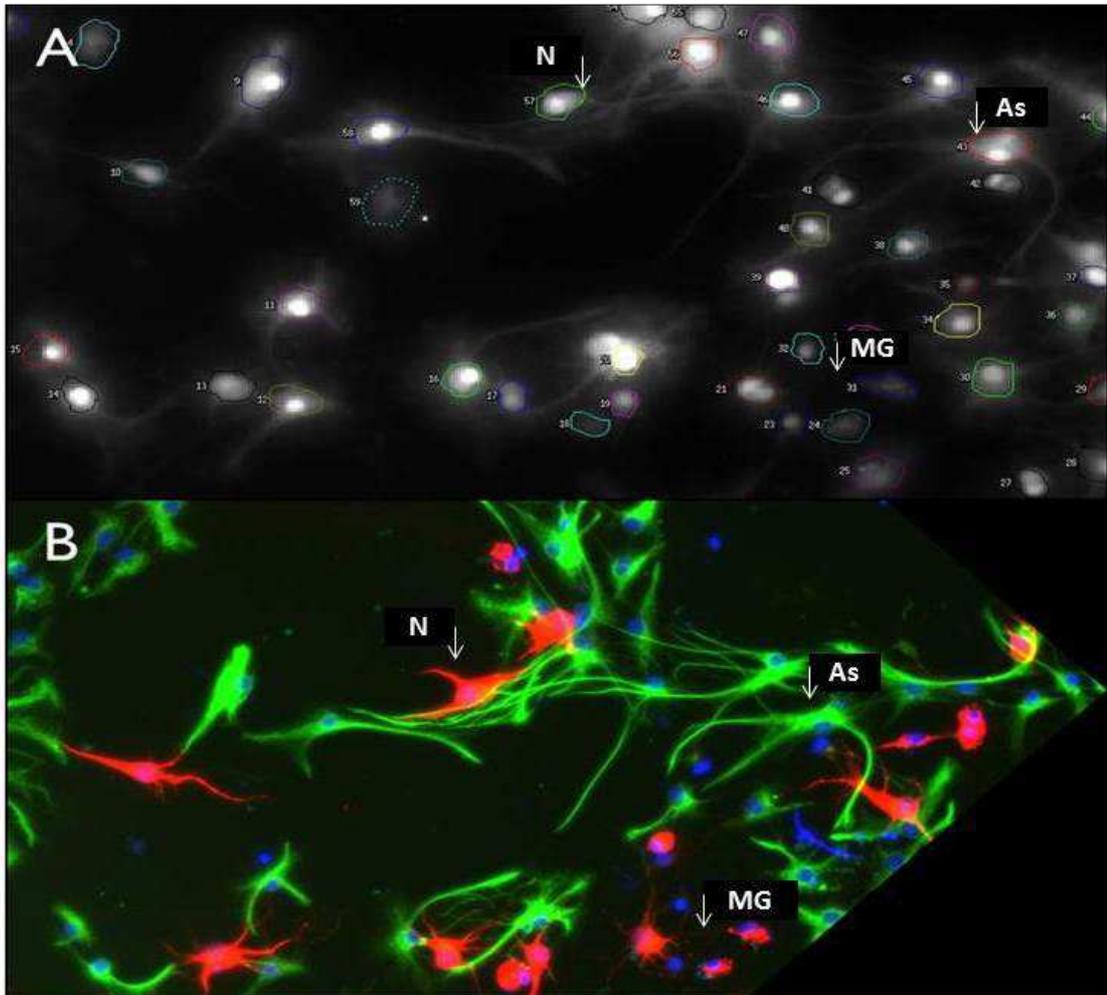


Figura 5: Exemplo de comparação de imagens de células de cultivo primário neuroglial. Utilizando as duas figuras foi possível a identificação fenotípica das células, comparando a imagem obtida no momento do experimento de sinalização de cálcio (A) e aquela obtida no microscópio óptico com o ensaio de imunocitoquímica (B). A cor azul representa os núcleos corados com DAPI. As células verdes são astrócitos corados com GFAP. Um exemplo da mesma célula com as duas técnicas é indicado por As. Tanto o ED-1 quanto o MAP_{2a+2b} coravam as células em rosa claro, porém as características morfológicas facilitavam a diferenciação entre neurônios e micróglia. Na figura ainda está indicada a presença de um Neurônio (N) e uma célula da microglia (MG) nas duas técnicas (setas). Objetiva de 20x em ambas as imagens, com lente adicional de 1,5x na imagem A.

3.16 Medidas de citocinas no sobrenadante de células de OVLT e MnPO

Esses experimentos também foram realizados de 5 a 6 dias após a obtenção do cultivo celular, e somente o Zimosan foi testado. Assim, as células de OVLT e MnPO foram incubados com Zimosan (100 µg/mL) ou PBS, diluídos em meio Neurobasal A completo, por 240 min, a 5% de CO₂, 37°C. Os sobrenadantes foram removidos e congelados a -20 °C.

A determinação de TNF-α foi realizada através de bioensaio que tem como base o efeito citotóxico dessa citocina na linhagem celular de fibrossarcoma de camundongo WEHI 164, subclone 13, e um padrão de TNF-α murino (código 88/532; *National Institute for Biological Standards and Control*, South Mimms, Reino Unido).

A medida de IL-6 foi feita por bioensaio baseado na estimulação dose-dependente do crescimento do hibridoma B9 pelo IL-6, utilizando um padrão de IL-6 (código 89/548; *National Institute for Biological Standards and Control*, South Mimms, Reino Unido).

Os níveis das citocinas avaliadas que foram determinadas nas nossas amostras não refletem a bioatividade em relação a padrões internacionais estabelecidos.

3.17 Análise estatística

Os dados referentes a temperatura abdominal, temperatura da pele da cauda e HLI foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguidas de teste de Bonferroni. Os níveis de citocinas foram analisados por teste t-Student ou ANOVA de uma via (este seguido de teste de Bonferroni), como apropriado. Esses resultados são reportados como média ± EPM.

O número de células responsivas nos experimentos de sinalização de cálcio foram expressos como uma porcentagem de todas as células desse fenótipo e os dados analisados por teste χ^2 . Os aumentos transitórios na $[Ca^{+2}]_i$ induzidos por estímulo foram expressos como a razão entre a medida de repouso e o pico induzido pelo estímulo (razão [340/380 nm]). Uma diferença na razão [340/380 nm] de mais de 0,1 foi considerada um sinal induzido por estímulo. As diferenças no ratio [340/380 nm] também foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguidas de teste de Bonferroni. Os

dados foram analisados através do software GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA) e um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da administração intraperitoneal de Zimosan ou Poli I:C sobre a temperatura corporal

Experimentos com diferentes doses de Zimosan ou Poli I:C, administrados por via intraperitoneal, foram realizados, com o intuito de encontrar a dose ideal de cada PAMP para prosseguir com a investigação de suas respostas febris. A dose de LPS (50 µg/kg) utilizada em todos os experimentos está baseada em estudos prévios em nosso laboratório, bem como dados da literatura (SOARES et al., 2009; FRAGA et al., 2009).

A Figura 6 representa o efeito que a administração intraperitoneal de Zimosan promoveu na temperatura corporal de ratos. A administração intraperitoneal de veículo (salina estéril) não induziu qualquer mudança significativa na temperatura abdominal dos animais. A administração de Zimosan na dose de 1 mg/kg também não alterou significativamente a temperatura dos animais (Figura 6A). No entanto, a administração de Zimosan nas doses de 3 e 10 mg/kg induziu um aumento na temperatura corporal, que começou ao redor de 2 h após o estímulo pirogênico, e teve o seu pico em aproximadamente 3 h após a injeção sistêmica de Zimosan (Figura 6A). Em seguida, a temperatura abdominal dos animais diminuiu, voltando aos seus níveis normais aproximadamente 4 h após o estímulo pirogênico. A dose escolhida para o prosseguimento dos experimentos foi a de 3 mg/kg.

Ainda, a administração de 3 mg/kg de Zimosan também induziu uma redução significativa na temperatura da cauda dos animais, aproximadamente 1,5 h após a injeção. Essa diminuição ocorreu por volta de 30 min antes de um aumento significativo da temperatura abdominal desses animais (Figura 6B). Na Figura 3C, pode-se observar o índice de perda de calor (HLI), calculado em base aos resultados descritos.

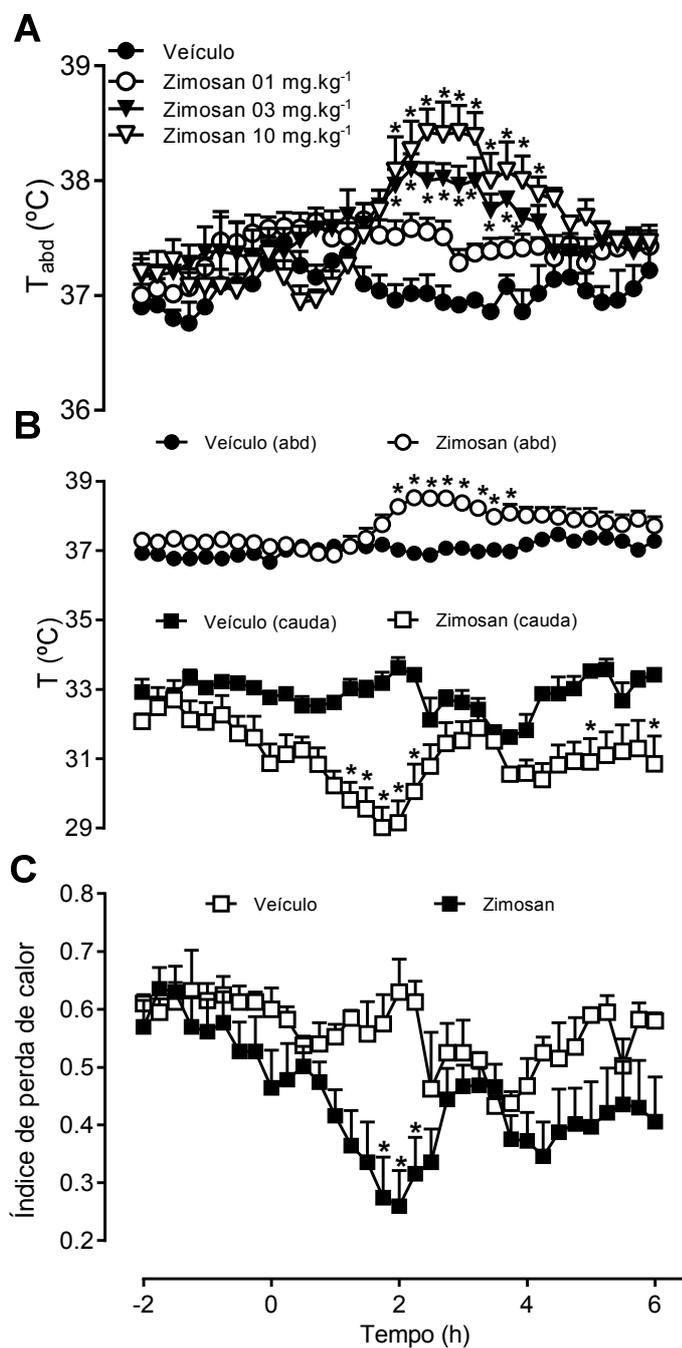


Figura 6: Efeito do Zimosan nas temperaturas abdominal e caudal em ratos. Animais receberam Zimosan por via intraperitoneal nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg (painéis A), somente 3 mg/kg (painéis B e C) ou Veículo. A temperatura abdominal (A) ou as temperaturas abdominal e caudal (B) foram medidas. Os pontos (A e B) mostram a média \pm epm da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-6). Em C, os pontos representam a média \pm epm do índice de perda de calor (HLI). *P<0,05, comparado ao grupo que recebeu somente veículo.

De modo semelhante, três diferentes doses de Poli I:C foram utilizadas na elaboração de uma curva de resposta febril. Na Figura 7A observa-se que a injeção de veículo (salina estéril) não alterou a temperatura abdominal basal dos animais durante todo o tempo de observação. A temperatura abdominal dos animais também não foi alterada pela injeção de Poli I:C na dose de 3 µg/kg (Figura 7A). A administração deste agonista de TLR3, a partir da dose de 30 µg/kg, promoveu aumento da temperatura abdominal dos animais. Nessa dose, o aumento da temperatura foi fugaz e relativamente tardio, com duração de 45 min e pico entre a terceira e a quarta hora após o estímulo pirogênico (Figura 7A). Na dose de 300 µg/kg o Poli I:C induziu uma resposta febril que iniciou-se 2 h após a administração do agente, apresentou um pico em torno de 3 h, com aumento de mais de 1 °C na temperatura abdominal, tendo esses valores de temperatura retornado a níveis basais em torno de 4 h após a injeção intraperitoneal de Poli I:C (Figura 7A). Essa última dose de Poli I:C foi escolhida para os experimentos subsequentes.

A vasoconstrição periférica, característica da resposta febril, também esteve presente quando da administração de Poli I:C na dose de 300 µg/kg e isso pode ser observado nas figuras 7B e 7C. Nesse experimento, o Poli I:C promoveu um aumento da temperatura abdominal semelhante àquele obtido na curva dose-resposta na mesma dose, aumento esse que coincidiu com uma diminuição na temperatura da cauda desses animais. A diminuição na temperatura da pele foi de até 2 °C e durou o mesmo período no qual a temperatura abdominal apresentou-se aumentada (Fig 7B). O cálculo do HLI também foi realizado, considerando ainda o fator da temperatura ambiental durante o experimento. Na Figura 7C, podemos observar valores HLI próximos a zero durante o período da resposta febril, o que representa vasoconstrição periférica.

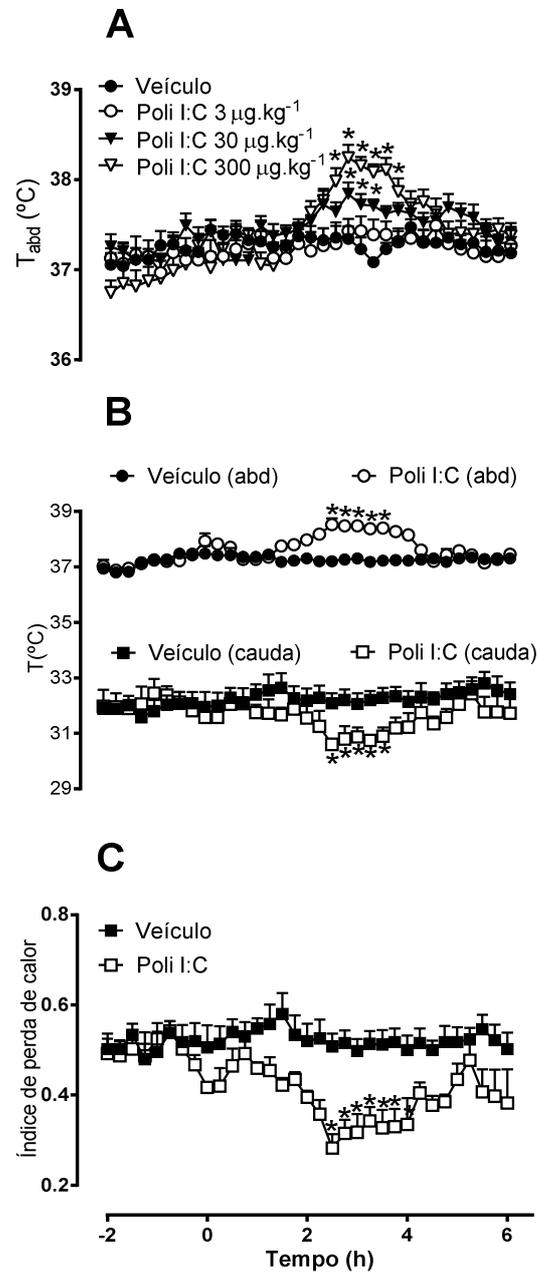


Figura 7: Efeito do Ácido Poliinosínico: Policidílico (Poli I:C) nas temperaturas abdominal e caudal em ratos. Animais receberam Poli I:C por via intraperitoneal nas doses de 3, 30 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, (painel A) somente 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (painéis B e C) ou Veículo. A temperatura abdominal (A) ou as temperaturas abdominal e caudal (B) foram medidas. Em A e B, os pontos representam a média \pm epm da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=5-6$). Em C, os pontos representam a média \pm epm do índice de perda de calor (HLI). * $P < 0,05$, comparado ao grupo que recebeu somente veículo.

4.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpo anti-TNF α por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

Os experimentos subsequentes avaliaram a participação de importantes citocinas nas respostas febris induzidas pelo Zimosan e pelo Poli I:C, bem como pelo LPS. A primeira citocina a ter a participação avaliada foi o TNF- α . A Figura 5 mostra os resultados desses experimentos demonstrando o efeito do anticorpo anti-TNF- α nas respostas febris induzidas por LPS (Fig. 8A), Zimosan (Fig. 8B) e Poli I:C (Fig. 8C).

O anticorpo anti-TNF- α administrado previamente a injeção intraperitoneal de salina estéril (grupo Anti-TNF- α X Veículo) não alterou a temperatura abdominal dos animais, comparado com os níveis basais (Figuras 8A, 8B e 8C). A administração de PBS estéril (veículo para o anticorpo anti-TNF- α), 30 min antes da administração dos agentes pirogênicos, promoveu respostas febris similares às descritas anteriormente para os três PAMPs. O LPS induziu uma resposta febril que iniciou após 2 h da sua administração e persistiu até o final do experimento (Fig. 8A). Já o Zimosan promoveu uma resposta febril de menor tempo de duração, entre 2 e 4 h após a sua administração (Fig 8B). O Poli I:C promoveu uma resposta febril entre 3 e 4 h após a administração (Fig 8C). A dose de anticorpo anti-TNF- α administrada reduziu as respostas febris de todos os PAMPs, confirmando a participação dessa citocina nesses eventos (Figura 8A-C). No caso da resposta febril induzida pelo LPS, a redução se deu a partir da segunda hora pós administração (Fig 8A). Já no que diz respeito ao Zimosan e Poli I:C, a redução da resposta febril pelo Anti-TNF α ocorreu principalmente na fase inicial de aumento da temperatura (Fig 8B e 8C).

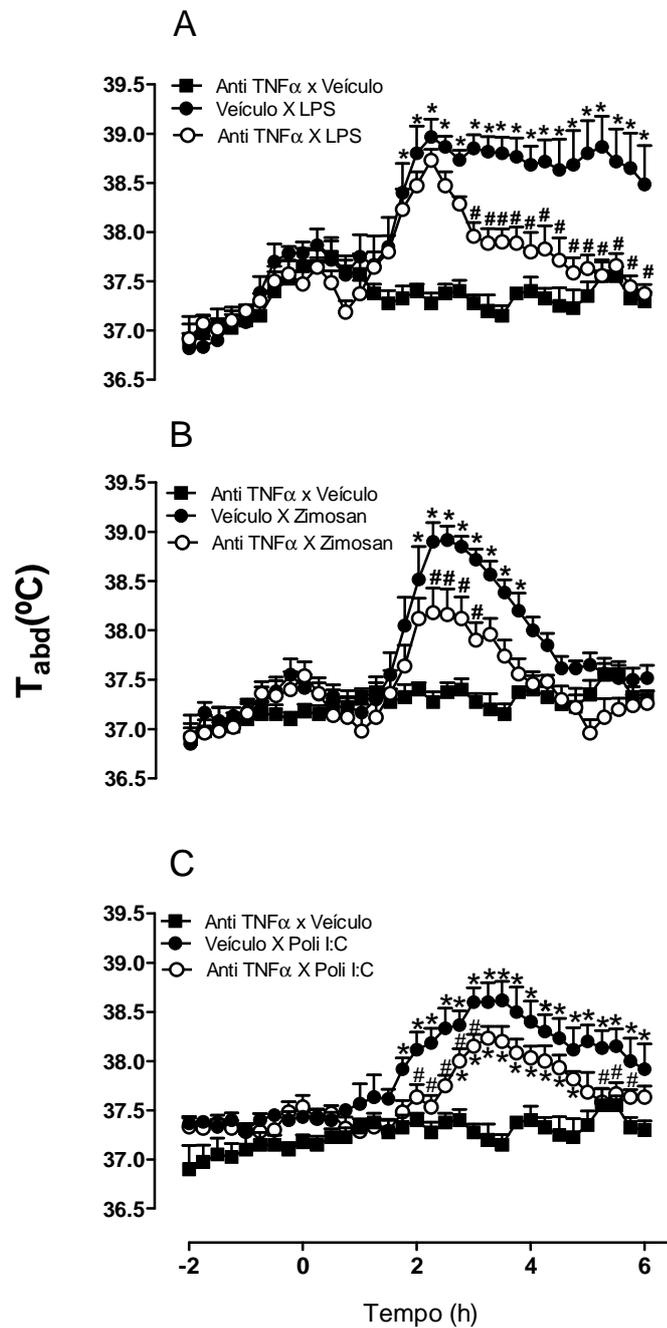


Figura 8: Efeito do tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF- α sobre a resposta febril induzida por LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de anti-TNF- α (2,5 μ g), ou o mesmo volume de veículo (PBS estéril, 2 μ L) e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 μ g/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de Veículo (Salina estéril). A temperatura abdominal foi avaliada a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo que recebeu anti-TNF- α X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (8A) / Zimosan (8B) / Poli I:C (8C).

4.3 Efeito do pré-tratamento com IL1-RA por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

A fim de avaliar o papel da IL-1 β na resposta febril induzida por estes PAMPs utilizou-se o antagonista de receptores para IL-1, o IL-1RA.

A administração i.c.v. de IL-1RA seguida de veículo por via i.p. não alterou a temperatura basal dos animais. A administração de veículo seguida de LPS, Zimosan e Poli I:C induziu respostas febris similares às descritas anteriormente (Figura 9). O tratamento dos animais com IL-1RA reduziu significativamente (em torno de 50%) a resposta febril induzida pelos três estímulos pirogênicos (Figura 9A-C). A redução da resposta febril se deu de maneira homogênea para os três PAMPs desde o início da resposta até a fase final da mesma.

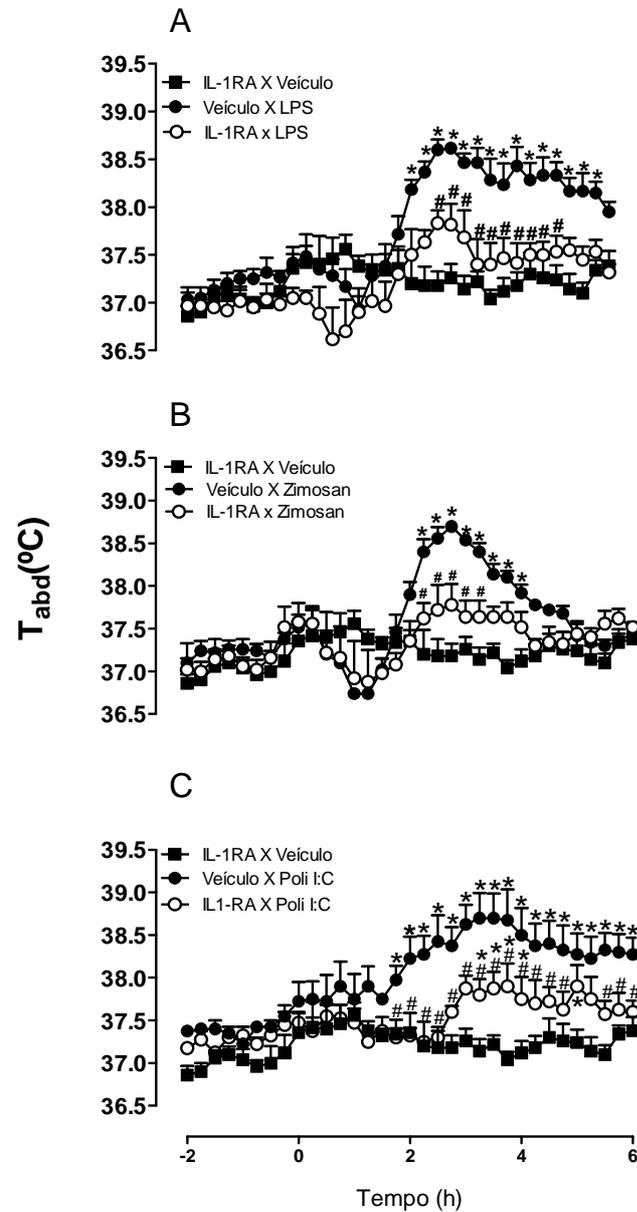


Figura 9: Efeito do tratamento dos animais com IL-1RA sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de IL-1RA (9,1 pmol), ou o mesmo volume de veículo (PBS estéril, 2 μ L) e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 μ g/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de Veículo (Salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo IL-1RA X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (9A) / Zimosan (9B) / Poli I:C (9C).

4.4 Efeito do pré-tratamento com anticorpo anti-IL-6 por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

Na sequência, buscamos avaliar a participação da IL-6 nas respostas febris induzidas por LPS, Zimosan e Poli I:C.

Os resultados estão representados na Figura 10. A administração central de Anti IL-6 seguida de Solução Salina estéril não promoveu alterações na temperatura abdominal dos animais. A administração de veículo seguida de LPS, Zimosan e Poli I:C induziu respostas febris similares às descritas anteriormente (Figura 9). O pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-IL-6 reduziu a resposta febril induzida pelos três estímulos (Figura 10A-C), confirmando a participação dessa importante citocina pró-inflamatória nas respostas febris avaliadas. Interessante notar que, enquanto as respostas febris induzidas por LPS (Figura 10A) ou por Poli I:C (Figura 10C) foram reduzidas desde o início pelo tratamento dos animais com anticorpo anti-IL-6, a febre induzida por Zimosan foi reduzida somente na fase final, sugerindo que essa citocina pode ter um papel indispensável na manutenção desse tipo de febre, e provavelmente uma menor importância para a sua indução.

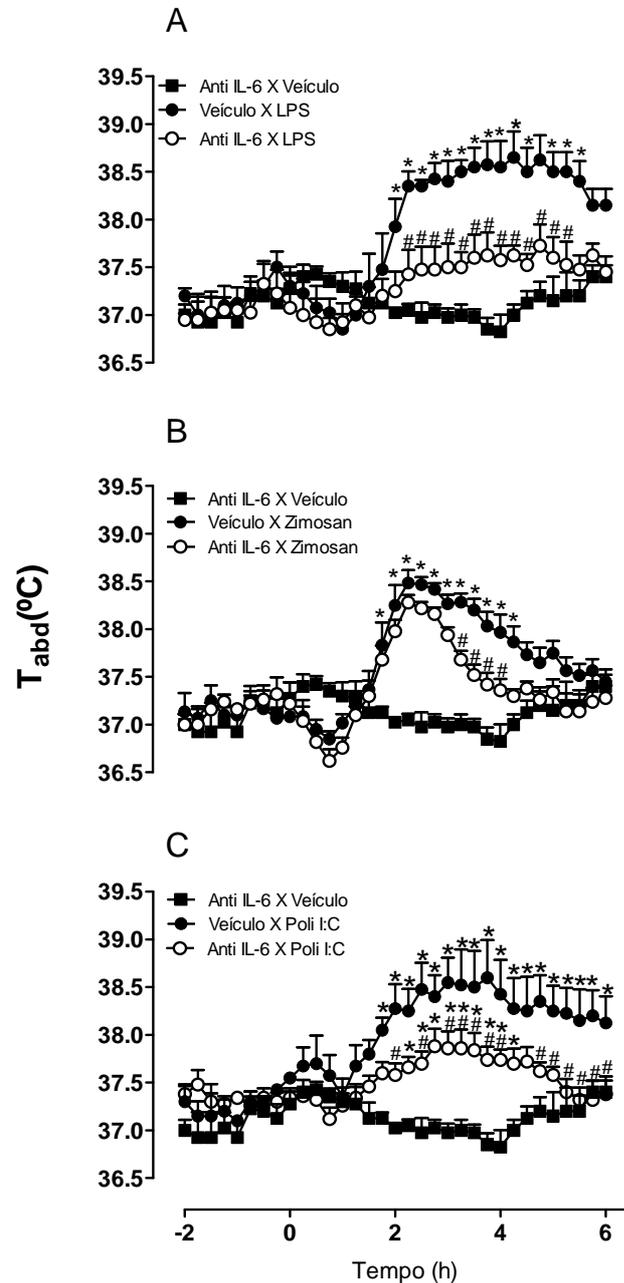


Figura 10: Efeito do tratamento dos animais com anticorpo anti IL-6 sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de Anti IL-6 (10 μ g), ou o mesmo volume de veículo (PBS estéril, 2 μ L) e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 μ g/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de Veículo (Salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em $^{\circ}C$ dos animais ($n=4-6$). * $p<0.05$ quando comparado com o grupo que recebeu anti IL-6 X veículo. # $p<0.05$ quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (10A) / Zimosan (10B) / Poli I:C (10C).

4.5 Efeito do pré-tratamento com anticorpo Anti-IFN γ por via intracerebroventricular sobre a resposta febril induzida por Poli I:C

Considerando a importância do IFN em respostas infecciosas virais, decidimos complementar nossos estudos, investigando o papel desta citocina na resposta febril induzida pelo componente sintético viral Poli I:C.

A administração do anticorpo Anti-IFN γ previamente à administração sistêmica de veículo não foi capaz de alterar a temperatura abdominal dos animais comparado com a temperatura basal (Figura 11). O Poli I:C promoveu uma resposta febril similar àquela obtida anteriormente. A administração prévia de anticorpo para IFN γ , aboliu a febre induzida por esse PAMP (Figura 11).

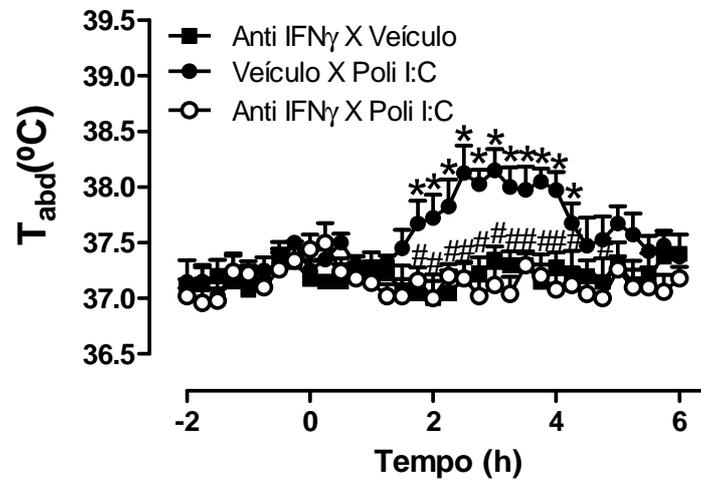


Figura 11: Efeito do tratamento dos animais com Anti IFN γ sobre a resposta febril induzida pelo Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de Anti IFN γ (2,5 μ g), ou o mesmo volume de veículo (PBS estéril, 2 μ L) e após 30 min receberam Poli I:C (300 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de Veículo (Salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T abd) em $^{\circ}$ C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo que recebeu anti IFN γ X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X poli I:C.

4.6 Avaliação das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em CSF e plasma após administração de LPS, Zimosan e Poli I:C

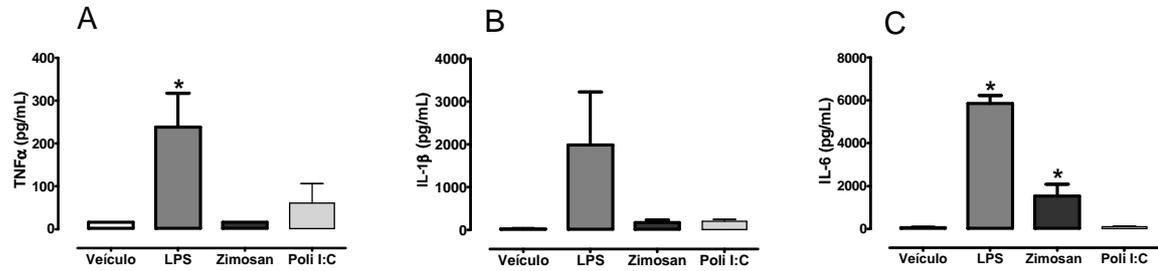
Com o intuito de verificar a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e assim complementar os dados descritos nos tópicos anteriores, foram realizados ensaios de ELISA para essas citocinas, utilizando amostras de plasma e CSF. Os resultados estão expostos na Figura 12.

Os níveis de TNF- α foram indetectáveis no plasma de animais tratados com o veículo, porém mostraram-se aumentados no plasma 1 h após a injeção de LPS (Figura 9A). Animais que receberam o Zimosan ou o Poli I:C não apresentaram níveis detectáveis de TNF- α , com esse mesmo tempo de coleta de material (Figura 12A). Nenhuma amostra de CSF apresentou valores detectáveis de TNF- α .

Com relação à IL-1 β , não podemos afirmar que houve diferenças entre os PAMPs e o Veículo, quando avaliamos o plasma (Figura 12B). No entanto, parece ser importante referir que, talvez, houve uma grande variabilidade nos valores desta citocina o que certamente contribuiu para a ausência de diferenças significativas. Os valores brutos, em pg/mL, para os grupos LPS (1987 ± 1233) e Zimosan (177 ± 56.9) parecem estar mais altos que o Veículo (25.06 ± 8.9). Isso também vale para valores plasmáticos de IL-1 β induzidos por Poli I:C, que ficaram na faixa de $207,3 \pm 86,8$ pg/mL, semelhante ao grupo Zimosan. No CSF (Figura 12D), somente a administração de LPS levou a um aumento significativo nos níveis dessa citocina 2 h após o estímulo (959.3 ± 434.6 pg/mL no grupo LPS). Os níveis de IL-1 β no CSF induzido por Poli I:C ($247,9 \pm 117,2$ pg/mL) se aproximaram aos valores observados após a administração de Veículo (268.3 ± 70.92 pg/mL). Já os níveis de IL-1 β induzidos no CSF por Zimosan, apesar de altos, também apresentaram uma grande variação (2278 ± 1230 pg/mL), dificultando a ocorrência de diferença significativa entre os grupos.

A administração de LPS ou Zimosan, mas não de Poli I:C aumentou significativamente os níveis de IL-6 no plasma 3 h após o estímulo pirogênico (Figura 12C). Com relação a essa mesma citocina, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos com amostras de CSF, mesmo que o grupo LPS tenha apresentado aparentemente um aumento em seus níveis (Figura 12E).

Plasma



CSF

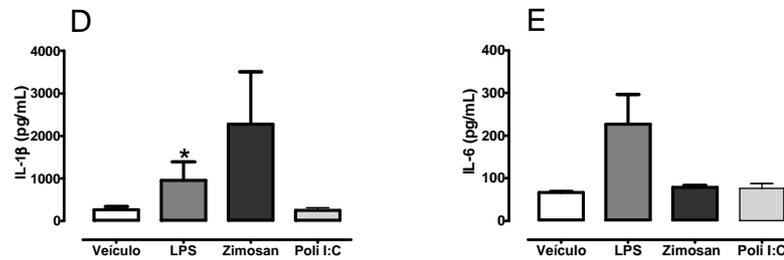


Figura 12. Concentrações de TNF- α , IL1 β e IL-6 no plasma e de IL1 β e IL-6 no CSF de ratos após à administração de LPS (50 μ g/mL), Zimosan (3 mg/mL) ou Poli I:C (300 μ g/mL). Os animais foram tratados com os diferentes PAMPs e amostras de plasma (painéis A, B e C) e de CSF (painéis D e E) foram coletadas 1 h, 2 h ou 3 h após a administração para dosagem de TNF- α (painel A), IL1 β (painel B e D) e IL-6 (painel C e E), respectivamente. As barras representam a média \pm e.p.m da concentração das citocinas em picogramas.mL⁻¹. *p < 0,05 comparado ao grupo que recebeu veículo.

4.7 Efeito do pré-tratamento com indometacina ou celecoxibe sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

A administração de indometacina não induziu qualquer alteração na temperatura dos animais (Figuras 13A-C). O pré tratamento dos animais com veículo também não alterou as respostas febris induzidas por LPS (Figura 13A), Zimosan (Figura 13B) ou Poli I:C (Figura 13C). Enquanto que o tratamento prévio com a indometacina na dose utilizada aboliu as respostas febris induzidas pelo LPS e pelo zimosan (Figura 13A e 13B) somente a fase final da resposta febril induzida pelo Poli I:C foi modificada (Figura 13C). De maneira similar ao experimento acima descrito, a administração de celecoxibe, seguida de injeção intraperitoneal de solução salina estéril, não alterou a temperatura abdominal dos animais (Figura 14A-C). O pré-tratamento dos animais com celecoxibe aboliu as respostas febris induzidas por LPS (Figura 14A), por Zimosan (Figura 14B) e por Poli I:C (Figura 14C).

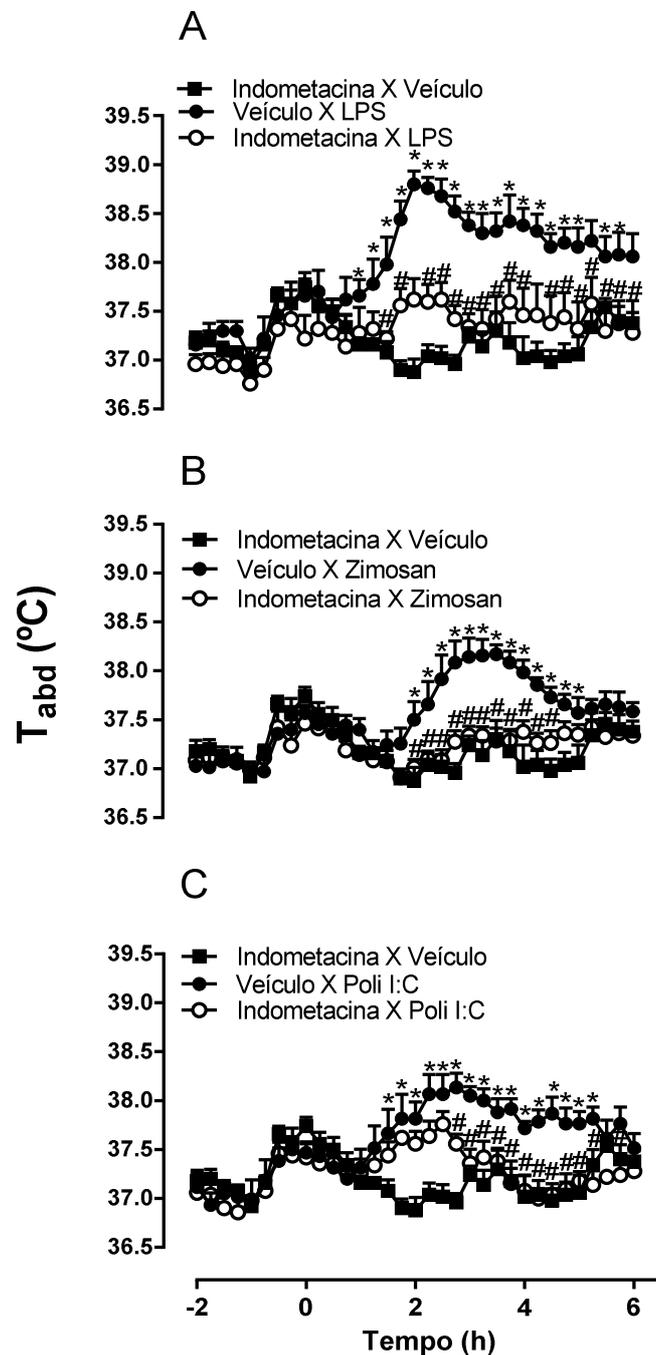


Figura 13: Efeito do tratamento dos animais com Indometacina sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.p. de Indometacina (2mg/kg), ou o mesmo volume de veículo (Tampão Tris 1mL/kg) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 µg/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média ± e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo que recebeu Indometacina X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (13A) / Zimosan (13B) / Poli I:C (13C).

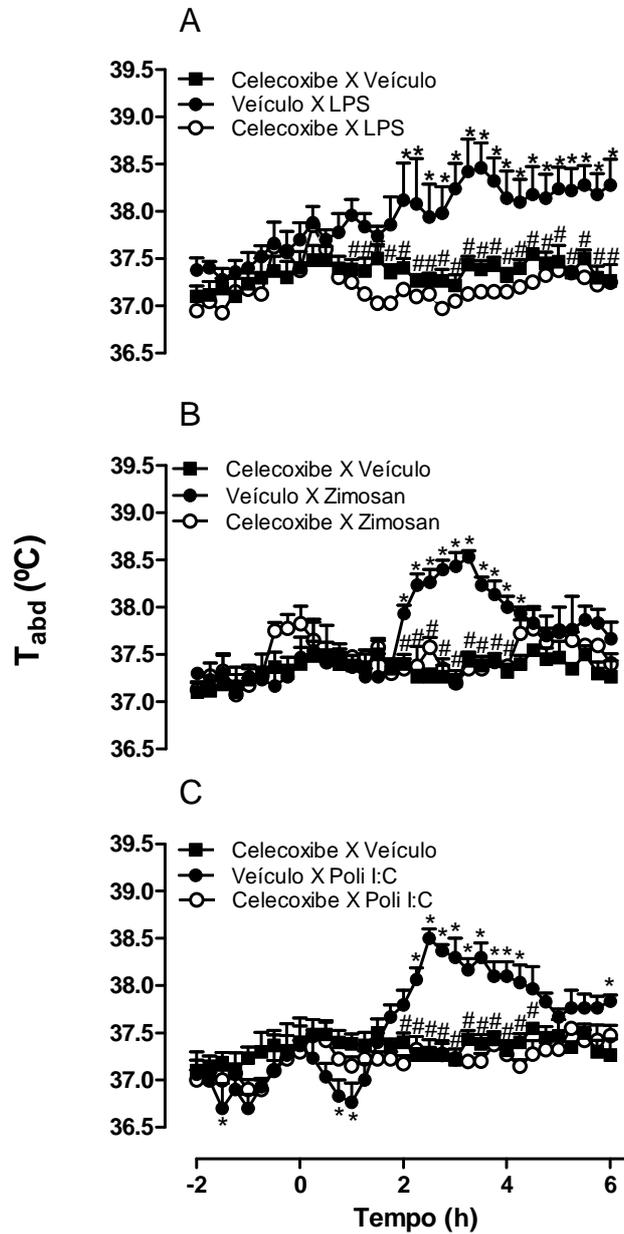


Figura 14: Efeito do tratamento dos animais com Celecoxibe sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam o Celecoxibe, por gavagem, na dose de 5 mg/kg, ou o mesmo volume de veículo (Tampão Tris 1mL/kg) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 µg/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais ($n=4-6$). * $p<0.05$ quando comparado com o grupo que recebeu Celecoxibe X veículo. # $p<0.05$ quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (14A) / Zimosan (14B) / Poli I: C (14C).

4.8 Medidas das concentrações de PGE₂ no CSF, após administração intraperitoneal de LPS, Zimosan e Poli I:C

Complementando os resultados referentes às respostas febris dos três PAMPs estudados associadas aos tratamentos com os inibidores de COX Indometacina e Celecoxibe, avaliamos os níveis de PGE₂ no CSF de animais submetidos aos nossos protocolos experimentais.

As administrações de veículos resultaram em níveis de PGE₂ próximos a níveis indetectáveis (Figura 15). A administração de LPS (Fig 15A), Zimosan (Fig 15B) e Poli I:C (Fig 15C), em doses pirogênicas, elevou significativamente os níveis de PGE₂, com valores em torno de 400 pg/mL para o Poli I:C, 500 pg/mL para o Zimosan e 700 pg/mL para o LPS. A administração de Indometacina previamente à injeção de LPS, Zimosan ou Poli I:C, diminuiu, também significativamente, os valores deste prostanóide (Fig. 15A-C).

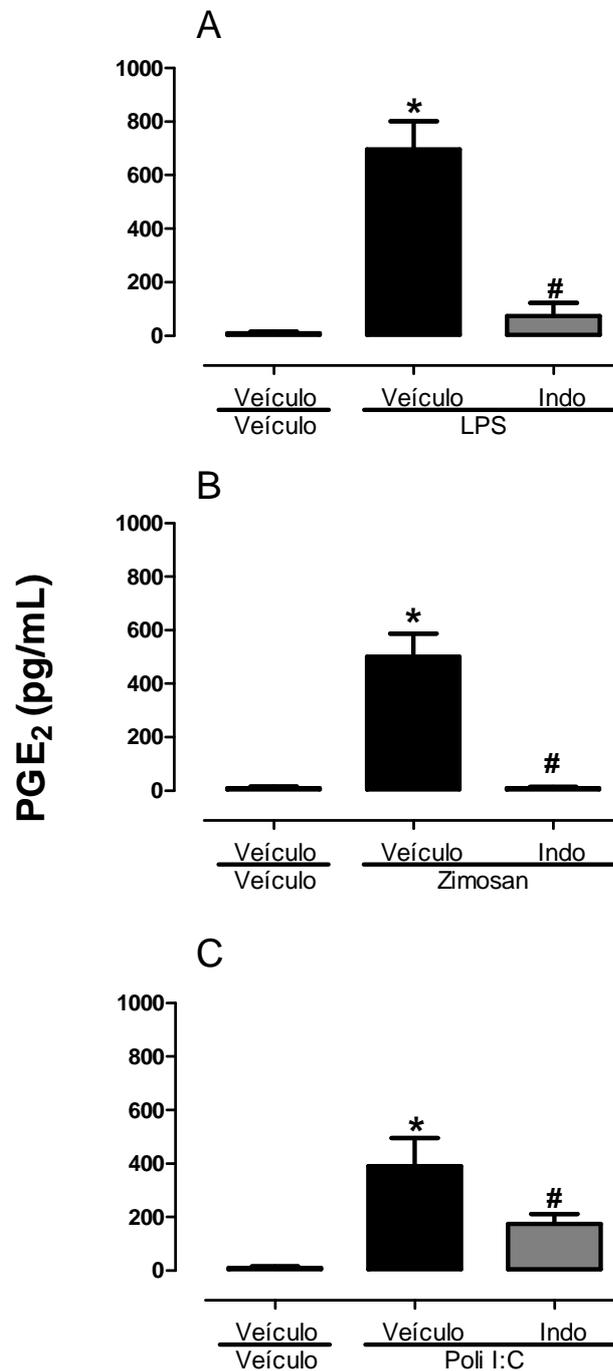


Figura 15. Níveis de PGE₂ no CSF após a administração de LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais foram tratados com veículo ou indometacina (Indo, 2 mg/kg, i.p.) e após 30 min receberam uma injeção intraperitoneal de LPS (50 µg/kg, painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 µg/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril). Amostras de CSF foram coletadas 3 h após o estímulo pirogênico. As barras representam a média ± e.p.m dos níveis de PGE₂ (pg/mL). *p< 0,05 comparado ao grupo que recebeu somente veículo (n=4-6). #p<0,05, comparado aos grupos que receberam veículo X LPS (15A), Zimosan (15B) ou Poli I:C (15C).

4.9 Efeito do pré-tratamento com BQ788 por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

A administração de BQ788 e veículo i.p. não alterou a temperatura basal dos animais que permaneceu estável durante todo o período de registro de temperatura. O LPS promoveu uma resposta febril semelhante aos outros experimentos, com início em 2 h, se estendendo até o final do experimento (Fig 16A). O Zimosan e o Poli I:C induziram respostas febris de início semelhantes aos do LPS, porém de menor duração, com temperaturas retornando aos valores basais em torno de 4 h (Figuras 16B e 16C, respectivamente).

O pré-tratamento dos animais por via i.c.v com BQ788 reduziu significativamente a resposta febril induzida por LPS (Fig 16A), corroborando dados da literatura. Esse antagonista promoveu um efeito semelhante na resposta febril induzida pelo Zimosan (Fig. 16B). No entanto, a resposta febril induzida pelo Poli I:C não foi alterada com o tratamento prévio dos animais com o BQ788 (Fig. 16C).

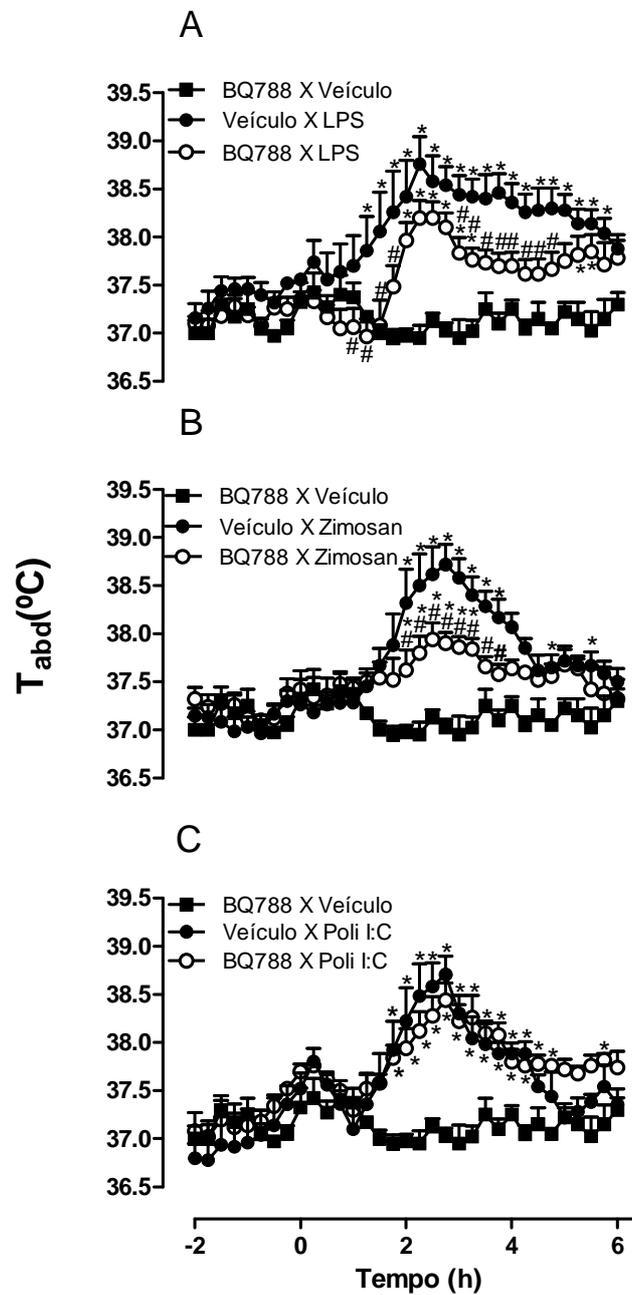


Figura 16: Efeito do tratamento dos animais com BQ788 sobre a resposta febril induzida por LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de BQ788 (3pmol), ou o mesmo volume de veículo (solução salina estéril, 2 μ L) e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 μ g/kg, i.p., painel C) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média \pm e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo que recebeu BQ788 X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (16A) / Zimosan (16B).

4.10 Efeito do pré-tratamento com SR140333B por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

A administração do antagonista de receptores NK_1 SR140333B, seguida de administração i.p. de Veículo, não alterou a temperatura corporal dos animais, comparativamente aos valores basais (Fig. 17). Também para os três estímulos e em todos os grupos, percebemos uma pequena e não significativa alteração na temperatura abdominal dos animais pouco antes da aplicação do agente pirogênico. A administração de veículo i.c.v, mesmo sendo um veículo distinto dos outros experimentos, não induziu qualquer variação na temperatura corporal dos animais. Podemos observar que, enquanto o LPS promoveu uma resposta similar àquela encontrada anteriormente (Fig. 17A), o Zimosan (Fig. 17B) e o Poli I:C (Fig. 17C) induziram respostas febris de maior duração do que em outros experimentos, como nas curvas dose-resposta. Porém, os picos de respostas febris foram semelhantes.

O tratamento dos animais com SR140333B antes dos estímulos pirogênicos inibiu significativamente a resposta febril induzida por LPS (Fig. 17A) e por Zimosan (Fig. 17B), porém não modificou a resposta febril induzida por Poli I:C (Fig. 17C).

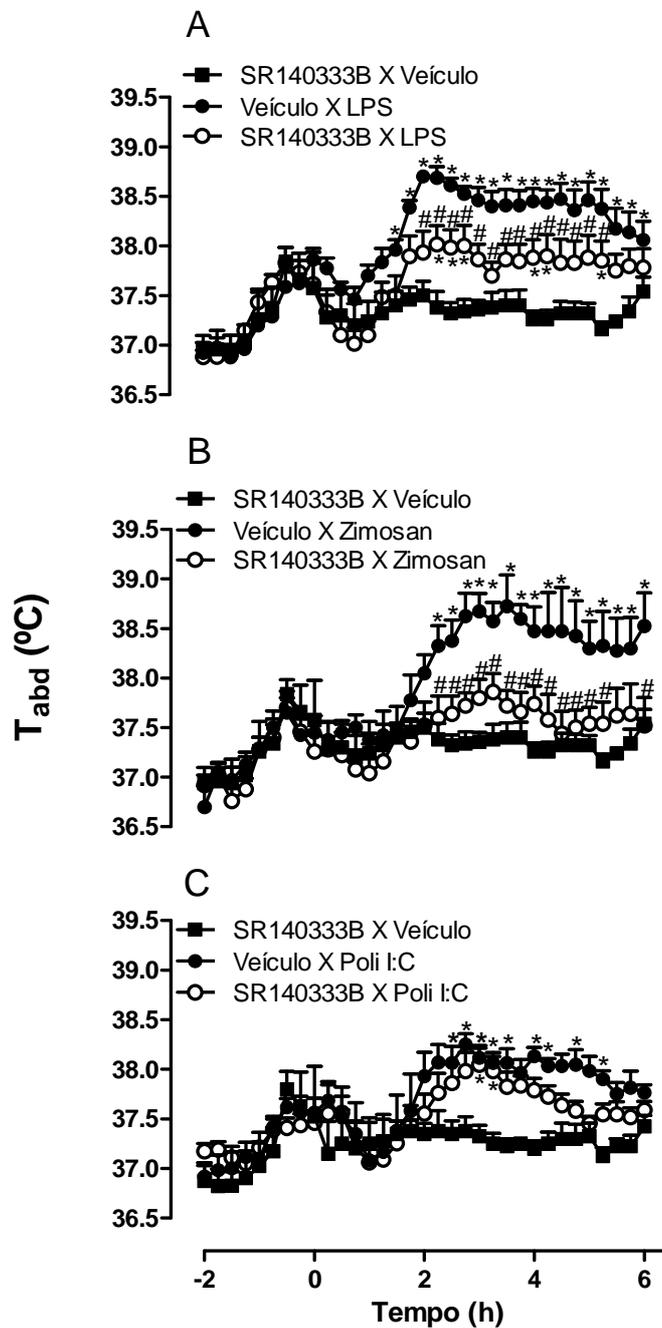


Figura 17: Efeito do tratamento dos animais com SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de SR140333B (3 µg), ou o mesmo volume de veículo (2 µL) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p., painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 µg/kg, i.p., painel C) ou veículo (solução salina estéril, 1 mL kg⁻¹). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média ± e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo que recebeu SR140333B X veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo que recebeu veículo X LPS (14A) / Zimosan (14B).

4.11 Efeito do pré-tratamento com CTAP por via intracerebroventricular sobre as respostas febris induzidas por LPS, Zimosan ou Poli I:C

A administração central de CTAP, antagonista de receptores μ -opioides, seguida de veículo via i.p., não alterou a temperatura dos animais. LPS, Zimosan e Poli I:C, administrados periféricamente após aplicação de veículo via i.c.v., induziram respostas febris de duração e picos febris característicos (Fig. 18A-C). A administração prévia do antagonista opioide reduziu significativamente as respostas febris do LPS (Fig. 18A), do Zimosan (Figura 18B) e do Poli I:C (Figura 18C).

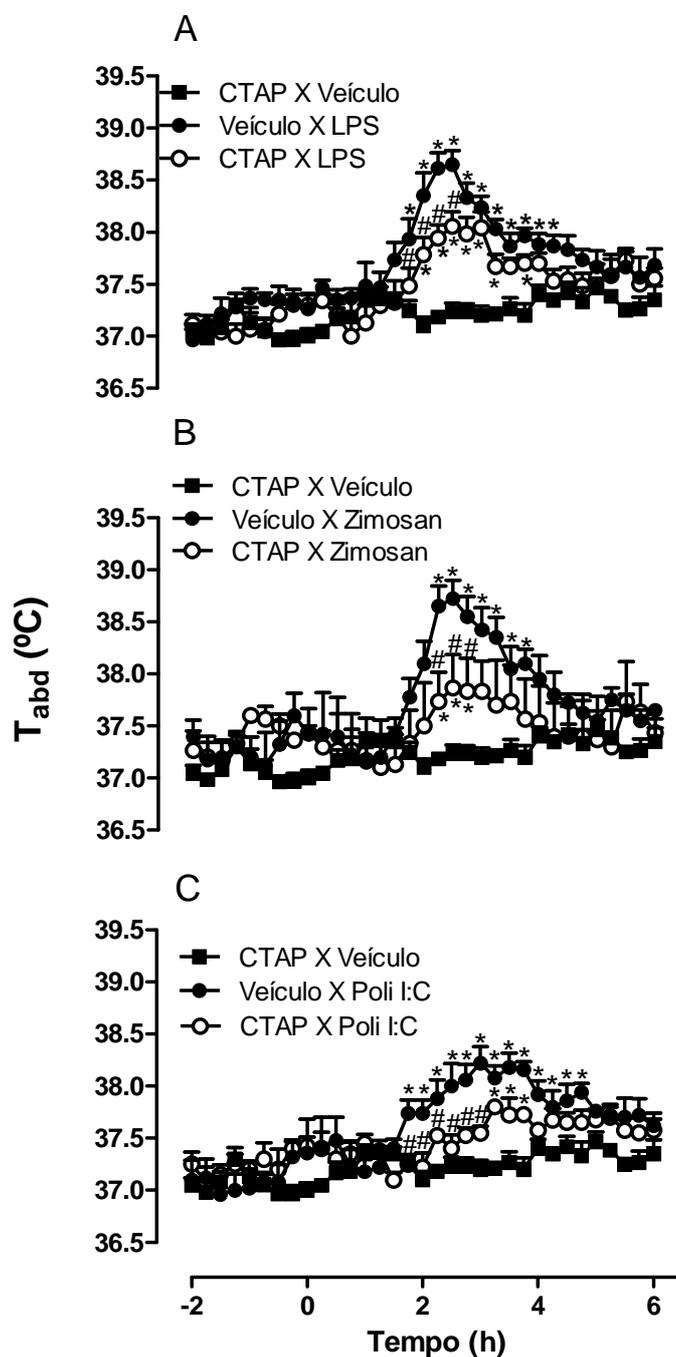


Figura 18: Efeito do tratamento dos animais com CTAP sobre a resposta febril induzida pelo LPS, Zimosan ou Poli I:C. Os animais receberam uma injeção i.c.v de CTAP (1 µg), ou o mesmo volume de veículo (2 µL) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p. painel A), Zimosan (3 mg/kg, i.p., painel B), Poli I:C (300 µg/kg, i.p., painel C) ou veículo (solução salina estéril, 1 mL/kg i.p.). A temperatura abdominal foi medida a cada 15 min por 6 h. Os pontos representam a média ± e.p.m da temperatura abdominal (T_{abd}) em °C dos animais (n=4-6). *p<0.05 quando comparado com o grupo CTAP X Veículo. #p<0.05 quando comparado ao grupo Veículo X LPS (18A) / Zimosan (18B) / Poli I:C (18C).

4.12 Efeito da administração *in bolus* de Zimosan sobre a concentração intracelular de cálcio em cultivos primários neurogliais na OVLT e MnPO

As Figuras 15A e 15B mostram os resultados obtidos a partir das análises de 233 neurônios, 385 astrócitos e 46 células da microglia, derivadas de 5 diferentes preparações de OVLT. De todas essas células, 3,9% dos neurônios (9 células), 35,8% dos astrócitos (138 células) e 43,5% das células da microglia (20 células) foram responsivas à aplicação de Zimosan (Fig. 19A). A média da intensidade dos sinais de Ca^{2+} induzidos pelo Zimosan foi diferente nos três fenótipos celulares, sendo significativamente mais forte em astrócitos e células da microglia, comparada aos neurônios, em análise feita por χ^2 . As médias dos valores da razão entre as leituras de comprimento de onda - $\Delta ratio [340/380 \text{ nm}]$ – foram de 0,13 para neurônios, 0,24 para astrócitos e 0,3 para as células da microglia (Fig. 19B).

Com relação à MnPO, quatro preparações distintas foram realizadas, e 290 neurônios, 163 astrócitos e 36 células da microglia foram analisadas (Fig. 19C e 19D). De todas essas células, 8 neurônios, 33 astrócitos e 16 células da microglia responderam à aplicação de Zimosan, com uma elevação pronunciada nas $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esses números correspondem a 2,8% dos neurônios, 20,2% dos astrócitos e 44,4% das células da microglia (Fig. 19C). A análise destes dados por χ^2 também demonstrou que, de maneira similar ao que ocorreu no OVLT, o número de astrócitos e células da microglia que responderam a aplicação de zimosan foi significativo na MnPO. Ainda, no caso da MnPO, uma porção significativamente maior de células da microglia responderam ao zimosan, comparativamente aos astrócitos. A intensidade média dos sinais de Ca^{2+} induzidos pelo Zimosan, para os três diferentes fenótipos celulares, foi muito similar. Os valores médios de $\Delta ratio [340/380 \text{ nm}]$, nesse caso, variaram entre 0,16 e 0,25 (Fig. 19D). A figura 16E mostra exemplos de traçados típicos de Ca^{2+} , registrados de um pequeno grupo de células da OVLT coradas com Fura2-AM, ilustrando assim atividades de dois astrócitos, duas células microgliais e dois neurônios, a uma aplicação *in bolus* de Zimosan. Esse PAMP induziu sinais de Ca^{2+} , e isso ocorreu segundos após a aplicação de Zimosan. Injeções *in bolus* de um volume equivalente de tampão não provocou efeito algum nas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, excluindo assim mecanismos não-

específicos de estimulação, em todas as células investigadas. Todos os neurônios não responsivos ao Zimosan responderam à perfusão de KCl, sendo assim considerado um teste de vitalidade para essas células.

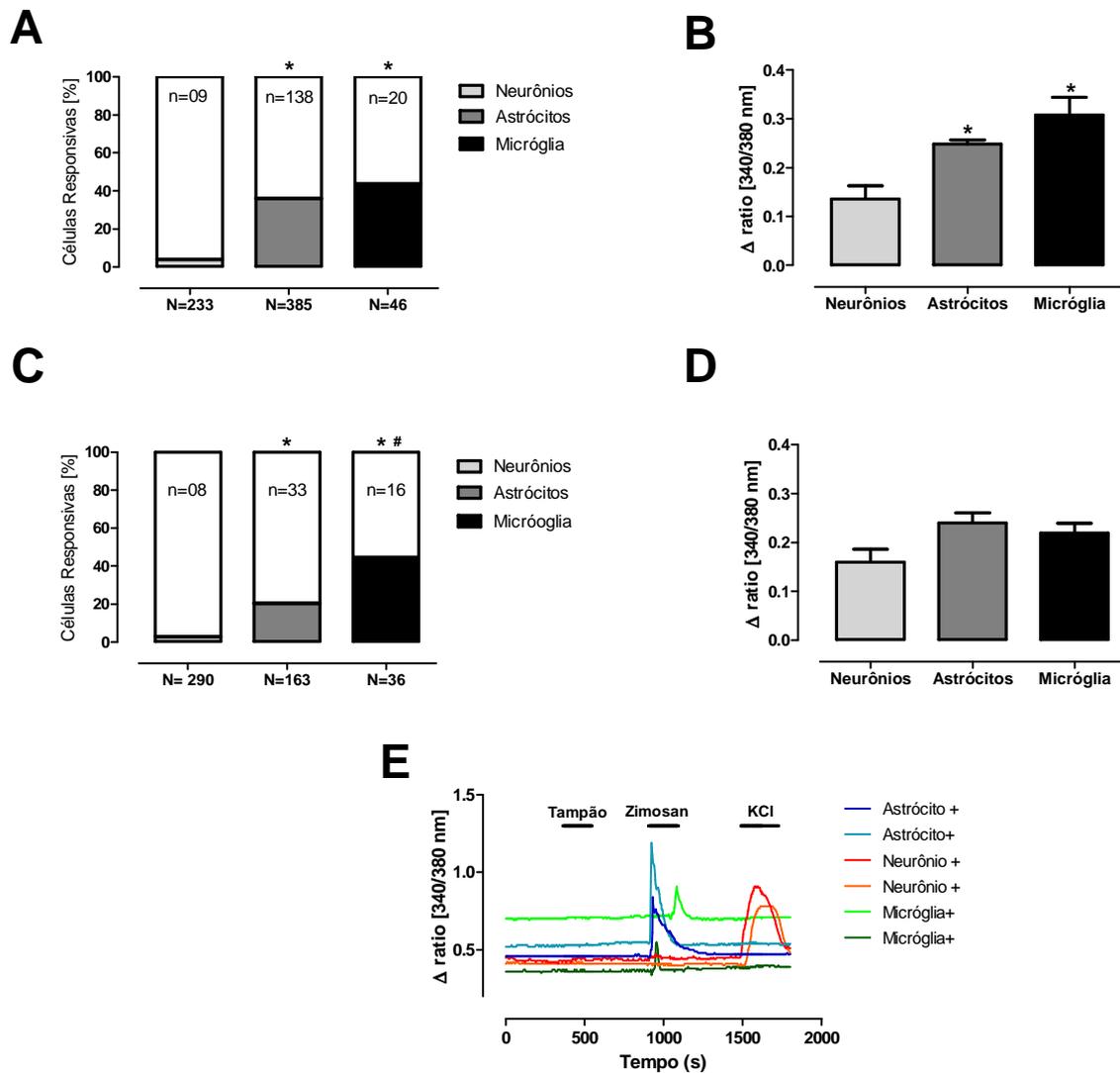


Figura 19. Respostas a uma aplicação de Zimosan em cultivo primário neuroglial de ratos. Os dados mostram a porcentagem de células da OVLT (Fig 19A) e MnPO (Fig 19C) responsivas ao Zimosan ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com uma elevação na concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). N, número de células testadas; n, número de células responsivas ao Zimosan. Os painéis B e D mostram os valores de variação da fluorescência (Δratio [340/380 nm]) como medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no OVLT e MnPO, respectivamente. As colunas representam a média \pm e.p.m. do Δratio para cada tipo celular. * $p \leq 0,05$, quando comparada com neurônios; # $p \leq 0,05$, quando comparada com astrócitos. O gráfico E mostra exemplos de traçados típicos registrados a partir de células da OVLT, ilustrando a responsividade de 6 células a uma aplicação única de zimosan ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e KCl. A intensidade da fluorescência Δratio [340/380 nm] é proporcional à $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

4.13 Concentrações de TNF α e IL-6 após estímulo *in bolus* de Zimosan em cultivos primários neurogliais na OVLT e MnPO

Adicionalmente, nós testamos a capacidade das células obtidas de OVLT e MnPO em liberar citocinas, em resposta a uma única estimulação com Zimosan. Após 240 min da aplicação de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Zimosan, um aumento na concentração de TNF- α foi observado nos sobrenadantes, tanto de OVLT quanto de MnPO, comparado aos microcultivos tratados com PBS (Fig. 20A). A concentração de TNF- α nos sobrenadantes de células da OVLT estimuladas com Zimosan foi aproximadamente duas vezes maior do que nas células da MnPO.

Ainda, níveis de IL-6 em sobrenadantes de células da OVLT e da MnPO, que foram estimuladas com Zimosan ou que receberam somente PBS, foram determinados, também 240 min após o estímulo. Podemos observar que o estímulo com Zimosan também aumentou os níveis de IL-6 em sobrenadantes de células provenientes da OVLT (Fig 20B). No que se diz respeito às células derivadas da MnPO, o aumento nos níveis desta citocina foi menor, comparado com a OVLT, e não estatisticamente significativo quando comprado ao grupo que recebeu PBS (Fig 20B).

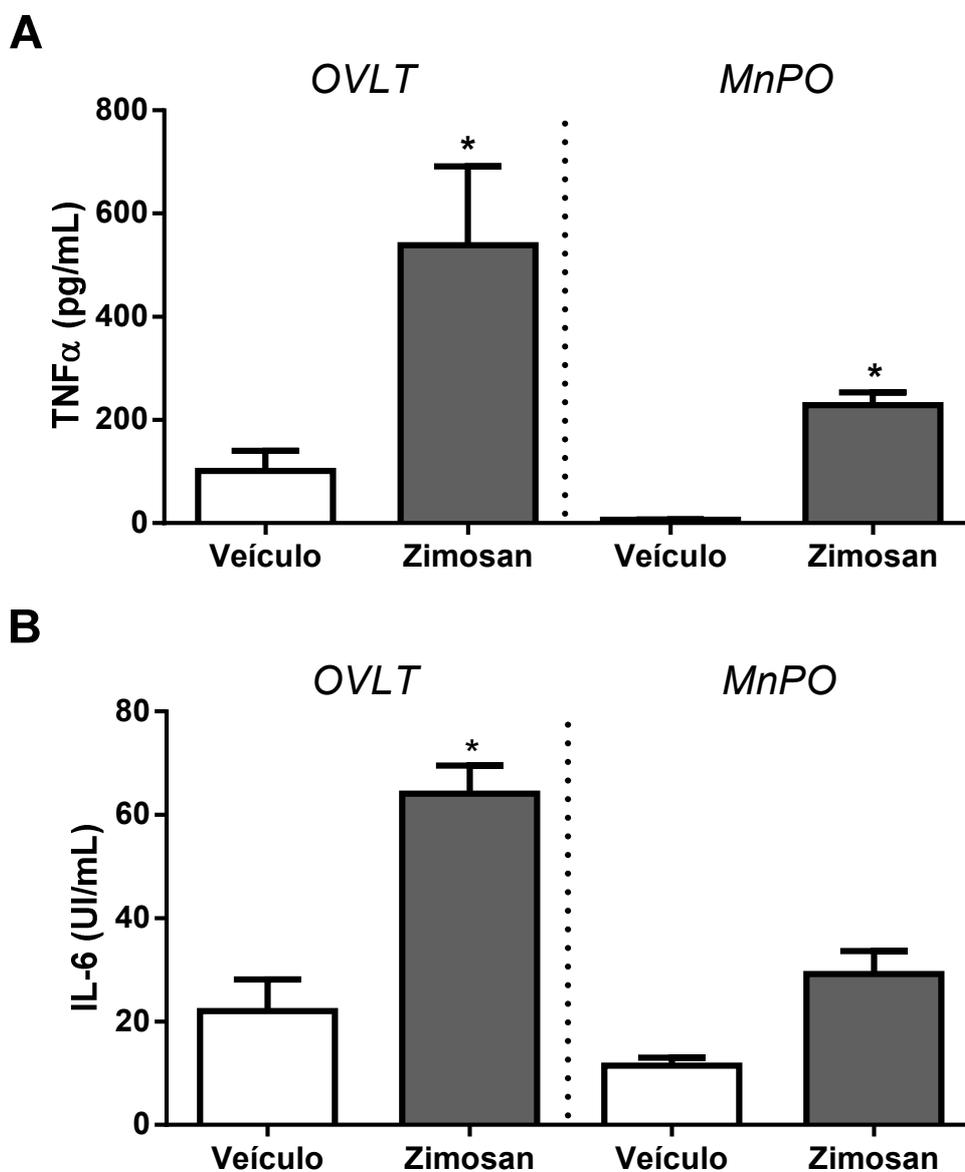


Figura 20. Liberação de TNF- α e IL-6 em células provenientes de OVLT ou MnPO estimuladas com Zimosan. Células provenientes da OVLT e MnPO (2-6 por grupo) foram estimuladas com Zimosan (100 μ g/mL) e os sobrenadantes coletados após 240 min. Os níveis de TNF α (Fig 20A) e IL-6 (Fig 20B) foram avaliados através de bioensaios. As colunas representam a média \pm e.p.m. dos níveis de citocinas em pg/mL ou UI/ml * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS.

4.14 Efeito da administração *in bolus* de Poli I:C sobre a concentração intracelular de cálcio em cultivos primários neurogliais na MnPO

Com relação aos experimentos *in vitro* utilizando o Poli I:C, nossos resultados são referentes apenas à região da MnPO, pois recentemente foi demonstrado que a aplicação deste PAMP, em células provenientes da OVLT, promoveu um aumento na sinalização de cálcio (OTT et al., 2012).

Assim, a partir de 04 diferentes preparações de células, obtivemos dados de 186 neurônios, 145 astrócitos e 22 células microgliais (Fig 21A). Destas, 08 neurônios, 06 astrócitos e 04 micróglia foram responsivos a uma aplicação de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Poli I:C, no que diz respeito a um aumento na sinalização de cálcio intracelular. Em porcentagem, esses valores correspondem a aproximadamente 4% dos neurônios e astrócitos, e 18% das células microgliais, e a análise por χ^2 demonstrou que a porcentagem de células da micróglia que foram responsivas foi significativamente maior, quando comparadas com neurônios e astrócitos. A média de Δ -ratio [340/380 nm] foi de 0,2 em todos os tipos celulares (Fig 21B). A Figura 21C demonstra exemplos de respostas à aplicação de Poli I:C e de KCL, nos três tipos celulares avaliados.

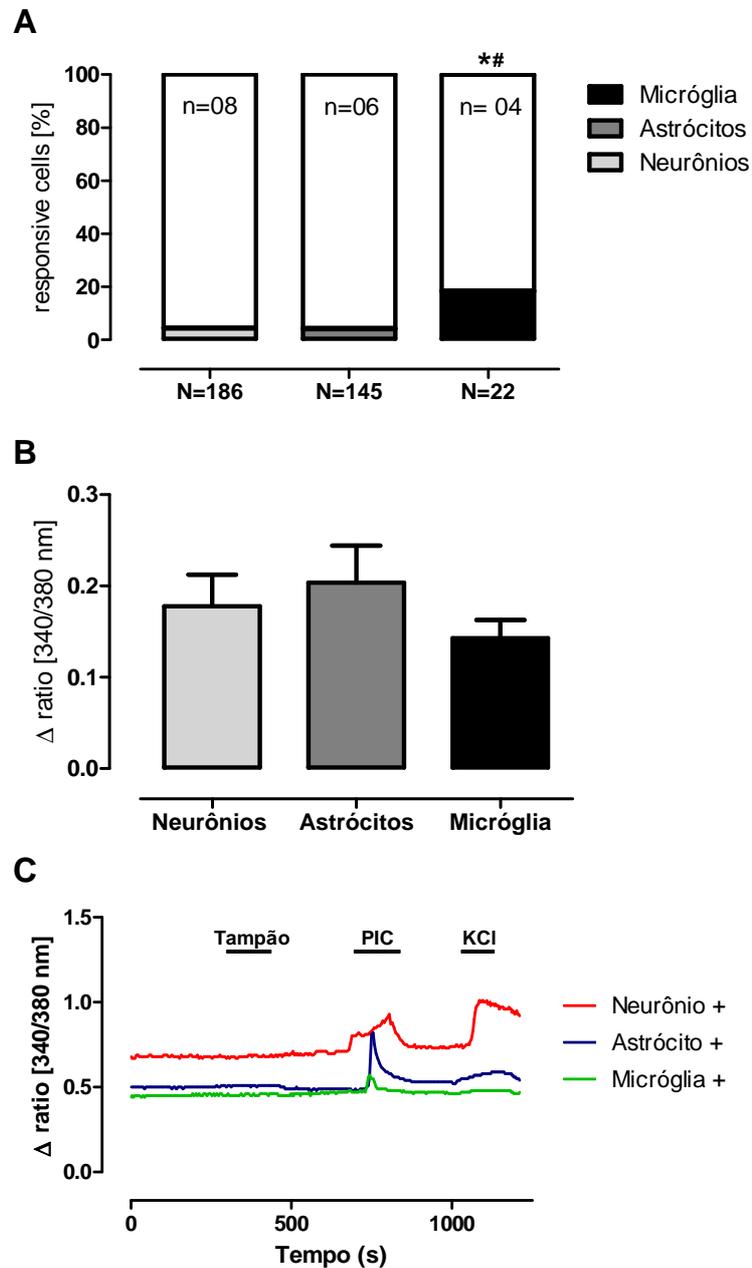


Figura 21. Respostas a uma aplicação de Poli I:C em cultivo primário neuroglial de ratos. O painel A mostra a porcentagem de células da MnPO responsivas ao PIC ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com uma elevação na concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). N, número de células testadas; n, número de células responsivas ao Poli I:C. O painel B mostra os valores de fluorescência de Δratio [340/380 nm] como medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. As colunas representam a média \pm e.p.m. das células responsivas para cada tipo celular. * $p \leq 0,05$, quando comparada com neurônios; # $p \leq 0,05$, quando comparada com astrócitos. O painel C mostra exemplos de traçados típicos registrados a partir de células da MnPO, ilustrando a responsividade de três células a uma aplicação única de Poli I:C ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A intensidade da fluorescência Δratio [340/380 nm] é proporcional à $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

5.DISSCUSSÃO

Os resultados desse estudo confirmaram que os dois PAMPs estudados, Zimosan e Poli I:C, induzem resposta febril quando administrados perifericamente a ratos. Em nossos experimentos, ainda foi possível verificar o envolvimento de alguns mediadores e compará-los com a resposta febril induzida pelo LPS. Constam na literatura informações a respeito da febre após injeção sistêmica dessas substâncias (FORTIER et al., 2004; HÜBSCHLE et al., 2007). Entretanto, não existem estudos sobre a participação de algumas citocinas nessas respostas febris através do uso de anticorpos ou antagonista por via central. O estudo da participação de outros mediadores centrais além das citocinas nessas respostas febris também é mostrado nesse trabalho de forma inédita.

Adicionalmente, obtivemos resultados envolvendo a indução de sinalizações de Ca^{+2} em células neurogliais de ratos, em duas áreas importantes relacionadas à termorregulação e indução de febre. Os dados referentes à aplicação de Zimosan nessas culturas vieram de cultivos de OVLT e MnPO. As atividades das citocinas TNF- α e IL-6 também foram analisadas após estímulo dessas células pelo Zimosan. Os estudos que utilizaram o Poli I:C para estimulação celular foram realizados somente em células provenientes da MnPO devido à existência de dados recentes na literatura envolvendo esse PAMP e a indução de sinalização de Ca^{+2} em células da OVLT, realizados pelo mesmo grupo de pesquisa (OTT et al., 2012).

5.1 Curvas de resposta febril induzidas pelo Zimosan e pelo Poli:I:C:

O Zimosan induziu resposta febril nas maiores doses utilizadas, porém não houve diferença estatística entre as doses de 3 e 10 mg/kg (Fig 3A). Por essa razão, os experimentos subsequentes foram conduzidos utilizando-se a menor dose que causou uma resposta febril significativa, comparada com o grupo veículo. No presente estudo não se observou hipotermia, como relatado por Li e colaboradores nas doses mais altas por eles usadas, que foram administradas por via i.v. em cobaias (LI et al., 2002). Ao contrário, uma proeminente resposta febril com pico de 1,5 °C, que durou 2 h, foi observada na dose de 3 mg/kg (Fig 3A). De forma semelhante aos resultados apresentados, Hübschle e colaboradores (2007), utilizando uma dose de 10 mg/kg em

ratos por via i.p., observaram uma resposta febril que durou 4 h, e relatam que, nesta dose, também não foi observada hipotermia nos animais (HÜBSCHLE et al., 2007). Em outro estudo, Kanashiro e colaboradores (2009) observaram que a administração intra-articular de 4 mg de Zimosan levou a uma resposta febril pronunciada e de longa duração, sendo essa dose utilizada como modelo de artrite induzida por Zimosan (KANASHIRO et al., 2009). Essas diferenças na intensidade e duração da febre podem estar relacionadas a espécies animais, via de administração e temperaturas ambientes nas quais os experimentos foram realizados.

Com relação ao Poli I:C, alguns estudos sobre este agonista de TLR3 foram encontrados na literatura. Para a escolha da dose a ser utilizada no presente estudo, baseamo-nos principalmente em trabalhos relacionados às alterações de temperatura e de comportamento de doença (*sickness behaviour*), e essas variavam entre 500 e 4000 µg/kg, por diferentes vias de administração (KATAFUCHI et al., 2003; FORTIER et al., 2004; VOSS et al., 2006, 2007; GANDHI et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2008; HOPWOOD et al., 2009). Os estudos que relatavam resposta febril foram os publicados por Fortier e colaboradores (2004) e Voss e colaboradores (2006, 2007), que utilizaram doses de 750 µg/kg i.p. em ratos e 500 µg/kg i.p. e i.a. (intra-articular) em cobaias, respectivamente. Os experimentos que relatam diminuição nas atividades, associadas à fadiga (frequentemente observada durante o comportamento de doença), relataram doses mais altas (em torno de 3 mg/kg) em ratos ou camundongos (KATAFUCHI et al., 2003; GANDHI et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2008; HOPWOOD et al., 2009).

Assim, os experimentos para determinação de uma curva dose-resposta iniciaram-se com doses i.p. de 300, 1000 e 3000 µg/kg. Todas estas doses induziram um aumento significativo da temperatura abdominal dos animais -comparados com os animais que receberam somente salina - e não apresentavam diferença estatística entre elas (dados das últimas doses não estão mostrados). Por conseguinte, a curva dose-resposta para a resposta febril foi repetida com doses menores, de 3 a 300 µg/kg. A dose de 3 µg/kg não aumentou significativamente a temperatura abdominal dos animais quando comparada aos animais que recebem veículo. Já a dose de 30 µg/kg apresentou alguns momentos de aumento significativo na temperatura corporal dos animais e a dose de 300 µg/kg manteve o padrão de aumento de temperatura corporal

que já havia sido observado. Essa dose foi escolhida para dar prosseguimento ao estudo. Desse modo, temos uma resposta febril que inicia 2 h após a injeção i.p. de Poli I:C, tem seu pico de aproximadamente 1,2 °C em 3 h, com valores de temperatura abdominal retornando aos basais por volta de 4 h (Fig 4A). Esse padrão de febre se manteve no seguimento do trabalho e é muito semelhante à febre induzida pelo Poli I:C em cobaias, por via i.p., na dose de 500 µg/kg (VOSS et al., 2006).

O LPS, na dose já estabelecida de 50 µg/kg, induziu uma resposta febril mais intensa e duradoura, como pode ser observado em várias figuras apresentadas (Fig. 5-7A; 10-11A; 13-15A). É possível que uma dose relativamente mais baixa do Poli I:C, como a utilizada neste estudo, poderia induzir uma resposta febril mais branda do que a observada para o LPS, o que poderia resultar em em possíveis diferenças com a resposta febril induzida por estes dois agentes. Hopwood e colaboradores, num intuito semelhante ao nosso, ao comparar a resposta viral do Poli I:C com a bacteriana do LPS, observaram fadiga e letargia mais brandos com o Poli I:C, mesmo em doses de 3 a 4 mg/kg i.p. (HOPWOOD et al., 2009). Esses dados, somados ao fato de não havermos tido uma diferença significativa na resposta febril com doses maiores de Poli I:C, sugerem que um aumento de dose possivelmente não afetaria os resultados obtidos com antagonistas e anticorpos, discutidos adiante, de forma significativa. E portanto, as doses escolhidas satisfazem o objetivo do presente trabalho no sentido de uma primeira análise comparativa destes estímulos. No entanto, é importante ter sempre em mente que, em doses superiores de qualquer dos estímulos (inclusive do LPS) diferentes mediadores poderiam estar envolvidos.

O LPS, de maneira similar ao presente estudo, também já foi utilizado como controle positivo, para comparação com agonistas TLR3, em um estudo a respeito da quebra da homeostasia em células endoteliais (SHIBAMIYA et al., 2009), além do já citado trabalho relacionando fadiga, letargia e febre com a utilização de Poli I:C e LPS (HOPWOOD et al., 2009).

Os resultados apresentados no presente trabalho também corroboram estudos prévios que mostraram que o aumento na temperatura corporal causado pelo Zimosan e pelo Poli I:C são de fato uma resposta febril. Os resultados obtidos demonstram que a injeção intraperitoneal desses PAMPs causou uma diminuição na temperatura da cauda

do animal, que precede o aumento na temperatura abdominal em alguns minutos, no caso do Zimosan (Fig. 3B), e que coincide com o aumento da temperatura abdominal no Poli I:C (Fig. 4B). Em ambos os casos ocorre uma redução do índice de perda de calor (Fig. 3C e 4C) sugerindo que a administração destes estímulos esteja ativando mecanismos de conservação de calor, tais como a vasoconstrição periférica. Este efeito do Zimosan também foi observado por Kanashiro e colaboradores (KANASHIRO et al., 2009). Além da vasoconstrição, o aumento na temperatura abdominal também está associado ao comportamento doença (*sickness behaviour*), o que também pode caracterizar uma resposta febril. A associação entre febre e comportamento-doença foi observada em estudos prévios com o Zimosan (HÜBSCHLE et al., 2007) e com o Poli I:C (KATAFUCHI et al., 2003; HOPWOOD et al., 2009). Em conjunto, esses resultados sugerem que ambos os estímulos, o Zimosan e o Poli I:C, são capazes de ativar mecanismos centrais de indução da febre.

5.2 Papel das citocinas nas respostas febris induzidas pelo Zimosan e pelo Poli I:C

O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que a resposta febril induzida pelo Zimosan foi reduzida pela administração central de anticorpos contra TNF- α e IL-6 e pelo IL1-RA, confirmando o envolvimento dessas três citocinas na resposta febril induzida por esse pirogênio. Nosso estudo demonstrou também de forma inédita que a resposta febril induzida pelo Poli I:C foi reduzida pelo tratamento dos animais com anticorpos contra as citocinas TNF- α e IL-6. A participação de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 na resposta febril induzida pelo LPS já tem sido reportado em grande número de estudos (LEMAY et al., 1990; ROTH et al., 1998; ROTH; SOUZA, DE, 2001).

Nossos resultados também apresentaram níveis de TNF- α e IL-6 aumentados nas amostras de plasma e IL-1 β no CSF dos animais que receberam LPS, reforçando a participação dessas citocinas na resposta febril induzida por esse PAMP.

Com relação ao TNF- α , a administração de Zimosan ou Poli I:C não resultou em um aumento significativo desta citocina 1 h após a administração do estímulo. No

entanto, esta citocina mostrou-se aumentada 1 h após a administração de LPS no plasma (Fig. 9A), estando estes dados de acordo com a literatura.

Um estudo relata aumento nos níveis desta citocina em modelo de artrite reumatoide induzida pelo Zimosan, em camundongos, no líquido sinovial da junção temporo-mandibular desses animais (CONTE et al., 2008). Em outro estudo, após a indução de hiperalgesia por Zimosan em ratos observou-se grandes quantidades de TNF- α , através de imunohistoquímica, na junção temporo-mandibular (CONCEIÇÃO-RIVANOR et al., 2014). Até o momento, não há dados correlacionando resposta febril induzida por este agente e aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α .

Já para o Poli I:C, Fortier e colaboradores encontraram um aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α 2 h após a administração desta substância. Porém, de maneira semelhante aos nossos resultados, os valores não foram significativos uma hora após a aplicação sistêmica deste estímulo (FORTIER et al., 2004). Outro estudo enfocou as mudanças na concentração de citocinas quando diferentes vias de administração foram usadas para aplicar o Poli I:C. Quando administrado via i.p. em cobaias, o Poli I:C induziu um pico menor e mais tardio de TNF- α , comparado com a administração via i.a. No caso desta citocina, o pico da administração i.p. foi também em 2 h (VOSS et al., 2006). Deste modo, é possível que o tempo utilizado para avaliação dos níveis plasmáticos e centrais de TNF- α no presente estudo tenha sido adequado para o LPS mas não para o Poli I:C ou para o Zimosan.

O anticorpo contra TNF- α , na dose utilizada nesse estudo, confirmou a participação desta citocina na resposta febril induzida pelo LPS. Estudos semelhantes já foram realizados com outros pirogênicos, porém normalmente a ferramenta farmacológica para avaliar a participação do TNF- α na resposta febril induzida por pirogênio era o receptor solúvel I de TNF- α (ROTH et al., 1998; SOARES et al., 2012). Como estávamos diante de uma molécula não antes utilizada para esse fim, calculamos a dose i.c.v. do anticorpo anti-TNF- α sendo dez vezes a dose de citocina que induz resposta febril (250 ng) (FRAGA et al., 2008), obtendo sucesso em nossos experimentos. Os resultados obtidos com o anticorpo anti-TNF- α na resposta febril induzida por Zimosan e Poli I:C demonstraram que este anticorpo reduziu de forma consistente a resposta febril do início até o final. Como não foi identificado TNF- α na

circulação ou no fluido cerebrospinal dos animais 1 h após a administração dos pirogênicos é possível que esta citocina seja liberada em tempos inferiores a 1 h, sendo portanto neutralizada pelo pré-tratamento com o anticorpo. Outra hipótese seria o fato do CSF ser um material que corresponde a todo o SNC, considerando a sua passagem por diferentes regiões de todo o sistema. Desse modo, a dosagem de citocinas a partir de tecido correspondente a regiões mais diretamente relacionadas à febre, como o hipotálamo, pode ser muito útil para confirmar esses dados. Assim, a confirmação destas suposições necessita de estudos mais detalhados.

No entanto, os dados obtidos com o anticorpo anti-TNF- α sugerem que, embora o período em que o TNF- α é liberado não esteja claro, sua participação na resposta febril induzida por estes pirogênicos foi confirmada.

Com relação a IL-1 β , embora os níveis desta citocina no CSF de animais submetidos à administração i.p. de Zimosan e Poli I:C estivessem aparentemente altos, estes não foram significativos e sugerem que 2 h também pode não ser o melhor tempo para detectar IL-1 β no plasma, após a injeção de Zimosan. Tampouco para o grupo Poli I:C. Assim como em nossos resultados, Fortier e colaboradores não obtiveram níveis significativamente aumentados de IL-1 β após a administração de Poli I:C. No entanto, a pré-administração sistêmica de IL-1RA diminuiu os níveis de IL-6 no plasma de animais submetidos à aplicação de Poli I:C, no tempo de 2 h (FORTIER et al., 2004), levando os autores a sugerir uma relação entre as duas citocinas, da qual estamos de acordo.

Já está bem estabelecida a capacidade do IL-1RA em atenuar a resposta febril induzida pela endotoxina bacteriana e a dose utilizada nesse estudo baseou-se em doses encontradas na literatura (FABRICIO et al., 2006). Em 2004, Fortier e colaboradores pré-trataram os animais com IL-1RA por via sistêmica, ao mesmo tempo ou 1 h após a administração periférica de Poli I:C e o resultado também foi uma atenuação da resposta febril (FORTIER et al., 2004). Portanto, com relação a IL-1 β , confirmamos a participação desta citocina na resposta febril induzida por Poli I:C. Uma vez que em nosso estudo o IL-1RA foi administrado i.c.v., sugerimos que a IL-1 β produzida periféricamente após a administração de Poli I:C é capaz de alcançar o SNC para induzir febre. Em 2007, Voss e colaboradores foram capazes de detectar a

presença de RNA mensageiro para IL-1 β no cérebro de cobaias submetidas à administração intra-arterial de Poli I:C, o que corrobora a presença dessa citocina também no SNC durante a resposta febril induzida por este PAMP (VOSS et al., 2006).

Com relação à IL-6 encontramos, no tempo escolhido para coleta, um aumento significativo dessa citocina no plasma dos animais submetidos apenas à administração de Zimosan, e não de Poli I:C. Voss e colaboradores observaram que esta citocina estava aumentada 2 h após as administrações de Poli I:C (VOSS et al., 2006). No trabalho já citado de Fortier e colegas, foram detectados valores cinco vezes maiores de IL-6 no plasma, 2 h após a administração do Poli I:C (FORTIER et al., 2004). No entanto, esses valores retornaram a níveis basais no tempo de 4 h. Portanto, é possível que em nosso estudo um perfil semelhante de retorno aos níveis baixos na terceira hora, tanto no plasma quanto no CSF tenha ocorrido. Neste sentido, o tempo de coleta de plasma utilizado em nosso estudo talvez não tenha sido o ideal para este estímulo.

Ainda com relação à IL-6, o estudo de Voss e colaboradores demonstraram a presença do STAT-3 no cérebro de cobaias, após a administração de Poli I:C (VOSS et al., 2007). A ativação desse fator de transcrição está relacionada não a uma ação direta do Poli I:C, mas sim à presença de alguma citocinas, principalmente a IL-6. Nosso estudo, portanto, confirma a importância da IL-6, ocorrendo particularmente no SNC, na resposta febril do Poli I:C sugerida anteriormente por Voss e colaboradores demonstrando a atenuação da resposta febril induzida pelo Poli I:C após o pré-tratamento dos animais com anticorpo anti IL-6 por via i.c.v.

Em relação à dose de anticorpo anti IL-6, a dose estabelecida foi de 10 μ g, intermediária entre a dose de 5 μ g já usada em experimentos de febre induzida pela citocina (SOARES et al., 2012) e de 15 μ g em experimentos de febre na sepse induzida por CLP (FIGUEIREDO et al., 2012). Portanto, os dados obtidos em nossos estudos confirmam estes dados anteriores.

É interessante observar que o anticorpo para TNF- α e o IL1-RA reduziram a primeira hora da resposta febril induzida pelo Zimosan, enquanto que o anti IL-6 bloqueou a última hora dessa resposta, sugerindo que as primeiras citocinas exercem maior importância para a indução dessa resposta febril, enquanto a IL-6 tem uma provável função de manter esta resposta. Já é relatado que as primeiras citocinas a

serem liberadas após a injeção de LPS são o TNF- α e a IL-1 β , enquanto que a IL-6 é liberada posteriormente (ROTH et al., 2009).

As amostras para avaliação dos níveis das três citocinas, após a administração dos PAMPs, foram coletadas em tempos baseados na resposta febril induzida pelo LPS e na cascata de citocinas ativada por esse estímulo (ROTH; SOUZA, DE, 2001). É importante observar que as respostas febris induzidas tanto pelo Zimosan quanto pelo Poli I:C apresentaram padrões distintos ao do LPS pois foram respostas febris de menor tempo de duração. Todas estas observações em conjunto nos sugerem que a liberação das citocinas, em especial do TNF- α e da IL-1 β , na resposta febril induzida por Zimosan e Poli I:C apresentam uma cinética distinta daquela induzida pelo LPS, porém não menos importante. Uma medida mais acurada, em diferentes tempos, poderia ser feita, a fim de determinar curso de liberação dessas citocinas no plasma e no CSF após a administração destes estímulos.

Com relação à ativação de STAT-3 pelo Poli I:C, é importante salientar que outra citocina cujo aumento de atividade estimula vias de transdução do tipo Jak/Stat é o IFN (SCHRODER et al., 2004). No caso da febre pelo IFN γ , o mecanismo para a indução da febre não está bem claro, uma vez que essa citocina inibe a PGE2 induzida por LPS e IL-1 β (DINARELLO, 2004). Won e colegas mostraram que o Poli I:C não foi capaz de estimular a síntese de IFN em células ou macerados de cérebro, obtidos de coelhos, sugerindo que essa citocina não estaria envolvida na resposta febril induzida por esse estímulo (WON et al., 1991). No entanto, ambos os IFN tipo I e II tem sido implicados na febre (HORI et al.; NAKASHIMA et al., 1987, 1988). Demonstramos claramente neste estudo que a administração central do anticorpo anti IFN γ aboliu a resposta febril induzida pelo agente viral sintético Poli I:C enfatizando assim, a importância dessa citocina e da continuidade do estudo do seu papel nesse processo. É possível que, além do IFN- γ , os IFN tipo I também participem da resposta febril induzida pelo Poli I:C uma vez que sua síntese está aumentada no cérebro após a injeção de Poli I:C (CUNNINGHAM et al., 2007).

O envolvimento de citocinas periféricas e centrais na manifestação de uma resposta febril induzida por vários estímulos tem sido mostrado extensivamente (ROTHWELL et al., 1991; GATTI; BARTFAI, 1993; LUHESHI et al., 1997; CARTMELL et

al., 2000; RUMMEL et al., 2006b; HARDEN et al., 2011). Entretanto, se os níveis aumentados de citocinas no SNC são decorrentes da entrada de citocinas advindas da corrente circulatória ainda uma questão extensivamente controversa. A hipótese mais tentadora sugere que essas citocinas agiriam nos vasos sanguíneos dos órgãos circumventriculares e induziriam mediadores centrais da febre (BLATTEIS, 1992). No entanto, tem sido sugerido que essas citocinas podem ser geradas no SNC, particularmente no hipotálamo e em áreas próximas, após injeção de LPS (VALLIÈRES; RIVEST, 1997; JACOBS et al., 1997; NADEAU; RIVEST, 1999).

No presente estudo, os anticorpos e o IL-1RA foram injetados diretamente no SNC. Um efeito periférico do IL-1RA injetado centralmente parece improvável, porque as doses necessárias de IL-1RA administradas por via i.p. para reduzir a febre induzida por LPS são de 600 a 1000 vezes maiores do que a dose utilizada neste estudo (SMITH; KLUGER, 1992; MILLER et al., 1997). Para IL-6 e TNF- α , não há estudos a respeito dos efeitos de anticorpos purificados que foram administrados periféricamente na febre. Anticorpos Anti TNF α e Anti IL-6 em doses de 20 a 800 vezes maiores que as utilizadas em nosso estudo foram necessárias para bloquear a atividade dessas citocinas em outras condições inflamatórias (PAUL et al., 2003; SAUD et al., 2005; RODERFELD et al., 2006). Além disso, a dose de Anti-IL-6, como já comentado, foi baseada em estudos prévios que também sugeriam um efeito central dos anticorpos (SOARES et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2012).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 presentes no SNC, assim como na resposta febril induzida por LPS, participam da resposta febril induzida por Zimosan e Poli I:C. Em adição, no caso da resposta febril induzida por Poli I:C, a participação central de INF- γ também é crucial. A origem precisa dessas citocinas não pode ser identificada através do método experimental que foi utilizado nesse estudo, mas nossos dados sugerem ainda a possibilidade de que a cinética de liberação destas citocinas, considerando-se as doses utilizadas, podem diferir entre o LPS, o Zimosan e o Poli I:C. Para confirmar essa hipótese, futuros estudos poderão ser realizados, administrando os anticorpos ou antagonista em diferentes tempos, antes ou após o estímulo pirogênico, evidenciando essas possíveis diferenças cinéticas. Complementando, as funções específicas de outras citocinas, tais

como o MIP-1 α e o CINC-1, poderão ser alvo de futuros estudos, tanto para o Poli I:C quanto para o Zimosan.

5.3 Papel das Prostaglandinas e de outros mediadores centrais na resposta febril induzida por Zimosan e Poli I:C.

Com base nos nossos resultados de citocinas e na capacidade de algumas destas proteínas em ativar a síntese de prostanóides, foi possível prever que as respostas febris induzidas pelos dois PAMPs em estudo seriam dependentes da produção da prostaglandinas. De fato, não somente a resposta febril induzida por esses agentes foi atenuada ou até abolida pelo pré-tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais, seletivos ou não para COX-2, quanto pudemos observar o aumento dos níveis de PGE₂ após o estímulo pirogênico e a atenuação desses níveis quando de um pré-tratamento antiinflamatório não-esteroidal.

Neste sentido, nossos estudos confirmam publicações anteriores. Apesar dos dados referentes ao Zimosan serem bastante escassos, a atenuação de sinais clínicos presentes no modelo de artrite induzida pelo Zimosan, quando da administração de indometacina, já foi reportada (GEGOUT et al., 1995). Além disso, Kanashiro e colaboradores observaram que a resposta febril induzida por esse agente por via intra-articular (i.a.) foi bloqueada por diferentes inibidores de COX (KANASHIRO et al., 2009). Esses autores também observaram níveis significativos de PGE₂ no CSF (e não no plasma) de ratos submetidos ao modelo de artrite, durante a resposta febril, sugerindo a liberação central desse prostanóide

Com relação ao Poli I:C, Voss e colaboradores verificaram uma atenuação da resposta febril induzida por essa substância após o tratamento dos animais com inibidores da síntese de prostaglandinas. Esses mesmos autores realizaram experimentos de hibridização *in situ*, onde verificaram um aumento na expressão da enzima COX-2 em tecidos cerebrais de animais submetidos ao tratamento com Poli I:C (VOSS et al., 2007).

Algumas citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 também são conhecidas por induzir a síntese de COX-2 na vasculatura cerebral e conseqüentemente, a síntese de PGs, que são importantes na indução da febre (CAO et al., 1996, 1998). Tendo como base os nossos resultados, parece plausível que a resposta febril induzida pelo Poli I:C dependa da síntese de PGs. De fato, muitos estudos observaram que a resposta febril induzida pelo Poli I:C foi bloqueada por diferentes inibidores de COX (DAVIDSON et al., 2001; VOSS et al., 2007; YAMATO et al., 2014). Também foi demonstrado que o Poli I:C aumenta os níveis circulantes de PGE₂ imunorreativa (MILTON et al., 1993). Mais tarde, Davidson e colaboradores mostraram que aumentos dos níveis de PGE₂ no plasma e CSF ocorreram em paralelo ao aumento da temperatura corporal, após injeção intravenosa de Poli I:C em coelhos (DAVIDSON et al., 2001).

O nosso estudo dá suporte a esses estudos prévios, demonstrando que as respostas febris induzidas tanto pelo Zimosan e pelo Poli I:C em ratos também são bloqueadas por inibidores de COX, inclusive o inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe. Somado a esse fato, um aumento nos níveis centrais de PGE₂ 3 h após a administração destes estímulos foi observada, e esses aumentos, de maneira semelhante com o que ocorreu nas respostas febris, foram reduzidos pelo tratamento dos animais com indometacina.

Além das prostaglandinas, foi demonstrado que os opióides endógenos, a ET-1 e a substância P podem também participar da resposta febril induzida pelo LPS (FABRICIO et al., 1998; FRAGA et al., 2008; REIS et al., 2011).

Nesse estudo, demonstramos que a resposta febril induzida pelo Zimosan e também pelo Poli I:C são também dependentes da liberação central de opioides endógenos. Embora nenhum estudo que demonstre que Zimosan ou Poli I:C podem induzir a síntese ou liberação de opioides endógenos no SNC tenha sido identificado, a participação desses mediadores nessas respostas febris não é surpreendente, uma vez que a resposta febril induzida por TNF- α e IL-6 pode ser bloqueada pelo tratamento dos animais com CTAP e portanto depende da liberação desses peptídeos (FRAGA et al., 2008). Em modelo de hiperalgesia por artrite reumatóide induzido por Zimosan, a administração i.a. do antagonista opioide naloxona não foi capaz de reduzir a hiperalgesia (CONCEIÇÃO-RIVANOR et al., 2014), nos levando a supor que a ação

opioide promovida pelo Zimosan está restrita ao seu papel como mediador central da resposta febril.

Por outro lado, a resposta febril induzida pelo Zimosan demonstrou ser dependente também de endotelina-1. Em 2008, Conte e colegas verificaram que o acúmulo neutrofílico e a formação de edema na artite induzida pelo Zimosan, em camundongos, poderiam ser amenizados com o pré-tratamento local dos antagonistas de receptores de ET (o não seletivo bosentan, o antagonista ETA BQ123 e o antagonista ETB BQ788) (CONTE et al., 2008), demonstrando que o Zimosan pode também promover efeitos periféricos modulados por endotelinas.

A resposta febril induzida pelo Zimosan também foi dependente da liberação de substância P. Nosso estudo é o primeiro em associar a resposta febril induzida por esse PAMP e a substância P. Porém, encontramos um estudo que envolve a participação desta taucicnina no modelo de inflamação intestinal aguda por Zimosan em ratos (LANDAU et al., 2007). Esses autores utilizaram o antagonista de receptores NK1 CP-96.345 ou um oligonucleotídeo antisense direcionado ao RNA mensageiro desse mesmo receptor, e verificaram atenuação de sinais inflamatórios intestinais decorrentes da aplicação de Zimosan diretamente no cólon. Além disso, observaram internalização de receptores NK1 (sinal de liberação de substância P) na medula espinal desses animais, apenas nos indivíduos ausentes de qualquer tratamento, verificando a importância da substância P na manifestação da doença inflamatória intestinal induzida pelo Zimosan. Em nosso estudo, demonstramos a sua participação como mediador central da resposta febril com esse agente.

Surpreendentemente, a resposta febril induzida pelo Poli I:C não depende da síntese ou liberação de endotelinas ou substância P. Farina e colaboradores demonstraram recentemente que o Poli I:C pode induzir ET-1 e outros marcadores de ativação vascular em células endoteliais e fibroblastos (FARINA et al., 2011). Além disso, o Poli I:C também induziu a liberação de ET-1 por células da musculatura lisa arterial pulmonar (GEORGE et al., 2012). Em adição, foi também demonstrado que o Poli I:C pode regular positivamente a síntese de ET-1 em células endoteliais microvasculares da derme (LENNA et al., 2013). Apesar disso, não há evidências de que o Poli I:C pode gerar ET-1 no sistema nervoso central. Níveis plasmáticos

aumentados de ET-1 foram também detectados após a administração de IL-1 β e TNF- α (VEMULAPALLI et al., 1994; KLEMM et al., 1995), citocinas que, como demonstrado no presente estudo, participam da resposta febril induzida pelo Poli I:C. Entretanto, a ET-1 não participa da resposta febril induzida por essas citocinas (FABRICIO et al., 1998, 2006). Dessa maneira parece que, embora o Poli I:C e as citocinas geradas após a sua administração (IL-1 β e TNF- α) possam potencialmente induzir ET-1, esse peptídeo não parece ser importante para a resposta febril induzida por este estímulo.

Um contexto similar pode ser observado com a Substância P. Embora a presença desta taquicinina e seu precursor preprotaquicinina A no hipotálamo já seja conhecida (GAUTREAU; KERDELHUÉ, 1998; HURD et al., 1999), não há estudos que demonstrem que o Poli I:C induz a liberação de substância P no cérebro. Demonstramos neste estudo que a resposta febril induzida pelo Poli I:C é dependente de IL-1 β . Existem algumas evidências de que a IL-1 β induz a liberação de substância P de células da medula espinal, neurônios aferentes primários e neurônios sensoriais adultos do corno dorsal da medula (MALCANGIO et al., 1996; INOUE et al., 1999; SKOFF et al., 2009). No entanto, estudos prévios demonstraram que a febre induzida por IL-1 β não depende da ativação de receptores NK1 (REIS et al., 2011).

Deste modo, os resultados obtidos demonstram que a resposta febril induzida pelo Zimosan possui mais semelhanças com a do LPS, no que diz respeito aos seus mediadores centrais. Já o Poli I:C apresenta algumas diferenças. Não nos surpreende que a resposta febril induzida por um agonista de TLR2, localizado na membrana celular, seja mais similar ao conhecido modelo utilizando o LPS, um agonista TLR4, também localizado na membrana. A intensidade de sinais poderia apresentar as suas particularidades, porém as vias ativadas seriam mais semelhantes nesse caso, quando comparadas com o Poli I:C, um agonista de TLR3, receptor intracitoplasmático e que usa primariamente a via TRIF de transdução de sinais (PIRAS; SELVARAJOO, 2014). Por essa perspectiva, também se pode justificar a ausência da participação de alguns mediadores como endotelina e substância P na resposta febril induzida pelo Poli I:C. A participação de outros mediadores, como o CRF e endocanabinoides, requerem futuras investigações.

5.4 Responsividade de células neurogлияis de ratos ao Zimosan e ao Poli I:C

A OVLT e a MnPO são áreas hipotalâmicas importantes, que se conectam, e estão relacionadas à resposta febril (BLATTEIS, 1992; RUMMEL et al., 2006; YOSHIDA et al., 2009; HATZELMANN et al., 2013). A OVLT possui uma BHE mais permeável, recebendo assim mais informações de áreas periféricas do corpo, e enviando sinais a áreas próximas, como a MnPO (OTT et al., 2010, 2012). Além disso, a expressão de TLR2 e TLR6 foi reportada em células endoteliais do SNC, e a administração do agonista destes receptores, o Zimosan, aumentou ainda mais a permeabilidade dos vasos (NAGYOSZI et al., 2010). Ainda, o Zimosan administrado diretamente na OVLT potenciou a resposta febril induzida por pirogênio endógeno (STITT; SHIMADA, 1989). Reunidos, esses estudos sugerem que o Zimosan poderia também apresentar um efeito direto no SNC, particularmente em áreas relacionadas à febre.

Em microcultivos neurogлияis primários, identificamos um número substancial de células da OVLT e da MnPO responsivas a uma única aplicação de Zimosan. Esse fenômeno foi observado principalmente em astrócitos e células da micróglia, quando comparados com neurônios, em ambas as áreas analisadas. Outra observação dos nossos resultados foi que os valores da razão entre as leituras de comprimento de onda, Δ ratio [340/380 nm], foram significativamente diferentes entre os fenótipos celulares responsivos ao Zimosan em microculturas da OVLT, porém não da MnPO. As respostas em astrócitos e células da micróglia foram mais expressivas do que em neurônios. Esse fato pode estar associado com as funções específicas das células gлияis e a expressão de TLR2/TLR6 na micróglia, e TLR2 e em astrócitos (BSIBSI et al., 2002; OLSON; MILLER, 2004; KIELIAN, 2006). Essas questões, em complementação aos nossos resultados, sugerem que, mesmo que as respostas de cálcio tenham sido observadas de forma separada na OVLT e na MnPO, as respostas induzidas pelo zimosan na OVLT poderiam ser transmitidas para a MnPO. Nas duas regiões, um aumento rápido de cálcio intracelular (poucos segundos), seguido de um lento decréscimo de aproximadamente 2 min foi observado na maioria das células responsivas, o que sugere um efeito direto desse PAMP nessas células. Para a estimulação de culturas da OVLT pelo LPS, quatro padrões distintos de sinalização de

cálcio foram descritos (OTT et al., 2010). O Zimosan exibiu um padrão de sinalização de cálcio similar a uma resposta aguda de curto prazo pelo LPS.

De forma semelhante, obtivemos resultados em cultivos neurogliais de MnPO, com células responsivas a uma aplicação in bolus de Poli I:C. Esses resultados vieram a complementar estudos anteriores, em que microculturas de OVLT e AP foram estimuladas com aplicações semelhantes desse estímulo (OTT et al., 2012). Nesse estudo, os sobrenadantes das microculturas estimuladas também foram submetidos a análises de citocinas, e a aplicação de Poli I:C aumentou o nível do TNF- α e da IL-6 nas duas áreas que foram estudadas. Nossos resultados dizem respeito a um número de células dos três fenótipos avaliados que foram responsivas ao Poli I:C. A presença do receptor TLR3 em astrócitos e células da glia já é documentada (BSIBSI et al., 2002; FARINA et al., 2005). A proporção de células responsivas foi menor na MnPO comparada com as áreas que possuem a BHE mais permeável, indicando que parte da informação nos órgãos circunventriculares avaliados pode estar sendo levada para a MnPO. Esse fato pode ser particularmente importante em viroses que atingem o SNC, em que o RNA de cadeia dupla possa estar sendo produzido durante a replicação viral.

Uma das consequências da estimulação dos TLRs no SNC com ativação de células da glia é a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas (BSIBSI et al., 2002; OLSON; MILLER, 2004). Observamos níveis aumentados das citocinas proinflamatórias TNF- α e IL-6 nas microculturas de OVLT e MnPO após a estimulação com o Zimosan, nas mesmas concentrações que promoveram aumento na concentração de cálcio intracelular. Investigações semelhantes foram realizadas previamente com LPS, na OVLT e AP (WUCHERT et al., 2008; OTT et al., 2010).

Mesmo que não possamos afirmar que a concentração utilizada para estimular as células de microcultura seja proporcional a um estímulo pirogênico periférico, podemos presumir uma associação entre a resposta febril observada em ratos, com bloqueio parcial quando os anticorpos e o IL-1RA foram administrados. Embora não tenhamos avaliado essa questão, é possível que níveis aumentados de IL-1 β em microculturas também estejam presentes, considerando que as células da micróglia, as mais estimuladas em nossos experimentos, são importantes fontes de ativação de IL-1 β (DANTZER, 2001). É também possível que a geração dessas citocinas dentro do SNC

pelo Zimosan forneça uma explicação para o efeito do Zimosan na resposta febril observada por Stitt e Shimada (STITT; SHIMADA, 1989). Essas citocinas são conhecidas em induzir COX-2 na vasculatura cerebral e, em consequência, a síntese de prostaglandinas, essenciais para a indução de febre (CAO et al., 1996, 1998).

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que a resposta febril induzida pelo Zimosan é pelo menos em parte dependente da ação central de citocinas como TNF- α e IL-6, e possivelmente IL-1 β . Essas citocinas, por sua vez, levam a ativação de mediadores centrais como a Prostaglandina E2, Endotelina-1, Peptídeos Opióides Endógenos e Substância P. Essa resposta febril pode também estar associada com a ativação direta do Zimosan de importantes áreas relacionadas à febre e comportamento doença, como a OVLT e a MnPO. Considerando os mediadores avaliados, a resposta febril induzida por Zimosan envolve os mesmos mediadores embora diferenças quantitativa e temporais de produção possam existir. Esses resultados são úteis para estabelecer um modelo de resposta febril induzida por componente fúngico, que pode nos permitir estudar mecanismos patológicos e buscar alvos terapêuticos.

Paralelamente, nosso trabalho estudou um modelo de indução de resposta febril por vírus, através do uso do RNA de cadeia dupla sintético Poli I:C. Embora mais elucidado, o mecanismo envolvido na resposta febril do Poli I:C ainda não está completamente desvendado. Nosso trabalho confirmou a dependência desta resposta de citocinas pró-inflamatórias clássicas, particularmente IL-1 β , TNF- α e IL-6, e ainda de INF- γ , bem como a participação de prostaglandinas e do sistema opioide. Surpreendentemente, nossos dados sugerem que endotelina e substância P não estão envolvidas na resposta febril induzida por essa substância. Comparativamente à resposta febril induzida por LPS e Zimosan, a resposta febril induzida por Poli (I:C) compartilha alguns mediadores, mas não todos.

Conhecendo os mediadores envolvidos, seria importante fazer uma análise temporal mais detalhada da produção destes mediadores.

A figura 22 sumariza os resultados obtidos neste estudo e os compara a dados na literatura.

| PIROGÊNIO EXÓGENO | | |
|--|--|--|
| LPS | Zimosan | Poli I:C |
| CITOCINA PIROGÊNICA | | |
| TNF- α , IL-6 e IL-1 β | TNF- α^* , IL-6* e IL-1 β^* | TNF- α^* , IL-6*, IL-1 β^* e IFN γ |
| *Com possíveis diferenças na cinética de liberação, comparando ao LPS. | | |
| MEDIADOR CENTRAL | | |
| Prostaglandina E2, Endotelina-1, Peptídeos Opioides Endógenos e Substância P | Prostaglandina E2, Endotelina-1, Peptídeos Opioides Endógenos e Substância P | Prostaglandina E2 e Peptídeos Opioides Endógenos |
| ÁREAS CEREBRAIS | | |
| ----- | OVLT e MnPO | MnPO |
| MODELO DE RESPOSTA FEBRIL | | |
| BACTERIANA | FÚNGICA | VIRAL |

Figura 22: Resumo dos resultados obtidos. Diferentes experimentos investigaram a participação de algumas citocinas pirogênicas e mediadores centrais, após a administração intraperitoneal dos pirogênios exógenos LPS (50 μ g/kg), Zimosan (3 mg/kg) ou Poli I:C (300 μ g/kg) em ratos. Adicionalmente, a estimulação de células de cultivo primário neuroglial de ratos com Zimosan ou Poli I:C na concentração de 100 μ g/mL foi também investigada. Os resultados obtidos contribuem na validação de modelos animais relacionados à resposta febril induzida por agentes bacterianos, fúngicos ou virais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, J. **The Innate Immune Response.** *Nature*, v. 406, p. 782–787, 2000.
- AKIRA, S.; SATO, S. **Toll-like receptors and their signaling mechanisms.** *Scandinavian journal of infectious diseases*, v. 35, n. 9, p. 555–62, 2003.
- ALEXANDER, S. P. H.; BENSON, H. E.; FACCENDA, E.; et al. **The Concise Guide to Pharmacology 2013/14 : G Protein-Coupled Receptors.** *British journal of pharmacology*, p. 1459–1581, 2013.
- ANDREAKOS, E.; SACRE, S. M.; SMITH, C.; et al. **Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP.** *Blood*, v. 103, n. 6, p. 2229–37, 2004.
- ANWAR, M. A.; BASITH, S.; CHOI, S. **Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling.** *Experimental & molecular medicine*, v. 45, n. 2, p. e11, 2013.
- ATKINS, E. **Fever: its history, cause, and function.** *The Yale journal of biology and medicine*, v. 55, n. 3-4, p. 283–9, 1982.
- BALK, R. A. **Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today?** *Virulence*, v. 5, n. 1, p. 20–6, 2014.
- BANKS, A.; ORTIZ, L.; PLOTKIN, S. A.; KASTIN, A. J. **Human Interleukin (IL) 1a , Murine IL-1a and Murine IL-1f1 Are Transported from Blood to Brain in the Mouse by a Shared Saturable Mechanism.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 259, p. 988–996, 1991.
- BANKS, W. A.; FARR, S. A.; MORLEY, J. E. **Entry of Blood-Borne Cytokines into the Central Nervous System : Effects on Cognitive Processes.** *Neuroimmunomodulation*, v. 10, p. 319–327, 2003.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; GUTIERREZ, E. G. **Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier.** *Neuroscience Letters*, v. 179, p. 53–56, 1994.
- BARTFAI, T.; CONTI, B. **Fever.** *Scientific World Journal*, v. 10, p. 490–503, 2011.
- BARTON, M.; YANAGISAWA, M. **Endothelin: 20 years from discovery to therapy.** *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 86, n. 8, p. 485–98, 2008.
- BENAMAR, K.; XIN, L.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. **Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a mu-opioid receptor-selective antagonist in rats.** *European journal of pharmacology*, v. 401, n. 2, p. 161–5, 2000.
- BEUTLER, B. A. **TLRs and innate immunity.** *Blood*, v. 113, n. 7, p. 1399–1407, 2009.
- BICEGO, K. C.; BRANCO, L. G. S. **Discrete electrolytic lesion of the preoptic area prevents LPS-induced behavioral fever in toads.** *The Journal of experimental biology*, v. 205, n. Pt 22, p. 3513–8, 2002.

BLATTEIS, C.M.; I, X. L.; NING, Q. **Neuromodulation of Fever: Apparent Involvement of Opioids.** *Brain Research Bulletin*, v. 26, p. 219–223, 1991.

BLATTEIS, C. M. **Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens.** *Progress in brain research*, v. 91, p. 409–12, 1992.

BLATTEIS, C. M.; LI, S.; LI, Z.; FELEDER, C.; PERLIK, V. **Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment.** *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 76, n. 1-4, p. 1–18, 2005.

BLATTEIS, C. M.; XIN, L.; QUAN, N. **Neuromodulation of fever. A possible role for substance P.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 741, p. 162–73, 1994.

BOLTAÑA, S.; REY, S.; ROHER, N.; et al. **Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 280(1766), p. 2013138, 2013.

BOULANT, J. A. **Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 856, p. 108–15, 1998.

BOULANT, J. A. **Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation.** *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), v. 100, n. 4, p. 1347–54, 2006.

BRITO, H. O. **Participação Taquicininérgica Via Receptores NK1 na Resposta Febril Induzida por Pirogênios Endógenos.** Universidade Federal do Paraná, 2011.

BROZ, P.; MONACK, D. M. **Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens.** *Nature reviews. Immunology*, v. 13, n. 8, p. 551–65, 2013.

BSIBSI, M.; RAVID, R.; GVERIC, D.; VAN NOORT, J.M. **Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* v.61, p. 1013-1021, 2002.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; SHIRAKAWA, N.; et al. **Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors.** *European Journal of Neurosciences*, v. 13, n. March, p. 1781–1790, 2001.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. **Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever.** *Brain research*, v. 733, p. 263–272, 1996.

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

CARTMELL, T.; MITCHELL, D. **The molecular basis of fever.** *Handbook of Stress and the Brain*, v. 15, p. 193–227, 2005.

CARTMELL, T.; POOLE, S.; TURNBULL, A. V.; ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. **Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats.** *The Journal of physiology*, v. 526 Pt 3, p. 653–61, 2000.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; BARTFAI, T. **Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice.** *The Journal of experimental medicine*, v. 183, n. 1, p. 311–6, 1996.

CHEN, G.; GOEDEL, D. V. **TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.** *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1634–5, 2002.

CHEN, J.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. **Molecular profiling of T-helper immune genes during dengue virus infection.** *Virology journal*, v. 5, p. 165, 2008.

CLIFFER, K. D.; BURSTEIN, R.; GIESLER, G. J. **Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinoencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 11, n. 3, p. 852–68, 1991.

COELHO, M. M.; PELÁ, I. R.; ROTHWELL, N. J. **Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F2 alpha, but not prostaglandin E2.** *European journal of pharmacology*, v. 238, n. 2-3, p. 391–4, 1993.

COLLISTER, J.P.; OLSON, M.K.; NAHEY, D.B.; VIEIRA, A.A.; OSBORN, J.W. **OVLT lesion decreases basal arterial pressure and the chronic hypertensive response to AngII in rats on a high-salt diet.** *Physiological reports*, v. 1, n. e00128, 2013.

CONCEIÇÃO-RIVANOR, R.L.; CHAVES, H.V.; VAL, D.R.; de FREITAS, A.R.; LEMOS, J.C.; RODRIGUES, J.A.; PEREIRA, K.M.; DE ARAÚJO, I.W.; BEZERRA, M.M.; BENEVIDES, N.M. **A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hypernociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis.** *International Immunopharmacology* v.21, n.1,p.34-43, 2014.

CONTE, F.P.; BERJA-FIDALGO, C.; VERRI, W.A.; CUNHA, F.Q.; RAE, G.A.; PENIDO, C.; et al. **Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF- α , and CXCL-1.** *Journal of Leukocyte Biology*. v.84, p.652–660, 2008.

CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. **Cytokines and Fever.** *Frontiers in bioscience*, v. 6, p. 1433–1449, 2004.

CUNNINGHAM, C.; CAMPION, S.; TEELING, J.; FELTON, J.; PERRY, V.H. **The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C).** *Brain, Behavior, and Immunity* v.21, p.490-502, 2007.

DANTZER, R. **Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications.** *Annals of the New York Academy of Sciences* v.933, p. 222-234, 2001.

DAVIDSON, J.; ABUL, H.T.; MILTON, A.S.; ROTONDO, D. **Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain.** *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* v. 442, p. 526-533, 2001.

- DEJONG, H. K.; POLL, T. VAN DER; WIERSINGA, W. J. **The systemic pro-inflammatory response in sepsis.** *Journal of innate immunity*, v. 2, n. 5, p. 422–30, 2010.
- DEESON, S.E.; FERGUSON, A.V. **Interleukin-1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance.** *Journal of Physiology*, v. 550, p. 113–22., 2003.
- DICARLO, F.; FIORE, J. **On the composition of zymosan.** *Science*, v. 127, p. 756–757, 1958.
- DIMOPOULOS, G.; ANTONOPOULOU, A.; ARMAGANIDIS, A.; VINCENT, J. **How to select an antifungal agent in critically ill patients.** *Journal of Critical Care*, v. 28, n. 5, p. 717–727, 2013.
- DINARELLO, C. **Review: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed.** *Journal of Endotoxin Research*, v. 10, n. 4, p. 200–222, 2004a.
- DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; et al. **Tumor Necrosis Factor (Cachectin) is an Endogenous Pyrogen and induces Production of Interleukin 1.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 163, n. June, p. 1433–1450, 1986.
- DOUKAS, J.; CUTLER, A H.; MORDES, J. P. **Polyinosinic:polycytidylic acid is a potent activator of endothelial cells.** *The American journal of pathology*, v. 145, n. 1, p. 137–47, 1994.
- DRGONA, L.; KHACHATRYAN, A; STEPHENS, J.; et al. **Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of Aspergillus and Candida species.** *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 7–21, 2014.
- ELMQUIST, J. K.; BREDER, C. D.; SHERIN, J. E.; et al. **Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages.** *The Journal of comparative neurology*, v. 381, n. 2, p. 119–29, 1997.
- FABRICIO, A. S. C.; RAE, G. A.; ZAMPRONIO, A. R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. P. **Central endothelin ET(B) 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*, v. 290, n. 1, p. R164–71, 2006.
- FABRICIO, A. S. C.; SILVA, C. A. A.; RAE, G. A.; P, D.-J.; GE, S. **Essential role for endothelin ET B receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats.** *British Journal of Pharmacology*, v. 125, p. 542–548, 1998.
- FARINA, G.; YORK, M.; COLLINS, C.; LAFYATIS, R. **dsRNA activation of endothelin-1 and markers of vascular activation in endothelial cells and fibroblasts.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 70, p.544-550, 2011.
- FIGUEIREDO, M.J.; SOARES, D.M.; MARTINS, J.M.; MARCHADO, R. DE R.; SORGI, C.A.; FACCIOLI, L.H., MELO, M.C.; MALVAR, D.DO C.; SOUZA, G.E. **Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E2 and cytokines.** *Medical Microbiology and Immunology* v.201, p. 219-229, 2012.

FLOREZ-DUQUET, M.; PELOSO, E.; SATINOFF, E. **Fever and behavioral thermoregulation in young and old rats.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 280, n. 5, p. R1457–61, 2001.

FORTIER, M.-E.; KENT, S.; ASHDOWN, H.; et al. **The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 287, n. 4, p. R759–66, 2004.

FRAGA, D. **Participação dos opioides endógenos na termorregulação e na resposta febril.** Universidade Federal do Paraná, 2004.

FRAGA, D.; MACHADO, R. R.; FERNANDES, C.; SOUZA, E. P.; ZAMPRONIO, A. **Endogenous opioids : role in prostaglandin-dependent and -independent fever.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 294, p. 411–420, 2008.

FRAGA, D.; ZANONI, C. I. S.; RAE, G. A.; PARADA, C. A.; SOUZA, G. E. P. **Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors.** *British journal of pharmacology*, v. 157, n. 8, p. 1494–501, 2009.

GANDHI, R.; HAYLEY, S.; GIBB, J.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. **Influence of poly I:C on sickness behaviors, plasma cytokines, corticosterone and central monoamine activity: moderation by social stressors.** *Brain, behavior, and immunity*, v. 21, n. 4, p. 477–89, 2007.

GAO, W.; SCHMIDTKO, A.; WOBST, I.; et al. **Prostaglandin D2 produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever.** *J Physiol Pharmacol*, p. 145–150, 2009.

GAUTREAU, A.; KERDELHUE, B. **Simultaneous quantitation of substance P-encoding preprotachykinin alternatively spliced mRNAs and substance P receptor NK-1 mRNA by an RNase protection assay.** *Brain Research Protocols* v.2, p.133-140, 1998.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M.; WEBER, A. N. R. **Toll-like receptors as molecular switches.** *Nature reviews. Immunology*, v. 6, n. 9, p. 693–8, 2006.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; et al. **Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism.** *Life sciences*, v. 55, n. 17, p. 321–326, 1994.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. **Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs.** *Life sciences*, v. 56, n. 20, p. 389–394, 1995.

GIVALOIS, L.; DORNAND, J.; MEKAOUCHE, M.; et al. **Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats.** *The American journal of physiology*, v. 267, n. 1 Pt 2, p. R164–70, 1994.

GEORGE, P.M.; BADIGER, R.; SHAO, D.; EDWARDS, M.R.; WORT, S.J.; PAUL-CLARK, M.J.; MITCHELL, J.A. **Viral Toll Like Receptor activation of pulmonary vascular smooth muscle cells results in endothelin-1 generation; relevance to pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n.426, p.486-491, 2012.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; HAMMACK, S. E.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. **Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve.** *Brain research*, v. 804, n. 2, p. 306–10, 1998.

HAN, H.; GONG, G.; BAI, X.; et al. **Inhibition of notch signaling protects mouse lung against zymosan-induced injury.** *Shock*, v. 40, n. 4, p. 312–9, 2013.

HARDEN, L. M.; PLESSIS, I. DU; POOLE, S.; LABURN, H. P. **Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats.** *Brain, behavior, and immunity*, v. 22, n. 6, p. 838–49, 2008.

HARTOG, A.; COZIJNSEN, M.; VRIJ, G. DE; GARSSSEN, J. **Collagen hydrolysate inhibits zymosan-induced inflammation.** *Experimental biology and medicine*, v. 238, n. 7, p. 798–802, 2013.

HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. **The role of fever in the infected host. Microbes and infection,** *Institut Pasteur*, v. 2, n. 15, p. 1891–904, 2000.

HATZELMANN, T.; HARDEN, L.M.; ROTH, J.; GERSTBERGER, R. **Antipyretic effect of central [Pyr1]apelin13 on LPS-induced fever in the rat.** *Regulatory Peptides*, v.184, p. 6-13, 2013.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; et al. **A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.** *Nature*, v. 408, n. 6813, p. 740–5, 2000.

HENSLEY, L. E.; GEISBERT, T. W. **The contribution of the endothelium to the development of coagulation disorders that characterize Ebola hemorrhagic fever in primates.** *Thrombosis and Haemostasis*, v. 94, p. 254–261, 2005.

HOPWOOD, N.; MASWANGANYI, T.; HARDEN, L. M. **Comparison of anorexia, lethargy, and fever induced by bacterial and viral mimetics in rats.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 87, p. 211–220, 2009.

HORI, T.; KATAFUCHI, T.; TAKE S.; SHIMIZU, N. **Neuroimmunomodulatory actions of hypothalamic interferon-alpha.** *Neuroimmunomodulation*. v.5, n. 3-4, p.172-7, 1998.

HURD, Y.L.; KELLER, E.; SOTONYI, P.; SEDVALL, G. **Preprotachykinin-A mRNA expression in the human and monkey brain: An in situ hybridization study.** *Journal of Comparative Neurology* v.411, p.56-72, 1999.

HÜBSCHLE, T.; REFALZIK, S.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. **Induction of Fever and Sickness Behavior in Telemetrically Monitored Rats During Systemic Inflammation Induced by Zymosan.** *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 6, p. 569–575, 2007.

INOUE, A.; IKOMA, K.; MORIOKA, N.; KUMAGAI, K.; HASHIMOTO, T.; HIDE, I.; NAKATA, Y. **Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system.** *Journal of Neurochemistry* v.73, p.2206-2213, 1999.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. **Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, v. 9, p. 1977–93, 2004.

JIANG, Z.; TANG, X.; XIAO, R.; JIANG, L.; CHEN, X. **Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells.** *The Journal of infection*, v. 55, n. 2, p. e23–8, 2007.

JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. **Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways.** *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 7, n. 8, p. 678–86, 1993.

KAGIWADA, K.; CHIDA, D.; SAKATANI, T.; et al. **Interleukin (IL)-6, but not IL-1, induction in the brain downstream of cyclooxygenase-2 is essential for the induction of febrile response against peripheral IL-1alpha.** *Endocrinology*, v. 145, n. 11, p. 5044–8, 2004.

KANASHIRO, A.; PESSINI, C.; MACHADO, R. R.; et al. **Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 296, p. 1631–1640, 2009.

KATAFUCHI, T.; KONDO, T.; YASAKA, T.; et al. **Prolonged effects of polyriboinosinic:polyribocytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon- α mRNA in rats: a model for immunologically induced fatigue.** *Neuroscience*, v. 120, n. 3, p. 837–845, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. **TLR signaling.** *Seminars in immunology*, v. 19, n. 1, p. 24–32, 2007.

KIEKKAS, P.; ARETHA, D.; BAKALIS, N.; et al. **Fever effects and treatment in critical care: Literature review.** *Australian critical care: official journal of the Confederation of Australian Critical Care Nurses*, v. 26, n. 3, p. 130–5, 2013.

KIELIAN, T. **Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis.** *Journal of Neuroscience Research* v.83, p. 711-730, 2006.

KIRKBY, N. S.; ZAISS, A. K.; WRIGHT, W. R.; et al. **Differential COX-2 induction by viral and bacterial PAMPs: Consequences for cytokine and interferon responses and implications for anti-viral COX-2 directed therapies.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 438, n. 2, p. 249–56, 2013.

KLEMM, P.; WARNER, T.D.; HOHLFELD, T.; CORDER, R.; VANE, J.R. **Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.92, p.2691-2695, 1995.

KLUGER, M. J. **Is Fever Beneficial ?** *The Yale journal of biology and medicine*, v. 59, p. 89–95, 1986.

KLUGER, M. J. **Fever: role of pyrogens and cryogens.** *Physiological reviews*, v. 71, n. 1, p. 93–127, 1991.

KLUGER, M.; KOZAK, W.; CONN, C.; LEON, L.; SOSZYNSKI, D. **Role of fever in disease.** *Annals of the New York Academy of Sciences.*, v. 856, p. 224–233, 1998.

KOBAYASHI, G. S.; FRIEDMAN, L. **Characterization of the pyrogenicity of *Candida Albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*.** *Journal of Bacteriology*, v. 88, p. 660–666, 1964.

KONSMAN, J. P.; VIGUES, S.; MACKERLOVA, L.; BRISTOW, A.; BLOMQVIST, A. **Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli.** *The Journal of comparative neurology*, v. 472, n. 1, p. 113–29, 2004.

KOZAK, W.; ZHENG, H.; CONN, C. A.; et al. **Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice.** *The American journal of physiology*, v. 269, n. 5 Pt 2, p. R969–77, 1995.

LANDAU, A.M.; YASHPAL, K.; CAHILL, C.M.; ST LOUIS, M.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; HENRY J.L. **Sensory neuron and substance P involvement in symptoms of a zymosan-induced rat model of acute bowel inflammation.** *Neuroscience*.v.16, n.145(2), p.699-707, 2007.

LASS-FLÖRL, C. **The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe.** *Mycoses*, v. 52, n. 3, p. 197–205, 2009.

LAZARUS, M.; YOSHIDA, K.; COPPARI, R.; et al. **EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses.** *Nature neuroscience*, v. 10, n. 9, p. 1131–3, 2007.

LEE, B. H.; INUI, D.; SUH, G. Y.; et al. **Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis: multi-centered prospective observational study.** *Critical care*, v. 16, n. 1, p. R33, 2012.

LEMAY L.G., OTTERNESS, I.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. **In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 beta.** *Cytokine*. v. 2, n.3, p.199-204, 1990.

LENCZOWSKI, M. J.; DAM, A. M. VAN; POOLE, S.; LARRICK, J. W.; TILDERS, F. J. **Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosterone response to intraperitoneal LPS.** *The American journal of physiology*, v. 273, n. 6 Pt 2, p. R1870–7, 1997.

LENNA, S.; CHROBAK, I.; FARINA, G.A.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; LAMAS, S.; LAFYATIS, R.; SCORZA, R. TROJANOWSKA, M. **HLA-B35 and dsRNA induce endothelin-1 via activation of ATF4 in human microvascular endothelial cells.** *PLoS One* v.8, p. e56123, 2013.

LEON, L. R.; KOZAK, W.; PESCHON, J.; KLUGER, M. J. **Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice.** *The American journal of physiology*, v. 272, n. 2 Pt 2, p. R563–9, 1997.

LI, S.; BALLOU, L. R.; MORHAM, S. G.; BLATTEIS, C. M. **Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1beta.** *Brain research*, v. 910, n. 1-2, p. 163–73, 2001.

LONG, N. C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S. L.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. **Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats.** *The American journal of physiology*, v. 259, n. 4 Pt 2, p. R724–8, 1990.

- LUHESHI, G. N.; STEFFERL, A.; TURNBULL, A. V.; et al. **Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat.** *The American journal of physiology*, v. 272, n. 3 Pt 2, p. R862–8, 1997.
- LUNDBERG, A. M.; DREXLER, S. K.; MONACO, C.; et al. **Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems.** *Blood*, v. 110, n. 9, p. 3245–52, 2007.
- LUNDKVIST, J.; SUNDGREN-ANDERSSON, A. K.; TINGSBORG, S.; et al. **Acute-phase responses in transgenic mice with CNS overexpression of IL-1 receptor antagonist.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 276, p. 644–651, 1999.
- MACKOWIAK, P. **Concepts of fever.** *Archives of Internal Medicine*, v. 158, p. 1870–1881, 1998.
- MAESHIMA, N.; FERNANDEZ, R. C. **Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, p. 3, 2013.
- MAJDE, J. A. **Viral double-stranded RNA, cytokines, and the flu.** *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, v. 20, n. 3, p. 259–72, 2000.
- MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G.; FLOWER, R.J.; PERRET, M. **Effect of interleukin-1 beta on the release of substance P from rat isolated spinal cord.** *European Journal of Pharmacology*, v.299, p.113-118, 1996.
- MALVAR, D. do; SOARES, D.M.; FABRICIO, A.S.; KANASHIRO, A., MACHADO, R.R.; FIGUEIREDO, M.J.; RAE, G.A.; DE SOUZA, G.E. **The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus.** *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 6, p. 1401-9., 2011.
- MATSUDA, B. Y. T.; HORI, T.; NAKASHIMA, T. **Thermal and PGE2 sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices.** *Journal of physiology*, v. 454, p. 197–212, 1992.
- MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, H.; SHIVA, D.; KAWANISHI, N.; KREMENIKI, M.J.; KATO, Y.; YANO, H. **The reduction of voluntary physical activity after poly I:C injection is independent of the effect of poly I:C-induced interferon-beta in mice.** *Physiology & Behavior* v.18, n.93(4-5), p.835-41, 2008.
- MCDONALD, J.; LAMBERT, D. **Opioid receptors.** *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, v. 5, n. 1, p. 22–25, 2005.
- MERCIER, F.; KITASAKO, J. T.; HATTON, G. I. **Fractones and Other Basal Laminae in the Hypothalamus.** *The Journal of Comparative Neurology*, v. 455, p. 324–340, 2003.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. **Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses.** *Molecular cell*, v. 22, n. 5, p. 561–9, 2006.

MILLER, A. J.; HOPKINS, S. J.; LUHESHI, G. N. **Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat.** *British journal of pharmacology*, v. 120, n. 7, p. 1274–9, 1997.

MILTON, A. S. **Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 559, p. 392–410, 1989.

MILTON, N.G.; SELF, C.H.; HILLHOUSE, E.W. **Effects of pyrogenic immunomodulators on the release of corticotrophin-releasing factor-41 and prostaglandin E2 from the intact rat hypothalamus in vitro.** *British Journal of Pharmacology* v.109, p.88-93, 1993.

MIÑANO, F. J.; FERNÁNDEZ-ALONSO, A; MYERS, R. D.; SANCIBRIÁN, M. **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*, v. 491 Pt 1, p. 209–17, 1996.

MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. **Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins.** *The American journal of physiology*, v. 254, n. 4 Pt 2, p. R633–40, 1988.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. **Central neural pathways for thermoregulation.** *Frontiers in bioscience*, v. 16, p. 74–104, 2011.

NAGYOSZI, P.; WILHELM, I., FARKAS, A.E.; FAZAKAS, C.; DUNG, N.T.; HASKO, J.; KRIZBAI, I.A. **Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells.** *Neurochemistry International* , v.57, p. 556-564, 2010.

NAKA, T.; NARAZAKI, M.; HIRATA, M.; et al. **Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.** *Nature*, v. 387, n. 6636, p. 924–9, 1997.

NAKAMURA, K. **Central circuitries for body temperature regulation and fever.** *The American journal of physiology*, v.301, n.5, p. R1207-28, 2011.

NAKAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMASHITA, Y.; et al. **Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system.** *The Journal of comparative neurology*, v. 421, n. 4, p. 543–69, 2000.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. **Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering.** *The Journal of physiology*, v. 589, n. Pt 14, p. 3641–58, 2011.

NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, K.; MORRISON, S. **Different populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions.** *Neuroscience*, v. 161, n. 2, p. 614–620, 2010.

NAKASHIMA, T.; HORI, T.; KURIYAMA, K.; KIYOHARA, T. **Naloxone blocks the interferon-alpha induced changes in hypothalamic neuronal activity.** *Neuroscience letters*, v. 82, n. 3, p. 332–6, 1987.

NAKASHIMA, T.; HORI, T.; KURIYAMA, K.; MATSUDA, T. **Effects of interferon-alpha on the activity of preoptic thermosensitive neurons in tissue slices.** *Brain research*, v. 454, n. 1-2, p. 361–7, 1988.

NAKASHIMA, T.; MURAKAMI, T.; MURAI, Y.; HORI, T.; MIYATA, S.; KIYOHARA, T. **Naloxone suppresses the rising phase of fever induced by interferon-alpha.** *Brain Research Bulletin*, v.37, n.1, p. 61-6, 1995.

NAVARRO-XAVIER, R. A.; NEWSON, J.; LUCIA, V.; et al. **A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties.** *Journal of immunology*, v. 184, n. 3, p. 1516–25, 2010.

NIVEN, D. J.; STELFOX, H. T.; LAUPLAND, K. B. **Antipyretic therapy in febrile critically ill adults: A systematic review and meta-analysis.** *Journal of critical care*, v. 28, n. 3, p. 303–10, 2013.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. **Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America.** *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 51, n. 5, p. 561–70, 2010.

OGOINA, D. **Fever, fever patterns and diseases called “fever” — A review.** *Journal of Infection and Public Health*, v. 4, n. 3, p. 108–124, 2011.

OKA, T. **Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors.** *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 9, p. 3046–57, 2004.

OLSON, J.K.; Miller, S.D. **Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs.** *The Journal of Immunology* v.173, p. 3916-3924, 2004.

OPP, M. R.; KRUEGER, J. M. **Interleukin 1-receptor antagonist blocks interleukin 1-induced sleep and fever.** *The American journal of physiology*, v. 260, n. 2 Pt 2, p. R453–7, 1991.

OTT, D.; MURGOTT, J.; RAFALZIK, S.; WUCHERT, F.; SCHMALENBECK, B.; ROTH, J.; GERSTBERGER, R. **Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines.** *Brain Research*, n.1363, p. 93-106, 2010.

OTT, D.; WUCHERT, F.; MURGOTT, J.; et al. **The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier.** *Neuroscience letters*, v. 530, n. 1, p. 64–8, 2012.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; et al. **The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13766–71, 2000.

PAN, W.; BANKS, W. A.; KENNEDY, M. K.; GUTIERREZ, E. G.; KASTIN, A. J. **Differential permeability of the BBB in acute EAE: enhanced transport of TNF- α .** *The American journal of physiology*, v. 271, n. 4 Pt 1, p. E636–42, 1996.

PANNEERSELVAM, P.; SINGH, L. P.; SELVARAJAN, V.; et al. **T-cell death following immune activation is mediated by mitochondria-localized SARM.** *Cell death and differentiation*, v. 20, n. 3, p. 478–89, 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition.** Elsevier: 2006.

PEASE, J. E.; WILLIAMS, T. J. **The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy.** *British journal of pharmacology*, v. 147 Suppl, p. S212–21, 2006.

PIRAS, V.; SELVARAJOO, K. **Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling.** *Frontiers in immunology*, v. 5, n. February, p. 70, 2014.

QUAN, N.; SUNDAR, S. K.; WEISS, J. M. **Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide.** *Journal of neuroimmunology*, v. 49, n. 1-2, p. 125–34, 1994.

RANELS, H. J.; GRIFFIN, J. D. **The effects of prostaglandin E 2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus.** *Brain research*, v. 964, p. 42–50, 2003.

RANELS, H. J.; GRIFFIN, J. D. **Effects of prostaglandin E2 on the electrical properties of thermally classified neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus.** *BMC neuroscience*, v. 6, p. 14, 2005.

RAWLS, S. M.; BENAMAR, K. **Opioid, cannabinoid, and transient receptor potential (TRP) systems: effects on body temperature.** *Frontiers in bioscience*, v. 3, p. 822–845, 2014.

REIS, R. C.; BRITO, H. O.; FRAGA, D.; CABRINI, D. A.; ZAMPRONIO, A. R. **Central substance P NK 1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3 / MIP-1 α in rats.** *Brain Research*, v. 1384, p. 161–169, 2011.

RESTREPO, B. N.; ISAZA, D. M.; SALAZAR, C. L.; et al. **Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ in infants with and without dengue.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 1, p. 6–10, 2008.

ROEDER, A.; KIRSCHNING, C.; RUPEC, R.; SCHALLER, M.; KORTING, H. **Toll-like receptors and innate antifungal responses.** *Trends in Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 44–49, 2004.

ROMANOVSKY, A. A. **Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation Thermoregulation: some concepts have changed.** *Functional architecture of the thermoregulatory system.*, v. 85013, p. 64–66, 2007.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. **Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality.** *Journal of applied physiology*, v. 92, n. 6, p. 2667–79, 2002.

ROMANOVSKY, A.A.; SUGIMOTO, N.; SIMONS, C.T.; HUNTER, W.S. **The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signalling: a reappraisal of lesion experiments.** *American journal of physiology*, v.285, p. R420-28., 2003.

ROSS, G.; ROTH, J.; STÖRR, B.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. **Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs.** *Physiology & Behavior*. n.1-15, v. 71(3-4), p. 305-13, 2000.

ROTH, J. **Endogenous antipyretics.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 371, n. 1-2, p. 13–24, 2006.

ROTH, J.; HARRÉ, E.M.; RUMMEL, C.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. **Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs.** *Frontiers in bioscience*, v.9, p. 290-300, 2004.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. **Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia.** *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 29, n. 2, p. 229–245, 2009.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; HARRÉ, E.-M.; et al. **Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine?** *Journal of Thermal Biology*, v. 29, n. 7-8, p. 383–389, 2004.

ROTH, J.; SOUZA, G. E. DE. **Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation.** *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 34, n. 3, p. 301–14, 2001.

ROTHWELL, N. J. **CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat.** *The American journal of physiology*, v. 256, n. 1 Pt 1, p. E111–5, 1989.

ROTHWELL, N. J. **Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, v. 22, n. 12, p. 616–8, 1990.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. **Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target.** *Trends in neurosciences*, v. 23, n. 12, p. 618–25, 2000.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N.; TOULMOND, S. **Cytokines and Their Receptors in the Central Nervous System: Physiology, Pharmacology and Pathology.** *Pharmacology & Therapeutics.*, v. 69, n. 2, p. 85–95, 1996.

ROUGHAN, J. V; FLECKNELL, P. A. **Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats.** *Pain*, v. 90, n. 1-2, p. 65–74, 2001.

RUMMEL, C.; HÜBSCHLE, T.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. **Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation.** *The Journal of physiology*, v. 557, n. Pt 2, p. 671–87, 2004.

RUMMEL, C.; SACHOT, C.; POOLE, S.; LUHESHI, G. N. **Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 291, p. 1316–1326, 2006.

- SCAMMELL, T. E.; ELMQUIST, J. K.; GRIFFIN, J. D.; SAPER, C. B. **Ventromedial Preoptic Prostaglandin E2 Activates Fever-Producing Autonomic Pathways.** *The journal of Neuroscience*, v. 16, n. 19, p. 6246–6254, 1996.
- SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. **Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 22, n. 13, p. 5606–18, 2002.
- SCHNITTLER, H.-J.; FELDMANN, H. **Viral hemorrhagic fever--a vascular disease?** *Thrombosis and haemostasis*, v. 89, n. 6, p. 967–72, 2003.
- SCHÖBITZ, B.; DOBBELSTEEN, M. VAN DEN; HOLSBOER, F.; SUTANTO, W.; KLOET, E. R. DE. **Regulation of interleukin 6 gene expression in rat.** *Endocrinology*, v. 132, n. 4, p. 1569–76, 1993.
- SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. **Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions.** *Journal of Leucocyte Biology*, v. 75, p. 163–189, 2004.
- SHIBAMIYA, A.; HERSEMEYER, K.; SCHMIDT WÖLL, T.; et al. **A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells.** *Blood*, v. 113, n. 3, p. 714–22, 2009.
- SILVA, A. H.; NETO, A. X. DO P.; GUIMARÃES, S. B. **Anesthesia Electro-acupuncture reduces the need for additional anesthetics in experimental studies** *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 25, n. 4, p. 381–384, 2010.
- SIMONS, C. T.; KULCHITSKY, V. A.; SUGIMOTO, N.; et al. **Signaling the brain in systemic inflammation : which vagal branch is involved in fever genesis?** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 275, p. 63–68, 1998.
- SKOFF, A.M.; ZHAO, C.; ADLER, J.E. **Interleukin-1alpha regulates substance P expression and release in adult sensory neurons.** *Experimental Neurology*, v.217, p.395-400, 2009.
- SOARES, D. M.; FIGUEIREDO, M. J.; MARTINS, J. M.; et al. **CCL3/MIP-1 alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF.** *Brain research*, v. 1269, p. 54–60, 2009.
- SOARES, D. M.; FIGUEIREDO, M. J.; MARTINS, J. M.; et al. **A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live E. coli.** *Medical microbiology and immunology*, v. 201, n. 1, p. 47–60, 2012.
- SOARES, D. M.; MACHADO, R. R.; YAMASHIRO, L. H.; MELO, M. C. C.; SOUZA, G. E. P. **Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats.** *Brain research*, v. 1233, p. 79–88, 2008.
- SOARES, D. M.; OTT, D.; MELO, M. C. C.; SOUZA, G. E. P.; ROTH, J. **Chemokine ligand (CCL)-3 promotes an integrated febrile response when injected within pre-optic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis.** *Brain, behavior, and immunity*, v. 34, p. 120–9, 2013.

SORENSEN, W. G.; SHAHAN, T. A.; SIMPSON, J. **Cell wall preparations from environmental yeasts: effect on alveolar macrophage function in vitro.** *Ann Agric Environ Med*, v. 5, n. January, p. 65–71, 1998.

STEINER, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. S. **Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response.** *Brain research*, v. 944, p. 135–145, 2002.

STITT, J.T.; SHIMADA, S.G. **Enhancement of the febrile responses of rats to endogenous pyrogen occurs within the OVLT region.** *Journal of Applied Physiology*, v. 67, p. 1740-1746, 1989.

STRIJBOS, P. J.; HARDWICK, A. J.; RELTON, J. K.; CAREY, F.; ROTHWELL, N. J. **Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF.** *The American journal of physiology*, v. 263, n. 4 Pt 1, p. E632–6, 1992.

SU, F.; NGUYEN, N. D.; WANG, Z.; et al. **Fever control in septic shock: beneficial or harmful?** *Shock*, v. 23, n. 6, p. 516–20, 2005.

SZELÉNYI, Z.; SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M. **Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 813, p. 316–23, 1997.

TAKAHASHI, Y.; SMITH, P.; FERGUSON, A.; PITMANN, Q.J. **Circumventricular organs and fever.** *The American journal of physiology*, v.273, p. R1690-95, 1997.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805–20, 2010.

TANAKA, M.; MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M. **Roles of two preoptic cell groups in tonic and febrile control of rat tail sympathetic fibers.** *The American journal of physiology*, v. 296, p. 1248–1257, 2009.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. **The biology and medical implications of interleukin-6.** *Cancer immunology research*, v. 2, n. 4, p. 288–94, 2014.

TAVARES, E.; MIÑANO, F. J. **RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat.** *Neuropharmacology*, v. 39, n. 12, p. 2505–13, 2000.

TRAYNOR, T. R.; MAJDE, J. A.; BOHNET, S. G.; KRUEGER, J. M. **Intratracheal double-stranded RNA plus interferon-gamma: a model for analysis of the acute phase response to respiratory viral infections.** *Life sciences*, v. 74, n. 20, p. 2563–76, 2004.

TULUC, F.; LAI, J. P.; KILPATRICK, L. E.; EVANS, D. L.; DOUGLAS, S. D. **Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity.** *Trends in immunology*, v. 30, n. 6, p. 271–6, 2009.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. **Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands.** *Handbook of experimental pharmacology*, n. 183, p. 1–20, 2008.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; et al. **Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP 3.** *Nature*, v. 395, p. 281–284, 1998.

VEMULAPALLI, S.; CHIU, P.J.; GRISCTI, K.; BROWN, A.; KUROWSKI, S.; SYBERTZ, E.J. **Phosphoramidon does not inhibit endogenous endothelin-1 release stimulated by hemorrhage, cytokines and hypoxia in rats.** *European Journal of Pharmacology* v.257, p.95-102, 1994.

VOGEL, S. N.; FITZGERALD, K. A.; FENTON, M. J. **TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression.** *Molecular interventions*, v. 3, n. 8, p. 466–77, 2003.

VOSS, T.; BARTH, S. W.; RUMMEL, C.; et al. **STAT3 and COX-2 activation in the guinea-pig brain during fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid.** *Cell and tissue research*, v. 328, n. 3, p. 549–61, 2007.

VOSS, T.; RUMMEL, C.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T.; ROTH, J. **Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections.** *Acta physiologica*, v. 187, n. 3, p. 379–89, 2006.

WATANABE, M. **Characteristics of TNF alpha- and TNF beta-induced fever in the rabbit.** *The Japanese journal of physiology*, v. 42, n. 1, p. 101–16, 1992.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; et al. **Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication.** *Neuroscience letters*, v. 183, n. 1-2, p. 27–31, 1995.

WERNER, M. F. P.; FRAGA, D.; MELO, M. C. C.; SOUZA, G. E. P.; ZAMPRONIO, A. R. **Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection.** *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, v. 52, n. 7, p. 291–6, 2003.

WERNER, M. F. P.; SOUZA, G. E. P.; ZAMPRONIO, A. R. **Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms.** *European journal of pharmacology*, v. 543, n. 1-3, p. 181–9, 2006.

WILLIAMS, B. B.; PAUL, R. T.; LERNER, A. M. **Pharmacokinetics of interferon in blood, cerebrospinal fluid, and brain after administration of modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid and amphotericin B.** *The Journal of infectious diseases*, v. 146, n. 6, p. 819–25, 1982.

WILLIAMS, H.; DACKS, P. A.; RANCE, N. E. **An improved method for recording tail skin temperature in the rat reveals changes during the estrous cycle and effects of ovarian steroids.** *Endocrinology*, v. 151, n. 11, p. 5389–94, 2010.

WON, S.J.; LIN, M.T.; KO, Y.H.; CHUANG, J. **The fever induced by polyriboinosinic:polyribocytidylic acid is not related to interferon synthesis in the rabbit's hypothalamus.** *Journal of Interferon & Cytokine Research* v.11, p. 165-169, 1991.

WU, J.; HUANG, S.; ZHAO, X.; et al. **Polyinosinic-polycytidylic acid treatment leads to the interferon-dependent clearance of hepatitis B virus in a hydrodynamic injection mouse model.** *Journal of virology*, 2014.

WU, J.; LU, M.; MENG, Z.; et al. **Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice.** *Hepatology*, v. 46, n. 6, p. 1769–78, 2007.

WUCHERT, F.; OTT, D.; MURGOTT, J.; RAFALZIK, S.; HITZEL, N.; ROTH, J.; GERSTBERGER, R. **Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide.** *Journal of Neuroimmunology* v. 204, p. 66-74, 2008.

YAMAGATA, K.; MATSUMURA, K.; INOUE, W.; et al. **Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 8, p. 2669–77, 2001.

YAMATO, M.; TAMURA, Y.; EGUCHI, A.; KUME, S.; MIYASHIGE, Y.; NAKANO, M.; WATANABE, Y.; KATAOKA, Y. **Brain interleukin-1beta and the intrinsic receptor antagonist control peripheral Toll-like receptor 3-mediated suppression of spontaneous activity in rats.** *PLoS One* v.9, p.e90950, 2014.

YOSHIDA, K.; CANO, G.; LAZARUS, M.; SAPER, C.B. **Parallel preoptic pathways for thermoregulation.** *The Journal of Neuroscience*, v.29, p. 11954-11964, 2009.

YU, H.M.; LIU, W.-H.; HE, X.H.; PENG, B.W. **IL-1 β : an important cytokine associated with febrile seizures?** *Neuroscience bulletin*, v. 28, n. 3, p. 301–8, 2012.

ZAMPRONIO, A. R.; MELO, M. C.; HOPKINS, S. J.; SOUZA, G. E. **Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor (PFPF).** *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, v. 49, n. 9, p. 473–9, 2000.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; SILVA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. **Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism.** *The American journal of physiology*, v. 266, n. 5 Pt 2, p. R1670–4, 1994.

ZHANG, Z.; SCHLUESENER, H. J. **Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration.** *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 63, n. 24, p. 2901–7, 2006.

ZHAO, Y.; BOULANT, J. A. **Temperature effects on neuronal membrane potentials and inward currents in rat hypothalamic tissue slices.** *The Journal of physiology*, v. 564, n. Pt 1, p. 245–57, 2005.

ZHOU, Y.; WANG, X.; LIU, M.; et al. **A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages.** *Immunology*, v. 131, n. 1, p. 40–9, 2010.

8. ARTIGOS

Direitos de publicação concedidos aos periódicos

Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response

Amanda L. Bastos-Pereira, Daniel Fraga, Daniela Ott, Björn Simm, Jolanta Murgott, Joachim Roth and Aleksander R. Zampronio

J Appl Physiol 116:1220-1229, 2014. First published 20 March 2014;
doi:10.1152/jappphysiol.01278.2013

You might find this additional info useful...

This article cites 75 articles, 32 of which can be accessed free at:
</content/116/9/1220.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
</content/116/9/1220.full.html>

Additional material and information about *Journal of Applied Physiology* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/jappl>

This information is current as of May 13, 2014.

Journal of Neuroimmunology 278 (2015) 100–107

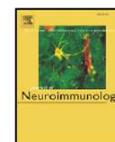


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim



Central mediators involved in the febrile response induced by polyinosinic–polycytidylic acid: Lack of involvement of endothelins and substance P

A.L. Bastos-Pereira, M.C.G. Leite, D. Fraga¹, A.R. Zampronio*

Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19031, 81540-970 Curitiba, PR, Brazil

