

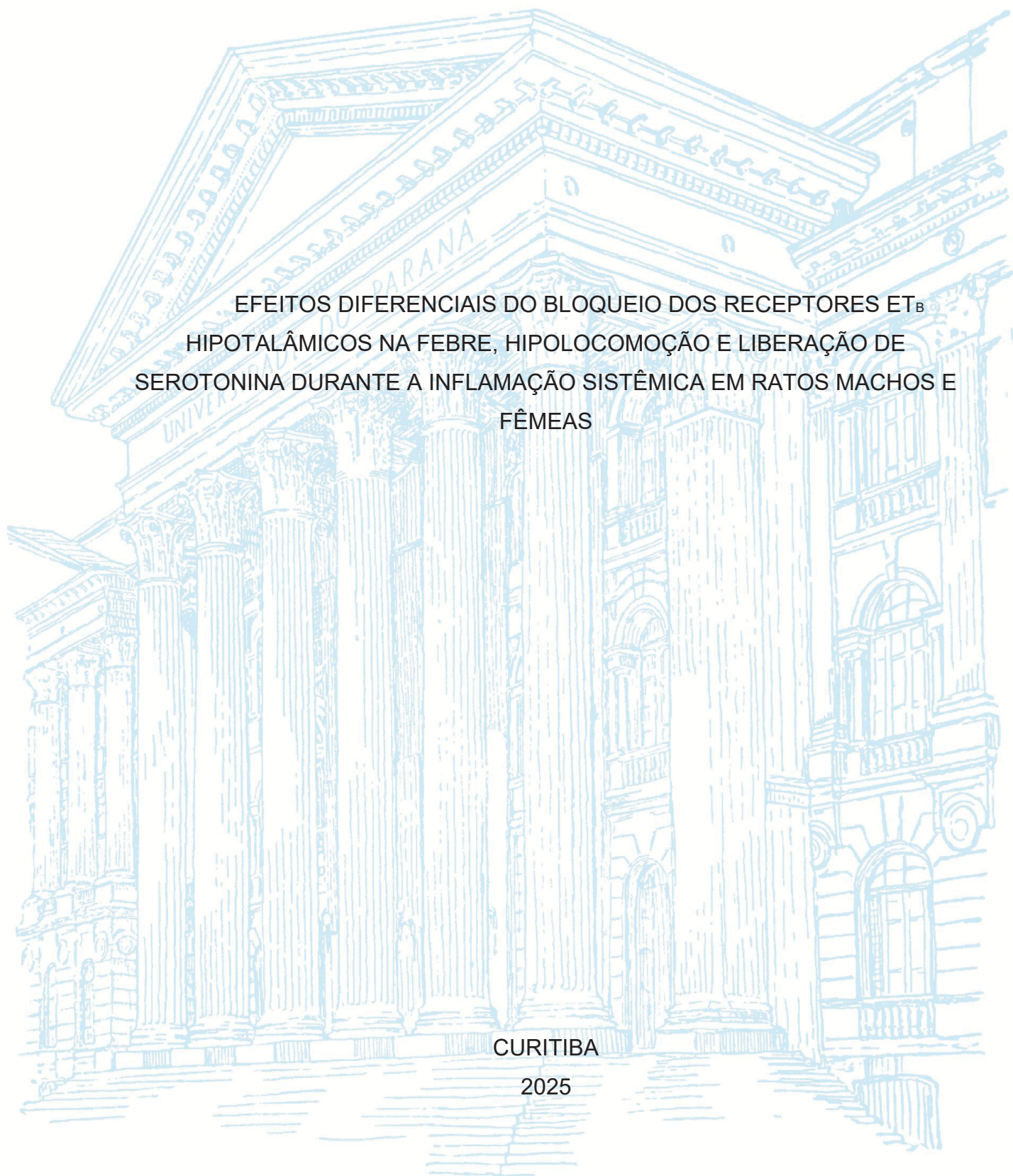
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS ALENCAR DE SOUZA

EFEITOS DIFERENCIAIS DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES 5HT_{1B}
HIPOTALÂMICOS NA FEBRE, HIPOLOCOMOÇÃO E LIBERAÇÃO DE
SEROTONINA DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS MACHOS E
FÊMEAS

CURITIBA

2025



THAÍS ALENCAR DE SOUZA

EFEITOS DIFERENCIAIS DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES ET_B
HIPOTALÂMICOS NA FEBRE, HIPOLOCOMOÇÃO E LIBERAÇÃO DE
SEROTONINA DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS MACHOS E
FÊMEAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio.

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Souza, Thaís Alencar de.

Efeitos diferenciais do bloqueio dos receptores ETB hipotalâmicos na febre, hipolocomoção e liberação de serotonina durante a inflamação sistêmica em ratos machos e fêmeas. / Thaís Alencar de Souza. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio.

1. Sexo - Pesquisa. 2. Endotelina-1. 3.Febre. 4. Comportamento de Doença. 5. Serotonina. I. Zamprônio, Aleksander Roberto, 1967- II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAÍS ALENCAR DE SOUZA**, intitulada: **Efeitos diferenciais do bloqueio dos receptores ETB hipotalâmicos na febre, hipolocomoção e liberação de serotonina durante a inflamação sistêmica em ratos machos e fêmeas**, sob orientação do Prof. Dr. ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 28 de Novembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

03/12/2025 11:14:19.0

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/12/2025 14:28:26.0

MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/12/2025 11:26:01.0

FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Ao universo, pela sincronicidade perfeita das bênçãos que já recebo e das que ainda estão por vir. À minha fé, que me guiou nos momentos de silêncio e incerteza. A Deus, por ter sustentado minha mente, meu corpo e meu espírito em cada passo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o meu trabalho diretamente ou indiretamente, no qual acreditei e acreditaram em mim e ao Autor da minha fé, que me permitiram executar este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aleksander Zampronio, por ter me aceitado em seu laboratório, todos os ensinamentos, paciência, dedicação e zelo com a pesquisa e todo trabalho executado. Obrigada pela persistência, compreensão e por confiar em mim. Sempre me mostrando que é possível melhorar cada vez mais. Te levarei para a vida como exemplo de professor, pesquisador e amigo.

Ao Departamento de Farmacologia da UFPR, professores e colegas que participaram e contribuíram com o meu desenvolvimento neste período.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos de laboratório, Regina, Marielle, Vitor Matheus, Ana Paula e todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Dor, Inflamação e Febre por toda ajuda e amizade neste período, tornando-o mais fácil e divertido. Aos meus amigos de departamento que foram muito importantes para mim nesse momento, ao Vitor Hélio, Fernando Spagnol, Ana Carolina, João Henrique, Thayná, Herval, Nicole, Jeferson Sohn por todos os conselhos e companheirismo.

Gostaria de agradecer imensamente ao Dr. Álvaro Henrique que me ajudou a estudar para o processo seletivo, que acreditou em mim, me apoiou e me incentivou a entrar para o programa, mesmo quando eu não achava que fosse possível. Seu apoio foi fundamental para o meu desenvolvimento até mesmo após ter entrado para a pós-graduação.

A minha querida amiga e irmã científica Stephanie Fernandes, por todo apoio, companheirismo e cumplicidade. Por muitas vezes dividir comigo a sua fé, e assim ser possível a realização deste trabalho.

A minha família, minha mãe, meus sobrinhos, minhas tias e tios, em especial a minha irmã Tatiane que percebeu muito cedo meu interesse pelos estudos, e me apoiou de uma maneira genuína. Com isso foi possível meu egresso na Universidade Federal do Paraná e realizar esse sonho.

Ao meu namorado, Lucas Freire e sua família por todo amor, apoio, cuidado e compreensão neste período.

As minhas queridas amigas e irmãs de coração Ana Flávia e Michele Motta por toda parceria e companheirismo. Mesmo estando cada uma em uma cidade diferente se fizeram presentes nesse momento tão importante para mim.

A todas as meninas que sonham em ter a ciência como profissão:
sigam em frente. É um caminho maravilhoso.
(Amy Farrah Fowler no episódio final de The Big Bang Theory, 2019)

RESUMO

A inflamação sistêmica desencadeia um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais conhecidas como síndrome de doença, incluindo febre e hipolocomoção. Estudos anteriores demonstraram que o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas induz essas respostas em ambos os sexos, com alterações específicas nos níveis de serotonina (5-HT) hipotalâmica reduzidos em machos e aumentados em fêmeas. Esses efeitos foram revertidos pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BQ788, um antagonista dos receptores do tipo B (ET_B) de endotelinas. Este estudo investigou se o hipotálamo seria um importante sítio de ação das endotelinas para induzir febre, comportamento de doença e alterações nos níveis de 5-HT através da administração intra-hipotalâmica (i.h.) de BQ788, considerando ainda possíveis diferenças sexuais. Ratos Wistar de ambos os sexos foram implantados com sensores de temperatura e receberam microinjeções hipotalâmicas de BQ788 ou salina, seguidas de LPS ou veículo por via intraperitoneal. A temperatura corporal foi monitorada por 5 h, a atividade locomotora avaliada por meio do teste de campo aberto, e os níveis hipotalâmicos de 5-HT e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram quantificados por High Performance Liquid Chromatography (HPLC). O LPS induziu febre e hipolocomoção em ambos os sexos, com redução dos níveis hipotalâmicos de 5-HT/5-HIAA em machos e aumento em fêmeas. Em machos, a administração i.h. de BQ788 reverteu esses efeitos, sugerindo ação direta no hipotálamo. Em fêmeas, BQ788 i.h. normalizou os níveis de 5-HT, mas não alterou a febre ou a hipolocomoção. No entanto, BQ788 i.c.v. reduziu essas respostas em fêmeas, indicando que os locais de sinalização das endotelinas diferem entre os sexos. Esses achados destacam uma resposta neuroimune dimórfica sexual à inflamação sistêmica, com a sinalização hipotalâmica de endotelinas mediando o comportamento de doença em machos, mas não em fêmeas. Isso reforça a importância de abordagens específicas por sexo na pesquisa neuroinflamatória.

Palavras-chave: sexo, endotelina-1, febre, comportamento de doença, serotonina

ABSTRACT

Systemic inflammation triggers a constellation of physiological and behavioural changes collectively known as sickness syndrome, including fever and hypolocomotion. Previous studies have demonstrated that lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria induces these responses in both sexes, with sex-specific alterations in hypothalamic serotonin (5-HT) levels decreased in males and increased in females. These effects were reversed by intracerebroventricular (i.c.v.) administration of BQ788, an antagonist of endothelin type B (ET_B) receptors. This study investigated whether the hypothalamus serves as a critical site of endothelin action in mediating fever, sickness behavior, and changes in 5-HT levels, through intra-hypothalamic (i.h.) administration of BQ788, while also considering potential sex differences. Male and female Wistar rats were implanted with temperature sensors and received hypothalamic microinjections of BQ788 or saline, followed by intraperitoneal injections of LPS or vehicle. Core body temperature was monitored for five hours, locomotor activity was assessed using the open field test, and hypothalamic levels of 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were quantified via high-performance liquid chromatography (HPLC). Lipopolysaccharide induced fever and hypolocomotion in both sexes, accompanied by decreased hypothalamic 5-HT/5-HIAA levels in males and increased levels in females. In males, i.h. administration of BQ788 reversed these effects, suggesting a direct hypothalamic mechanism. In females, BQ788 normalized 5-HT levels but did not affect fever or hypolocomotion. However, i.c.v. administration of BQ788 attenuated these responses in females, indicating that endothelin signalling sites differ between sexes. These findings underscore a sexually dimorphic neuroimmune response to systemic inflammation, with hypothalamic endothelin signalling mediating sickness behavior in males but not in females. This highlights the critical importance of sex-specific approaches in neuroinflammatory research.

Keywords: sex differences, endothelin-1, fever, sickness behavior, serotonin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1: Linha do tempo dos protocolos experimentais	35
Figura 2: Caracterização anatômica e funcional da injeção i.h. em ratos machos	40
Figura 3: Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 na resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas	42
Figura 4: Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos machos e fêmeas	44
Figura 5: Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 nas alterações de 5-HT/5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas	46
Figura 6: Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 na resposta febril induzida por LPS em ratos fêmeas	48
Figura 7: Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos fêmeas	50
Figura 8: Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 nas alterações de 5-HT/5-HIAA induzidas por LPS em ratos fêmeas	52

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

5-HIAA- Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT- Serotonina (5-hidroxitriptamina)

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA- Análise de variância

AUC- Área sob a curva (*Area Under the Curve*)

BQ123- 2-[(3R,6R,9S,12R,15S)-6-(1H-indol-3-ilmetil)-9-(2-metilpropil)-2,5,8,11,14-pentaoxo-12-propan-2-il-1,4,7,10,13-pentazabicyclo[13.3.0]octadecan-3-il]acetic acid
- Antagonista seletivo do receptor ETA

BQ788- (2R)-2-[[[(2R)-2-amino-3-(1-methoxycarbonylindol-3-yl)propanoyl]-[(2S)-2-[[[(2R,6S)-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl]amino]-4,4-dimethylpentanoyl]amino]hexanoic acid – Antagonista seletivo do receptor ET_B

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CEUA-BIO/UFPR- Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

CINC- Fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas

CCL3- Ligante 3 da quimiocina do motivo C-C (proteína inflamatória de macrófago-1 α)

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Covid- coronavirus disease (doença causada pelo coronavírus)

COX- Ciclooxigenase

CRF- Fator liberador de corticotrofina (corticotropin-releasing factor)

DMH- Núcleo do hipotálamo dorso medial

ECE- Enzimas de conversão da endotelina (endothelin-converting enzymes)

EP₃- Prostaglandin E receptor 3 (receptor prostanoide EP3)

ET-1- Endotelina-1

ET_B- Receptor do tipo B de endotelina

ET_A- Receptor do tipo A de endotelina

Ethovision®- Software de rastreamento comportamental (Noldus EthoVision®)

G*Power- Software para cálculo do tamanho da amostra (G*Power)

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

IL – Interleucina

LPS- Lipopolissacarídeo

MIP- Proteína inflamatória de macrófago (macrophage inflammatory protein)

MnPO - Núcleo pré-óptico mediano

mPGES1- Microsomal prostaglandin E synthase 1

NF-Kb- Fator nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)

PGE₂- Prostaglandina E₂

Poly I:C- Ácido poliinosínico:policitidílico (mimético viral)RA

PPR: Receptor de Reconhecimento de Padrão

PO/HA - Região pré-óptica do hipotálamo anterior

RANKL- Ligante do receptor-ativador de NF-κB (receptor activator of NF-κB ligand)

RMR- Núcleo da rafe medular rostral

SAL- Solução salina

SNC- Sistema Nervoso Central

SP- Substância P

TLR4- Receptor do tipo Toll 4 (Toll-like receptor 4)

TNF-α- Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

UFPR- Universidade Federal do Paraná

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.h. - Intra-hipotalâmica

i.m. – Intramuscular

i.p. – Intraperitoneal

~- Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A RESPOSTA FEBRIL E A REDUÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.	17
1.2 ENDOTELINA-1 NA RESPOSTA FEBRIL	20
1.3 DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA.....	22
2 HIPÓTESE	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 ANIMAIS.....	27
4.2 REAGENTES	27
4.3 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA	29
4.4 IMPLANTAÇÃO DE REGISTRADORES REMOTOS DE TEMPERATURA.....	30
4.5 ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS.	30
4.6 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.	31
4.7 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO ESPONTÂNEA.	32
4.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	33
4.9 INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE PGE ₂	33
4.10 INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE BQ788	33
4.11 INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE BQ788	34
4.12 COLETA DO HIPOTÁLAMO	36
4.13 DOSAGEM DE SEROTONINA E SEU METABÓLITO POR HPLC	37
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Diferenças relacionadas ao sexo na fisiopatologia e nos desfechos de doenças têm recebido atenção crescente nos últimos anos e cada vez os estudos apontam para uma prevalência ou severidade de uma doença em um dos sexos. Por exemplo, é sabido que mulheres apresentam maior prevalência em doenças autoimunes enquanto homens apresentam maior prevalência e severidade em doenças cardiovasculares. Essas diferenças são particularmente relevantes no contexto de infecções sistêmicas, nas quais fatores imunológicos, hormonais e neurobiológicos interagem para influenciar a progressão da doença e as respostas terapêuticas. A pandemia de COVID-19 evidenciou esse fenômeno: enquanto os homens apresentaram sintomas mais graves e maiores taxas de mortalidade, as mulheres demonstraram maior ativação de células T e respostas imunológicas mais robustas (TAKAHASHI; ELLINGSON; WONG; ISRAELOW *et al.*, 2020). Por outro lado, as sequelas pós-virais conhecidas como COVID longa foram relatadas com maior frequência em mulheres, sendo os sintomas como fadiga e cefaleia especialmente prevalentes (DURANÍKOVÁ; HORVÁTHOVÁ; SABAKA; MINÁR *et al.*, 2024; SHAH; THAWEETHAI; KARLSON; BONILLA *et al.*, 2025).

Estas diferenças relacionadas ao sexo também são evidentes em infecções bacterianas. Os homens são geralmente mais suscetíveis a infecções do trato gastrointestinal e respiratório, incluindo pneumonia e tuberculose, e apresentam maiores taxas de mortalidade em casos de sepse. Em contraste, as infecções do trato urinário são mais comuns em mulheres (DIAS; BROUWER; VAN DE BEEK, 2022). Embora a influência dos hormônios sexuais, particularmente sua modulação na expressão e atividade de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) e na função de células imunológicas, tenha sido amplamente estudada (DIAS; BROUWER; VAN DE BEEK, 2022; HONG; LIANG; MAN; ZHAO *et al.*, 2025), outros fatores como diferenças específicas entre os sexos particularmente no sistema nervoso central (SNC), permanecem pouco explorados.

No presente trabalho iremos estudar estas diferenças, focalizando em duas respostas que são controladas no sistema nervoso central: a resposta febril e a redução da movimentação espontânea.

1.1 A RESPOSTA FEBRIL E A REDUÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Os animais endotérmicos, entre eles os seres humanos, desenvolveram mecanismos complexos para manter a temperatura corporal dentro de limites estreitos. Em algumas condições, ajustes na temperatura corporal são necessários como, por exemplo, durante uma infecção quando ocorre febre. A resposta febril é definida como um aumento controlado da temperatura corporal ocasionado por uma elevação do ponto de regulação da temperatura corporal localizado no hipotálamo induzida por mediadores produzidos durante uma inflamação ou processo infeccioso (KLUGER, 1991; ROTH; DE SOUZA, 2001); (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). Especificamente, a área pré-óptica no hipotálamo anterior (PO/HA) exerce um controle integrativo sobre as respostas termorregulatórias e febril (BOULANT, 2006; MORRISON; NAKAMURA, 2019).

A administração de LPS em animais de laboratório representa um dos modelos clássicos de indução de febre, mimetizando o que ocorre naturalmente em processos infecciosos. O LPS estimula receptores do tipo *Toll* (TLR), especificamente TLR4, em células fagocíticas (particularmente em macrófagos) (GAY; GANGLOFF; WEBER, 2006) induzindo a liberação de citocinas (KLUGER, 1991). Dentre as citocinas reconhecidas como pirogênicas encontram-se a interleucina (IL)-1 β , IL-1 α , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-8 e o fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas (CINC), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α e β , interferon β e γ e RANKL (ligante do receptor-ativador de NF- κ B) (KLUGER, 1991; MIÑANO; FERNÁNDEZ-ALONSO; MYERS; SANCIBRIÁN, 1996; ZAMPRONIO; SOUZA; SILVA; CUNHA *et al.*, 1994); (HANADA; LEIBBRANDT; HANADA; KITAOKA *et al.*, 2009; SOARES; MACHADO; YAMASHIRO; MELO *et al.*, 2008). Algumas como a IL-8, CINC, MIP-1 α e RANKL parecem ser geradas diretamente no sistema nervoso central enquanto as outras poderiam ser geradas periféricamente.

Estas citocinas induzem à síntese e liberação de mediadores centrais como prostaglandinas E₂, (PGE₂), fator liberador de corticotrofina (CRF), opióides endógenos, substância P (SP), endotelina-1 (ET-1) e endocanabinóides endógenos (FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998; FRAGA; ZANONI; ZAMPRONIO; PARADA *et al.*, 2016; REIS; BRITO; FRAGA; CABRINI *et al.*, 2011; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015) resultando em um reajuste do termostato

hipotalâmico que passaria a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5-37°C. Portanto, são estes mediadores que, em última análise, promovem a mudança dos disparos nos neurônios hipotalâmicos que ativariam a produção/conservação de calor.

As prostaglandinas são, com clareza, os mediadores mais estudados e importantes da resposta febril. Estes eicosanóides derivam do ácido araquidônico e são formados pela ação da ciclooxygenase (COX). Existem duas isoformas de COX: a COX₁ é constitutivamente ativa em muitos tecidos, e COX₂ é induzida principalmente durante a resposta inflamatória. A COX₂ induzida por LPS e por citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 nas células endoteliais próximas a PO/HA bem como a PGE sintase 1 (mPGES₁) que forma PGE₂ a partir dos endoperóxidos cíclicos (produtos da COX) são críticas para resposta febril de origem inflamatória. A deleção seletiva destas enzimas nas células endoteliais reduziu a febre induzida por LPS (WILHELMS; KIRILOV; MIRRASEKHIAN; ESKILSSON *et al.*, 2014). Na área pré-óptica do hipotálamo, a PGE₂ atua no receptor EP₃, um receptor acoplado a proteína Gi para induzir febre (LAZARUS; YOSHIDA; COPPARI; BASS *et al.*, 2007; USHIKUBI; SEGI; SUGIMOTO; MURATA *et al.*, 1998). Este receptor é expresso em grande quantidade no núcleo pré-óptico mediano (MnPO) que é a área do hipotálamo mais sensível às ações pirogênicas da PGE₂ (NAKAMURA; MATSUMURA; KANEKO; KOBAYASHI *et al.*, 2002). Os neurônios que expressam receptores EP₃ são neurônios inibitórios gabaérgicos que inibem vias descendentes responsáveis produção e conservação de calor (NAKAMURA; MATSUMURA; KANEKO; KOBAYASHI *et al.*, 2002). Particularmente, os receptores α e γ EP₃ são acoplados à proteína Gi, reduzindo portanto os níveis de fosfato cíclico de adenosina (AMPc) nestes neurônios o que leva a redução de sua atividade. Assim, a PGE₂ ao inibir os neurônios gabaérgicos, promove uma desinibição de vias descendentes que projetam-se para o hipotálamo dorso medial (DMH) e para rafe medular rostral (RMR) (NAKAMURA, 2011). Estas áreas, quando ativadas (desinibidas) ativam respostas de produção de calor como a ativação do tecido adiposo marrom e de conservação de calor como a vasoconstrição cutânea que resulta no aumento da temperatura corporal característico da febre (MORRISON; NAKAMURA, 2019; NAKAMURA, 2011).

Com relação aos outros mediadores centrais da febre, enquanto que a substância P parece participar de um mecanismo autócrino com a liberação de

prostaglandinas (prostaglandinas liberam substância P que promove a liberação de mais prostaglandinas) (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016a), outros parecem ser liberados paralelamente às prostaglandinas, como ET-1, opióides endógenos e CRF induzindo uma resposta febril independente da síntese destes eicosanóides (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015).

Durante a inflamação sistêmica, o organismo não apenas ativa respostas imunológicas periféricas, mas também desencadeia um conjunto coordenado de alterações comportamentais conhecidas como *sickness behavior* um estado adaptativo que visa redirecionar a energia do indivíduo para a recuperação fisiológica (BLUTHÉ; DANTZER; KELLEY, 1992; DANTZER, 2001; HART, 1988). Esse fenótipo comportamental é caracterizado por fadiga, anedonia, anorexia, febre, hipolocomoção e sonolência, refletindo a integração entre os sistemas imunológico, endócrino e nervoso central.

A mediação dessas respostas envolve a ação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que atuam tanto periféricamente quanto no sistema nervoso central, modulando circuitos neurais hipotalâmicos, pré-ópticos e mesolímbicos (DANTZER; KELLEY, 2007). Experimentos clássicos demonstraram que a administração central ou periférica dessas citocinas reproduz o espectro completo de *sickness behavior* em roedores, evidenciado pela diminuição da exploração social, da ingestão alimentar e da atividade espontânea (BLUTHÉ; DANTZER; KELLEY, 1992; BLUTHÉ; PAWLOWSKI; SUAREZ; PARNET *et al.*, 1994).

Diferenças sexuais têm sido consistentemente relatadas na magnitude dessas respostas. Fêmeas exibem maior sensibilidade neuroendócrina à administração de LPS, o que parece estar associado a uma ativação mais robusta do sistema serotoninérgico e a uma adaptação comportamental mais eficiente frente ao estresse inflamatório (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). Em contraste, estudos *in vitro* indicam que macrófagos derivados de camundongos machos liberam concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com LPS, enquanto as fêmeas desenvolvem tolerância endotóxica de forma mais rápida (MARRIOTT; HUET-HUDSON, 2006).

Entre as manifestações comportamentais mais precoces, a hipolocomoção destaca-se como um marcador sensível da resposta inflamatória aguda. Essa redução da atividade motora está associada à ativação de estruturas hipotalâmicas,

pré-ópticas e telencefálicas, incluindo o núcleo accumbens e o núcleo central da amígdala, regiões envolvidas na regulação motivacional e emocional do comportamento (FRENOIS; MOREAU; O'CONNOR; LAWSON *et al.*, 2007). Notavelmente, a hipolocomoção ocorre nas primeiras horas após a administração do LPS e se resolve espontaneamente, distinguindo-se de comportamentos tipo-depressivo observados em fases posteriores. Estes últimos emergem após cerca de 24 h, quando o animal já recuperou a mobilidade, e correlacionam-se com a ativação de circuitos límbicos, especialmente da amígdala e do hipocampo implicados na neurobiologia da depressão inflamatória (FRENOIS; MOREAU; O'CONNOR; LAWSON *et al.*, 2007).

Assim, o *sickness behavior* representa uma resposta neuroimune altamente conservada, na qual a inflamação periférica comunica-se com o cérebro para modular estados motivacionais e emocionais, refletindo uma estratégia evolutivamente adaptativa, porém potencialmente mal adaptada em condições crônicas.

1.2 ENDOTELINA-1 NA RESPOSTA FEBRIL

As endotelinas são uma família de peptídeos descoberta há mais de vinte anos, são constritores potentes dos vasos sanguíneos de mamíferos (INOUE; YANAGISAWA; KIMURA; KASUYA *et al.*, 1989) (INOUE; YANAGISAWA; KIMURA; KASUYA *et al.*, 1989). A ET-1 é um peptídeo que foi descoberto em 1988, ao ser isolada e sequenciada de um sobrenadante de cultura de células endoteliais aórticas, enquanto que a ET-2 e ET-3 foram descobertas após o isolamento dos genes relacionados a ET-1 (INOUE; YANAGISAWA; KIMURA; KASUYA *et al.*, 1989; YANAGISAWA; KURIHARA; KIMURA; TOMOBE *et al.*, 1988). Fatores físicos, bioquímicos e humorais regulam a transcrição do gene da ET-1 estimulando a síntese da pré-proendotelina-1. Este pré-hormônio é então transformado pelas endopeptidases em *big*-endotelina-1, que é a forma circulante no plasma, mas que é funcionalmente inativa (RUBANYI; POLOKOFF, 1994). As enzimas de conversão da endotelina (ECE), quinases e metaloproteases, clivam a *big*-endotelina entre as posições 21 (triptofano) e 22 (valina), liberando a forma ativa da ET-1 com 21 aminoácidos (RUBANYI; POLOKOFF, 1994).

Diversos estímulos inflamatórios desencadeiam a produção de ET-1 como endotoxinas, TNF- α e IL-1 β (WANECEK; WEITZBERG; RUDEHILL; OLDNER, 2000). A expressão dos receptores da endotelina é regulada em paralelo com a expressão da ET-1. Existem dois receptores para a endotelina: o receptor ET_A e o receptor ET_B. O receptor ET_A e o receptor ET_B são farmacologicamente caracterizados pelas suas afinidades pelas diferentes endotelinas: o receptor ET_A tem afinidade pela ET-1 e ET-2 e 100 vezes menos afinidade pela ET-3, enquanto que o receptor ET_B apresenta afinidade igual para todos os ligantes (BARTON; YANAGISAWA, 2008).

Em 1998, Fabrício e colaboradores demonstraram que a resposta febril induzida por LPS em ratos machos foi reduzida pelo tratamento dos animais com o antagonista de receptores ET_B BQ788 administrado por via i.c.v. mas não pelo antagonista de receptores ET_A BQ123 (FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998). A injeção i.c.v. e intra-hipotalâmica de ET-1 também induziu febre e esta resposta foi acompanhada pela ativação de vasoconstrição periférica, um mecanismo de conservação de calor ativado pelo hipotálamo, confirmando a atividade pirogênica deste peptídeo (FABRICIO; RAE; D'ORLEANS-JUSTE; SOUZA, 2005; FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998). A febre induzida por ET-1 em ratos se dá independentemente da síntese de prostaglandinas pois não foi reduzida pelos inibidores de cicloxigenase (FABRICIO; VEIGA; CRISTOFOLETTI; NAVARRA *et al.*, 2005). Os níveis do precursor de ET-1, *big*-endotelina, e da própria ET-1 aumentaram no fluido cérebro-espinhal de ratos após a administração de LPS (FABRICIO; RAE; D'ORLEANS-JUSTE; SOUZA, 2005). No entanto, este peptídeo não participa da febre induzida por IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂ e PGEF_{2 α} (FABRICIO; RAE; ZAMPRONIO; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2006; FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998). Estes dados em conjunto sugerem que a ET-1 é um mediador central da resposta febril induzida por LPS, atuando através da ativação de receptores ET_B no hipotálamo que atua paralelamente e independentemente da síntese de prostaglandinas.

1.3 DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA.

Em modelos de inflamação sistêmica bacteriana, ratas com ciclo estral intacto apresentam respostas febris atenuadas ao LPS em comparação aos machos (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016b; MOUIHATE; PITTMAN, 2003). Essa diferença é abolida pela ovariectomia, implicando os hormônios ovarianos especialmente o estrogênio como moduladores-chave da resposta febril. Estudos demonstraram que o estrogênio reduz a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), da prostaglandina E₂ (PGE₂) e dos receptores EP₃, contribuindo assim para a atenuação da febre (BRITO; BARBOSA; REIS; FRAGA *et al.*, 2016; COELHO; CRUZ; MABA; ZAMPRONIO, 2021). Essa resposta atenuada não se limita a estímulos bacterianos, mas também se estende a miméticos virais e fúngicos, como o ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C) e a Zymosan (COELHO; CRUZ; MABA; ZAMPRONIO, 2021). No entanto, a influência dos hormônios sexuais vai além da sinalização por prostaglandinas. Enquanto fêmeas com ciclo estral intacto respondem a uma variedade de pirógenos endógenos incluindo interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α /CCL3 e endotelina-1 (ET-1) fêmeas ovariectomizadas apresentam resposta febril apenas à IL-1 β (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020; BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016b). Esses achados sugerem que a ausência de hormônios ovarianos altera a sinalização pirógena central de forma não atribuível apenas à quantidade de mediadores ou à expressão de receptores. Por exemplo, a expressão de receptores hipotalâmicos de ET-1 permanece inalterada após a ovariectomia, embora a administração exógena de ET-1 não induza febre nesses animais (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020). Além disso, o sistema endotelinérgico parece estar regulado positivamente na ausência de hormônios sexuais femininos (MALEKI; KHOSH RAVESH; SALEHIYEH; FAISAL FAIZ *et al.*, 2022; TAN; WANG; YANG; FU *et al.*, 2003).

Além da participação clássica das citocinas e prostaglandinas na mediação central da inflamação sistêmica, evidencia-se que sistemas neurotransmissores exercem papel decisivo na modulação sexo-dependente dessas respostas. Entre esses sistemas, a sinalização serotoninérgica tem se destacado como um modulador crítico das adaptações neuroimunes ao LPS. A área pré-óptica do hipotálamo, núcleo-chave da termorregulação, recebe inervação densa de neurônios

serotoninérgicos oriundos do núcleo dorsal da rafe, estabelecendo um eixo funcional capaz de integrar sinais térmicos, autonômicos e inflamatórios (MORRISON; NAKAMURA, 2019; NAKAMURA, 2011).

Em ratos machos, há evidências consistentes de que a 5-hidroxitriptamina (5-HT) hipotalâmica exerce um papel anti-inflamatório significativo durante a febre induzida por LPS. A administração exógena de 5-HT nessa região reduz a magnitude da febre, inibe a síntese de prostaglandinas e suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, tanto no plasma quanto no baço (MOTA; BORGES; AMORIM; CAROLINO *et al.*, 2019; MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Esses efeitos têm sido amplamente atribuídos à ativação do chamado *reflexo inflamatório*, um circuito neuroimune descrito por (TRACEY, 2002) no qual sinais aferentes provenientes da inflamação periférica são integrados no SNC e modulados por vias eferentes capazes de limitar a liberação sistêmica de citocinas (PAVLOV; TRACEY, 2005).

Embora tradicionalmente associado à via colinérgica vagal, estudos recentes ampliam esse conceito ao demonstrar que monoaminas centrais, especialmente a 5-HT, podem atuar como reguladores adicionais desse reflexo, ajustando a sensibilidade inflamatória e o balanço autonômico de maneira dependente do sexo (MARTELLI; YAO; MCKINLEY; MCALLEN, 2014) (CHAVAN; PAVLOV; TRACEY, 2017). Assim, no contexto do LPS, a 5-HT hipotalâmica não apenas modula a febre, mas emerge como um elo fundamental entre o SNC e o sistema imune, contribuindo para a compreensão dos mecanismos neuroquímicos que sustentam o dimorfismo sexual observado durante a inflamação sistêmica.

Achados recentes de nosso laboratório demonstraram um claro dimorfismo sexual nos níveis hipotalâmicos de 5-HT durante a inflamação sistêmica. A administração de LPS reduz os níveis de 5-HT em machos, mas os aumenta em fêmeas (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024). Notavelmente, a administração i.c.v. de BQ788, um antagonista seletivo de receptores ET_B, bloqueou essas alterações induzidas por LPS em ambos os sexos, implicando a ET-1 como mediadora chave desse dimorfismo.

Apesar desses achados, o local exato de ação da ET-1 permanece incerto. Considerando que as projeções serotoninérgicas para o hipotálamo se originam no núcleo dorsal da rafe, é possível que a ET-1 atue em regiões mais anteriores, embora seus efeitos pirógenos já tenham sido demonstrados após administração

direta no hipotálamo em ambos os sexos (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020; FABRICIO; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE; SOUZA, 2005).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar se o bloqueio de receptores ET_B especificamente no hipotálamo é suficiente para modular a febre, o comportamento de doença (hipolocomoção) e os níveis hipotalâmicos de 5-HT em ratos machos e fêmeas.

2 HIPÓTESE

Com base em evidências prévias do nosso grupo de pesquisa, levantou-se a hipótese de que a ET-1, ao sinalizar por meio de receptores ET_B no hipotálamo, atuaria como mediadora central da resposta febril e do comportamento de doença de forma sexualmente dimórfica, modulando os níveis hipotalâmicos de 5-HT em machos e fêmeas. Os experimentos realizados permitiram investigar se o bloqueio seletivo dos receptores ET_B no hipotálamo seria suficiente para reverter essas alterações neuroquímicas e comportamentais, evidenciando a dependência funcional da ação local da ET-1 e da regulação hormonal feminina.

3 OBJETIVOS

Avaliar se o hipotálamo é o sítio de ação das endotelinas para indução de febre, comportamento de doença (hipolocomoção) e pelas alterações nos níveis de 5-HT em ratos machos e fêmeas, identificando possíveis diferenças entre os sexos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a injeção intra-hipotalâmica de substâncias através de avaliação morfológica e funcional.
- Avaliar o efeito da administração intra-hipotalâmica de BQ788 na resposta febril, na movimentação espontânea e nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e de seu metabolito 5-HIAA de ratos machos e fêmeas após a administração de LPS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os protocolos experimentais foram conduzidos com ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com 90 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram alojados em grupos de quatro por gaiola, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), sob ciclo claro/escuro de 12 h (luz acesa às 07h00), com acesso *ad libitum* à ração padrão e água filtrada.

A estimativa do tamanho amostral foi realizada utilizando o software G*Power 3.1, considerando um tamanho de efeito padronizado ($F = 0,5$), poder estatístico de 0,85 e nível de significância de $\alpha = 0,05$, resultando em um mínimo de cinco animais por grupo.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Instituição (CEUA-BIO/UFPR, protocolo nº 1601) e conduzidos em estrita conformidade com as Diretrizes Internacionais para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, bem como com as Diretrizes Brasileiras para Experimentação Animal estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes internacionais para o uso de animais em pesquisa, em conformidade com as recomendações do Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE), versão 2.0. O delineamento experimental, a alocação dos animais nos grupos, a condução dos experimentos e a análise dos dados foram planejados de modo a reduzir o número de animais utilizados e minimizar o sofrimento, respeitando os princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction e Refinement).

4.2 REAGENTES

Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 0111:B4, prostaglandina E_2 e o antagonista seletivo de receptores ET_B 2,6-dimetilpiperidinocarbonil- γ -metil-Leu-Nin-(metoxycarbonil)-D-Trp-D-Nle, N-[N-[N-[(2,6-dimetil-1-piperidinil)carbonil]-4-metil-L-leucil]-1-(metoxycarbonil)-D-triptofílico]-D-norleucina sal de sódio (BQ788) foram

adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Cetamina, xilazina e isoflurano foram adquiridos da Syntec do Brasil Ltda (Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Terramicina e cetoprofeno foram de grau comercial.

4.3 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA

Os animais receberam uma cânula-guia no sistema nervoso central uma semana antes do início dos experimentos. Para esse procedimento, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após ser confirmada a ausência de respostas a estímulos nociceptivos, os animais foram imobilizados em um aparelho estereotático com inclinação da barra incisal de 3,3 mm (PAXINOS; WATSON, 2014). Aproximadamente 0,2 ml de solução de lidocaína a 2% com vasoconstritor foi administrada por via subcutânea na região superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele para exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo, contribuindo para a inibição de estímulos dolorosos, redução da sensibilização de fibras e redução do sangramento. Após a limpeza do local, os parâmetros estereotáticos utilizados para perfuração do crânio e implantação da cânula foram: para administração i.h., 7,7 mm anterior à linha interauricular, -0,6 mm lateralmente e 6,5 mm de profundidade; para administração i.c.v., -0,8 mm posterior ao bregma, -1,5 mm lateralmente e 2,5 mm de profundidade. Uma cânula-guia esterilizada (19 x 0,7 mm) foi fixada ao estereotático e inserida no tecido cerebral. A cânula foi fixada ao crânio com acrílico polimerizável e parafusos.

Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção de oxitetraciclina (Terramicina, 400 mg/kg, i.m.) como profilaxia cirúrgica e cetoprofeno (15 mg/kg, por via oral, durante dois dias) para analgesia. Nos experimentos com injeção i.h., foi realizado treinamento prévio para posicionamento da cânula por meio da injeção de 0,5 µl de azul de Evans (2,5% em solução salina). Os experimentos foram iniciados apenas quando o posicionamento correto foi alcançado em 90% dos animais. A justificativa para este procedimento foi a impossibilidade de avaliar o posicionamento da cânula ao final dos experimentos onde se faria a coleta do hipotálamo para quantificação de 5-HT.

Nos experimentos com injeção i.c.v., o posicionamento da cânula foi verificado ao final do experimento por meio da injeção de 2 µl de azul de Evans (2,5% em solução salina). A presença do corante no ventrículo lateral foi verificada macroscopicamente. Animais que apresentaram deslocamento da cânula, obstrução durante a injeção ou perda de peso corporal anormal após a cirurgia foram excluídos do estudo.

4.4 IMPLANTAÇÃO DE REGISTRADORES REMOTOS DE TEMPERATURA

Sob a mesma anestesia utilizada para a implantação da cânula, os animais receberam transmissores remotos para registro da temperatura corporal (Subcue Dataloggers, Calgary, Canadá), implantados na cavidade peritoneal (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024). Após uma laparotomia de aproximadamente 2 cm ao longo da linha média do abdômen, os transmissores previamente programados e esterilizados foram implantados na cavidade peritoneal, com sutura separada dos músculos e da pele.

4.5 ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Para as administrações i.h. e i.c.v., os tratamentos foram realizados assepticamente utilizando uma agulha de calibre 30 conectada a um tubo de polietileno-10, com volume de 0,5 µl para i.h. e 2 µl para i.c.v. A agulha excedia a cânula-guia em 2 mm em ambos os casos. O fluxo das injeções i.h. foi controlado por uma bomba eletrônica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) a uma taxa de 0,5 µl por minuto. Para as injeções i.c.v., o volume foi administrado manualmente durante aproximadamente 1 minuto.

4.6 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

No dia anterior ao experimento, os animais foram transferidos para uma sala com temperatura ambiente de 28 ± 1 °C, considerada a zona termoneutra para ratos (GORDON, 1990), para habituação. Nesse mesmo dia, os animais também foram submetidos à manipulação simulada de injeção por três vezes com o objetivo de reduzir o estresse durante o procedimento a ser realizado no dia do experimento. No dia seguinte, os dispositivos previamente programados iniciaram o registro da temperatura corporal automaticamente às 7h00. A temperatura corporal foi avaliada a cada 15 min por pelo menos 2 h antes de qualquer manipulação, a fim de obter os níveis basais de temperatura de cada animal.

Entre 9h00 e 11h00, os animais receberam os tratamentos conforme o protocolo experimental, e a temperatura corporal foi registrada a cada 15 min durante 5 h. Após a injeção do estímulo pirogênico (LPS), a iluminação da sala experimental foi reduzida (40 lux) e, ao final das 5 h, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto na mesma sala.

No experimento em que a PGE₂ foi injetada no hipotálamo, a temperatura corporal foi avaliada por apenas 2 h uma vez que este pirogênio promove uma resposta de curta duração.

4.7 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO ESPONTÂNEA

A locomoção espontânea foi avaliada por meio do teste de campo aberto, 5 h após a administração do pirógeno. Cada rato foi colocado individualmente no centro do aparato de campo aberto (um quadrado de 60 cm x 60 cm dividido em 9 quadrantes) e sua movimentação no aparato registrada por câmera por 3 min para análise posterior. A iluminação reduzida da sala (40 lux) favorece a movimentação do animal no aparato do campo aberto em condições normais.

O aparato foi higienizado com etanol a 70% após o teste de cada animal a fim de evitar efeitos relacionados a odores residuais. O número de cruzamentos, a distância percorrida e a velocidade foram analisados utilizando o software Ethovision® (Noldus, Wageningen, Países Baixos).

4.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais descritos abaixo aparecem esquematizados na Figura 1 para auxiliar na compreensão.

4.9 INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE PGE₂

Como a localização das injeções i.h. não pôde ser verificada ao final do experimento, as coordenadas foram previamente testadas por meio da injeção de azul de Evans seguida de avaliação funcional (Fig.1A).

Ratos machos receberam azul de Evans (0,5 µl) e em seguida foram anestesiados, o cérebro retirado e colocado em formaldeído 4% para análise posterior. Os cérebros foram então seccionados em vibratomo e a posição do corante compara com o Atlas de Paxinos & Watson.

Quando o nível de acerto na região hipotalâmica atingiu 90%, um novo grupo de animais foi preparado e os ratos receberam uma injeção i.h. de PGE₂ (50 ng, 0,5 µl) ou veículo. A temperatura corporal dos animais foi avaliada como descrito.

4.10 INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE BQ788

Após o período de avaliação da temperatura basal, ratos machos e fêmeas receberam uma injeção i.h. de BQ788 (0,6 pmol, 0,5 µl) ou o mesmo volume de veículo (solução salina). Após 30 min, os animais receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal e a locomoção espontânea foram avaliadas conforme descrito anteriormente, e o hipotálamo foi coletado para análise de neurotransmissores (Fig. 1B).

4.11 INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE BQ788

Para confirmar a eficácia do BQ788, após o período de avaliação da temperatura basal as ratas receberam uma injeção i.c.v. de BQ788 (6,0 pmol, 2 µl) ou o mesmo volume de veículo (solução salina). Após 30 min, os animais receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal e a locomoção espontânea foram avaliadas conforme descrito anteriormente, e o hipotálamo foi coletado para análise de neurotransmissores (Fig. 1C).

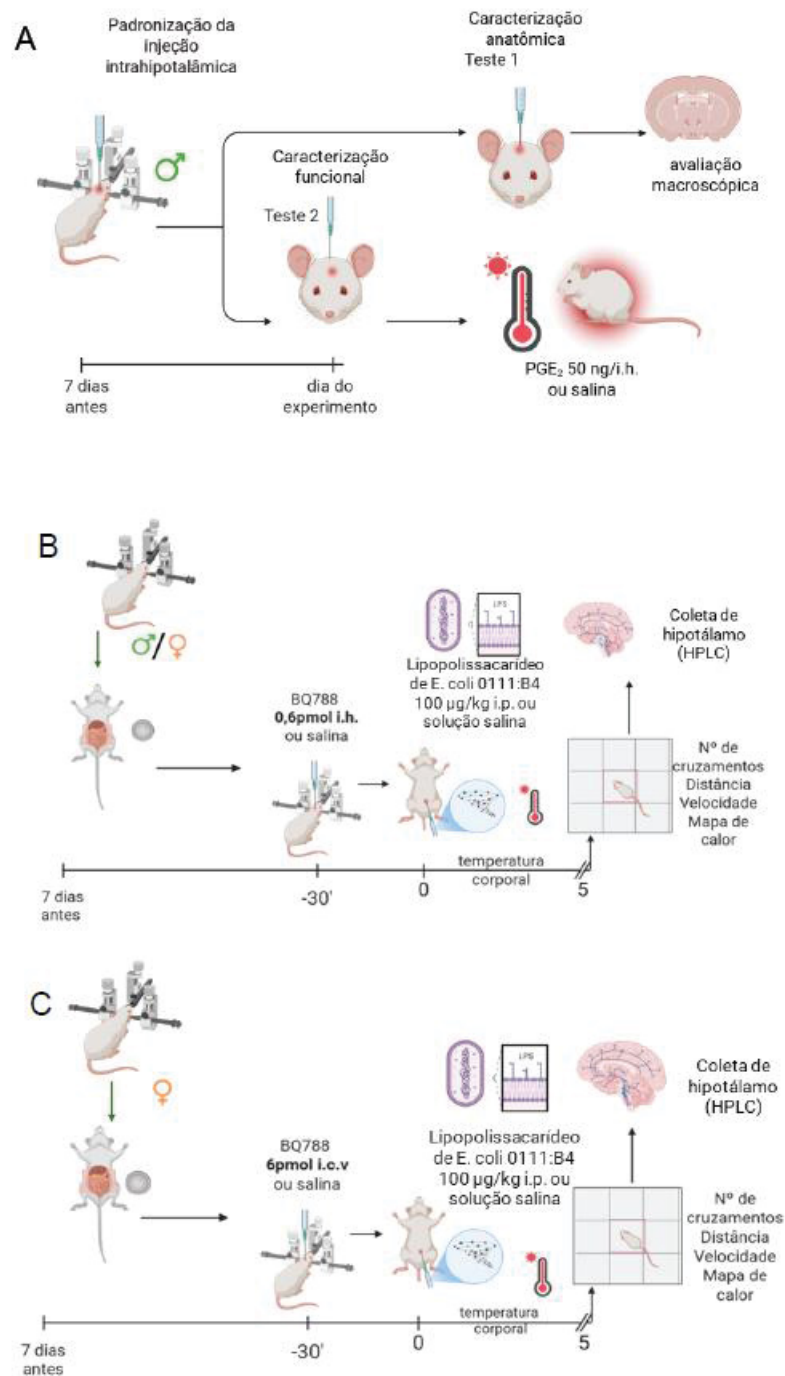


Figura 1: Linha do tempo dos protocolos experimentais. Em A, caracterização anatômica e funcional da administração i.h. em ratos machos. Em B, protocolo experimental da injeção i.h. de BQ788 em ratos machos e fêmeas. Em C protocolo experimental da injeção i.c.v. de BQ788 em ratos fêmeas. Criado com BioRender.com.

4.12 COLETA DO HIPOTÁLAMO

Imediatamente após a avaliação da locomoção espontânea no campo aberto, os animais foram anestesiados com halotano e então submetidos a guilhotina para separação da cabeça. Os ossos cranianos foram rapidamente e cuidadosamente removidos e o cérebro posicionado com sua superfície ventral para cima em uma placa de Petri mantida no gelo. O hipotálamo foi rapidamente separado, colocado em tubos previamente pesados e imediatamente congelado em gelo seco. Ao final da coleta de todos os animais, os tubos foram novamente pesados para determinação da massa de amostra em cada tudo e então congelados a -80°C até a dosagem por HPLC.

4.13 DOSAGEM DE SEROTONINA E SEU METABÓLITO POR HPLC

As amostras de tecido foram homogeneizadas com um disruptor ultrassônico em ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e um padrão interno (50 ng/ml de 3,4-dihidroxibenilamina, Sigma-Aldrich). As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. 20 µl do sobrenadante foram injetados no sistema de HPLC. A fase móvel consistia em 20 g de ácido cítrico monoidratado (Merck), 200 mg de sal de sódio de ácido octano-1-sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminotetracético (Sigma-Aldrich) e 900 ml de água deionizada grau HPLC, filtrada em filtro de 0,45 µm. Metanol (Merck) foi então adicionado para uma composição final de 10% de metanol (v/v). As concentrações de 5-HT e 5-HIAA foram avaliadas por HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica. O sistema consistia em uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RPC-18 (150 × 4,6 mm de diâmetro interno, 4 µm de tamanho de partícula), equipada com pré-coluna de 4 × 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP), detector eletroquímico ESA Coulochem III com célula de proteção (ESA 5020) ajustada a 350 mV e célula analítica de duplo eletrodo (ESA 5011A), e bomba LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipada com injetor manual Rheodyne 7725 com alça de 20 µl. A coluna foi mantida em estufa com temperatura controlada (25 °C, Shimadzu, Kyoto, Japão). A célula possuía duas câmaras em série, cada uma com eletrodo colorimétrico de grafite poroso, eletrodo duplo de referência e eletrodo duplo auxiliar. Os potenciais de oxidação foram ajustados em 100 mV para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo. Os neurotransmissores foram detectados no segundo eletrodo. As áreas dos picos dos padrões foram utilizadas para quantificação dos picos das amostras. Os dados foram expressos em ng/g de tecido com base em estudos anteriores (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024).

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados no estudo utilizando-se a média $\pm$ erro padrão da média. A resposta febril foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas em duas vias, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Como análise complementar, estas respostas também foram analisadas pelo índice de febre. Para o cálculo deste índice, a temperatura basal de cada animal foi calculada pela média de pelo menos quatro medidas obtidas antes de qualquer injeção. Em seguida, foi calculada a variação da temperatura corporal de cada animal em relação a basal, e a área sob esta curva entre a segunda e quinta hora após a injeção (período em que ocorre a febre induzida por LPS) foi determinada como índice de febre.

O índice de febre bem como os dados do teste de campo aberto (número de cruzamentos, distância percorrida e velocidade) e os níveis de neurotransmissores foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni ou pelo teste t de Student, conforme apropriado.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 10 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

A Figura 2A mostra os locais de injeção do corante no hipotálamo. Os experimentos para a análise funcional somente foram iniciados apenas quando pelo menos 90% das injeções foram localizadas na mesma região, uma vez que o hipotálamo precisaria ser coletado para análise de neurotransmissores. A figura apresentada demonstra a localização das injeções nos últimos animais testados, denotando a precisão da localização da cânula.

Para caracterizar funcionalmente o local de injeção, baixas doses de PGE_2 foram administradas no hipotálamo. A administração i.h. de PGE_2 induziu uma resposta febril que iniciou 60 min após a injeção e persistiu até 90 min (Fig. 2B), reduzindo a níveis normais na medida subsequente. A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre tempo e tratamento ($F_{(12, 144)} = 6,156$ $P < 0,0001$). O índice de febre apresentou diferenças estatísticas entre os grupos que receberam veículo (salina) e PGE_2 (Fig. 2C, teste t não pareado, $t_{(12)} = 2,661$, $p = 0,0207$).

Nos experimentos seguintes, avaliamos o efeito do antagonista de receptores ET_B , BQ788, administrado diretamente no hipotálamo de ratos machos e fêmeas antes da administração de LPS.

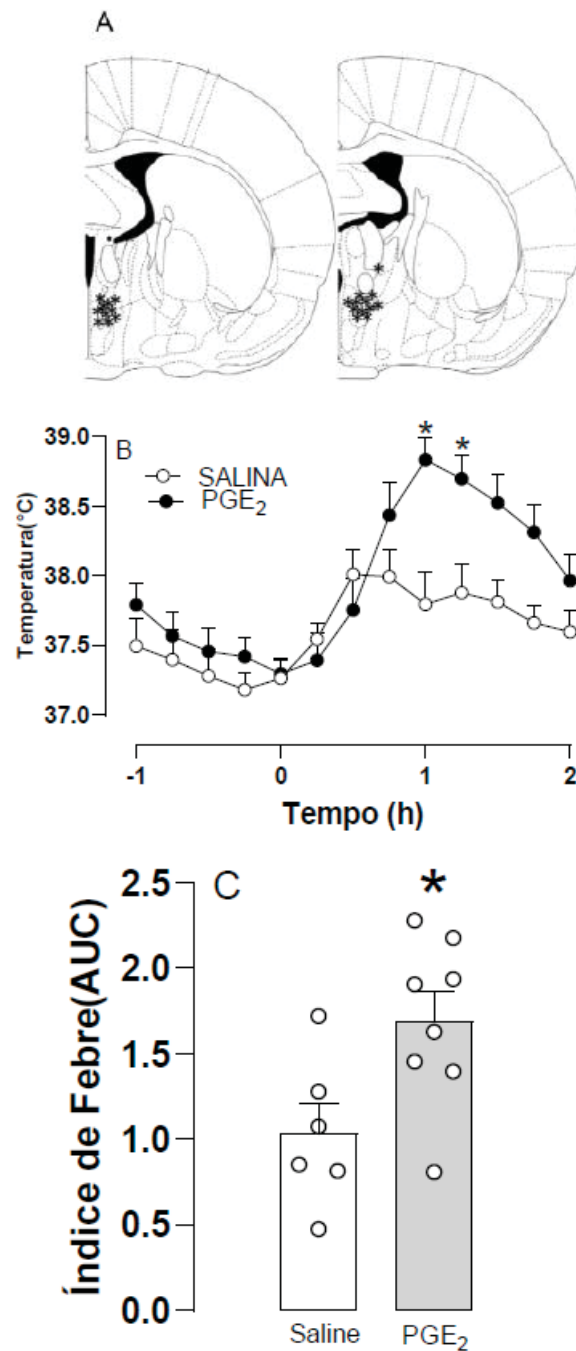


Figura 2: **Caracterização anatômica e funcional da injeção i.h. em ratos machos.** Em (A), localização dos sítios de injeção em experimento preliminar onde os animais receberam somente o Azul de Evans. Os sítios marcados com o corante são identificados com *. Em (B), os animais receberam PGE₂ (50 ng, 0,5 µl, i.h.) ou o mesmo volume de solução salina, e a temperatura corporal foi avaliada por 2 h. Em (C), o índice febril calculado como área sob a curva (AUC) da variação da temperatura corporal. Os dados representam a média ± erro padrão da média da temperatura corporal (°C) ou do índice de febre em unidades arbitrárias (n = 6-8). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina, p < 0,05.

A administração de veículo ou BQ788 no hipotálamo de ratos machos e fêmeas não induziu alterações significativas na temperatura corporal (Fig. 3A-D). A administração de LPS induziu uma resposta febril em ambos os sexos, com início entre 2 e 3 h após a injeção (Fig. 3A e 3C). Em ratos machos, o pré-tratamento i.h. com BQ788 reduziu significativamente a resposta febril a partir da terceira hora até o final do experimento (Fig. 3A). A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre tempo e tratamento ($F_{(72, 408)} = 7,315$, $p < 0,0001$). O índice de febre induzido por LPS foi reduzido em ~55-60% pelo pré-tratamento com BQ788, quando comparado ao grupo SAL+LPS. O índice de febre também apresentou uma redução significativa com o BQ788 (Fig. 3B, $F_{(3, 17)} = 6,650$, $p < 0,0036$). De maneira inesperada, a administração da mesma dose do antagonista de receptores ET_B BQ788 em ratas não alterou a resposta febril (Fig. 3B). A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre tempo e tratamento ($F_{(72, 408)} = 8,362$, $p < 0,0001$) a qual se restringe ao aumento da resposta febril induzida por LPS, uma vez que o índice de febre foi aumentado em ~120-130% em relação ao grupo SAL+SAL, e não foi reduzido pelo tratamento com BQ788. O índice de febre também não apresentou redução significativa com o BQ788 (Fig. 3D, $F_{(3, 17)} = 22,42$, $p < 0,0001$).

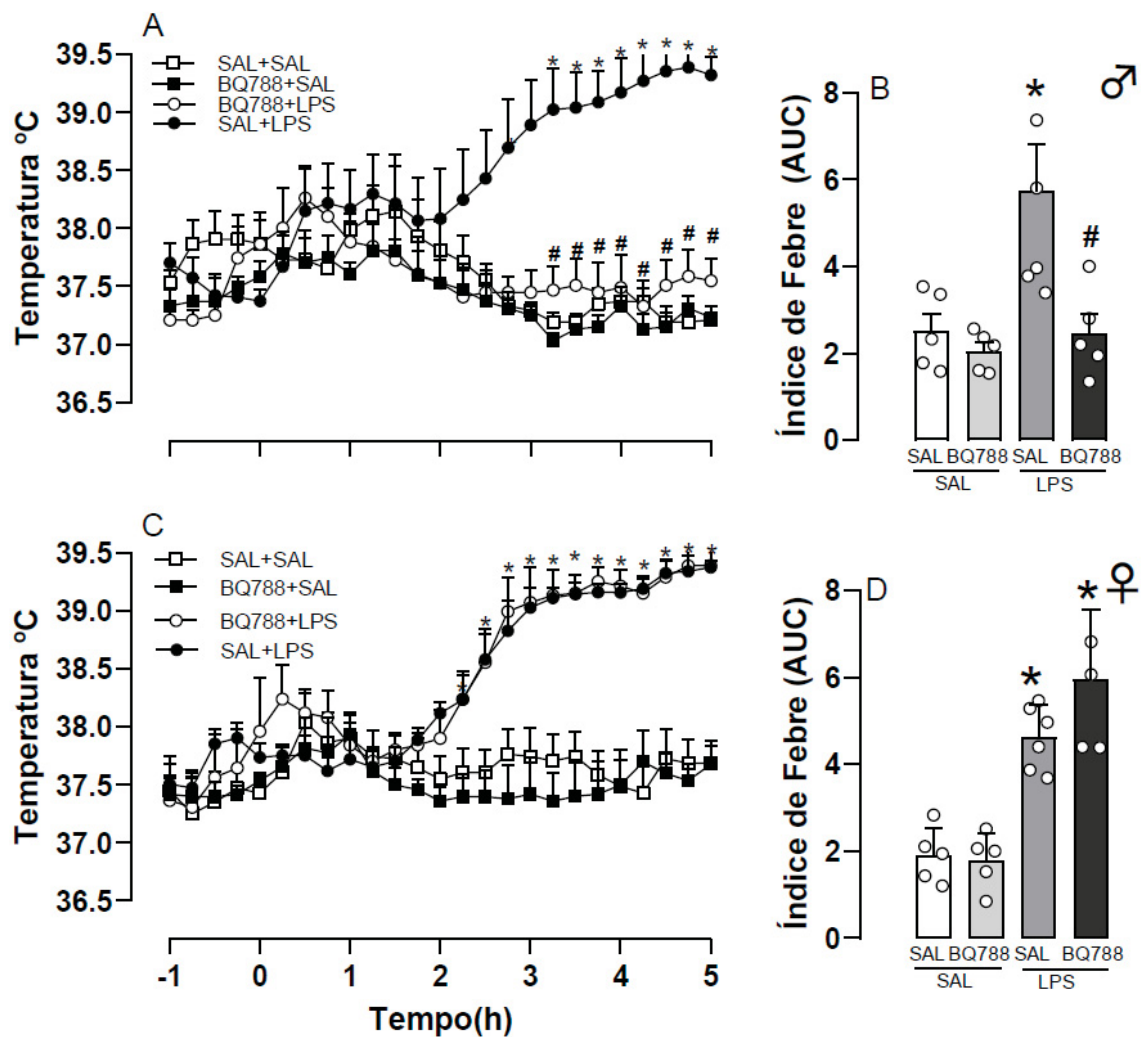


Figura 3: Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 na resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas. Ratos machos (A,B) e fêmeas (C,D) receberam BQ788 (0,6 pmol, 0,5 µl) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). Nos painéis A e C, a temperatura corporal foi avaliada a cada 15 min durante 5 h após a injeção de LPS. Nos painéis B e D, o índice de febre calculado como área sob a curva (AUC). Os dados representam a média ± erro padrão da média (°C) ou o índice de febre em unidades arbitrárias (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, p < 0,05. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, p < 0,05.

A Figura 4 demonstra que a administração de LPS em ratos machos e fêmeas promoveu uma redução significativa da locomoção espontânea no teste de campo aberto. Em ratos machos, o LPS reduziu a velocidade locomotora em ~60% em relação ao grupo SAL+SAL (Fig. 4A, $F_{(3,17)}=10,45$; $p=0,0004$), bem como a distância total percorrida em cerca de 30% (Fig. 4B, $F_{(3,17)}=5,171$; $p=0,0101$) e o número de cruzamentos em ~50% (Fig. 4C, $F_{(3,17)}=24,16$; $p<0,0001$). Notavelmente, a administração intra-hipotalâmica de BQ788 foi capaz de reverter esses efeitos em machos, promovendo aumentos de ~ 170-180% na velocidade, 35-40% na distância percorrida e 90-100% no número de cruzamentos quando comparado ao grupo SAL+LPS, restaurando valores próximos aos observados no grupo controle.

Em ratas fêmeas, o LPS também induziu hipolocomoção significativa, reduzindo a velocidade em cerca de 30-35% (Fig. 4E, $F_{(3,17)}=12,70$; $p=0,0001$), a distância percorrida em ~20-25% (Fig. 4F, $F_{(3,17)}=6,275$; $p=0,0046$) e o número de cruzamentos em torno de 55-60% (Fig. 4G, $F_{(3,17)}=8,883$; $p=0,0009$), em comparação ao grupo SAL+SAL. Contudo, diferentemente do observado em machos, o tratamento com o antagonista de receptores ET_B não modificou significativamente a redução desses parâmetros em fêmeas, indicando ausência de reversão da hipolocomoção induzida pelo LPS.

As Figuras 4D e 4H ilustram mapas de calor representativos do deslocamento de um animal por grupo experimental, evidenciando qualitativamente os padrões de exploração do campo aberto em machos e fêmeas, respectivamente.

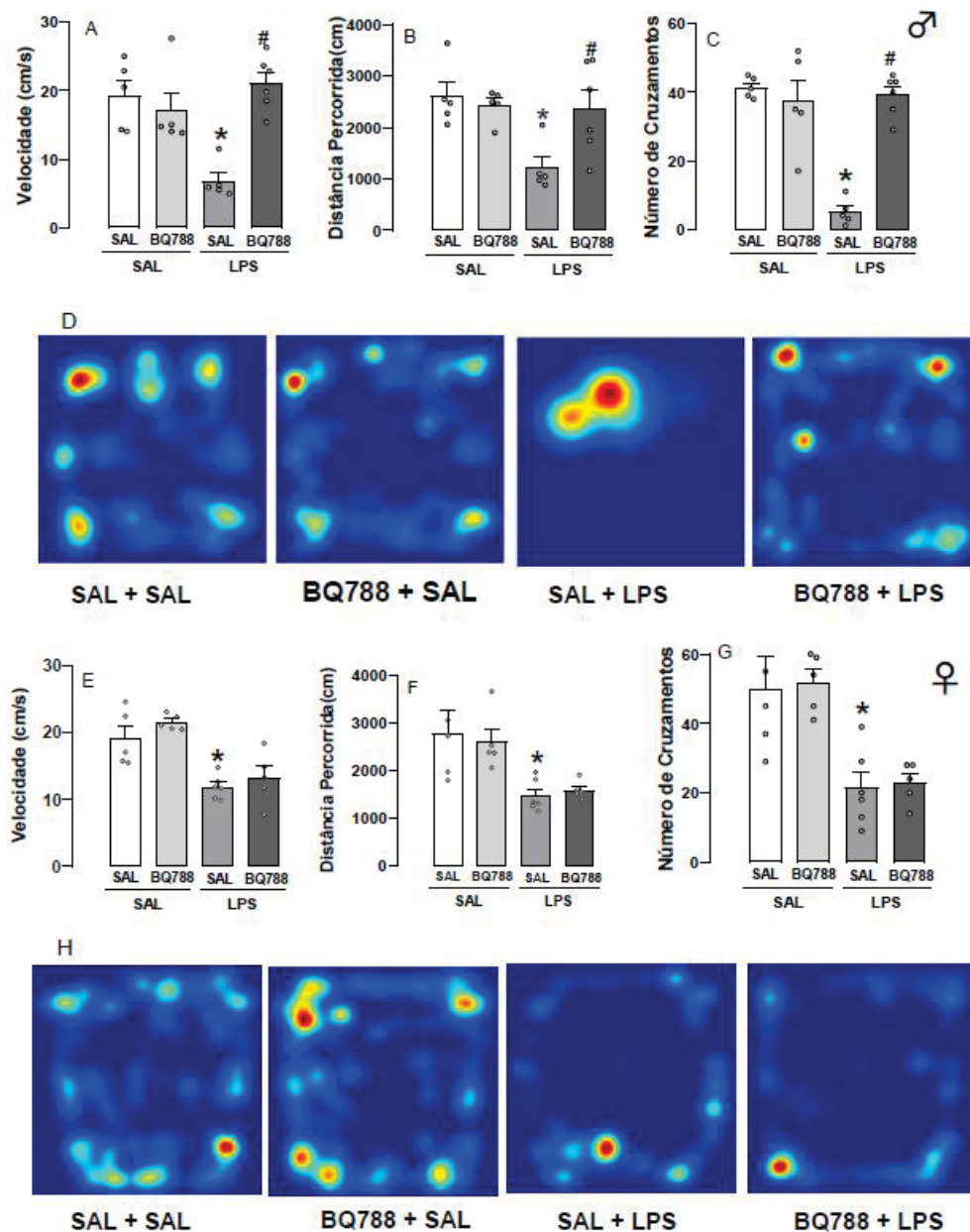


Figura 4: **Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos machos e fêmeas.** Ratos machos (A-D) ou fêmeas (E-H) receberam BQ788 (0,6 pmol, 0,5 µl) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). A locomoção espontânea foi avaliada no aparato de campo aberto 5 h após a injeção de LPS, durante 3 min. Os dados representam a média ± erro padrão da média velocidade (cm/s, A e E), da distância percorrida (cm, B e F) e do número de cruzamentos (C e G). Os painéis D e H exemplificam o comportamento de um animal em cada grupo através do mapa de calor para machos e fêmeas, respectivamente (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, $p < 0,05$. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, $p < 0,05$.

A Figura 5 mostra que a administração i.h. do antagonista de receptores ET_B BQ788, isoladamente, não alterou os níveis hipotalâmicos de 5-HT nem de seu metabólito 5-HIAA em ratos machos ou fêmeas. Em ratos machos, a administração de LPS promoveu uma redução significativa dos níveis hipotalâmicos de 5-HT, cerca de 50-60% em relação ao grupo SAL+SAL (Fig. 5A), bem como uma diminuição de ~40-50% nos níveis de 5-HIAA (Fig. 5B). A ANOVA de duas vias indicou que o tratamento i.h. com BQ788 reverteu essas reduções, promovendo um aumento de cerca de 120-150% nos níveis de 5-HT (Fig. 5A, $F_{(3,17)}=9,355$; $p=0,0007$) e de ~80-100% nos níveis de 5-HIAA (Fig. 5B, $F_{(3,17)}=8,330$; $p=0,0013$), quando comparado ao grupo SAL+LPS, restaurando valores próximos aos do controle.

Em ratas fêmeas, por outro lado, a administração de LPS induziu um aumento significativo dos níveis hipotalâmicos de 5-HT, em torno de 120-140% em relação ao grupo SAL+SAL (Fig. 5C), assim como um aumento de aproximadamente 100-120% nos níveis de 5-HIAA (Fig. 5D). O tratamento i.h. com BQ788 foi capaz de reverter esse aumento induzido pelo LPS, reduzindo os níveis de 5-HT em cerca de 45-55% (Fig. 5C, $F_{(3,17)}=14,28$; $p<0,0001$) e os níveis de 5-HIAA em aproximadamente 40-50% (Fig. 5D, $F_{(3,17)}=22,88$; $p<0,0001$), em comparação ao grupo SAL+LPS.

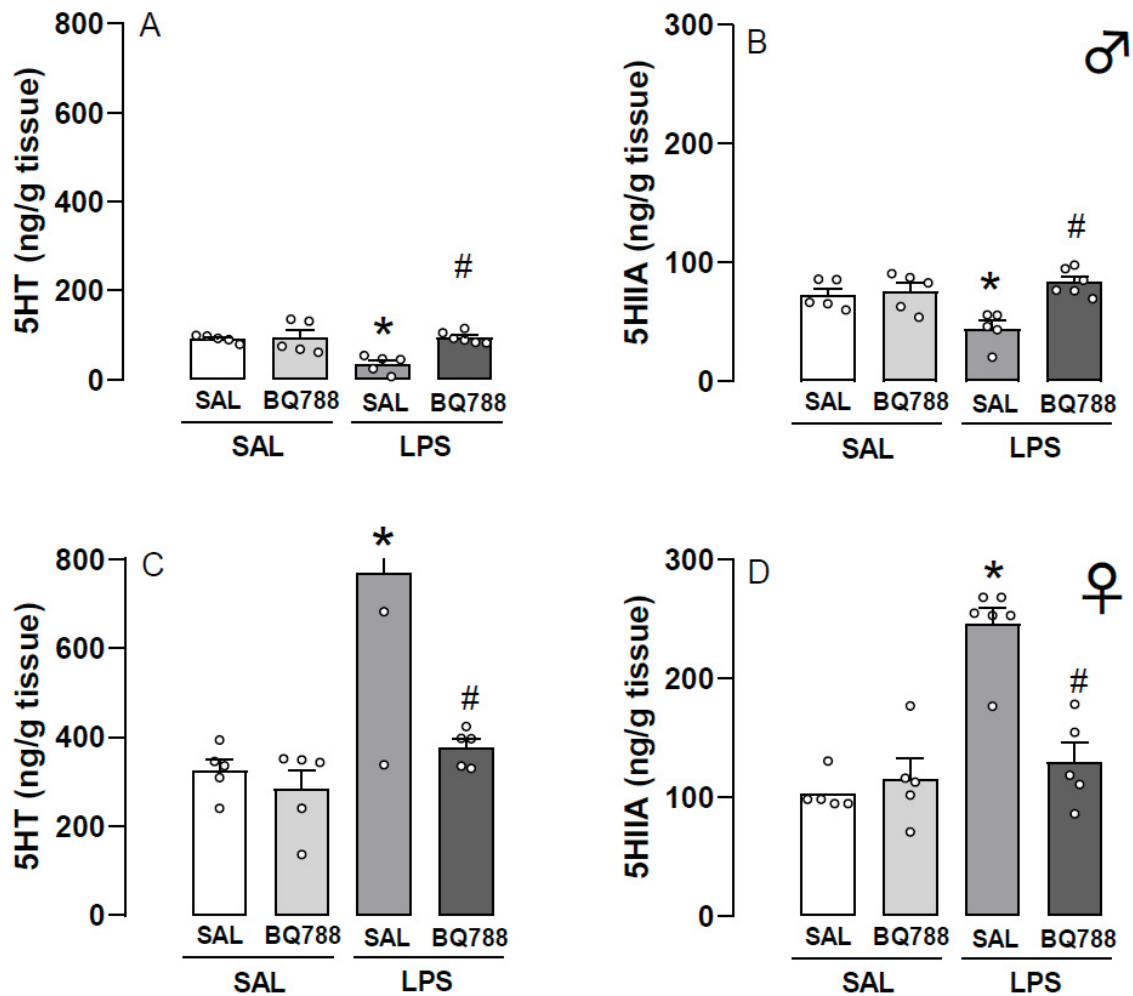


Figura 5: Efeito da injeção intra-hipotalâmica de BQ788 nas alterações de 5-HT/5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas. Ratos machos (A,B) e fêmeas (C,D) receberam BQ788 (0,6 pmol, 0,5 µl) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). O hipotálamo foi coletado após 5 h e os níveis de 5-HT e 5-HIAA foram avaliados por HPLC. Os dados representam a média ± erro padrão da média dos níveis de 5-HT (A, C) ou 5-HIAA (B,D) no hipotálamo (ng/g de tecido) (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, $p < 0,05$. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, $p < 0,05$.

Como a administração de BQ788 no hipotálamo não foi eficaz em reduzir a resposta febril induzida por LPS em fêmeas, a mesma solução foi testada por via i.c.v. . Conforme mostrado na Figura 6, a injeção i.c.v. do antagonista de receptores ET_B BQ788 reduziu a resposta febril induzida por LPS em fêmeas. O tratamento i.c.v. com BQ788 promoveu uma atenuação significativa dessa resposta, reduzindo a febre em ~40-50% quando comparado ao grupo SAL+LPS, valores próximos ao basal. A análise por ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre tempo e tratamento (Fig. 6A, $F_{(72, 408)}=11,77$; $p<0,0001$), indicando que o efeito do BQ788 sobre a febre induzida por LPS.

A análise do índice de febre, calculado como a área sob a curva (AUC), mostrou que a administração de LPS aumentou o índice de febre em aproximadamente 200-250% em relação ao grupo SAL+SAL, enquanto o tratamento i.c.v. com BQ788 reduziu esse índice em cerca de 60-65% quando comparado ao grupo SAL+LPS (Fig. 6B, $F_{(3,17)}=8,893$; $p=0,0009$), demonstrando uma redução efetiva.

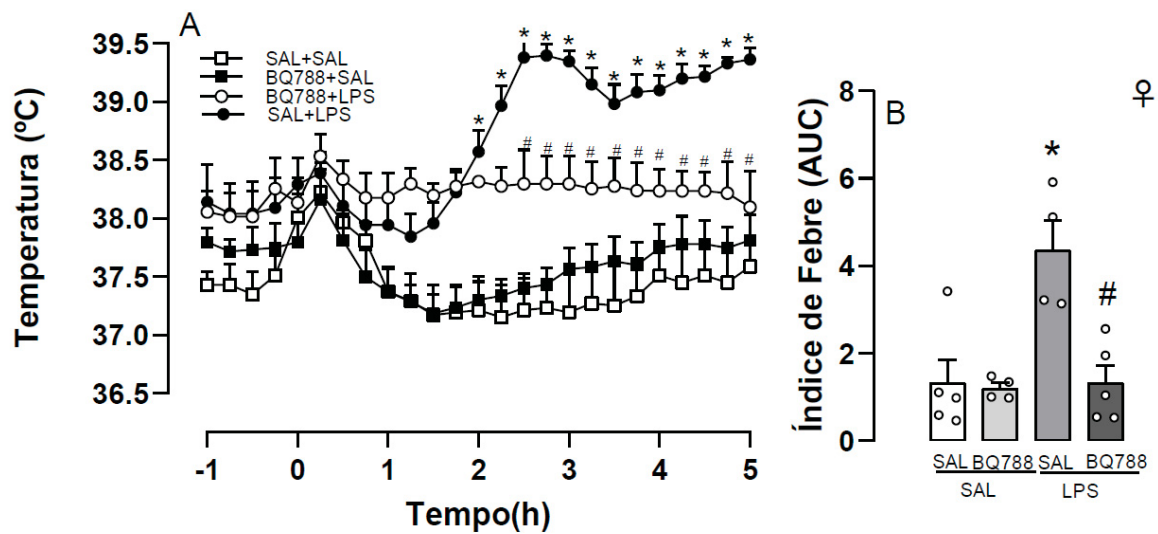


Figura 6: **Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 na resposta febril induzida por LPS em ratos fêmeas.** Os animais receberam BQ788 (6 pmol, 2 μ l) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). A temperatura corporal (A) foi avaliada a cada 15 min durante 5 h após a injeção de LPS. O índice de febre (B) foi calculado como a área sobre a curva (AUC) da variação da temperatura corporal. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) ou do índice de febre em unidades arbitrárias (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, $p < 0,05$. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, $p < 0,05$.

A Figura 7 demonstra que a administração i.c.v. do antagonista de receptores ET_B BQ788 reverteu significativamente a hipolocomoção induzida por LPS em ratas fêmeas, diferentemente do observado após a administração i.h. A injeção sistêmica de LPS reduziu a velocidade locomotora em ~55-60% em relação ao grupo SAL+SAL (Fig. 7A), bem como a distância total percorrida em cerca de 50-55% (Fig. 7B) e o número de cruzamentos em torno de 55-60% (Fig. 7C).

O tratamento i.c.v. com BQ788 promoveu uma reversão significativa desses efeitos, aumentando a velocidade em ~120-140% (Fig. 7A, $F_{(3,17)}=20,24$; $p<0,0001$), a distância percorrida em cerca de 120-150% (Fig. 7B, $F_{(3,17)}=18,67$; $p<0,0001$) e o número de cruzamentos em ~130-150% (Fig. 7C, $F_{(3,17)}=14,10$; $p<0,0001$), quando comparado ao grupo SAL+LPS, restaurando valores próximos aos observados no grupo controle.

Os mapas de calor representativos (Fig. 7D) corroboram os dados quantitativos, evidenciando que o tratamento i.c.v. com BQ788 promoveu uma redistribuição do padrão exploratório no campo aberto, com aumento da mobilidade e da ocupação espacial, em contraste com o padrão restrito observado no grupo tratado apenas com LPS.

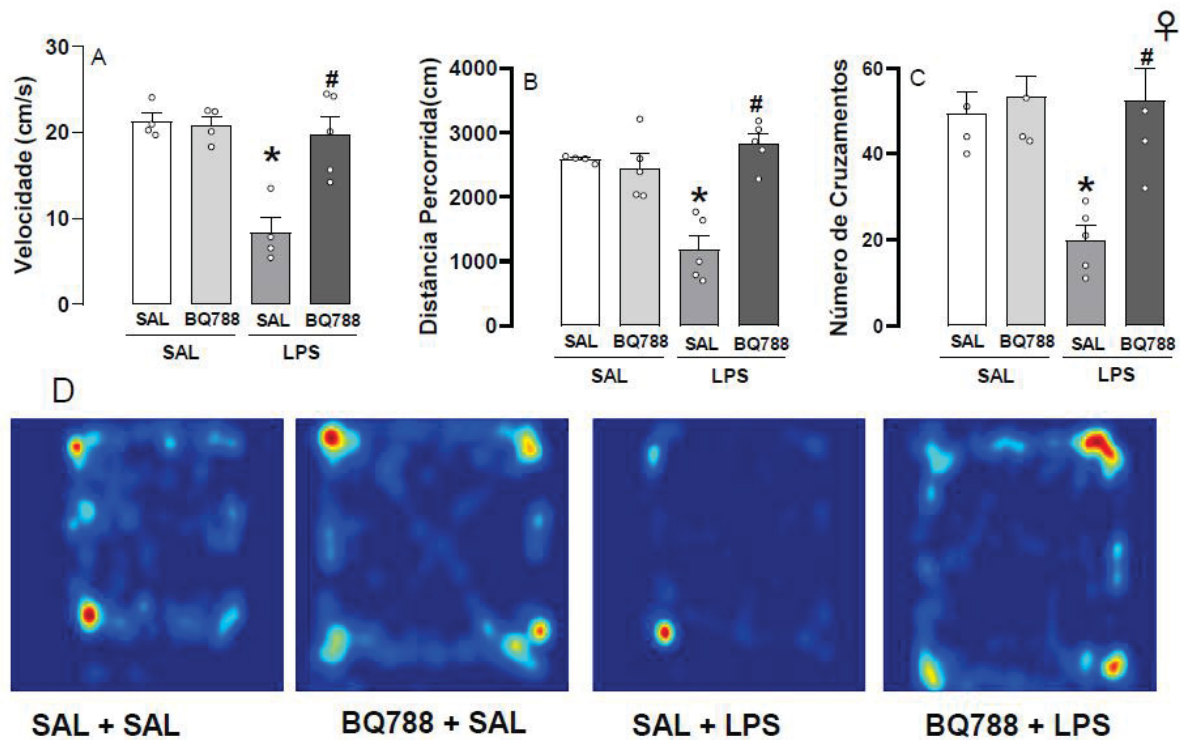


Figura 7: Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos fêmeas. Os animais receberam BQ788 (6 pmol, 2 μ l) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). A locomoção espontânea foi avaliada no aparato de campo aberto 5 h após a injeção de LPS, durante 3 min. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média do número de cruzamentos, velocidade (cm/s) e distância percorrida (cm) (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, $p < 0,05$. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, $p < 0,05$.

De maneira consistente com os efeitos observados na resposta febril e na locomoção, a Figura 8 demonstra que a administração i.c.v. do antagonista de receptores ET_B BQ788 reverteu as alterações serotoninérgicas hipotalâmicas induzidas por LPS em ratas fêmeas. A administração de LPS promoveu um aumento significativo dos níveis de 5-HT, em cerca de ~35-40% em relação ao grupo SAL+SAL (Fig. 8A), bem como um aumento de ~30-35% nos níveis de 5-HIAA (Fig. 8B).

O tratamento i.c.v. com BQ788 reduziu de forma robusta esses aumentos, promovendo uma diminuição de cerca de ~55-60% nos níveis de 5-HT (Fig. 8A, $F_{(3,17)}=17,18$; $p<0,0001$) e de ~40-45% nos níveis de 5-HIAA (Fig. 8B, $F_{(3,17)}=22,19$; $p<0,0001$), quando comparado ao grupo SAL+LPS.

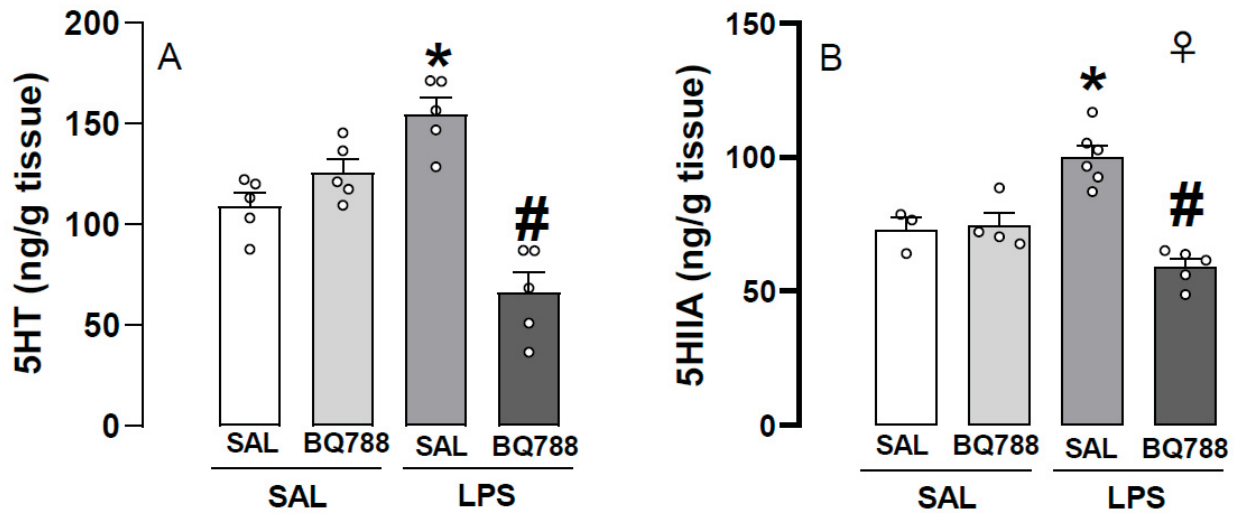


Figura 8: **Efeito da injeção i.c.v. de BQ788 nas alterações de 5-HT/5-HIAA induzidas por LPS em ratos fêmeas.** Os animais receberam BQ788 (6 pmol, 2 μ l) ou o mesmo volume de solução salina (SAL) e, após 30 min, receberam LPS (100 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (SAL). O hipotálamo foi coletado após 5 h e os níveis de 5-HT e 5-HIAA foram avaliados por HPLC. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média dos níveis de 5-HT (A) ou 5-HIAA (B) no hipotálamo (ng/g de tecido) (n = 5–6). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL+SAL, $p < 0,05$. # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo SAL+LPS, $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências de que as endotelinas atuando no hipotálamo são mediadoras críticas da febre e do comportamento de doença induzidos por LPS em ratos machos, mas não em fêmeas. Em contraste, os níveis hipotalâmicos de serotonina (5-HT) parecem ser modulados por endotelinas via receptores ET_B em ambos os sexos.

Para garantir a precisão das microinjeções intracerebrais, o direcionamento exato do hipotálamo foi confirmado previamente aos experimentos, uma vez que a verificação pós-morte foi inviabilizada pela necessidade de coleta do tecido para quantificação de 5-HT e 5-HIAA. Após estabelecer uma taxa de acerto superior a 90%, a relevância funcional da região hipotalâmica selecionada na termorregulação foi validada. A injeção de prostaglandina E₂ (PGE₂) nessa área induziu uma resposta febril transitória, consistente com achados anteriores que demonstram a ação da PGE₂ sobre neurônios do hipotálamo anterior na indução da febre (WILLIAMS; RUDY; YAKSH; VISWANATHAN, 1977) (NAKAMURA; MATSUMURA; KANEKO; KOBAYASHI *et al.*, 2002). Esses resultados reforçam a relevância anatômica e funcional do sítio de injeção na mediação das respostas febris.

Os experimentos subsequentes investigaram o papel dos receptores de endotelina nessa região. A endotelina-1 (ET-1) é um mediador pirógeno bem estabelecido tanto em ratos machos quanto em fêmeas. Estudos prévios demonstraram que a administração i.c.v. de BQ788, um antagonista seletivo de receptores ET_B, atenua a febre induzida por LPS em ambos os sexos (COELHO; CRUZ; MABA; ZAMPRONIO, 2021) (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024; FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998). Além disso, a administração i.c.v. de ET-1 induz febre em machos e fêmeas, e durante a febre induzida por LPS em machos, o líquido cefalorraquidiano apresenta níveis reduzidos de *big-endotelina* (precursor da ET-1) e níveis aumentados do peptídeo ativo (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020) (FABRICIO; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE; SOUZA, 2005). Evidências adicionais indicam que a microinjeção de baixas doses de ET-1 diretamente no hipotálamo de ratos machos também induz febre (FABRICIO; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE; SOUZA, 2005).

De forma geral, os resultados destes estudos citados acima sugerem um papel central da endotelina-1 (ET-1) na mediação da febre induzida por LPS. No entanto, até o momento, nenhum estudo havia avaliado o bloqueio de receptores ET_B diretamente no hipotálamo, tanto em machos quanto em fêmeas, e ainda que o sítio de ação das endotelinas em fêmeas também seria o hipotálamo, embora esta fosse uma conclusão bastante plausível dos estudos.

Deste modo, este é o primeiro estudo a investigar o impacto do bloqueio de receptores ET_B hipotalâmicos na resposta febril em ratos machos e fêmeas. Como esperado, a administração intra-hipotalâmica de BQ788 atenuou significativamente a febre induzida por LPS em machos. De forma inesperada, a mesma intervenção não alterou a resposta febril em fêmeas. Esses achados reforçam a hipótese de que as endotelinas, particularmente a ET-1, medeiam a febre em machos por meio de mecanismos hipotalâmicos diretos (FABRICIO; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE; SOUZA, 2005), enquanto em fêmeas o sítio de ação da ET-1 parece ser extra-hipotalâmico.

Embora o LPS induza níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias pirógenas em fêmeas do que em machos (HALAWA; REES; MCCAMY; WINZER-SERHAN, 2020), não foram observadas diferenças sexuais na expressão de mRNA de *c-fos* na área postrema e no núcleo do trato solitário, sugerindo ativação neuronal comparável, apesar das diferenças imunológicas periféricas. Ainda assim, diversos estudos relatam diferenças sexuais específicas nas respostas hipotalâmicas. Por exemplo, Mello e colaboradores demonstraram que a administração de LPS induz comportamento tipo desespero em machos e comportamento tipo ansiedade em fêmeas, sendo que estas últimas apresentaram estresse oxidativo acentuado no hipotálamo região implicada na regulação da ansiedade (MELLO; CHAVES FILHO; CUSTÓDIO; CORDEIRO *et al.*, 2018). Além disso, fêmeas exibem maior ativação de astrócitos induzida por LPS no hipotálamo, hipocampo e amígdala em comparação aos machos (ZHANG; ELIAS; MANNERS, 2024). Xu *et al.* identificaram alterações sexuais específicas na via esteroidogênica hipotalâmica durante o comportamento tipo depressivo induzido por LPS, com destaque para a redução da pregnenolona em fêmeas, mas não em machos (XU; WEI; XU; ZHANG *et al.*, 2023). Esses achados evidenciam o dimorfismo sexual na função hipotalâmica, ao qual o presente estudo acrescenta evidências inéditas sobre a indução febril mediada por ET-1.

A ausência inesperada de efeito do bloqueio dos receptores ET_B no hipotálamo de fêmeas merece investigação adicional para identificar o sítio central

de ação da ET-1 nesse sexo para indução de febre. Dada a extensa conectividade aferente do núcleo pré-óptico medial (SIMERLY; SWANSON, 1986), a identificação precisa do local de ação da ET-1 permanece desafiadora. No entanto, estudos futuros devem priorizar os núcleos da rafe, que estão implicados na termorregulação (NAKAMURA, 2024; ROGERS; VANDENDOREN; PRATHER; LANDEN *et al.*, 2024) e apresentam acentuado dimorfismo sexual.

Além da febre, a administração de LPS desencadeia comportamento de doença, caracterizado por letargia, anorexia e sonolência. No presente modelo, esse comportamento foi avaliado por meio da redução da locomoção espontânea no campo aberto, um indicador bem estabelecido de comportamento de doença em ambos os sexos (LOH; STICKLING; SCHRANK; HANSHAW *et al.*, 2023; PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). A sinalização central de ET-1 também está implicada nessa resposta, uma vez que a administração i.c.v. de BQ788 e do antagonista de receptores ET_A, BQ123, atenua a hipolocomoção induzida por LPS (LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021). Nossos achados demonstram que a ET-1 hipotalâmica atuando via receptores ET_B contribui para o comportamento de doença em machos. No entanto, de forma consistente com a resposta febril, a administração intra-hipotalâmica de BQ788 não foi capaz de reverter a hipolocomoção em fêmeas.

Conforme relatado anteriormente, a administração de LPS reduziu os níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em machos, enquanto aumentou esses níveis em fêmeas (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024). Notavelmente, a administração intra-hipotalâmica de BQ788 normalizou essas alterações em ambos os sexos, revertendo a redução em machos e o aumento em fêmeas. Esses resultados corroboram o papel da ET-1 na modulação da atividade serotoninérgica hipotalâmica de forma dependente do sexo. De maneira mais importante no presente estudo, estes dados confirmam a eficácia e especificidade anatômica do tratamento com o antagonista, ou seja, embora o tratamento tenha sido efetivo em reduzir os níveis de 5-HT e 5-HIAA não foi efetivo em reduzir a febre e o comportamento de doença nos mesmos animais.

Estudos anteriores associaram a redução dos níveis hipotalâmicos de 5-HT em machos à ativação comprometida do reflexo inflamatório (MOTA; BORGES; AMORIM; CAROLINO *et al.*, 2019; MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Se o aumento de 5-HT induzido por LPS observado em

fêmeas reflete uma ativação aumentada desse reflexo ainda precisa ser elucidado, representando uma importante questão para investigações futuras.

Diversos estudos têm relatado diferenças sexuais específicas na sinalização serotoninérgica hipotalâmica, incluindo maior densidade de fibras serotoninérgicas originadas dos núcleos da rafe em fêmeas (SIMERLY; SWANSON; GORSKI, 1984a; b), bem como níveis hipotalâmicos mais elevados de 5-HT e de seu principal metabólito, 5-HIAA, em comparação aos machos (CARLSSON; CARLSSON, 1988; COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024; GOEL; PHILIPPE; CHANG; KOBLANSKI *et al.*, 2022; SENS; SCHNEIDER; MAUCH; SCHAFFSTEIN *et al.*, 2017). Em consonância com esses achados, o presente estudo também demonstrou níveis basais significativamente mais altos de 5-HT no hipotálamo de ratas tratadas com veículo (Fig. 5). Notavelmente, enquanto a administração de LPS levou à redução dos níveis hipotalâmicos de 5-HT em machos, induziu um aumento em fêmeas, reforçando ainda mais o caráter dimórfico sexual das respostas serotoninérgicas à inflamação sistêmica.

Dada a eficácia observada da administração intra-hipotalâmica de BQ788 na modulação dos níveis de 5-HT, foi conduzido um experimento adicional para confirmar se as diferenças sexuais observadas, particularmente na resposta febril e na locomoção espontânea, eram atribuíveis à ação sítio-específica do antagonista de receptores ET_B. Para isso, BQ788 foi administrado por via i.c.v. em ratas, replicando um protocolo previamente estabelecido. Em concordância com achados anteriores (COSTA; AMATNECKS; DE OLIVEIRA GUAITA; STERN *et al.*, 2024), a administração i.c.v. de BQ788 em fêmeas atenuou significativamente a febre e a hipolocomoção induzidas por LPS, bem como o aumento associado nos níveis hipotalâmicos de 5-HT. Esses resultados sustentam a hipótese de que a ausência de efeito observada com a administração intra-hipotalâmica de BQ788 em fêmeas se deve à diferença no local de ação da ET-1 no cérebro feminino.

É importante destacar que a fase do ciclo estral das ratas não foi sincronizada nem monitorada no presente estudo. Consequentemente, é possível que a magnitude ou a direção dos efeitos observados varie entre as diferentes fases do ciclo. Estudos futuros devem abordar essa limitação por meio do monitoramento do ciclo estral, a fim de elucidar possíveis influências hormonais sobre as respostas mediadas por ET-1.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que a endotelina-1 (ET-1) exerce efeitos específicos de sexo nas respostas induzidas por inflamação sistêmica. Em ratos machos, a ET-1 atua predominantemente no hipotálamo para mediar a febre, a hipolocomoção e a redução dos níveis de 5-HT. Em contraste, em ratos fêmeas, a ET-1 parece exercer seus efeitos sobre a febre e o comportamento de doença por meio de regiões cerebrais alternativas, sendo os núcleos da rafe uma possível estrutura envolvida. Assim, a conectividade funcional entre o hipotálamo e os núcleos da rafe pode representar um eixo crítico subjacente às respostas neuroimunes específicas de sexo à inflamação sistêmica.

O presente estudo fornece novas evidências sobre os papéis dimórficos sexuais da ET-1 na mediação de respostas induzidas por inflamação sistêmica. Enquanto a ET-1 atua no hipotálamo para induzir febre, hipolocomoção e supressão serotoninérgica em ratos machos, seus efeitos em fêmeas parecem ser mediados por mecanismos extra-hipotalâmico. Ainda assim, a sinalização hipotalâmica de ET-1 permanece essencial para a modulação dos níveis de 5-HT em ambos os sexos, embora em direções opostas. Esses achados ressaltam a importância de considerar o sexo como uma variável biológica em pesquisas neuroimunes e destacam a necessidade de investigações adicionais sobre as vias centrais que medeiam a ação da ET-1 em fêmeas.

REFERÊNCIAS

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. **Can J Physiol Pharmacol**, 86, n. 8, p. 485-498, Aug 2008.

BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res**, 573, n. 2, p. 318-320, Feb 28 1992.

BLUTHÉ, R. M.; PAWLOWSKI, M.; SUAREZ, S.; PARNET, P. *et al.* Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. **Psychoneuroendocrinology**, 19, n. 2, p. 197-207, 1994.

BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol (1985)**, 100, n. 4, p. 1347-1354, Apr 2006.

BRITO, H. O.; BARBOSA, F. L.; REIS, R. C. D.; FRAGA, D. *et al.* Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- α , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. **J Neuroimmunol**, 293, p. 1-7, Apr 15 2016.

BRITO, H. O.; RADULSKI, D.; WILHELMS, D. B.; STOJAKOVIC, A. *et al.* Immune-mediated febrile response in female rats: Role of central hypothalamic mediators. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 4073, Mar 5 2020.

BRITO, H. O.; RADULSKI, D. R.; WILHELMS, D. B.; STOJAKOVIC, A. *et al.* Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1 β in Rats. **J Neuroendocrinol**, 28, n. 10, Oct 2016a.

BRITO, H. O.; RADULSKI, D. R.; WILHELMS, D. B.; STOJAKOVIC, A. *et al.* Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1 β in Rats. **J Neuroendocrinol**, 28, n. 10, Oct 2016b.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. A regional study of sex differences in rat brain serotonin. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 12, n. 1, p. 53-61, 1988.

CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. **Immunity**, 46, n. 6, p. 927-942, Jun 20 2017.

COELHO, L. C. M.; CRUZ, J. V.; MABA, I. K.; ZAMPRONIO, A. R. Fever Induced by Zymosan A and Polyinosinic-Polycytidylic Acid in Female Rats: Influence of Sex Hormones and the Participation of Endothelin-1. **Inflammation**, 44, n. 1, p. 321-333, Feb 2021.

COSTA, R. A.; AMATNECKS, J. A.; DE OLIVEIRA GUAITA, G.; STERN, C. A. J. *et al.* Sexual dimorphism of hypothalamic serotonin release during systemic inflammation: Role of endothelin-1. **J Neuroimmunol**, 394, p. 578427, Sep 15 2024.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Ann N Y Acad Sci**, 933, p. 222-234, Mar 2001.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, 21, n. 2, p. 153-160, Feb 2007.

DIAS, S. P.; BROUWER, M. C.; VAN DE BEEK, D. Sex and Gender Differences in Bacterial Infections. **Infect Immun**, 90, n. 10, p. e0028322, Oct 20 2022.

DURANÍKOVÁ, O.; HORVÁTHOVÁ, S.; SABAKA, P.; MINÁR, M. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Headache Associated with COVID-19. **J Clin Med**, 13, n. 17, Aug 24 2024.

FABRICIO, A. S.; RAE, G. A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Res**, 1066, n. 1-2, p. 92-100, Dec 20 2005.

FABRICIO, A. S.; RAE, G. A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Res**, 1066, n. 1-2, p. 92-100, Dec 20 2005.

FABRICIO, A. S.; RAE, G. A.; ZAMPRONIO, A. R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. *et al.* Central endothelin ET(B) receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 290, n. 1, p. R164-171, Jan 2006.

FABRICIO, A. S.; SILVA, C. A.; RAE, G. A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. *et al.* Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. **Br J Pharmacol**, 125, n. 3, p. 542-548, Oct 1998.

FABRICIO, A. S.; VEIGA, F. H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P. *et al.* The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 288, n. 3, p. R671-677, Mar 2005.

FRAGA, D.; ZANONI, C. I. S.; ZAMPRONIO, A. R.; PARADA, C. A. *et al.* Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain Behav Immun**, 51, p. 204-211, Jan 2016.

FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J.; LAWSON, M. *et al.* Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, 32, n. 5, p. 516-531, Jun 2007.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M.; WEBER, A. N. Toll-like receptors as molecular switches. *In: Nat Rev Immunol*. England, 2006. v. 6, p. 693-698.

GOEL, N.; PHILIPPE, T. J.; CHANG, J.; KOBLANSKI, M. E. *et al.* Cellular and serotonergic correlates of habituated neuroendocrine responses in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, 136, p. 105599, Feb 2022.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, 47, n. 5, p. 963-991, 1990/05/01/ 1990.

HALAWA, A. A.; REES, K. A.; MCCAMY, K. M.; WINZER-SERHAN, U. H. Central and peripheral immune responses to low-dose lipopolysaccharide in a mouse model of the 15q13.3 microdeletion. **Cytokine**, 126, p. 154879, Feb 2020.

HANADA, R.; LEIBBRANDT, A.; HANADA, T.; KITAOKA, S. *et al.* Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**, 462, n. 7272, p. 505-509, Nov 26 2009.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**, 12, n. 2, p. 123-137, Summer 1988.

HONG, L.; LIANG, H.; MAN, W.; ZHAO, Y. *et al.* Estrogen and bacterial infection. **Front Immunol**, 16, p. 1556683, 2025.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 8, p. 2863-2867, Apr 1989.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, 71, n. 1, p. 93-127, Jan 1991.

LAZARUS, M.; YOSHIDA, K.; COPPARI, R.; BASS, C. E. *et al.* EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nat Neurosci**, 10, n. 9, p. 1131-1133, Sep 2007.

LOH, M. K.; STICKLING, C.; SCHRANK, S.; HANSHAW, M. *et al.* Liposaccharide-induced sustained mild inflammation fragments social behavior and alters basolateral amygdala activity. **Psychopharmacology (Berl)**, 240, n. 3, p. 647-671, Mar 2023.

LOMBA, L. A.; CRUZ, J. V.; COELHO, L. C. M.; LEITE-AVALCA, M. C. G. *et al.* Role of central endothelin-1 in hyperalgesia, anhedonia, and hypolocomotion induced by endotoxin in male rats. **Exp Brain Res**, 239, n. 1, p. 267-277, Jan 2021.

MALEKI, N.; KHOSH RAVESH, R.; SALEHIYEH, S.; FAISAL FAIZ, A. *et al.* Comparative effects of estrogen and silibinin on cardiovascular risk biomarkers in ovariectomized rats. **Gene**, 823, p. 146365, May 20 2022.

MARRIOTT, I.; HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. **Immunol Res**, 34, n. 3, p. 177-192, 2006.

MARTELLI, D.; YAO, S. T.; MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. **J Physiol**, 592, n. 7, p. 1677-1686, Apr 1 2014.

MELLO, B. S. F.; CHAVES FILHO, A. J. M.; CUSTÓDIO, C. S.; CORDEIRO, R. C. *et al.* Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **J Neuroimmunol**, 320, p. 133-142, Jul 15 2018.

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? **J Physiol**, 491 (Pt 1), n. Pt 1, p. 209-217, Feb 15 1996.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central Mechanisms for Thermoregulation. **Annu Rev Physiol**, 81, p. 285-308, Feb 10 2019.

MOTA, C. M. D.; BORGES, G. S.; AMORIM, M. R.; CAROLINO, R. O. G. *et al.* Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, 80, p. 255-265, Aug 2019.

MOTA, C. M. D.; RODRIGUES-SANTOS, C.; FERNÁNDEZ, R. A. R.; CAROLINO, R. O. G. *et al.* Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, 66, p. 372-381, Nov 2017.

MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q. J. Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. **Endocrinology**, 144, n. 6, p. 2454-2460, Jun 2003.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 301, n. 5, p. R1207-1228, Nov 2011.

NAKAMURA, K. Central Mechanisms of Thermoregulation and Fever in Mammals. **Adv Exp Med Biol**, 1461, p. 141-159, 2024.

NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KANEKO, T.; KOBAYASHI, S. *et al.* The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. **J Neurosci**, 22, n. 11, p. 4600-4610, Jun 1 2002.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behav Immun**, 19, n. 6, p. 493-499, Nov 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Seventh edition. ed. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2014. 9780123919496.

PITYCHOUTIS, P. M.; NAKAMURA, K.; TSONIS, P. A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**, 159, n. 4, p. 1216-1232, Apr 10 2009.

REIS, R. C.; BRITO, H. O.; FRAGA, D.; CABRINI, D. A. *et al.* Central substance P NK₁ receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain Res**, 1384, p. 161-169, Apr 12 2011.

ROGERS, J. F.; VANDENDOREN, M.; PRATHER, J. F.; LANDEN, J. G. *et al.* Neural cell-types and circuits linking thermoregulation and social behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, 161, p. 105667, Jun 2024.

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

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, 46, n. 3, p. 325-415, Sep 1994.

SENS, J.; SCHNEIDER, E.; MAUCH, J.; SCHAFFSTEIN, A. *et al.* Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 153, p. 168-181, Feb 2017.

SHAH, D. P.; THAWEETHAI, T.; KARLSON, E. W.; BONILLA, H. *et al.* Sex Differences in Long COVID. **JAMA Netw Open**, 8, n. 1, p. e2455430, Jan 2 2025.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. **J Comp Neurol**, 246, n. 3, p. 312-342, Apr 15 1986.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; GORSKI, R. A. Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat. **J Comp Neurol**, 225, n. 2, p. 151-166, May 10 1984a.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; GORSKI, R. A. The cells of origin of a sexually dimorphic serotonergic input to the medial preoptic nucleus of the rat. **Brain Res**, 324, n. 1, p. 185-189, Dec 17 1984b.

SOARES, D. M.; MACHADO, R. R.; YAMASHIRO, L. H.; MELO, M. C. *et al.* Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. **Brain Res**, 1233, p. 79-88, Oct 3 2008.

TAKAHASHI, T.; ELLINGSON, M. K.; WONG, P.; ISRAELOW, B. *et al.* Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**, 588, n. 7837, p. 315-320, Dec 2020.

TAN, Z.; WANG, T. H.; YANG, D.; FU, X. D. *et al.* Mechanisms of 17beta-estradiol on the production of ET-1 in ovariectomized rats. **Life Sci**, 73, n. 21, p. 2665-2674, Oct 10 2003.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, 420, n. 6917, p. 853-859, Dec 19-26 2002.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, 395, n. 6699, p. 281-284, Sep 17 1998.

WANECEK, M.; WEITZBERG, E.; RUDEHILL, A.; OLDNER, A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **Eur J Pharmacol**, 407, n. 1-2, p. 1-15, Oct 27 2000.

WILHELMS, D. B.; KIRILOV, M.; MIRRASEKHIAN, E.; ESKILSSON, A. *et al.* Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. **J Neurosci**, 34, n. 35, p. 11684-11690, Aug 27 2014.

WILLIAMS, J. W.; RUDY, T. A.; YAKSH, T. L.; VISWANATHAN, C. T. An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. **Brain Res**, 120, n. 2, p. 251-262, Jan 21 1977.

XU, F. R.; WEI, Z. H.; XU, X. X.; ZHANG, X. G. *et al.* The hypothalamic steroidogenic pathway mediates susceptibility to inflammation-evoked depression in female mice. **J Neuroinflammation**, 20, n. 1, p. 293, Dec 7 2023.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332, n. 6163, p. 411-415, Mar 31 1988.

ZAMPRONIO, A. R.; SOARES, D. M.; SOUZA, G. E. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. **Temperature (Austin)**, 2, n. 4, p. 506-521, Oct-Dec 2015.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; SILVA, C. A.; CUNHA, F. Q. *et al.* Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **Am J Physiol**, 266, n. 5 Pt 2, p. R1670-1674, May 1994.

ZHANG, A. Y.; ELIAS, E.; MANNERS, M. T. Sex-dependent astrocyte reactivity: Unveiling chronic stress-induced morphological changes across multiple brain regions. **Neurobiol Dis**, 200, p. 106610, Oct 1 2024.

ZHANG, Y.; KERMAN, I. A.; LAQUE, A.; NGUYEN, P. *et al.* Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. **J Neurosci**, 31, n. 5, p. 1873-1884, Feb 2 2011.