

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE MENDES BOUTIN BARTNECK TELLES

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA  
ADOLESCÊNCIA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL EM RATOS**

CURITIBA

2016

TATIANE MENDES BOUTIN BARTNECK TELLES

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA  
ADOLESCÊNCIA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL EM RATOS**

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

Orientador: Prof Dr Aleksander R Zamprônio  
Co – orientador: Diego Correia

CURITIBA

2016

Telles, Tatiane Mendes Boutin Bartneck  
Efeitos da exposição intermitente ao etanol na adolescência sobre a resposta febril em ratos / Tatiane  
Mendes Boutin Bartneck Telles – Curitiba, 2016.  
60 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Aleksander R. Zampronio  
Coorientador: Professor Dr. Diego Correia  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Etanol. 2. Febre. 3. Animais de laboratório. I. Zampronio, Aleksander R. II. Correia, Diego.  
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.7828

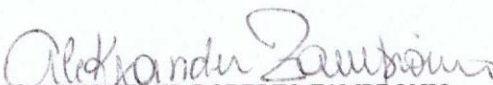


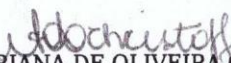
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA  
Código CAPES: 40001016038P0


### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **TATIANE MENDES BOUTIN BARTNECK TELLES**, intitulada: "**EFETOS DA EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL EM RATOS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 29 de Junho de 2016.

  
Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
Prof ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF  
Avaliador Externo (UNIBRASIL)

  
Prof ROBERTO ANDREATINI  
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho ao meu marido, Ricardo, que sempre me apoiou e muito me ajudou e a minha filha, Gabriela, que enquanto ela me enche de alegria eu quero enche-la de orgulho e incentivo aos estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao final destes dois anos, a conclusão do mestrado tem um sabor de vitória, pois, vários obstáculos foram vencidos, muito conhecimento foi adquirido e um sonho foi vivido.

Quero expressar o meu profundo agradecimento aos meus pais, por tudo que já fizeram e fazem por mim e a minha tia, Denise, pela motivação a sempre estudar.

Ao orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo conhecimento compartilhado, pela sinceridade, pela disponibilidade de tempo e pela exigência na conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pelas boas risadas, pelo compartilhamento do conhecimento e pela ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório Municipal de Curitiba, setor da Imunoquímica, pela compreensão nas tardes em que estive ausente e por todo apoio em vencer esta etapa da minha vida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho.

“Não senti dor nem medo,

Mas a emoção arrasadora de ter conseguido viver até ali”

(Gabriel Garcia Marquez)

## RESUMO

A exposição ao etanol, durante diferentes fases da vida pode aumentar o risco de infecções e promover alterações no sistema nervoso central. No presente estudo, investigou-se o efeito da exposição ao etanol (*binge*) em ratos adolescentes na resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ). A exposição dos animais durante a adolescência ao etanol não alterou a temperatura corporal dos animais. Observou-se uma redução significativa na resposta febril induzida por LPS (5 ou 50  $\mu$ g/kg, por via intraperitoneal) no dia 51 pós-natal (13 dias depois da última exposição ao etanol). No entanto, não foram observadas alterações na resposta febril em animais expostos ao etanol no dia 63 pós-natal (25 dias depois da última exposição ao etanol). A resposta febril induzida pela administração intracerebroventricular de IL-1 $\beta$  (3  $\eta$ g) foi também reduzida em animais expostos ao etanol (*binge*) durante a adolescência (dia 51 pós-natal). O tratamento oral agudo com etanol 24 h antes da administração de LPS não alterou a resposta febril induzida por este pirogênio. A exposição ao etanol durante a adolescência não alterou os parâmetros hematológicos ou o número e viabilidade dos macrófagos peritoneais. A administração de LPS aumentou os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  de maneira similar em animais que receberam salina ou expostos ao etanol na adolescência. No entanto, os animais expostos ao etanol apresentaram níveis significativamente menores de IL-1 $\beta$  no fluido cerebroespinal após a administração de LPS quando comparados com animais que receberam salina. Estes resultados sugerem que a exposição ao etanol (*binge*) durante a adolescência produz alterações no sistema nervoso central que podem prejudicar a resposta febril e que podem ser observadas mais tarde, após a suspensão da exposição, mas que são reversíveis. Estas alterações parecem envolver as mudanças na sinalização LPS/IL-1 $\beta$ .



## ABSTRACT

Ethanol exposure during different phases of life may increase the risk of infections and promote alterations in the central nervous system. In the present study, investigated the effect of binge-like exposure to ethanol of adolescent rats in the febrile response induced by lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). The exposure of the animals during adolescence to ethanol did not change the body temperature of the animals. A significant reduction in the febrile response induced by LPS (5 or 50  $\mu$ g/kg, intraperitoneally) was observed on postnatal day 51 (13 days after the last exposure to ethanol). However, no changes in the febrile response in ethanol-exposed animals were observed on postnatal day 63 (25 days after last exposure to ethanol). The febrile response induced by intracerebroventricular IL-1 $\beta$  (3 ng) was also significantly abrogated in binge-like ethanol exposed animals during adolescence (postnatal day 51). The acute oral treatment with ethanol 24 h prior LPS administration did not change the febrile response induced by LPS (50  $\mu$ g/kg). The binge-like exposure to ethanol during adolescence did not change the hematological parameters or the number and viability of peritoneal macrophages. LPS administration increase the plasma levels of IL-1 $\beta$  in both animals that received saline and exposed to ethanol during adolescence. However, the animals that were exposed to ethanol showed significantly lower levels of IL-1 $\beta$  in the cerebrospinal fluid after the administration of LPS when compared to animals that received saline. These results suggest that binge-like exposure to ethanol during adolescence produce changes in the central nervous system that can impair the febrile response and that can be observed later after the suspension of the treatment but that are reversible. These changes may involve changes in LPS/IL-1 $\beta$  signaling.

## LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS MORTES ATRIBUÍDAS AO ETANOL DIVIDIDAS POR CATEGORIAS.....</u>	16
<u>FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL.....</u>	23
<u>FIGURA 3 - INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE ETANOL NA TEMPERATURA CIRCADIANA EM RATOS MACHOS.....</u>	32
<u>FIGURA 4 - RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS INTRAPERITONEAL NO DIA PN51 APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL PRÉVIA DE ETANOL.....</u>	33
<u>FIGURA 5 - RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS INTRAPERITONEAL NO DIA PN63 APÓS A ADMINISTRAÇÃO PRÉVIA DE ETANOL.....</u>	34
<u>FIGURA 6 - RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO ICV DE IL-1B APÓS A EXPOSIÇÃO AO ETANOL.....</u>	36
<u>FIGURA 7 - RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS INTRAPERITONEAL APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA POR VIA ORAL DE ETANOL.....</u>	38
<u>FIGURA 8 - NÚMERO DE MONÓCITOS, LINFÓCITOS, ERITRÓCITOS E NÍVEIS DE HEMOGLOBINA PRESENTES NO SANGUE APÓS EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA, AVALIADOS NO DIA PN51.....</u>	40
<u>FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS EM ANIMAIS EXPOSTOS AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA.....</u>	42
<u>FIGURA 10 - NÍVEIS DE IL-1B NO PLASMA E NO CSF APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE LPS EM ANIMAIS QUE FORAM EXPOSTOS ETANOL (ETOH) NO DIA PN51.....</u>	45

## LISTA DE SIGLAS

COX	- ciclooxigenase
CRF	- fator liberador de corticotrofina
CSF	- fluído cérebro- espinhal
DAMP	- padrão molecular associado ao dano
ET-1	- endotelina 1
HPA	- hipotálamo pituitária adrenal
IFN	- interferon
IL	- interleucina
IRF3	- fator regulador de interferon
LPS	- lipopolissacarídeo
MIP-1 $\alpha$	- proteína inflamatória de macrófago 1 $\alpha$
MnPO	- núcleo préoptico mediano
MTT	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromidrato de tetrazólio
NF-K $\beta$	- fator de transcrição nuclear $\kappa$
OVLT	- órgão vascular da lamina terminal
PAMP	- padrão molecular associado a patógeno
PGD <sub>2</sub>	- prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	- prostaglandina E <sub>2</sub>
PO/HA	- área pré óptica do hipotálamo anterior
PVN	- núcleo paraventricular
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SNC	- sistema nervosa central
SP	- substância P
TLR4	- receptor do tipo toll 4
TNF	- fator de necrose tumoral

## LISTA DE ABREVIATURAS

cm	- centímetro
g	- grama
h	- hora
icv	- intracerebrovascular
lp	- intraperitoneal
kg	- quilo
mg	- miligrama
min	- minuto
mm	- milímetro
p/v	- peso/volume
sc	- sub cutâneo
Tc	- temperatura corporal
ng	- nano grama
µg	- micro grama

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. Resposta febril .....	13
1.2. Inflamação, febre e etanol.....	16
2. OBJETIVOS .....	21
2.1. Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais utilizados .....	22
3.2. Soluções e tampões .....	22
3.3. Modelo de exposição intermitente ao etanol.....	22
3.4. Modelo de exposição aguda ao etanol em ratos adultos .....	23
3.5. Registro da temperatura corporal .....	24
3.6. Implante de cânula no ventrículo lateral .....	24
3.7. Avaliação do ritmo circadiano da temperatura .....	25
3.8. Avaliação da resposta febril.....	25
3.9. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	26
3.10. Avaliação dos leucócitos na cavidade peritoneal.....	26
3.11. Avaliação da viabilidade celular .....	27
3.12. Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ no sangue e fluido cerebrospinal.....	28
3.13. Dosagem dos níveis de IL-1 $\beta$ .....	28
3.14. Análise estatística .....	30
4. Resultados .....	31

4.1.	Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre a temperatura corporal e sobre a resposta febril induzida por LPS .....	31
4.2.	Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre a resposta febril induzida por IL-1 $\beta$ .....	35
4.3.	Efeito da administração oral aguda de etanol sobre a resposta febril induzida por LPS em animais adultos.....	37
4.4.	Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre parâmetros hematológicos.....	39
4.5.	Avaliação do perfil de macrófagos peritoneais após a exposição ao etanol.	41
4.6.	Níveis de IL-1 $\beta$ no plasma e no fluido cerebrospinal de animais expostos ao etanol na adolescência após a administração de LPS. ....	43
5.	DISCUSSÃO .....	46
6.	APÊNDICE .....	52
6.1.	Esterilização.....	52
6.2.	Soluções, Tampões, Meios de Cultura e Reagentes .....	52
6.2.1.	Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS) .....	52
6.2.2.	Solução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) 5 mg/mL	52
6.2.3.	Meio de cultura RPMI 1640.....	53
6.2.4.	Solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) .....	53
6.2.5.	Solução de ácido nítrico 5%.....	53
6.2.6.	Tampão de lavagem para ELISA .....	54
6.2.7.	Tampão de bloqueio para ELISA .....	54
6.2.8.	Solução para estreptovidina.....	54

6.2.9. Tampão fosfato – citrato 0,05 M para OPD.....	54
6.2.10. Ácido sulfúrico 3 M.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Os animais endotérmicos, entre eles os seres humanos, desenvolveram mecanismos complexos para manter a temperatura corporal dentro limites estreitos. Estes mecanismos são regulados através de respostas termorregulatórias involuntárias como, tremores e termogênese sem tremores, vasomotricidade cutânea, sudorese, ofegação e piloereção (Nakamura, 2011). Os seres humanos normalmente mantêm a temperatura corporal em torno de 37°C e a manutenção da temperatura elevada é crítica para a sobrevivência humana (Tansey et al., 2015).

O hipotálamo é o centro de integração ou coordenação do sistema de termorregulação (Tansey et al., 2015). Este centro termorregulador recebe informações através de vias neuronais aferentes sensoriais de termorreceptores localizados na pele, fibras viscerais localizadas na cavidade abdominal e de neurônios termossensíveis localizados no cérebro e medula espinhal. Estas informações são processadas na área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA) e sinais são enviados para efetores periféricos através de neurônios eferentes e vias neuroendócrinas (Nakamura, 2011).

O sistema termorregulador atua na defesa do hospedeiro de patógenos invasores através da elevação da temperatura central do corpo, que é chamado de febre (Nakamura, 2011). 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, mudança esta induzida por mediadores produzidos durante uma inflamação ou processo infeccioso (Roth & Souza, 2001).

Estes mediadores conhecidos por citocinas pró-inflamatórias atingem o sistema nervoso central (SNC), induzindo a produção de mediadores centrais, tais como prostaglandinas, que aumentam o ponto de regulação da temperatura. O aumento da temperatura corporal tem várias vantagens durante infecções: resulta na inibição do crescimento bacteriano, aumento das atividades bactericidas de neutrófilos e macrófagos, a estimulação da síntese



de proteínas de fase aguda, a fixação do íon ferro, anorexia e sonolência. Através destas mudanças fisiológicas, a febre tem um papel adaptativo importante para a sobrevivência do hospedeiro durante episódios infecciosos (Nakamura, 2011).

Assim, duas hipóteses foram propostas para explicar o valor adaptativo da febre: (1) a febre pode causar um ambiente hostil para organismos patogênicos, o que dificulta o seu crescimento, proliferação e sobrevivência, e/ou (2) a febre pode melhorar a eficiência do sistema imune do hospedeiro, facilitando assim a recarga da infecção (Sköld-Chiriac et al., 2015).

A febre é uma parte integral da resposta de fase aguda – a primeira linha de defesa contra um agente patogênico, que consiste de uma série de ajustamentos fisiológicos e comportamentais. Durante uma resposta de fase aguda, os animais exibem os comportamentos típicos de doença, que além de febre incluem a redução da ingestão de alimentos (e até anorexia) e atividade (letargia). Esses ajustes agem coletivamente para aliviar os efeitos de infecções e facilitar a eliminação do patógeno (Blatteis, 2003)

### 1.1. **Resposta febril**

A febre é uma importante característica no processo de defesa do organismo. Ela pode ser induzida por uma variedade de agentes exógenos e endógenos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMP), respectivamente. O mais conhecido e estudado PAMP é o lipopolissacarídeo (LPS) da parede de bactérias Gram–negativas (Romanovsky et al., 2006), um potente pirogênio e forte indutor de citocinas pró-inflamatórias (Blatteis et al., 1998). Um certo número de substâncias exógenas são capazes de induzir a febre, tais agentes, são chamados de pirogênios exógenos (Roth & De Souza, 2001).

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* (receptores tirosina-quinases, TLR), especificamente TLR4, em células fagocíticas (particularmente em macrófagos) (Gay et al., 2006) ativando duas vias de transdução de sinal dependente e independente de uma proteína chamada Myd88. A via dependente de Myd88 ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que resulta na produção de citocinas tais como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) entre outras. A via independente de MyD88 ativa o fator regulador de interferon 3 (IRF3) resultando na expressão de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Yamawaki et al., 2010). A administração de LPS pode induzir a liberação de diversas citocinas, denominadas de pirogênios endógenos. Essas citocinas são liberadas a partir de células incluindo macrófagos, células de Kupfer, adipócitos e micróglia, no local da infecção. Algumas hipóteses descrevem a maneira como elas alcançam o SNC e particularmente o hipotálamo. A hipótese mais aceita é de que as citocinas são distribuídas através da corrente sanguínea e podem adentrar o SNC através de transportadores específicos ou interagir com as células do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e induzem a síntese e liberação de mediadores centrais na área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA) (Cannon, 2013).

Dentre estes mediadores centrais está a indução de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Wilhelms et al., 2014) e PGD<sub>2</sub> (Gao et al., 2009) que resulta da indução de síntese de COX-2 nas células endoteliais da microvasculatura cerebral (Eskilsson et al., 2014).}Outros mediadores centrais também são liberados tais como: fator liberador de corticotrofina (CRF) (Soares et al., 2009), opióides endógenos (Fraga et al., 2008), substância P (SP) (Brito et al., 2016), endotelina-1 (ET-1) (Fabricio et al., 2006) e endocanabinóides (Fraga et al., 2015). Estes mediadores seriam os responsáveis pelo 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.

As prostaglandinas são, sem dúvida alguma, os mediadores mais estudados e importantes da resposta febril. Derivam do ácido araquidônico e são formadas pela ação da ciclooxigenase (COX). Existem duas formas de COX: a COX-1 é constitutivamente ativa em muitos tecidos, e a COX-2 é induzida principalmente durante a resposta inflamatória (Seibert et al., 1994). Entretanto, a administração periférica de LPS induz a expressão de COX-2 no cérebro em células perivasculares e endoteliais ao longo de pequenas vênulas enquanto que a administração de IL-1 $\beta$  induz a expressão de COX-2 principalmente em células perivasculares (Schiltz & Sawchenko, 2002).

Estas vênulas são encontradas em todo o sistema nervoso central, mas a PO/HA, a medula ventrolateral e o núcleo do trato solitário possuem uma grande quantidade delas. Várias outras enzimas participam da formação de prostaglandinas entre elas a PGE sintase 1 (mPGES<sub>1</sub>) que forma PGE<sub>2</sub> e a lipocalina sintase PGD (L-PGDS) que forma PGD<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> pode atuar em quatro receptores diferentes, todos os quais são típicos receptores acoplados à proteína G, a saber, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, que são expressos em diferentes partes do sistema nervoso central (Woodward et al., 2011). A PGD<sub>2</sub> está envolvida em diversos processos fisiopatológicos como a atração de células inflamatórias, modulação da resposta febril e atua no receptor DP<sub>1</sub> o qual é expresso no íleo e pulmão (Gao et al., 2009).

Embora existam evidências da participação de outras prostaglandinas na febre, as participações de PGE<sub>2</sub> e do receptor EP<sub>3</sub> parecem ser essenciais (Lazarus et al., 2007). Este receptor é expresso em grande quantidade no núcleo pré-óptico mediano (MnPO) que é a área do hipótalamo mais sensível às ações pirogênicas da PGE<sub>2</sub> (Nakamura, 2011). Ao receber informações centrais e periféricas sobre a temperatura corporal, algumas respostas são ativadas como: termogênese através de tremores da musculatura esquelética, termogênese através do tecido adiposo marrom e vasoconstrição periférica (Nakamura, 2011).

## 1.2. *Inflamação, febre e etanol*

A importância adaptativa da febre já foi discutida anteriormente. Situações onde a resposta febril não se apresenta adequada podem, portanto, representar uma deficiência na defesa do indivíduo contra infecções. Dentre estas situações está o uso do etanol. O uso nocivo do etanol é um dos principais riscos à saúde mundial que provoca cerca de 3,3 milhões de mortes a cada ano (ou 5,9% de todas as mortes), e 5,1% da carga global de doenças é atribuída ao consumo de etanol. Há o conhecimento da relação causal entre o consumo de etanol e mais de 200 condições de saúde, incluindo doenças infecciosas como a tuberculose, HIV/AIDS e pneumonia (WHO, 2014).

A figura 1 mostra a distribuição das 5,9% de mortes atribuídas ao etanol distribuídas por categoria de doenças.

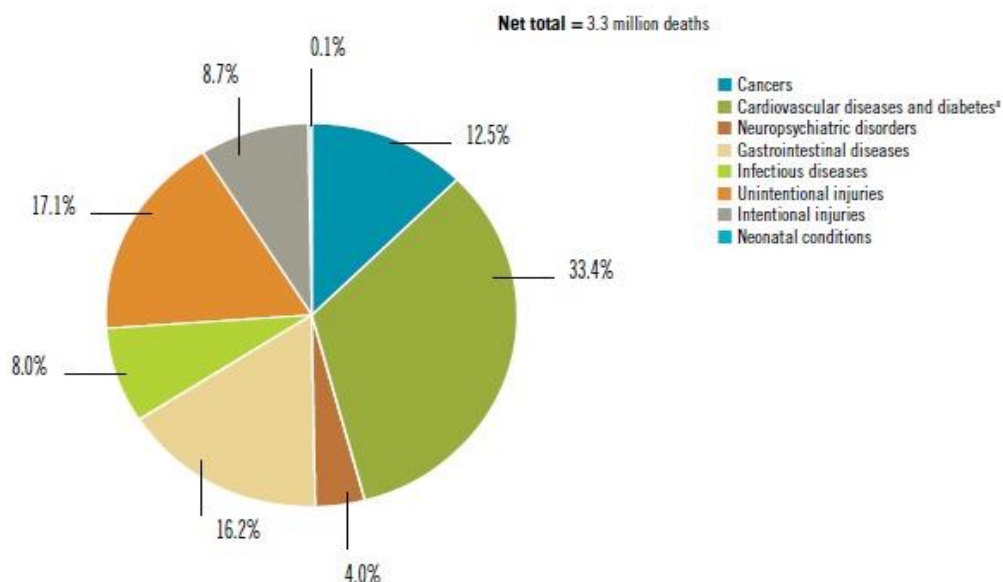


Figura 1 - Distribuição das mortes atribuídas ao etanol divididas por categorias (WHO, 2014).

Acredita-se que estes dados estejam muito abaixo dos reais índices devido aos danos indiretos que o uso de etanol causa e que não são

notificados/comunicados as autoridades e também as subnotificações quando o médico não faz uma relação causal da doença do paciente com o uso de etanol. O uso de etanol diminui a imunidade inata e por consequência aumenta a susceptibilidade a infecções. A administração aguda de etanol através de sonda esofágica em ratos, suprimiu a indução de citocinas e quimiocinas pela administração de LPS nas amostras de soro e lavado peritoneal (Pruett et al., 2004). Ainda, tem sido demonstrado que ratos submetidos tanto a intoxicação crônica como aguda ao etanol sofreram significativamente um impacto na diminuição de citocinas centrais (Doremus-Fitzwater et al., 2014). Com relação à resposta febril, estudos em ratos adultos demonstraram o efeito imunomodulatório no uso crônico e agudo de etanol.

Embora existam estudos sobre o etanol e a resposta febril em ratos na fase adulta, ainda se conhece pouco de como o etanol, e particularmente como a ingestão de etanol na adolescência pode afetar a resposta febril induzida por microorganismos. Alguns estudos, tais como os estudos de Allen (2011), Forbes (2013), Pascual (2014) sugerem a possibilidade de alterações no sistema nervoso central. É possível que estas alterações envolvam a sinalização dos principais mediadores envolvidos como as citocinas e as prostaglandinas.

A adolescência é o período do neurodesenvolvimento em humanos e em outras espécies de mamíferos abrangendo a transição da fase infantil para a fase adulta. Alguns estudos sugerem que mais de 40% dos estudantes universitários nos Estados Unidos já passaram por um episódio de *binge* (Vetreno et al., 2014). O padrão *binge* corresponde a prática de consumir grandes quantidades de etanol em uma única sessão, geralmente definida como cinco ou mais doses (350 ml cerveja, 150 ml taça de vinho, 50 ml destilado) de uma só vez para um homem, ou quatro ou mais doses de uma só vez para uma mulher (WHO,2014).

No Brasil de acordo com o “VI Levantamento Nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras em 2010”, 41,1%

dos estudantes fizeram uso de etanol no ano de 2010 (CEBRID, 2010). Por ser uma fase de desenvolvimento neural, o SNC está passando por mudanças em várias regiões como: córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo. Estudos demonstram que a exposição ao etanol na adolescência tem uma maior influência a longo prazo no desenvolvimento e na função cerebral. Allen e colaboradores (2011) apontam que após 15 dias de exposição intermitente ao vapor de etanol em ratos adolescentes, houve uma mudança na morfologia dos astrócitos e neurônios localizados no núcleo paraventricular (PVN). Em outro estudo, realizado por Risher e colaboradores (2015) com ratos jovens e o uso de etanol, foi observado um aumento no número de espinhas dendríticas nos neurônios que é um sinal de imaturidade neuronal.

A exposição crônica ao etanol pode por si só induzir uma resposta inflamatória através da ativação de diversas cascatas de sinalização que resultam na ativação do NFκB (Crews & Vetreno, 2011). Outros estudos sugerem que uma grande variedade de sinais inflamatórios estão associados a um aumento na preferência e no consumo de etanol (Blednov et al., 2012) e que a inflamação periférica promove um aumento no consumo voluntário de etanol enquanto que a administração de anti-inflamatórios reduz seu consumo (Agrawal et al., 2011).

Adicionalmente, pouco se sabe sobre o efeito do etanol na micróglia, as células relacionadas à inflamação presentes no sistema nervoso central. Collins e Neafsey (2012) sugeriram que em um modelo de exposição crônica ao álcool ocorre um aumento na expressão de aquaporina 4 e consequente edemaciação glial. Esta edemaciação levaria a ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que por fim contribuiriam para a lesão tecidual e consequente neuroinflamação. No entanto, em um estudo recente Marshal e colaboradores (2013) sugerem inclusive que não há uma relação direta entre consumo de etanol, ativação de micróglia e neuroinflamação. Na verdade, estes autores sugerem que uma ativação parcial da micróglia ocasionada pelo consumo em grandes quantidades (*binge*) de álcool (4 dias) tem um papel benéfico e homeostático mais do que um papel na neurodegeneração. Fernandez-Lizarbe e

colaboradores (2013) demonstraram que o álcool induz ativação do TLR4 presente nas células da glia causando neuroinflamação e dano cerebral. Portanto, as evidências são contraditórias.

Por outro lado, a ocorrência frequente de infecções em feridas bem como a cicatrização dificultada destas feridas tem sido demonstrada após o consumo agudo de etanol. Curtis e colaboradores (2014) demonstraram que a exposição aguda ao etanol em um modelo de *binge* episódico promoveu um retardo na cicatrização de feridas, uma menor produção de MIP-1 $\alpha$  e um menor acúmulo de macrófagos na região sugerindo que mesmo o consumo episódico de etanol pode afetar diversos componentes da resposta inflamatória.

No modelo crônico de exposição ao etanol, Wood e colaboradores (2013) demonstraram que o uso diário de etanol no período de 2 meses enfraqueceram as junções celulares do intestino reduzindo a habilidade da integridade da barreira intestinal ocasionando um aumento do número de bactérias na corrente sanguínea.

Taylor e colaboradores (2002) estudaram a influência do etanol na febre induzida por LPS ou IL-1 $\beta$ . Nesse estudo ratos que receberam uma dieta líquida contendo etanol por 14 dias tiveram uma redução na resposta febril induzida por LPS ou IL-1 $\beta$  quando administrados por via intraperitoneal. No entanto, essa resposta foi normal em ratos que receberam etanol quando a IL-1 $\beta$  foi administrada diretamente no sistema nervoso central (i.c.v.). Estes dados sugerem que o consumo crônico de etanol de alguma forma interfere na resposta inflamatória ao LPS, e uma das consequências disso é uma menor produção de IL-1 $\beta$ , inclusive no sistema nervoso central, o que levaria a uma resposta febril reduzida.

Outros estudos relatando os efeitos da exposição ao etanol durante a gestação em ratas mostram que os filhotes que foram expostos ao etanol tem menor resposta febril ao LPS (Yirmiya et al., 1993) e a IL-1 $\beta$  (Yirmiya et al., 1996) porém resposta à PGE<sub>2</sub> foi normal (Taylor et. al., 1999). No entanto, estes dados são únicos e nunca foram reproduzidos.

Após a observação de todos estes estudos verificou-se que a maioria dos dados obtidos na literatura referem-se ao período de exposição ao etanol na fase fetal e na fase adulta, ocorrendo uma lacuna entre estes dois intervalos que seria o período da adolescência o qual é o período de início e muitas vezes de grande consumo de bebidas alcoólicas. A adolescência além de iniciar o uso do etanol e consumir mais comparado a outras fases da vida ainda se tem o agravante que é o período de amadurecimento de várias estruturas do SNC o qual poderá gerar várias consequências futuramente. Dentro deste contexto levantou-se a hipótese que a exposição intermitente ao etanol na adolescência poderia alterar a resposta febril na fase adulta.



## 2. OBJETIVOS

Considerando os pontos discutidos anteriormente, o presente estudo objetiva avaliar se a administração intermitente de etanol na fase jovem, mais especificamente entre os dias pós-natal (PN) 25 e PN38 no modelo de *binge* poderia afetar a resposta febril induzida por LPS e por IL-1 $\beta$ .

### 2.1. *Objetivos específicos*

- Avaliar a temperatura basal dos ratos controle e expostos ao etanol de modo intermitente na fase jovem (PN25 – 38).
- Avaliar a resposta febril induzida pela administração intraperitoneal de diferentes doses de LPS em ratos controle e expostos ao etanol quando jovens ( PN25 – 38).
- Avaliar se a exposição ao etanol no protocolo utilizado não alterou as respostas periféricas de viabilidade dos macrófagos peritoneais bem como os parâmetros hematológicos.
- Avaliar a resposta febril induzida pela administração central da IL-1 $\beta$  em animais normais e expostos ao etanol.
- Avaliar se há diferenças nos níveis de IL-1 $\beta$  no plasma e no fluido cérebro-espinhal de animais normais e expostos ao etanol após a administração intraperitoneal de LPS.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Animais utilizados*

Foram utilizados 230 ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200 g. Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7h da manhã) e temperatura controlada ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) com livre acesso à água e ração comercial. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, CEUA n° 813. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.2. *Soluções e tampões*

Todas as soluções e tampões utilizados estão descritos detalhadamente no anexo apresentado ao final da dissertação.

#### 3.3. *Modelo de exposição intermitente ao etanol*

Inicialmente, foram administradas doses de 3 g/kg de etanol (25% p/v em solução salina, intraperitoneal) aos ratos no dia PN25 (grupo pré-tratado com etanol) ou solução salina em volume equivalente (grupo controle). Nos dias PN26, 29, 30, 33, 34, 37 e 38 os animais receberam o mesmo tratamento. Esse padrão foi escolhido com base em Lerma-Cabrera e colaboradores (2013) e Forbes e colaboradores (2013) por simular um padrão de intoxicação aguda (*binge*) comum durante a adolescência. Para avaliar a resposta febril, os animais foram divididos em dois grupos: 1) após o modelo de exposição intermitente ao etanol os ratos receberam uma dose adicional de etanol por via

oral no dia PN50 (3 g/kg) e no dia seguinte foram executados os experimentos; 2) após o modelo de exposição intermitente ao etanol os ratos receberam uma dose adicional de etanol (3 g/kg) por via oral no dia PN62 e no dia seguinte foram executados os experimentos. Portanto, os experimentos foram realizados nos dias PN51 ou PN63. A Figura 2 mostra esquematicamente este protocolo.

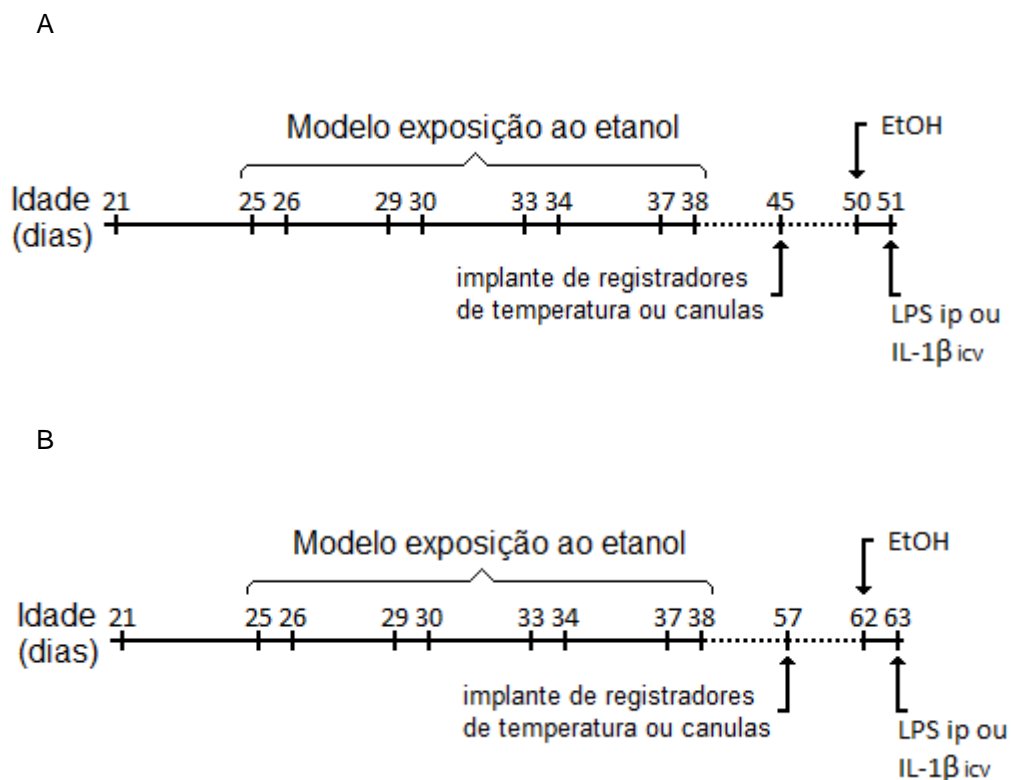


Figura 2 - Representação esquemática da exposição ao etanol. Os animais receberam 3 g/kg, i.p. etanol ou o mesmo volume de solução salina nos dias pós-natal mostrado na figura. Nos dias PN50 (A) ou PN62 (B), os animais receberam uma dose adicional de etanol (3 g/kg) ou de soro fisiológico por via oral. Os experimentos foram executados no dia seguinte.

### 3.4. **Modelo de exposição aguda ao etanol em ratos adultos**

Em um grupo separado de animais, sem tratamento prévio, animais adultos receberam uma única dose de 3 g/kg de etanol (25% p/v em solução salina, via oral) ou solução salina em volume equivalente (grupo controle) 24 h

antes da injeção de LPS. No dia seguinte foi avaliada a resposta febril induzida por LPS (50 µg/kg, i.p.).

### **3.5. *Registro da temperatura corporal***

Este procedimento ocorreu 1 semana antes do procedimento experimental. Os transmissores remotos de temperatura foram programados para iniciar a medida da temperatura corporal dos animais às 7 h da manhã e estas foram feitas a cada 15 min em um período de 5 h após a administração do estímulo pirogênico. Animais de ambos os grupos (controle e etanol) foram anestesiados com cetamina/xilasina (90/10 mg/kg, ip) e receberam transmissores remotos para medida de temperatura central abdominal (Tc) (Subcue Dataloggers, Calgary, Canadá). Os transmissores foram imersos por 30 min em etanol para assepsia. Após realizou-se a tricotomia e antissepsia da pele, executou-se laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Os transmissores remotos de temperatura foram previamente programados foram implantados na cavidade peritoneal e a cavidade foi suturada. Durante o experimento, a temperatura ambiente foi mantida a 28°C, que é a zona termoneutra para ratos (Gordon, 2010). Ao final da cirurgia os animais receberam 400 mg/kg de terramicina.

### **3.6. *Implante de cânula no ventrículo lateral***

Durante a mesma anestesia descrita para o implante de transmissores remotos de temperatura e, quando se fez necessário (em experimentos da avaliação da resposta febril após administração central de IL-1β), implantou-se cânulas no ventrículo lateral para administração do pirogênio. Para tanto, 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 estereotáticos 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 16 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foram fixadas ao estereotático e 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 de avaliação da resposta febril, 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.

### **3.7. Avaliação do ritmo circadiano da temperatura**

Ratos que receberam os transmissores remotos de temperatura do grupo controle e do grupo etanol foram aclimatados à temperatura de 28°C no dia anterior ao experimento e foram mantidos nesta temperatura até o final do experimento. A temperatura basal dos animais foi registrada no PN49 (Fig. 2A) por um período de 24 h a cada 15 min.

### **3.8. Avaliação da resposta febril**

Ratos que receberam os transmissores remotos de temperatura do grupo controle e do grupo etanol foram aclimatados à temperatura de 28°C no dia anterior ao início do experimento e foram mantidos nesta temperatura até o final do experimento. Entre 9 e 10 h da manhã do dia do experimento, os animais receberam então LPS (*E. coli*, 0111:B4, 5 ou 50 µg/kg, i.p) nos dias PN51 ou PN63 (Fig. 2). A utilização inicial de 2 doses de LPS nos permitiu avaliar tanto o aumento quanto as reduções nas respostas (febre). No caso da IL-1β os animais foram avaliados somente no PN 51 (Fig. 2B). Em um outro grupo de animais, para a administração de IL-1β icv foi utilizada uma agulha de microinjeção (30G curta) que excedeu a cânula em 2 mm, conectada a uma seringa de Hamilton (25 µl) por um tubo de polipropileno P10 durante 1 min. Animais controle de ambos os grupos (salina e etanol) receberam somente salina. A temperatura corporal dos animais continuou sendo registrada pelos aparatos implantados no peritônio, a cada 15 min por 5 h.

### 3.9. ***Avaliação dos parâmetros hematológicos***

No dia PN38, amostras de sangue foram coletadas da veia cava abdominal (3 ml), utilizando seringas heparinizadas. As amostras foram refrigeradas em gelo e analisadas no Laboratório Municipal de Curitiba. O material foi processado em um analisador de hematologia (hemograma) Sysmex XE-2100 TM por citometria de fluxo utilizando um laser semiconductor, foco hidrodinâmico e método de impedância. Os parâmetros hematológicos foram avaliados a fim de se ter uma ideia do estado de saúde dos animais quando da realização dos experimentos.

### 3.10. ***Avaliação dos leucócitos na cavidade peritoneal***

Uma vez que a administração de etanol foi feita, alguns dias antes do experimento por via intraperitoneal, avaliamos o número e a viabilidade dos

macrófagos nesta cavidade nos dias PN51 e PN63. Os animais foram anestesiados com halotano e o fluido peritoneal foi recolhido através da introdução de 10 ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) contendo 0,03% de albumina de soro bovino e 5 U/ml de heparina. As amostras foram diluídas em solução de Turk e as contagens de leucócitos totais foram realizadas sob microscopia de luz. Os resultados são expressos como o número de células por mililitro de fluido peritoneal.

O fluido peritoneal foi então centrifugado a 1000 g por 10 min, 4<sup>o</sup> C. As células foram lavadas duas vezes sendo ressuspensas na primeira lavagem em PBS e na segunda em meio de cultura RPMI 1640 e centrifugadas conforme descrito acima. Ao final da última centrifugação, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contadas em câmara de Neubauer, diluídas apropriadamente e foram colocadas para aderirem em uma placa de cultivo de 96 poços (1x10<sup>6</sup> células/poço). Depois de 1 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, as monocamadas foram lavadas para remover as células não aderidas. Este procedimento resulta em uma monocamada contendo em torno de 95% de macrófagos.

### 3.11. *Avaliação da viabilidade celular*

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada através da redução do sal de tetrazólio, o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromidrato de tetrazólio (MTT) (modificado de Mosmann, 1983; Tada et al., 1986). O MTT é um corante que é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais. Neste método as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio, formando cristais de formazan resultando na cor roxa característica.

A placa foi novamente incubada a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após 24 h, a reação de redução desencadeada pelo MTT, foi bloqueada com uma solução ácida a 10% de SDS. A solução de SDS também é responsável

pela diluição do precipitado de formazan cuja absorbância pode ser medida a 550 nm.

### **3.12. Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ no sangue e fluido cerebrospinal**

O sangue foi coletado conforme descrito acima 2 h após a administração de LPS ip no dia PN51 em seringas heparinizadas. Estas amostras foram refrigeradas em gelo imediatamente após a coleta e, em seguida, centrifugadas a 1200 g durante 15 min a 4°C. O plasma foi separado e as amostras armazenadas a -80°C até a análise. Após a coleta de sangue, os animais foram colocados no aparelho estereotáxico para permitir a visão da cisterna magna. Usando um escalpe, 100  $\mu$ l de fluido cerebrospinal (CSF) foi aspirado diretamente da cisterna magna (Consiglio & Lucion, 2000). As amostras foram imediatamente transferidas para um tubo, centrifugou-se a 1000g, 4°C durante 10 min e em seguida as amostras foram armazenadas a -80°C para posterior análise da concentração de IL-1 $\beta$ .

### **3.13. Dosagem dos níveis de IL-1 $\beta$**

A dosagem dos níveis plasmáticos e no CSF de IL-1 $\beta$  foi realizado por imunoenensaio. Foi usada uma placa de 96 poços, a qual foi coberta com 100  $\mu$ l/poço com anticorpo de captura para IL-1 $\beta$  (1  $\mu$ g/ml) e deixada a temperatura ambiente por 24 h. No dia seguinte a placa foi lavada com tampão de lavagem (300  $\mu$ l) por três vezes, e após, adicionado o volume de 300  $\mu$ l de tampão de bloqueio em cada poço, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após 1 h de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada por três vezes novamente com tampão de lavagem e então foram adicionados 100  $\mu$ l/poço das amostras diluídas (1:2) e o padrão IL-1 $\beta$  diluído em 7 concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 e 31.2 pg/ml). Após 24 h, a placa foi novamente lavada utilizando-se tampão de lavagem e então foram adicionados 100  $\mu$ l/poço



de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  de detecção biotinilado (50 ng/ml). A placa foi incubada por 2 h e após este período, a placa foi novamente lavada, e foi acrescentada a solução de estreptoavidina 100  $\mu$ l/poço (concentração definida no lote) e a placa foi incubada por 20 min a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionada a placa 150  $\mu$ l/poço de solução de diidrocloreto de o-fenilenodiamina (OPD), juntamente com 5  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio 30% em sala escura. A placa foi então coberta com papel alumínio e mantida por 30 min. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M. A leitura da absorbância foi feita em espectrofômetro a 550 nm.

### **3.14 Análise estatística**

Os resultados obtidos para resposta febril foram avaliados por análise de variância (ANOVA) *Two-Way* de medidas repetidas seguida por teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Os dados de níveis de citocinas foram analisados por ANOVA *One-Way* seguida de teste de Bonferroni.

O número de macrófagos, número de células sanguíneas e a viabilidade celular foi analisado por teste t de Student não pareado.

Em todos os casos o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Todos os dados foram analisados usando o software Prisma 6 (Graph Pad, San Diego, CA, EUA).

## 4. Resultados

### 4.1. Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre a temperatura corporal e sobre a resposta febril induzida por LPS

As variações circadianas da temperatura corporal dos animais no período de 24 h expostos ao etanol no modelo de *binge* durante a adolescência e que receberam salina foi similar (Figura 3). Esta temperatura foi avaliada no dia anterior ao início dos experimentos utilizando LPS. Os dois grupos apresentaram uma temperatura corporal menor no período claro e maior no período escuro (Figura 3).

A administração intraperitoneal de veículo (salina estéril) no dia PN51 não induziu qualquer mudança significativa na temperatura abdominal dos animais (Figura 4). A administração de LPS induziu uma resposta febril que foi dependente da dose, ou seja, o LPS 5 µg/kg (Figura 4A) induziu uma resposta febril significativamente menor do que aquela induzida por LPS 50,0 µg/kg (Figura 4B). A exposição dos animais no modelo de *binge* durante a adolescência ao etanol reduziu significativamente a resposta febril induzida por LPS em ambas as doses (Figura 4A e B).

No protocolo seguinte, utilizamos o mesmo esquema descrito anteriormente, mas a resposta febril foi avaliada no dia PN63. De maneira similar ao observado anteriormente, a administração intraperitoneal de veículo (salina estéril) não induziu qualquer mudança significativa na temperatura abdominal dos animais no dia PN63 (Figura 5). Da mesma forma, a administração de LPS induziu uma resposta febril que foi dependente da dose, mas diferentemente do que foi observado no dia PN51, não houveram diferenças significativas na resposta febril entre os animais expostos ao etanol ou que receberam somente salina na adolescência e ambas as doses de LPS no dia PN63 (Figura 5).

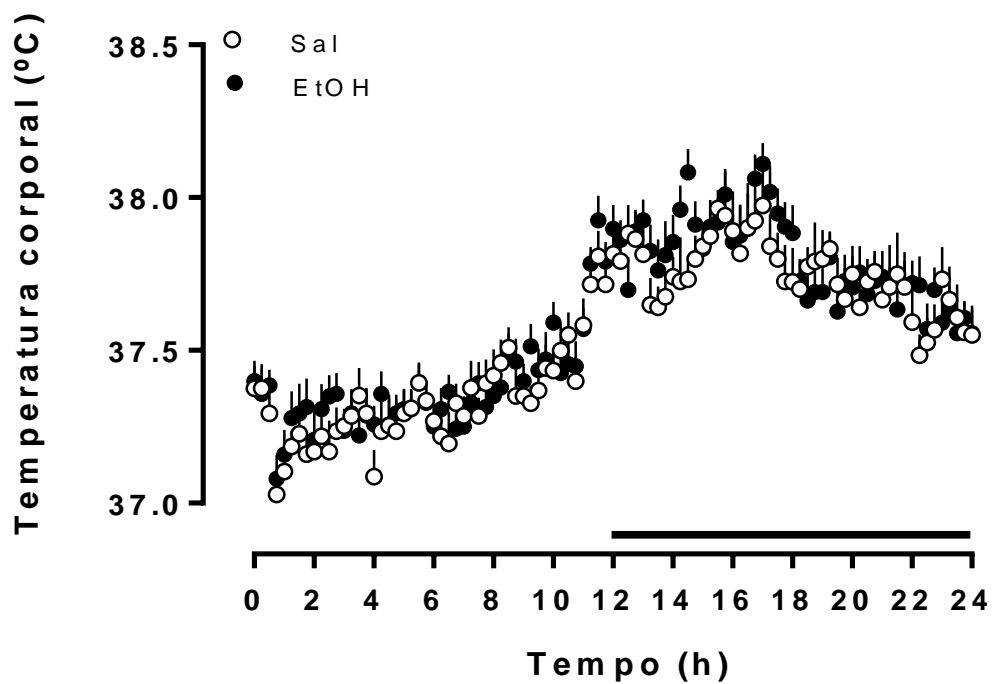


Figura 3 - Influência do consumo de etanol na temperatura circadiana em ratos machos. Os animais receberam etanol (EtOH) ou salina (Sal) no modelo de *binge* na adolescência e a temperatura corporal dos animais foi analisada no dia PN49. A barra em preto representa o período escuro (19 h – 07 h). Os pontos representam a média +/- EPM da temperatura corporal (°C) dos animais durante 24 horas (n= 14).

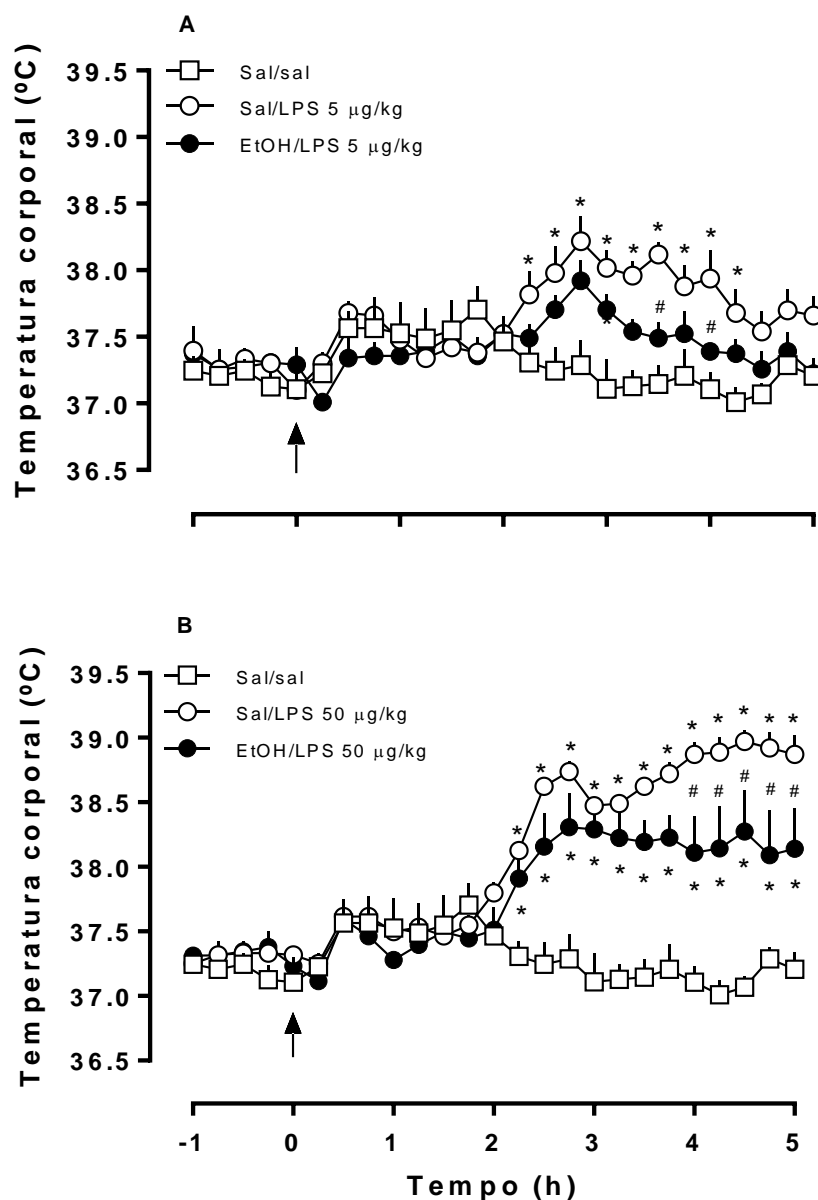


Figura 4 - Resposta febril induzida por LPS intraperitoneal no dia PN511 após a administração oral prévia de etanol. LPS 5 (painel A) ou 50 (painel B) µg/Kg foi administrado por via intraperitoneal no dia PN51 em animais expostos a etanol (EtOH) ou salina (Sal). Animais controle receberam 1 ml/kg de salina estéril. As setas representam o momento da injeção do LPS ou salina. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal (°C) dos animais durante 5 h (n= 9). \* p<0.05 quando comparado ao grupo Sal/Sal. # p<0.05 quando comparado ao grupo Sal/LPS.

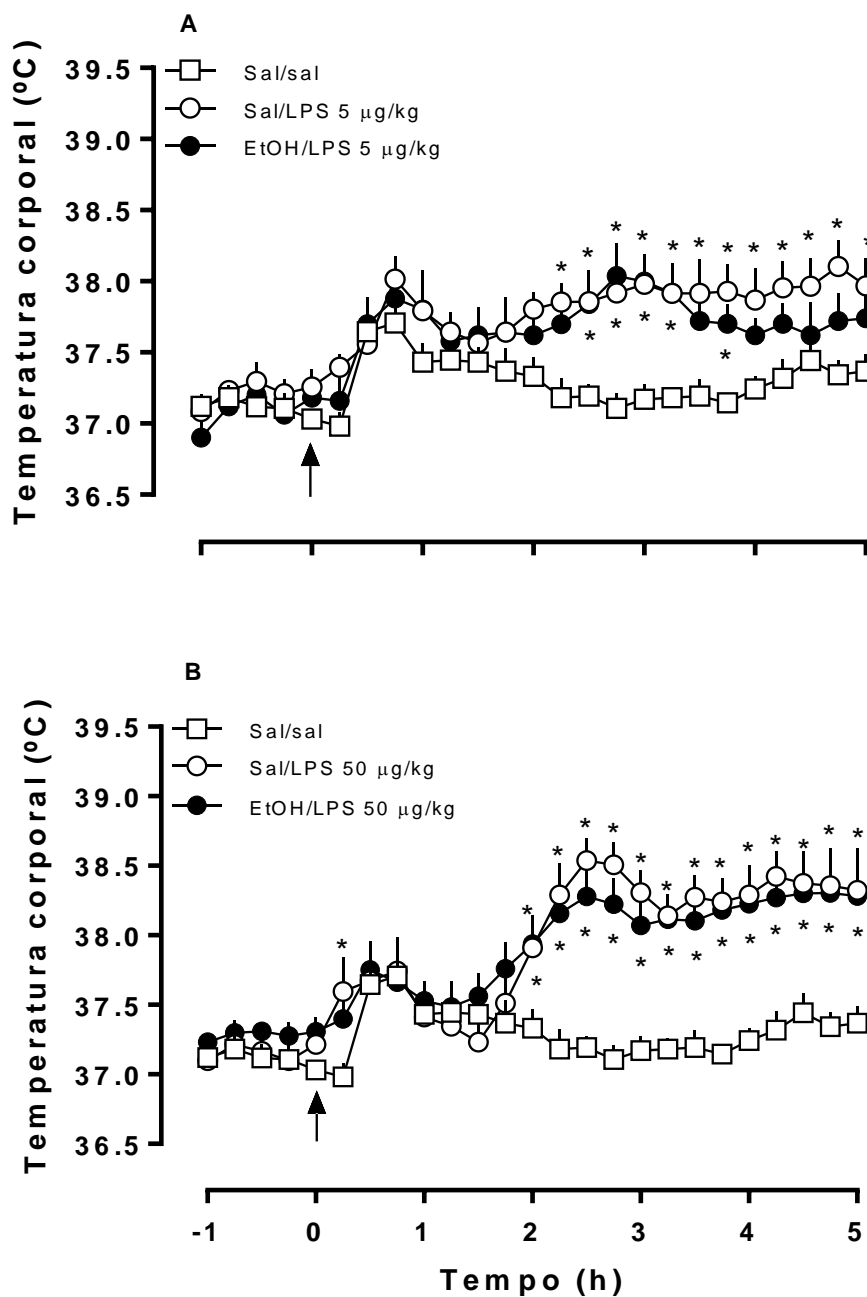


Figura 5 - Resposta febril induzida por LPS intraperitoneal no dia PN63I após a administração prévia de etanol. LPS 5 (painel A) ou 50 (painel B) µg/Kg foi administrado por via intraperitoneal no dia PN63 em animais expostos a etanol (EtOH) ou salina (Sal). Animais controle receberam 1 ml/kg de salina estéril. As setas representam o momento da injeção do LPS ou salina. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal (°C) dos animais durante 5 h (n=9). \*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo tratado com Sal/Sal.

#### **4.2. Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre a resposta febril induzida por IL-1 $\beta$ .**

A administração i.c.v. de IL-1 $\beta$  em animais expostos somente a salina na adolescência induziu resposta febril com início 1.5 h depois da administração, com pico na segunda hora e que permaneceu significativamente maior que o grupo que recebeu somente salina até a quinta hora (Figura 6). Observou-se que a exposição de animais ao etanol no modelo de *binge* na adolescência reduziu de forma significativa a resposta febril induzida por IL-1 $\beta$  (Figura 6).

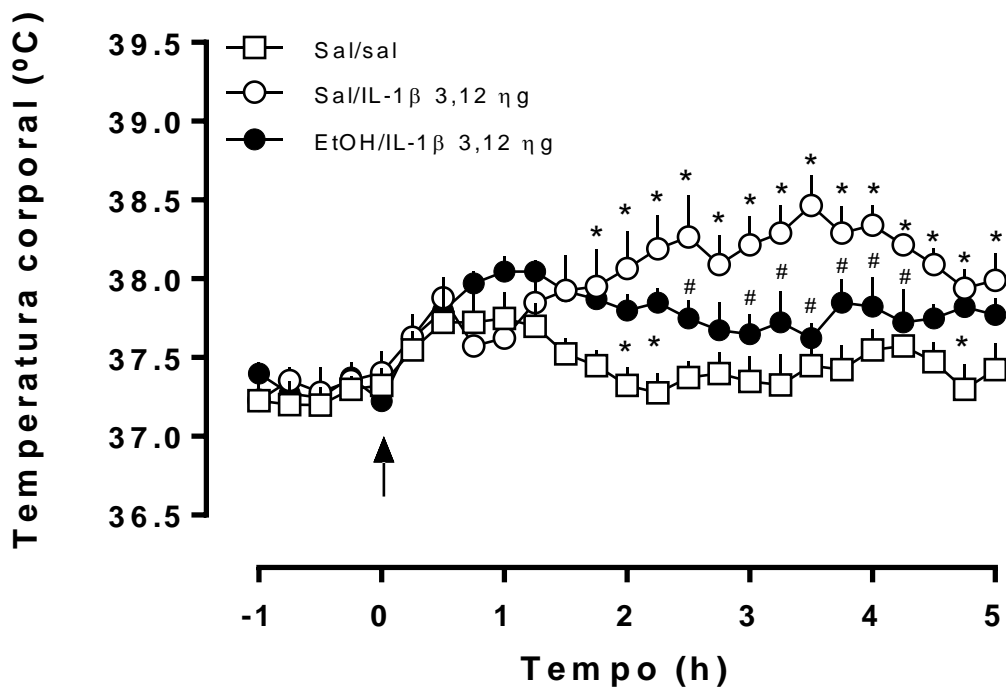


Figura 6 - Resposta febril induzida pela administração icv de IL-1 $\beta$  após a exposição ao etanol. IL-1 $\beta$  (3.12 ng) ou veículo (salina) foram administrados por icv no dia PN51 em animais expostos ao etanol (EtOH) ou salina (Sal) no modelo de *binge* na adolescência.. A seta indica o momento da injeção do IL-1 $\beta$  ou salina. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal ( $^{\circ}$ C) dos animais por 5 h (n=5). \*  $p < 0.05$  quando comparado com o grupo tratado com Sal/Sal. #  $P < 0.05$  quando comparado com o grupo tratado com Sal/IL-1 $\beta$



#### **4.3. Efeito da administração oral aguda de etanol sobre a resposta febril induzida por LPS em animais adultos.**

Com o intuito de verificar se a exposição aguda ao etanol 24 h antes da administração i.p. de LPS estaria influenciando a resposta febril foi realizado o experimento que está demonstrado na figura 7. Neste experimento utilizamos somente à dose de LPS 50 ug/kg. A administração intraperitoneal de veículo (salina estéril) não induziu qualquer mudança significativa na temperatura corporal dos animais. Os animais que receberam LPS, tanto do grupo etanol quanto salina não apresentaram diferenças significativas na resposta febril (Figura 7).

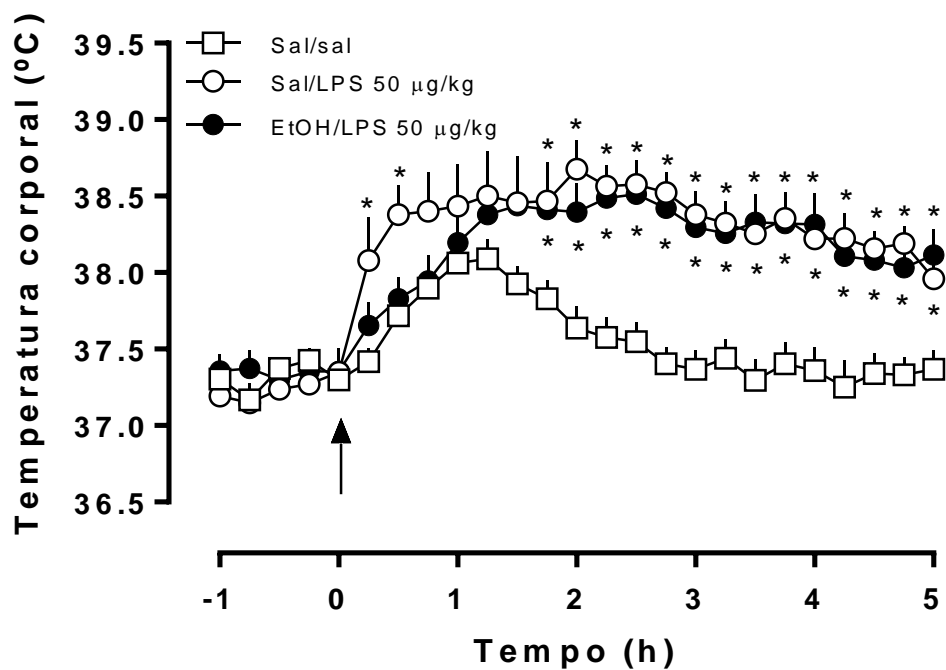


Figura 7 - Resposta febril induzida por LPS intraperitoneal após a administração aguda por via oral de etanol. LPS 50 µg/Kg foi administrado por via intraperitoneal 24 h após receberem etanol (EtOH) ou veículo (Sal) por via oral e a temperatura corporal foi avaliada. Animais controle receberam 1 ml/Kg de salina estéril. A seta indica o momento da administração de LPS ou salina. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal (°C) dos animais durante 5 h (n= 8). \*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo tratado com Sal/Sal.

#### **4.4. Efeito da exposição ao etanol na adolescência sobre parâmetros hematológicos**

Selecionado o protocolo de indução de febre no dia PN51, parâmetros hematológicos foram avaliados neste período para avaliar possíveis alterações no sistema imune-hematológico no momento da administração de LPS.

Os animais apresentaram parâmetros hematológicos, especificamente contagem de monócitos (Figura 8A), linfócitos (Figura 8B), eritrócitos (Figura 8C) e hemoglobina (Figura 8D) dentro dos parâmetros de normalidade e sem diferença significativa com o grupo exposto apenas ao veículo (salina) na adolescência.

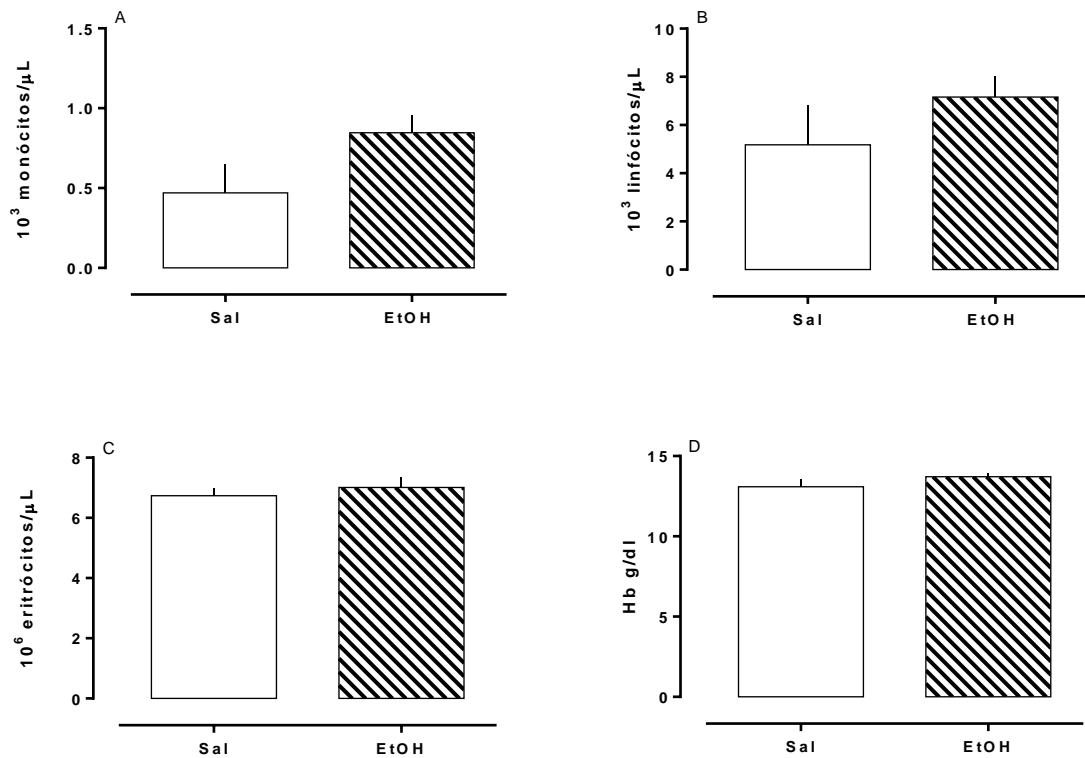


Figura 8 - Número de monócitos (A), linfócitos (B), eritrócitos (C) e níveis de hemoglobina (D) presentes no sangue após exposição ao etanol na adolescência, avaliados no dia PN51. Após obtenção do sangue, a amostra foi processada no equipamento Sysmex XE-2100. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de células ou dos níveis de hemoglobina (n=14).

#### **4.5. Avaliação do perfil de macrófagos peritoneais após a exposição ao etanol.**

Como a administração de etanol na fase jovem ocorreu por via intraperitoneal foi avaliado o número e a viabilidade de macrófagos para determinar possíveis danos decorrente ao modo de administração do etanol.

O resultado pode ser observado na figura 9 que demonstra que não houveram diferenças significativas entre o número de macrófagos (Figura 9A) e a viabilidade celular (Figura 9B) do grupo que recebeu etanol e do grupo que recebeu salina.

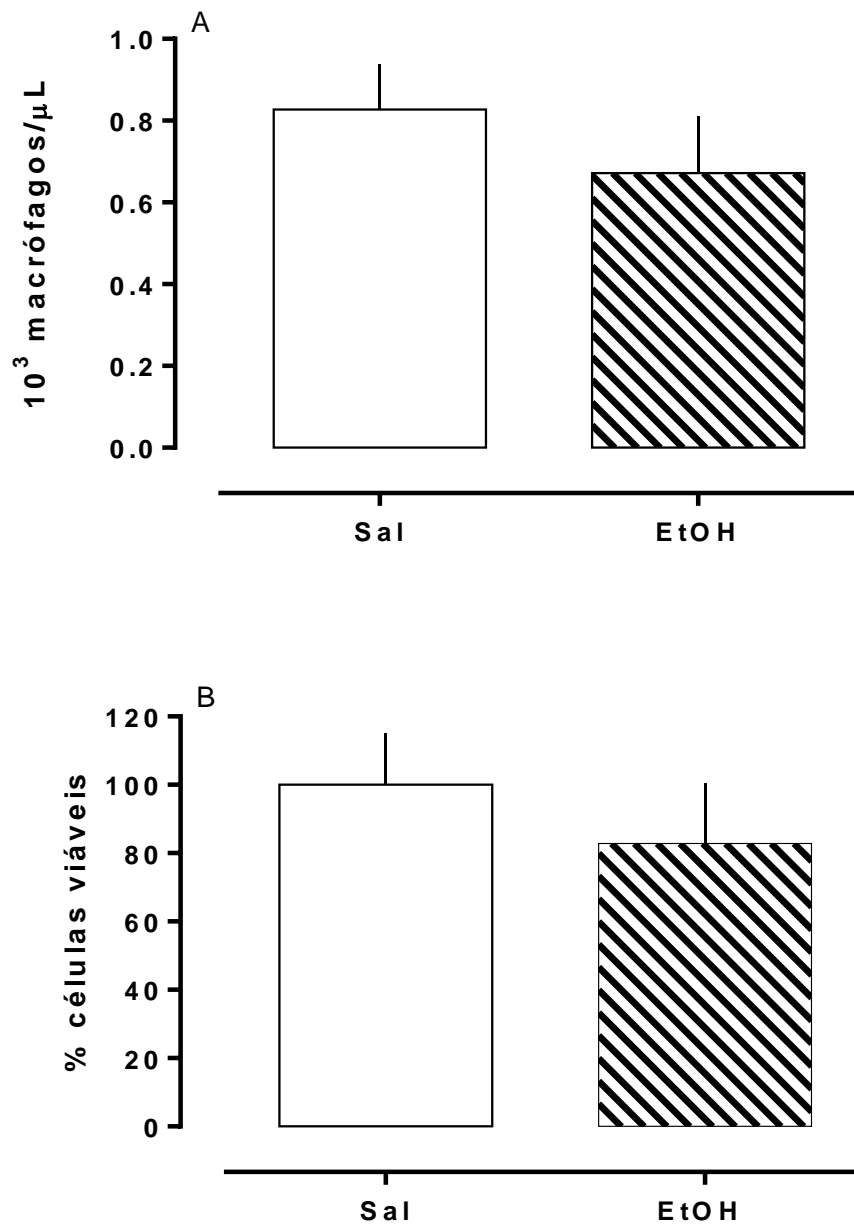


Figura 9 - Avaliação dos macrófagos peritoneais em animais expostos ao etanol na adolescência. Células peritoneais de animais expostos ao etanol (EtOH) ou solução salina (Sal) foram coletadas no dia PN51. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de macrófagos (A) e da % de células viáveis (B) (n=14).

**4.6. Níveis de IL-1 $\beta$  no plasma e no fluido cerebrospinal de animais expostos ao etanol na adolescência após a administração de LPS.**

Após a exposição ao etanol ou salina os animais no dia PN51, receberam LPS ou salina e após um período de 2 h amostras de sangue e de CSF foram retiradas para avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ .

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 10. Não houveram diferenças significativas entre a dosagem de IL-1 $\beta$  do grupo que recebeu etanol e o grupo salina no plasma (Figura 10A). Entretanto, os níveis de IL-1 $\beta$  no CSF foram significativamente menores nos animais expostos ao etanol quando comparados aos animais expostos somente a salina (Figura 10B).

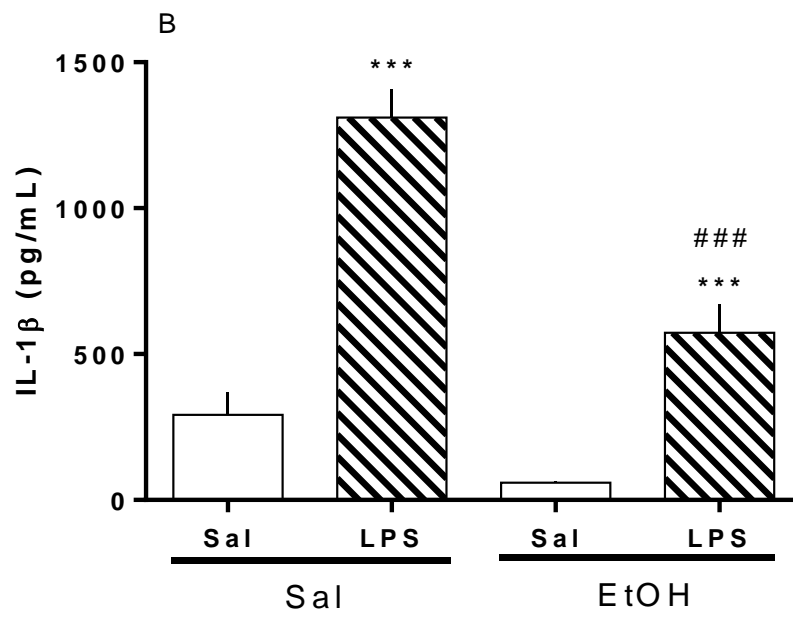
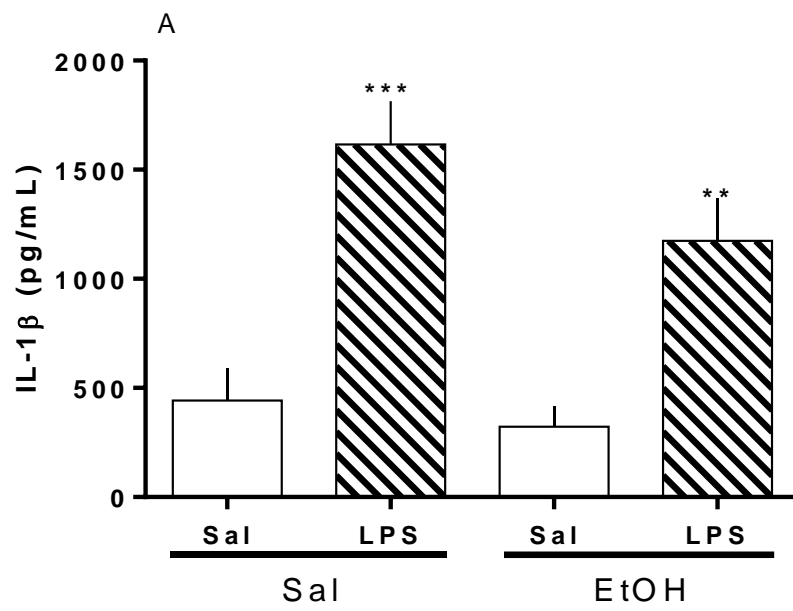




Figura 10 - Níveis de IL-1 $\beta$  no plasma e no CSF após administração intraperitoneal de LPS em animais que foram expostos etanol (EtOH) no dia PN51. LPS (50  $\mu$ g/kg) ou veículo (salina, Sal)) foram administrados por via intraperitoneal e o sangue (A) e CSF (B) foram coletados após 2 h após . As barras representam a média  $\pm$  EPM dos níveis de IL-1 $\beta$  no plasma (A) e no CSF (B) em pg/ml) (n= 7). \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 quando comparado ao grupo Sal/Sal. ### p<0.001 quando comparado ao grupo Sal/LPS.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo deu suporte a nossa hipótese de que a exposição ao etanol seguindo um modelo de *binge* na adolescência pode influenciar, de modo negativo, a resposta febril. De acordo com a literatura, se tem muitos modelos de exposição ao etanol crônica, porém, o modelo de *binge* é uma fase anterior ao uso crônico e que pode levar a várias mudanças neurofisiológicas que ocorrem nesta fase do desenvolvimento.

Os efeitos da exposição ao etanol na temperatura corporal normal e na resposta febril em diferentes idades e padrões de exposição (aguda e crônica) já foram descritos anteriormente. Estudos anteriores relataram os efeitos da exposição ao etanol durante o período fetal. Yirmiya e colaboradores (1993) observaram que uma dieta líquida contendo 5% de etanol oferecido desde o 8º dia de gestação até o dia do parto às ratas diminuiu a resposta febril induzida por LPS na prole, avaliada 60 dias após o nascimento. O mesmo grupo relatou resultados semelhantes após a administração de IL-1 $\beta$  por via intraperitoneal. A exposição ao etanol na fase fetal mostrou-se associada a profundas alterações no desenvolvimento e na função do sistema imune. O estudo utilizou três tipos grupos: grupo com dieta líquida contendo 5% etanol, grupo com dieta líquida isocalórica e o terceiro grupo recebeu água e ração para roedores. A atividade motora e a temperatura basal dos animais foram registradas bem como os efeitos da IL-1 $\beta$  na temperatura e a atividade circadiana dos animais no período claro e no período escuro. Houve uma redução na resposta febril no grupo de animais expostos ao etanol na fase fetal no período claro mas esta diferença não foi observada no período escuro o que levou estes pesquisadores a concluir que a exposição fetal ao etanol regula a resposta febril de forma diferente nas diferentes fases do ciclo circadiano (Yirmiya et al., 1996). Posteriormente, Taylor e colaboradores (1999) demonstraram que os ratos expostos ao etanol no período fetal apresentavam níveis de IL-1 $\beta$  no hipotálamo inferiores, 2 h após um desafio imunológico com LPS, e também apresentaram menor resposta febril induzida pela administração i.c.v. de IL-1 $\beta$ . No entanto, a resposta febril após injeção i.c.v. de PGE<sub>2</sub> apresentou-se normal.

Estes resultados sugerem uma deficiência na sinalização da IL-1 $\beta$  no centro termorregulador no hipotálamo, mas também sugerem que esta deficiência não danifica os mecanismos efetores para a resposta febril após a exposição fetal ao álcool uma vez que a resposta à PGE<sub>2</sub> apresentou-se normal. A resposta febril mais baixa induzida pela administração intraperitoneal de IL-1 $\beta$  foi revertida pela adrenalectomia materna no dia gestacional 7 para os ratos expostos ao álcool durante a fase fetal em ambos os sexos, masculino e feminino, sugerindo que as mudanças observadas foram relacionadas à corticosterona liberada pela mãe após a exposição ao etanol (Taylor et al., 2002).

Da maneira similar, ratos adultos alimentados com uma dieta líquida contendo 5% de etanol durante 14 dias mostraram um aumento da atividade do ritmo circadiano da temperatura prejudicado durante o período escuro. A resposta febril induzida por injeção i.p. de LPS ou IL-1 $\beta$  (mas não de IL-1 $\beta$  i.c.v.) em animais expostos ao etanol foi reduzido quando comparado com animais controle. Os níveis de IL-1 $\beta$  no hipotálamo após o consumo de etanol crônico mostrou-se reduzida quando comparados com animais controle. Esta redução hipotalâmica de IL-1 $\beta$  poderia ser um fator que contribuiu na atenuação da resposta febril em animais expostos ao etanol. Porém, a administração central de IL-1 $\beta$  criaria um mecanismo de compensação na concentração desta citocina promovendo uma resposta febril normal (Taylor et al., 2002).

Em nosso estudo, diferentemente do que foi observado por Taylor e colaboradores (2002), não houve diferença na temperatura basal dos animais expostos ao etanol ou salina. Esta diferença poderia estar relacionada ao fato de que no presente estudo, os animais após a fase de *binge* não foram expostos ao etanol por 12 dias enquanto que no estudo de Taylor e colaboradores, os efeitos no aumento da temperatura no período escuro começam a surgir após 11 dias e durante a exposição ao etanol.

No nosso estudo, verificou-se que a exposição ao etanol durante a adolescência gera alterações semelhantes na resposta febril induzida por LPS e IL-1 $\beta$ , isto é, uma redução da resposta febril que podem ser observadas mesmo após 13 dias (dia pós-natal 51). Para o LPS, essas mudanças não são

permanentes e não foram observadas na resposta febril no dia 63 pós-natal. Portanto, as alterações observadas após a exposição ao etanol na adolescências são semelhantes àquelas observadas por Yirmiya e colaboradores quando da exposição na fase fetal, mas provavelmente permanecem por um período mais curto (Yirmiya et al., 1996).

Além disso, foi demonstrado que não há mudanças significativas detectáveis nos parâmetros hematológicos ou alterações no número ou viabilidade de macrófagos peritoneais o que poderia ser responsável pela resposta febril reduzida observada nos animais. Com relação aos parâmetros hematológicos, estes são um indicativo de um bom estado de saúde dos animais. Os animais expostos ao etanol, embora apresentassem estes parâmetros normais, apresentaram uma menor massa corporal. Portanto, é possível que outros parâmetros estejam alterados.

Adicionalmente, não observamos alterações significativas no número ou na viabilidade dos macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais são uma das principais fontes de IL-1 $\beta$ , um dos mais importantes pirogênios endógenos (West et al., 1997) . Os níveis plasmáticos normais de IL-1 $\beta$  observados nos animais expostos ao etanol na adolescência e que receberam LPS corroboram a ideia que a exposição ao etanol na adolescência não afetou a produção periférica desta citocina. Deste modo, estes dados sugerem que uma redução da síntese de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos não está relacionado com a redução da resposta febril observado após a exposição ao etanol durante a adolescência. No entanto, mais estudos são necessários para afirmar que apenas mecanismos centrais estão envolvidos na resposta febril reduzida observada após a exposição ao etanol.

Estas mudanças na resposta febril também não podem ser atribuídas à exposição aguda ao etanol uma vez que não foram observadas alterações na resposta febril de ratos que receberam etanol 24 h antes da injeção de LPS em comparação com aqueles que receberam solução salina.

A exposição ao etanol, por si só, induz uma neuroinflamação e pode alterar as citocinas no cérebro e periferia na ausência de um desafio imunológico. O etanol na dieta líquida durante 5 semanas aumentou os níveis cerebrais de citocinas, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e proteína quimioatrativa de

monócitos-1 (MCP-1) (Lippai et al., 2013). Em pacientes dependentes de álcool foram encontrados a ter aumentos na região específica do cérebro em marcadores microgliais e níveis de MCP-1 de proteína (He & Crews, 2008).

O aumento da expressão de citocinas no cérebro é, pelo menos em parte, mediada pelo receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) (Alfonso-Loeches et al., 2010) e pelo multicomplexo protéico NLRP3 (do inglês *NOD-like receptor Family, pyrin domain containing 3*, ou família do receptor do tipo NOD, contendo domínio pirina 3) do inflamossoma (Lippai et al., 2013). Estes autores demonstraram que a diminuição da expressão (*knockdown*) de TLR4, NLRP3 e de outros componentes das vias de sinalização de LPS e IL-1/receptor de IL-1 reverteu a neuroinflamação. Ainda, ratos adolescentes tratados com etanol num protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo mostraram alterações na sinalização do TLR4 associada a disfunções cognitivas de longa duração, tais como o reconhecimento de objeto e de comportamento passivo (Montesinos et al., 2015). Portanto, sugere-se que a diminuição da expressão da via de sinalização do receptor de IL-1/IL-1 no cérebro pode também ser responsável pela redução da febre observada após a administração de LPS e IL-1 $\beta$  durante a adolescência.

O álcool também altera a função de barreira do intestino e os componentes bacterianos podem entrar na circulação. Os níveis de LPS estão aumentados no soro de dependentes de álcool e isto poderia induzir a ativação do TLR4 (Szabo & Lippai, 2014). Há evidências de que o etanol produz efeitos biológicos, principalmente por interação com lipídios de membrana e este reflete um equilíbrio entre os efeitos anti-inflamatórios de etanol e efeitos pró-inflamatórios de bactérias que entram na circulação devido à função de barreira diminuída no trato gastrointestinal (Szabo et al., 2007).

O cérebro adolescente está em desenvolvimento constante com a produção de axônios e sinapses que conferem plasticidade para o desenvolvimento de circuitos neuronais. Estes circuitos são moldados para atender às necessidades ambientais que levam à maturidade adulta. Tal período de remodelação pode tornar-se frágil para insultos externos (por exemplo a maior exposição a toxinas bacterianas como o LPS advindas e um

aumento na permeabilidade barreira intestinal) redefinindo, assim, não só funções cognitivas, mas também a resposta febril (Crews et al., 2011).

Estudos realizados em adolescentes humanos forneceram evidências de que o consumo de álcool do tipo *binge* reduziu a qualidade da matéria branca e afetou a integridade do trato de fibras ligadas a conexões frontais (Pascual et al., 2014). Há também evidências citadas por McCambridge e colaboradores (2011) que os efeitos aparentes sobre o consumo de álcool persistem além da idade de 30 anos, que é um período de tempo mais longo do que tinha sido previamente sugerido. Nosso trabalho demonstrou mudanças na resposta febril após a exposição ao etanol no período da adolescência mas esta não foram permanentes embora possam durar por um longo período. Vinte e cinco dias após a última exposição ao etanol não foi possível detectar mais nenhuma alteração na resposta febril.

O consumo de etanol durante a puberdade, no entanto, resultou em uma desregulação permanente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Przybycień-Szymanska e colaboradores (2011) mostraram que animais adultos que foram previamente expostos ao etanol durante a puberdade apresentaram níveis circulantes de corticosterona basal significativamente mais baixos e que a desregulação do eixo HPA tem demonstrado ser preditivo para o desenvolvimento de transtornos de humor porém mais experimentos são necessários pra determinar se existe uma relação direta entre a exposição ao etanol e o desenvolvimento de transtorno de humor.

Em conclusão, este estudo demonstra que a exposição ao etanol durante a adolescência pode produzir, porém de forma reversível, alterações no sistema nervoso central as quais podem prejudicar a resposta febril. Estas alterações podem durar por um longo mas não são permanentes e parecem envolver, pelo menos em parte a sinalização envolvendo LPS/IL-1 $\beta$ . Este comprometimento pode ter consequências importantes na susceptibilidade destes indivíduos às doenças infecciosas pois, além da febre pode matar alguns microorganismos patogênicos, este não parece ser o seu papel principal. Em vez disso, a febre possui uma função importante adjuvante, aumentando a eficácia de certas respostas seletivas, ativadas por estímulos

adaptativos do sistema imunológico e, assim, ajudando a resposta de fase aguda.

## 6. APÊNDICE

### 6.1. *Esterilização*

Os materiais utilizados nos experimentos foram adquiridos estéreis. Quando a esterilização se fazia necessária, os materiais foram autoclavados a 121°C por 1 h (material plástico, soluções, tampões e material cirúrgico) ou por calor seco (vidraria).

### 6.2. *Soluções, Tampões, Meios de Cultura e Reagentes*

#### 6.2.1. *Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS)*

NaCl: 80 g

KCl: 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 14,4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2 g

Água MiliQ qsp 1 L

Quando necessário o pH foi elevado a 7.4 com NaOH 0,1 N. Para uso a solução foi diluída 10 vezes com água deionizada e autoclavada durante 20 minutos em 120°C.

#### 6.2.2. *Solução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) 5 mg/mL*

MTT: 250 mg



PBS: 50 mL

A solução foi exposta ao sonificador até completa dissolução do MTT.

#### 6.2.3. Meio de cultura RPMI 1640

Meio RPMI 1640 com glutamina sem bicarbonato: 10.40 g

Bicarbonato de Sódio: 0,67 g

HEPES: 2,38 g

Água Deionizada autoclavada: q.s.p. 1L

A solução foi incubada a 37°C por 30 min em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O pH foi ajustado para 7.4 com HCl ou NaOH 1N estéril, quando necessário. O meio foi esterilizado em filtros Millipore com poros de 0,2 µm de diâmetro.

#### 6.2.4. Solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS)

SDS: 50,0 g

Água Destilada q.s.p. 500 mL

#### 6.2.5. Solução de ácido nítrico 5%

Água mili-q: 950 ml

Ácido nítrico: 50 ml

6.2.6. *Tampão de lavagem para ELISA*

PBS: 1L

Tween 20: 50 µl

6.2.7. *Tampão de bloqueio para ELISA*

Albumina bovina: 0,5 g

Sacarose: 2,5 g

Após pesagem dos pós diluir em 50 ml de PBS. Se for armazenar, adicionar 0,025 g de azida ( $\text{NaN}_3$ ).

6.2.8. *Solução para estreptavidina*

Estreptavidina (1:250)

Albumina bovina: 0,11 g

A estreptoavidina deve ser diluída conforme a bula do fabricante. Após a pesagem dos pós diluir em 11 ml de PBS.

6.2.9. *Tampão fosfato – citrato 0,05 M para OPD*

$\text{Na}_2\text{PO}_4$ : 2,839 g

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ : 1,921 g

Acrescentar 40 ml de água Mili-Q. O pH foi ajustado para 5.0. completar o volume para 100 ml com água Mili-Q.

6.2.10. *Ácido sulfúrico 3 M*

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 15,99 ml

Água q.s.p 100 ml

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, R. G., A. Hewetson, C. M. George, P. J. Syapin, and S. E. Bergeson. 2011. "Minocycline Reduces Ethanol Drinking." *Brain, Behavior, and Immunity* 25(SUPPL. 1).

Alfonso-Loeches, Silvia, Maya Pascual-Lucas, Ana M. Blanco, Irene Sanchez-Vera, and Consuelo Guerri. 2010. "Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(24):8285–95.

Blatteis, Clark M. 2003. "Fever: Pathological or Physiological, Injurious or Beneficial?" *Journal of Thermal Biology* 28(1):1–13.

Blatteis, Clark M. and Elmir Sehic. 1998. "Cytokines and Fever." Pp. 608–18 in *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 840.

Blednov, Yuri A. et al. 2012. "Neuroimmune Regulation of Alcohol Consumption: Behavioral Validation of Genes Obtained from Genomic Studies." *Addiction Biology* 17(1):108–20.

Brito, Haissa Oliveira et al. 2016. "Evidence of Substance P Autocrine Circuitry That Involves TNF-A, IL-6, and PGE2 in Endogenous Pyrogen-Induced Fever." *Journal of neuroimmunology* 293:1–7.

Cannon, Joseph G. 2013. "Perspective on Fever: The Basic Science and Conventional Medicine." *Complementary Therapies in Medicine* 21(SUPPL.1).

Consiglio, Angelica Rosat and Aldo Bolten Lucion. 2000. "Technique for Collecting Cerebrospinal Fluid in the Cisterna Magna of Non-Anesthetized Rats." *Brain Research Protocols* 5(1):109–14.

Crews, Fulton T. and Ryan Peter Vetreno. 2011. "Addiction, Adolescence, and Innate Immune Gene Induction." *Frontiers in Psychiatry* 2(APR).

Doremus-Fitzwater, Tamara L. et al. 2014. "Intoxication- and Withdrawal-Dependent Expression of Central and Peripheral Cytokines Following Initial Ethanol Exposure." *Alcoholism, clinical and experimental research* 38(8):2186–98.

Esilsson, Anna et al. 2014. "Immune-Induced Fever Is Mediated by IL-6 Receptors on Brain Endothelial Cells Coupled to STAT3-Dependent Induction of Brain Endothelial Prostaglandin Synthesis." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(48):15957–61.

Fabricio, Aline S. C., Giles a Rae, Aleksander R. Zampronio, Pedro D'Orléans-Juste, and Glória E. P. Souza. 2006. "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* 290:R164–71.

Fraga, Daniel et al. 2015. “Endocannabinoids, through Opioids and Prostaglandins, Contribute to Fever Induced by Key Pyrogenic Mediators.” *Brain, Behavior, and Immunity*.

Fraga, Daniel, Renes R. Machado, Luíz C. Fernandes, Glória E. P. Souza, and Aleksander R. Zamprônio. 2008. “Endogenous Opioids: Role in Prostaglandin-Dependent and -Independent Fever.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294(2):R411–20.

Gao, W. et al. 2009. “Prostaglandin D<sub>2</sub> Produced by Hematopoietic Prostaglandin D Synthase Contributes to LPS-Induced Fever.” *Journal of Physiology and Pharmacology* 60(2):145–50.

Gay, N. J., M. Gangloff, and A. N. Weber. 2006. “Toll-like Receptors as Molecular Switches.” *Nat Rev Immunol* 6(9):693–98.

Gordon, C. J. 2010. “Autonomic Nervous System: Central Thermoregulatory Control.” Pp. 891–98 in *Encyclopedia of Neuroscience*.

He, Jun and Fulton T. Crews. 2008. “Increased MCP-1 and Microglia in Various Regions of the Human Alcoholic Brain.” *Experimental Neurology* 210(2):349–58.

Lazarus, Michael et al. 2007. “EP3 Prostaglandin Receptors in the Median Preoptic Nucleus Are Critical for Fever Responses.” *Nature neuroscience* 10(9):1131–33.

Lerma-Cabrera, Jose Manuel et al. 2013. “Adolescent Binge-like Ethanol Exposure Reduces Basal  $\alpha$ -MSH Expression in the Hypothalamus and the Amygdala of Adult Rats.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 110:66–74.

Lippai, Dora et al. 2013. “Alcohol-Induced IL-1 $\beta$  in the Brain Is Mediated by NLRP3/ASC Inflammasome Activation That Amplifies Neuroinflammation.” *Journal of leukocyte biology* 94(1):171–82.

Montesinos, Jorge et al. 2015. “TLR4 Elimination Prevents Synaptic and Myelin Alterations and Long-Term Cognitive Dysfunctions in Adolescent Mice with Intermittent Ethanol Treatment.” *Brain, Behavior, and Immunity* 45:233–44.

Nakamura, K. 2011. “Central Circuitries for Body Temperature Regulation and Fever.” *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301(5):R1207–28.

Pascual, María, Antoni Pla, José Miñarro, and Consuelo Guerri. 2014. “Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction: A Review with

- Reference to Human Adolescent Drinking." *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 49(2):187–92.
- Paxinos, George and Charles Watson. 2006. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition by." *Academic press* 170:547612.
- Pruett, Stephen B., Qiang Zheng, Ruping Fan, Kametra Matthews, and Carlton Schwab. 2004. "Ethanol Suppresses Cytokine Responses Induced through Toll-like Receptors as Well as Innate Resistance to Escherichia Coli in a Mouse Model for Binge Drinking." *Alcohol* 33(2):147–55.
- Romanovsky, Andrej A., Alexandre A. Steiner, and Kiyoshi Matsumura. 2006. "Cells That Trigger Fever." *Cell Cycle* 5(19):2195–97.
- Roth, J. and G. E. P. De Souza. 2001a. "Fever Induction Pathways: Evidence from Responses to Systemic or Local Cytokine Formation." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(3):301–14.
- Roth, J. and G. E. P. De Souza. 2001b. "Fever Induction Pathways: Evidence from Responses to Systemic or Local Cytokine Formation." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(3):301–14.
- Schiltz, Jennifer C. and Paul E. Sawchenko. 2002. "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* 22(13):5606–18.
- Seibert, K. et al. 1994. "Pharmacological and Biochemical Demonstration of the Role of Cyclooxygenase 2 in Inflammation and Pain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(25):12013–17.
- Sköld-Chiriac, S., A. Nord, M. Tobler, J. A. Nilsson, and D. Hasselquist. 2015. "Body Temperature Changes during Simulated Bacterial Infection in a Songbird: Fever at Night and Hypothermia at Day." *Journal of Experimental Biology* 218:2961–69.
- Soares, Denis Melo et al. 2009. "CCL3/MIP-1 $\alpha$  Is Not Involved in the LPS-Induced Fever and Its Pyrogenic Activity Depends on CRF." *Brain Research* 1269:54–60.
- Szabo, Gyongyi, Angela Dolganiuc, Qun Dai, and Stephen B. Pruet. 2007. "TLR4, Ethanol, and Lipid Rafts: A New Mechanism of Ethanol Action with Implications for Other Receptor-Mediated Effects." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(3):1243–49.
- Szabo, Gyongyi and Dora Lippai. 2014. "Converging Actions of Alcohol on Liver and Brain Immune Signaling." *International Review of Neurobiology* 118:359–80.

Tansey, Etain A. and Christopher D. Johnson. 2015. "Recent Advances in Thermoregulation." *Advances in Physiology Education* 39(3):139–48.

Taylor, a N., D. L. Tio, and R. Yirmiya. 1999. "Fetal Alcohol Exposure Attenuates Interleukin-1beta-Induced Fever: Neuroimmune Mechanisms." *Journal of neuroimmunology* 99:44–52.

Vetreno, Ryan P., Margaret Broadwater, Wen Liu, Linda P. Spear, and Fulton T. Crews. 2014. "Adolescent, but Not Adult, Binge Ethanol Exposure Leads to Persistent Global Reductions of Choline Acetyltransferase Expressing Neurons in Brain." *PLoS ONE* 9(11).

West, M. A., T. Bennet, S. C. Seatter, L. Clair, and J. Bellingham. 1997. "LPS Pretreatment Reprograms Macrophage LPS-Stimulated TNF and IL-1 Release without Protein Tyrosine Kinase Activation." *Journal of leukocyte biology* 61(1):88–95.

Wilhelms, Daniel Björk et al. 2014. "Deletion of Prostaglandin e2 Synthesizing Enzymes in Brain Endothelial Cells Attenuates Inflammatory Fever." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 34(35):11684–90.

Woodward, D. F., R. L. Jones, and S. Narumiya. 2011. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress." *Pharmacological reviews* 63(3):471–538.

World Health Organisation. 2014. "Global Status Report on Alcohol and Health 2014." *Global status report on alcohol* 1–392.

Yamawaki, Yosuke, Hitomi Kimura, Toru Hosoi, and Koichiro Ozawa. 2010. "MyD88 Plays a Key Role in LPS-Induced Stat3 Activation in the Hypothalamus." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 298(2):R403–10.

Yirmiya, R., M. L. Pilati, F. Chiappelli, and A. N. Taylor. 1993. "Fetal Alcohol Exposure Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Fever in Rats." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 17(4):906–10.

Yirmiya, R., D. L. Tio, and A. N. Taylor. 1996. "Effects of Fetal Alcohol Exposure on Fever, Sickness Behavior, and Pituitary-Adrenal Activation Induced by Interleukin-1 Beta in Young Adult Rats." *Brain, behavior, and immunity* 10(3):205–20.