

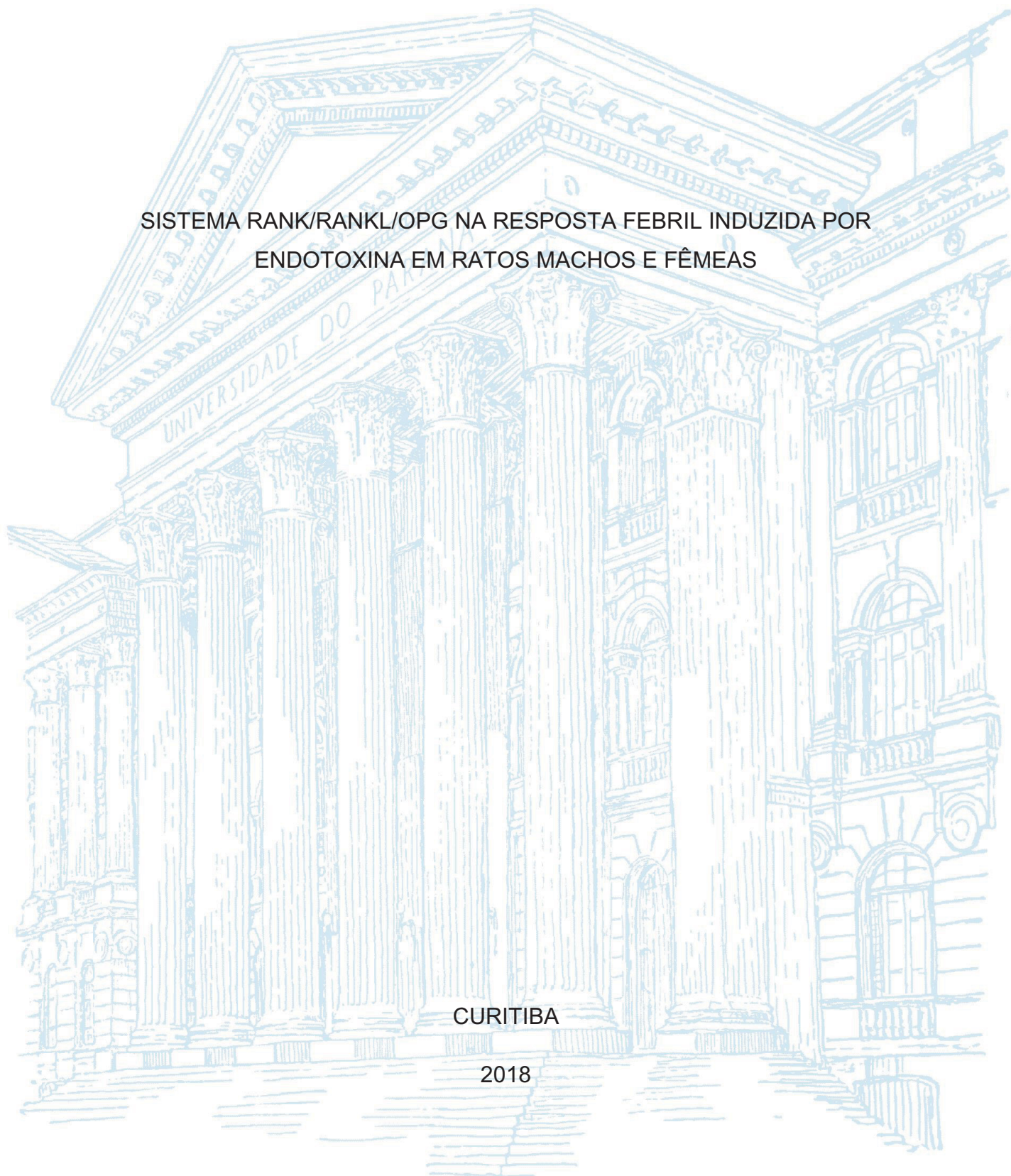
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA RASEC RADULSKI

SISTEMA RANK/RANKL/OPG NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR
ENDOTOXINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

CURITIBA

2018



DÉBORA RASEC RADULSKI

SISTEMA RANK/RANKL/OPG NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR
ENDOTOXINA 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 Zampronio.

CURITIBA

2018

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

Radulski, Débora Rasec.

Sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por endotoxina em ratos machos e fêmeas. / Débora Rasec Radulski. – Curitiba, 2018.
79 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Zamprônio.

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

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

CDD (20. ed.) 616.047



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

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 DÉBORA RASEC RADULSKI intitulada: Sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por endotoxina em ratos machos e fêmeas, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

Curitiba, 13 de Julho de 2018.


ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRÔNIO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



RENATA CRISTIANE DOS REIS

Avaliador Externo (UFPR)


JULIANA GEREMAS CHICHORRO

Avaliador Interno (UFPR)

*“Se você tem conhecimento, deixe os outros acenderem as suas velas nele”
Margaret Fuller*

AGRADECIMENTOS

Ao meu companheiro, Paulo Eduardo Sypriano, meu melhor amigo e meu grande amor.

Aos meus familiares, que mesmo em situações adversas contribuíram para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao CNPQ e a CAPES, pelo apoio financeiro durante todo este período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Zampronio, que me acolheu em um momento de necessidade. Serei eternamente grata pela oportunidade de crescimento e desenvolvimento. O senhor é referência como pesquisador científico.

Ao grupo de Pesquisa do Laboratório de inflamação e Febre que participaram deste projeto de diversas formas.

Aos funcionários da Universidade Federal, secretários, técnicos e colaboradores.

Aos amigos de pós-graduação, Felipe Barbosa, Leonardo Escalante, Letícia Milani e Maycon Matias, que foram peças fundamentais para que eu continuasse a caminhada em meio às dificuldades.

A algumas pessoas que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional através de conselhos, críticas e sugestões e serei grata por isso, Prof. Dra. Cristina Stern e Prof. Dra. Maria Fernanda Werner.

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

RESUMO

Alterações nas interações do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL) com seu receptor (RANK) e com seu bloqueador endógeno osteoprotegerina (OPG) estão envolvidas em várias doenças como osteoporose, artrite reumatóide e diabetes mellitus. Estudos anteriores mostraram que este sistema também está envolvido na resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em machos. O objetivo deste estudo foi avaliar se este sistema também está envolvido na resposta febril em ratas e como ele se comporta frente as alterações hormonais nas fêmeas. Ratas falso-operadas (Sham) na fase proestro (PE) apresentaram uma temperatura corporal (T_c) mais baixa em comparação com machos, fêmeas na fase diestro (DE) ou ovariectomizadas (OVX). A injeção intraperitoneal de LPS induziu uma resposta febril pronunciada em ratos machos e fêmeas OVX, e uma resposta significativamente menor em fêmeas Sham nas fases PE e DE do ciclo estral. O pré-tratamento com o antagonista de RANK, OPG, reduziu a resposta febril em machos, fêmeas na fase DE e OVX. Diferentemente, as fêmeas na fase PE não tiveram sua resposta febril alterada pela administração de OPG. A reposição de estradiol em animais OVX reduziu a febre induzida por LPS a níveis comparáveis aqueles observados em fêmeas em DE e PE. O tratamento com OPG também reduziu a resposta febril das fêmeas OVX a níveis similares. No entanto, a combinação de ambos os tratamentos, reposição de estradiol e tratamento com OPG, não alterou o efeito observado com qualquer tratamento individual. As fêmeas na fase PE apresentam uma expressão de receptores RANK no hipotálamo significativamente maior após a administração de LPS enquanto que os níveis deste receptor não se alteraram significativamente em ratas em DE ou OVX, após a administração deste pirogênio. Ainda, a reposição hormonal em ratas OVX aumentou significativamente a expressão destes receptores, resultado este similar aquele verificado nas ratas na fase PE. Esses resultados sugerem que o sistema RANK/RANKL é influenciado pelos hormônios sexuais femininos, em especial os estrógenos, desempenhando um papel importante na indução da febre apenas quando esses hormônios estão reduzidos (DE e OVX). Em fêmeas em PE o RANKL não participa da resposta febril e esse fato não está correlacionada com variações (redução) na expressão do receptor no hipotálamo. Além disso, pela primeira vez foi observado a participação de um mediador na resposta febril em decorrência de variações hormonais em fêmeas.

Palavras-chave: Pirogênios Endógenos, Febre, Hormônios Sexuais.

ABSTRACT

Changes in the signaling of the Receptor Activator of Nuclear factor κ B ligand (RANKL), its receptor (RANK) and endogenous blocker osteoprotegerin (OPG) are involved in several diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis and diabetes mellitus. Previous studies also showed that this system is involved in the febrile response induced by LPS in males. The aim of this study was to evaluate if this system is involved in the febrile response in rats and how this system behaves when hormonal occurs. Sham-operated female rats in proestrous (PE) showed a lower core temperature compared to males, sham-operated females in diestrous (DE) and ovariectomized (OVX) female rats. Intraperitoneal injection of LPS induced a pronounced febrile response in male and OVX female rats, and a significantly lower response in female sham-operated animals in both PE and DE phases of the hormonal cycle. Pre-treatment with the RANK antagonist, OPG, reduced the fever in males, sham-operated females in DE and OVX female rats. Differently, females in the PE phase did not have their febrile response altered by the administration of OPG. Replacement of estradiol (E2) in OVX animals reduced LPS-induced fever to levels comparable to those observed in females in DE and PE. In addition, OPG treatment also reduced the febrile response of OVX females to similar levels. However, the combination of both treatments, E2 and OPG, did not alter the effect observed with either treatment individually. Females in the PE phase exhibit significantly increased expression of RANK receptors in the hypothalamus after administration of LPS. However, in female rats in DE or OVX the levels of this receptor do not change significantly after administration of this pyrogen. Moreover, hormone replacement in OVX rats is capable of increasing this expression of receptors, a result similar to that observed in rats in the PE phase. These results suggest that the RANK / RANKL system is influenced by female hormones, especially estrogens, and plays an important role in inducing fever only when these hormones are reduced (DE and OVX). In females in PE, RANKL does not participate in the febrile response and this fact is not correlated with variations (reduction) in receptor expression in the hypothalamus. In addition, the participation of a mediator in the febrile response due to hormonal variations in females was observed for the first time.

Keyword: Endogenous pyrogens, Fever, sex hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Figura esquemática do sistema RANK/RANKL nos ossos	17
Figura 2: Esquema do modelo de termorregulação.....	19
Figura 3: Representação da zona de termoneutralidade em ratos.....	20
Figura 4: Figura esquemática do sistema RANK/RANKL no cérebro.....	22
Figura 5: Prevalência de doenças autoimunes em relação ao país e sexo	23
Figura 6: Níveis hormonais no ciclo reprodutivo.....	25
Figura 7: Realização de lavado vaginal	32
Figura 8: Diferenciação celular nas fases do ciclo estral em ratas	33
Figura 9: Registrador remoto de temperatura.....	35
Figura 10: Delineamento experimental.....	37
Figura 11: Avaliação dos parâmetros de eficácia da ovariectomia.....	43
Figura 12: Temperatura corporal e Temperatura corporal basal de ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e nas fases diestro e proestro durante o período claro.....	45
Figura 13: Resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas, nas fases diestro e proestro.....	47
Figura 14: Efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratos machos.....	49
Figura 15: Efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase proestro.....	51
Figura 16: Efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase diestro.....	53
Figura 17: Efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas ovariectomizadas.....	55
Figura 18: Efeito do tratamento com β -estradiol e osteoprotegerina em ratas ovariectomizadas	57
Figura 19: Expressão de RANK no hipotálamo de ratas ovariectomizadas e nas fases diestro, proestro através da técnica de Western blotting.....	59
Figura 20: Expressão de RANK no hipotálamo de ratas ovariectomizadas após reposição hormonal através da técnica de Western Blotting	60

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

CRF	- fator liberador de corticotropina
DE	- diestro
EOp	- opioides endógenos
ET-1	- endotelina-1
FSH	- hormônio folículo estimulante
i.c.v	- intracerebroventricular
IL	- interleucina
i.p	- intraperitoneal
LBP	- proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LH	- hormônio luteinizante
LPS	- lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias Gram-negativas
LSn	- núcleo septal lateral
MnPO	- núcleo pré-óptico mediano
MPA	- área pré-óptica medial
MSn	- núcleo septal medial
NF-kB	- fator nuclear kB
OPG	- osteoprotegerina
OVX	- ovariectomizadas
PE	- proestro
PEnd	- Pirogênios Endógenos
PG	- prostaglandina
PO/HA	- área pré-óptica no hipotálamo anterior

POA	- área pré-óptica
PTH	- paratormônio
RANK	- receptor ativador do fator NF-kB
RANKL	- ligante do receptor ativador do fator nuclear kB
s.c	- subcutâneo
SNC	- sistema nervoso central
SP	- substância P
Tb	- temperatura corporal basal
Tc	- temperatura corporal
TLR	- receptores do tipo "Toll"
VCm	- vasoconstrição máxima
VDm	- vasodilatação máxima
ZNT	- zona de termoneutralidade

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

k - kappa

Δ - variação

$^{\circ}$ - grau

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Sistema RANKL/RANK/OPG	15
1.2 Regulação da temperatura corporal.....	17
1.3 Resposta Febril	20
1.4 Diferenças entre sexo e a influência dos hormônios sexuais.....	22
2. OBJETIVO	28
2.1 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	31
3.2 Esterilização.....	31
3.3 Determinação do ciclo estral	31
3.4 Ovariectomia	34
3.5 Implante de registrador remoto de temperatura na cavidade peritoneal ..	34
3.6 Implante de cânula no ventrículo lateral.....	35
3.7 Protocolos experimentais	37
3.8 Avaliação da expressão de receptores RANK no hipotálamo	39
3.9 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Avaliação da eficácia do modelo de menopausa em ratas	42
4.3 Avaliação da resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas na fase diestro, proestro e ovariectomizadas.....	46
4.4 Avaliação do tratamento com osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratos machos.....	48
4.5 Avaliação do tratamento com osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase proestro	50
4.6 Avaliação do efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase diestro.....	52
4.7 Avaliação do efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas ovariectomizadas	54
4.8 Avaliação do efeito do tratamento com β -estradiol e osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas ovariectomizadas.....	56
4.9 Avaliação da expressão de receptores RANK no hipotálamo de ratas em diestro, proestro e ovariectomizadas	58
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema RANKL/RANK/OPG

O ligante do receptor ativador do fator nuclear kB (RANKL) foi descoberto nos anos 90 por grupos independentes e recebeu diferentes denominações como: membro 11 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral (TNFSF11), citocina induzida pela ativação relacionada ao fator de necrose tumoral (TRACE, Wong, Josien et al. 1997), fator de diferenciação de osteoclastos (ODF, Yasuda, Shima et al. 1998) e ligante do fator de diferenciação de osteoclastos (OPGL, Lacey, Timms et al. 1998), sendo portanto caracterizado como uma citocina pertencente a grande família do fator de necrose tumoral α (TNF- α).

O RANKL foi identificado primordialmente com a função de inibir a apoptose dos osteoclastos através da diferenciação dos mesmos. Neste contexto, trata-se de uma proteína transmembrana do tipo II expressa em osteoblastos, células do mesênquima e em células T ativas. Sua expressão pode ser induzida por fatores inflamatórios como interleucina (IL)-1 β , TNF- α , prostaglandina (PG)E₂, IL-6, IL-11e IL-17 mas também por outros fatores como o paratormônio (PTH) (Lam, Nelson *et al.*, 2001, Leibbrandt and Penninger 2008). O RANKL também é capaz de inibir a apoptose de células dendríticas, aumentando sua sobrevivência, contribuindo com a atuação imune no organismo (Anderson, Maraskovsky et al. 1997). Além da forma ligada a membrana de osteoblastos e linfócitos, existe uma forma solúvel de RANKL sendo extraída da membrana celular por uma metaloproteinase, a enzima conversora de TNF- α (TACE) (Lum, Wong *et al.*, 1999, Kanzaki, Makihira *et al.*, 2016)

O segundo constituinte do sistema RANKL/RANK/OPG, o receptor ativador do NF-kB (RANK), é também conhecido como TRANCE-R (Wong, Josien et al. 1997). Trata-se do receptor do RANKL, uma proteína de membrana do tipo I, expressa na superfície de osteoclastos e em células dendríticas. (Anderson, Maraskovsky et al. 1997). Este receptor foi encontrado em outras áreas além da superfície dos osteoclastos, como por exemplo em neurônios e astrócitos do hipotálamo (Hanada, Leibbrandt et al. 2009).

Há ainda um terceiro constituinte deste sistema e também pertencente a grande família do TNF- α , ligado a homeostase óssea. A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel produzida por osteoblastos que compete com o RANK pela ligação com o RANKL, impedindo sua ação (Yasuda, Shima et al. 1998). Deste modo a OPG serve como um receptor “decoy” para RANKL (Rao, Cronin et al. 2018). Interessantemente, a expressão de OPG é regulada por estrógeno, portanto ligando os hormônios sexuais, principalmente na osteoporose em mulheres pós-menopausa (Wada, Nakashima et al. 2006).

A homeostase óssea é regulada através da formação e reabsorção óssea, exercidas pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Um desequilíbrio entre as atividades de remodelação óssea, proveniente de alterações hormonais, inflamação e fatores de crescimento, pode causar doenças ósseas como a osteoporose e a osteopetrose (Yasuda, Shima et al. 1998, Horowitz, Xi et al. 2001). A osteopetrose é caracterizada pelo aumento acentuado de massa óssea, condição rara e hereditária. De forma diferente, a osteoporose caracteriza-se pela perda de massa óssea e tem grande prevalência no período pós-menopausa em mulheres (Leibbrandt and Penninger 2008).

Ainda em relação a homeostase óssea, durante muito tempo, o PTH, a vitamina D e a calcitonina foram considerados seus principais reguladores. Com a descoberta do sistema RANK/RANKL/OPG, o foco passou a ser o estudo da sinalização envolvida entre osteoclastos e osteoblastos (Baud'huin, Lamoureux et al. 2007).

Em relação a homeostase óssea, moléculas como a IL-1 β , o TNF- α e a PGE₂ estimulam a produção de RANKL nos osteoblastos. O RANKL, liga-se ao receptor RANK presente nos osteoclastos precursores, promovendo sua diferenciação, aumentando a reabsorção óssea (Figura 1). Já a OPG, pode impedir esta ligação com o RANK, ao ligar-se ao RANKL, antagonizando seu efeito (Figura1). Assim, uma alta concentração de OPG faz com que o RANKL esteja menos disponível para ligação com o RANK e favorece assim o aumento da massa óssea. Por outro lado, uma baixa concentração de OPG faz com que o RANKL se torne mais disponível para a ligação com o RANK favorecendo a reabsorção e diminuição da massa óssea. A concentração de OPG produzida regula a massa óssea, acredita-se assim que a OPG possa ter efeito ósseo protetor no organismo.

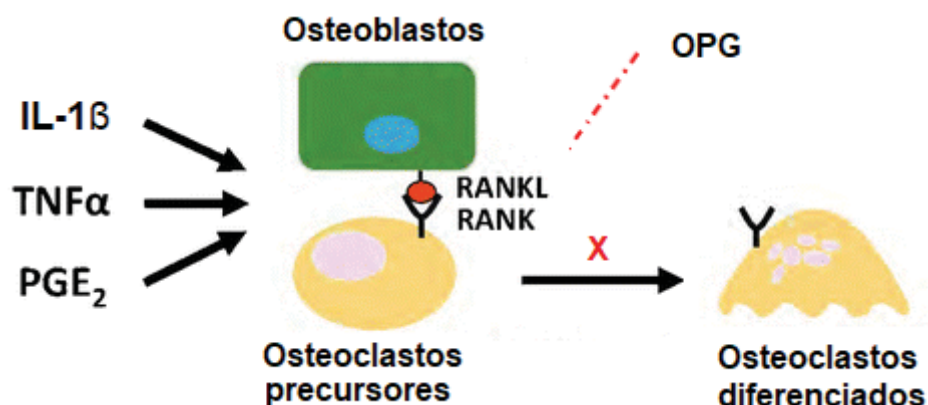


Figura 1. Figura esquemática do sistema RANK/RANKL nos ossos. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e outros mediadores como PGE $_2$ são capazes de aumentar a expressão de RANKL em osteoblastos, facilitando sua ligação com o receptor RANK, promovendo assim a diferenciação de osteoclastos precusores, aumentando a reabsorção óssea. A OPG é capaz de se ligar ao RANKL, bloqueando ligação deste com o receptor RANK, impedindo assim a diferenciação de osteoclastos precusores e favorecendo a formação óssea (Hanada, Hanada et al. 2011) Adaptado. Número de autorização para utilização: 4406180868808

Embora o envolvimento do sistema RANK/RANKL/OPG na homeostase óssea esteja bastante elucidado sendo a principal fonte de dados bibliográficos, outras condições já estão sendo atreladas a este sistema, como artrite reumatoide e diabetes mellitus (Kiechl, Wittmann et al. 2013, Zhao, Huang et al. 2016). Estas doenças estão relacionadas a um componente imune importante, sendo assim há uma íntima ligação entre o metabolismo ósseo e o sistema imune, principalmente relacionado ao sistema RANKL/RANK/OPG. Estudos mais recentes evidenciam uma nova linha de pesquisa, chamada de osteoimunidade (Walsh and Choi 2014, Zhao, Huang et al. 2016). Tyrovola e colaboradores (2017) realizaram uma extensa revisão a respeito desse mecanismo ósseo associado a outras áreas do organismo e suas perspectivas na pesquisa científica. Em relação a regulação da temperatura corporal e a resposta febril, foco do nosso estudo, a participação deste sistema já foi identificada (Hanada, Leibbrandt et al. 2009), porém ainda faltam estudos para melhor compreender o mecanismo envolvido nesta condição.

1.2 Regulação da temperatura corporal

O controle da temperatura corporal (T_c) é uma das principais funções do organismo para a manutenção da homeostase. A forma como este controle é mantido se diferencia de acordo com as espécies. Alguns animais como répteis, anfíbios e peixes, chamados de ectotermos, tem sua T_c regulada através de fatores externos. Diferentemente disso, animais endotermos (aves e mamíferos), regulam sua temperatura de acordo com fatores internos, através do seu próprio metabolismo (Bicego, Barros et al. 2007). Neste estudo focaremos nos mamíferos, em especial na utilização de ratos na experimentação animal e na bibliografia de estudos em humanos.

O funcionamento deste mecanismo de termorregulação no sistema nervoso central foi investigado primeiramente em 1965, por Hammel, que identificou como os neurônios hipotalâmicos poderiam controlar a T_c dentro dos limites ideais. Mais tarde e através de diversos estudos, Morrison e Nakamura (2011) realizaram diversos trabalhos acrescentando novas informações ao modelo de Hammel, contribuindo para o entendimento do complexo mecanismo da termorregulação em animais endotermos.

De forma simplificada, para esses autores, o controle da temperatura corporal inicia-se com a detecção da temperatura ambiente pelos receptores de temperatura (de frio e calor) localizados na pele e nos órgãos internos. Esta informação periférica é levada até o sistema nervoso central (SNC) através de neurônios de diversas ordens onde atingirão áreas termosensíveis do hipotálamo (que detectam alterações térmicas), como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Em um ambiente quente, o MnPO envia aferências excitatórias para a área pré-óptica medial (MPA) que inibe os neurônios eferentes de produção e conservação de calor, reduzindo então a produção e aumentando a perda de calor (Figura 2). Em um ambiente frio, o MnPO inibe a MPA e desinibe os neurônios eferentes de produção e conservação de calor, aumentando a produção e diminuindo a perda de calor (Figura 2) (Nakamura and Morrison 2011).

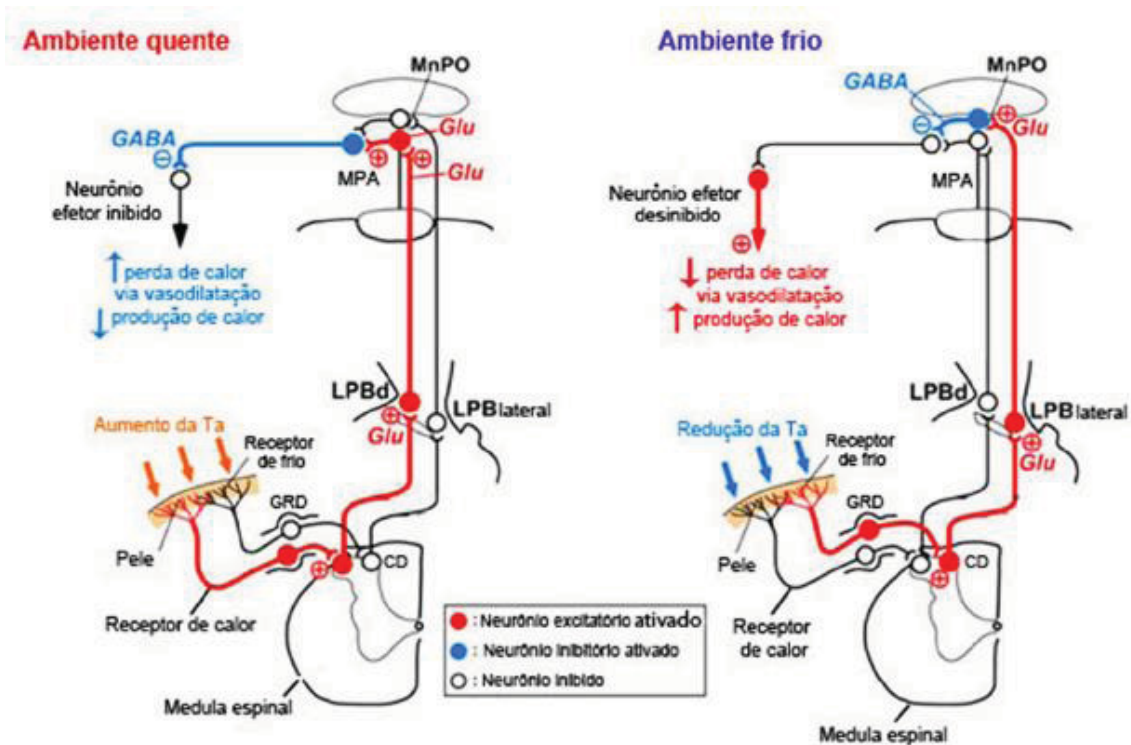


Figura 2. Esquema do modelo de termoregulação. Estímulos de calor e frio são detectados pelos sensores na pele, a informação é conduzida até o MnPO através de neurônios, passando pelo LPB dorsal (LPBd para estímulo de calor) e LPB lateral (para estímulo de frio). Em um ambiente quente, ocorre a estimulação da MPA, mantendo o neurônio efector inibido. Em um ambiente frio, ocorre a inibição da MPA, desinibindo o neurônio efector. Ta, temperatura ambiente; GRD, gânglio da raiz dorsal; CD, MnPO, núcleo pré óptico mediano corno dorsal; LPBd, núcleo parabraquial lateral; MPA, área pré-óptica medial (Nakamura and Morrison 2011) Adaptado.

Autorização para utilização: 4406191072181

Além destes mecanismos de termoregulação previamente mencionados, existe uma faixa de temperatura chamada zona de termoneutralidade ou termoneutra (ZTN), bem caracterizada em animais de experimentação. E a faixa de temperatura ambiente onde essa temperatura tem pouco efeito na temperatura corporal, sendo facilmente compensada. Na faixa da ZTN (entre 26°C e 30°C para ratos), o mecanismo de termoregulação pode ser facilmente ajustado através da vasodilatação e vasoconstrição. Temperaturas abaixo da vasoconstrição máxima (VCm) ou acima da vasodilatação máxima (VDm) alteram a temperatura corporal do animal, pois não havendo mais possibilidade de alteração do vaso para promover dilatação ou constrição o organismo teria que envolver mecanismos mais complexos para perder calor (sudorese, ofegação) ou para produzir calor (termogênese associada ou não a tremores) (Figura 3) (Gordon 1990, Romanovsky, Ivanov et al. 2002).

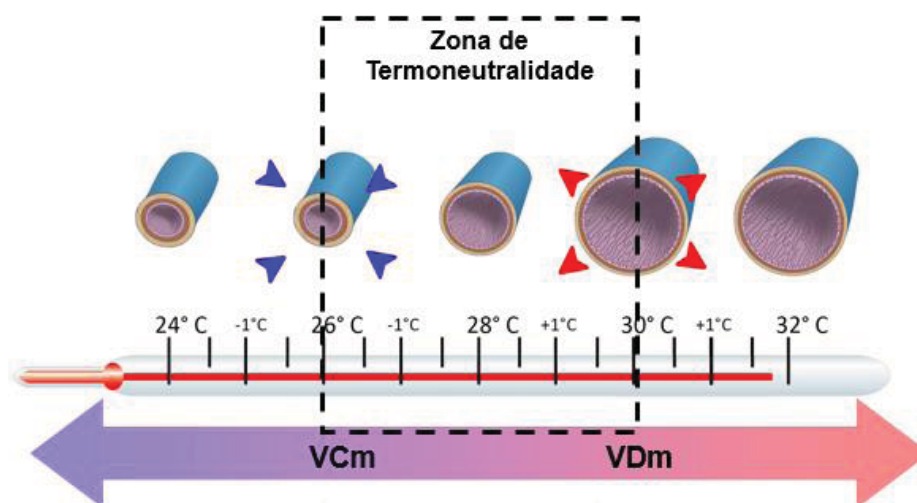


Figura 3. Representação da zona de termoneutralidade (ZTN), em ratos. A ZTN compreende na faixa de temperatura ambiente na qual o mecanismo mais simples de controle da temperatura corporal, ou seja vasodilatação e vasoconstrição funcionalmente é capaz de controlar a temperatura corporal e em ratos encontra-se entre os 26°C (vasoconstrição máxima, VCm) e 30 °C (vasodilatação máxima, VDm). Em temperaturas inferiores àquela em que ocorre VCm, mecanismos de produção de calor (termogênese) serão ativados. Em temperaturas superiores àquela em que ocorre VDm, mecanismos adicionais de perda de calor (sudorese, ofegação) serão ativados (do autor).

Através destes mecanismos, a temperatura corporal nos animais endotermos é mantida relativamente constante. Porém em algumas condições, ocorrem alguns ajustes adicionais na temperatura corporal além daquele relacionado ao fator temperatura ambiental, por exemplo em uma infecção onde há a ocorrência da febre.

1.3 Resposta Febril

A febre é uma reação de fase aguda realizada pelo hospedeiro em resposta a uma lesão ou infecção. Caracteriza-se pela elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de regulação hipotalâmica da temperatura. É uma estratégia evolutiva de sobrevivência, geralmente benéfica, pois aumenta a migração celular, a proliferação de células T e a fagocitose, aumentando assim

as chances de combate ao patógeno (Dinarello, Cannon. et al. 1988, Hasday, Thompson et al. 2014).

A indução de resposta febril pela administração de lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias Gram-negativas (LPS), em animais de laboratório, é um modelo bem descrito na literatura para o estudo da febre e inflamação. Neste modelo é possível mimetizar os efeitos de forma mais uniforme, se comparados com o uso de bactérias vivas (Blatteis 2006) . O LPS ao penetrar no organismo, liga-se a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), formando o complexo LPS-LBP. Este complexo irá interagir com receptores semelhantes ao *Toll* (TLR) do tipo 4, processo que deve ser mediado pelo receptor CD14 na membrana do macrófago. A partir daí uma cascata de sinalização celular é ativada para que o fator de transcrição NF- κ B seja internalizado para o núcleo, e assim seja capaz de realizar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Por promover a febre, essas citocinas são chamadas de pirógenos endógenos (PEnd). Dentre os PEnd conhecidos destacam-se as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Kluger 1991, Ashdown, Poole et al. 2007, Brito, Radulski et al. 2016).

Estes PEnd periféricos, mencionados anteriormente, levam a informação até o SNC, especificamente em áreas próximas ao hipotálamo anterior onde ocorrerá um controle integrativo entre as respostas termorregulatória e febril. Estes pirogênios não precisam necessariamente cruzar a barreira hematoencefálica, mas podem induzir nas células endoteliais locais, a síntese de novos PE ou de mediadores centrais que irão atingir a área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA) (Zamprônio, Soares et al. 2015). Dentre os mediadores centrais envolvidos na resposta febril, destacam-se prostaglandinas E2 (PGE₂) e F2 α (PGF2 α), fator liberador de corticotrofina (CRF), opioides endógenos, substância P (SP) e endotelina-1 (ET-1) (Blatteis, Xin et al. 1994, Zamprônio, Souza et al. 1994, Fabricio, Silva et al. 1998, Dinarello 1999, Reis, Brito et al. 2011, Zamprônio, Soares et al. 2015, Brito, Radulski et al. 2016). Estes mediadores centrais alteram a frequência de disparos de neurônios hipotalâmicos, que passarão a controlar a temperatura corporal em valores acima de 36,5-37°C. Uma excelente revisão a respeito do envolvimento dos mediadores centrais na febre foi realizada por Zamprônio e colaboradores (2015).

Além dos mediadores citados anteriormente, Hanada e colaboradores (2009), verificaram que o RANKL é um mediador central importante na resposta febril induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α , e que o mesmo recruta prostaglandinas para exercer seu efeito pirogênico (Figura 4).

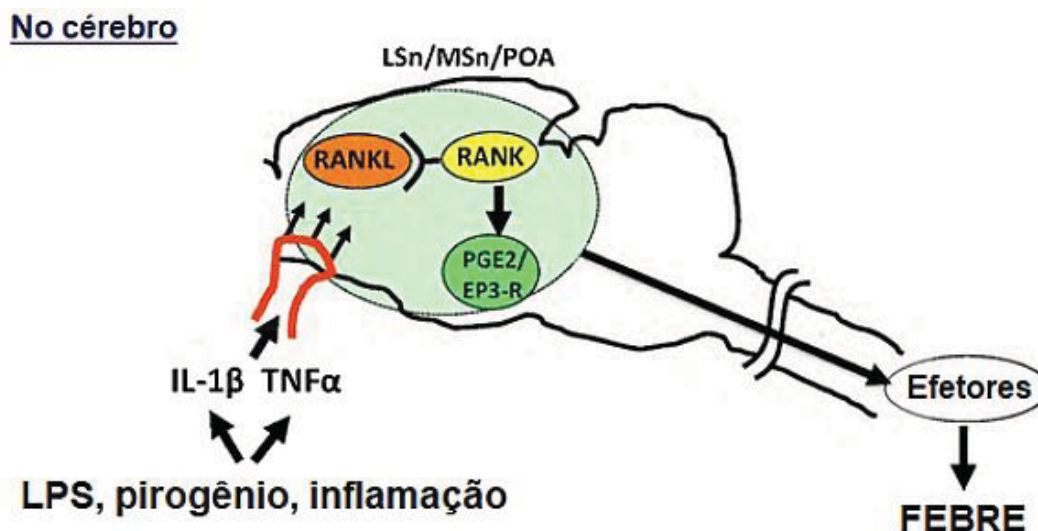


Figura 4. Figura esquemática do sistema RANK/RANKL no cérebro. Estímulos pirogênicos ou inflamatórios estimulam a formação de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Estas citocinas vão estimular a ligação do RANKL com o RANK no cérebro, em sua forma livre, estimulando a produção de PGE₂, tendo como consequência a febre (Hanada, Hanada et al. 2011). Adaptado. LSn, núcleo septal lateral; MSn, núcleo septal medial; POA, área pré-optica.

Autorização: 4406180868808

Esses pesquisadores realizaram seus estudos prioritariamente em animais machos, não tendo sido realizado nenhum tratamento farmacológico ou mesmo avaliada a resposta febril em fêmeas. Na literatura, já é evidenciado a necessidade de estudos comparativos entre gêneros, principalmente em pesquisas relacionadas a fatores imunológicos, onde pode ocorrer maior diferença entre gêneros (Ngo, Steyn et al. 2014). Considerando-se ainda que há uma relação bastante importante entre o funcionamento do sistema RANK/RANKL/OPG e os hormônios sexuais femininos (Wada, Nakashima et al. 2006), torna-se essencial avaliar possíveis diferenças de sexo na resposta febril.

1.4 Diferenças entre sexo e a influência dos hormônios sexuais

Há bastante tempo, tem se estudado a diferença na resposta imune entre sexos e os mecanismos envolvidos nessa particularidade. Esta abordagem iniciou-se com a observação de uma maior incidência de determinadas doenças autoimunes em um gênero, em detrimento do outro (Ansar Ahmed, Penhale et al. 1985, Bouman, Heineman et al. 2005).

Para verificar estas diferenças em relação ao sexo, Beeson (1994) realizou uma análise de dados clínicos brutos a respeito de 40 doenças autoimunes bem descritas em humanos, adicionando então ao estudo os fatores idade e sexo. Nesse estudo, o autor obteve uma co-prevalência em apenas duas patologias, a Síndrome de Sjogren e o Lupus Eritematoso sistêmico. Em geral, nessas doenças a prevalência foi maior em mulheres na faixa dos 30 anos de idade.

Dez anos mais tarde, e com maior número de dados, Ngo e colaboradores (2014), realizaram uma extensa revisão e análise de dados a respeito da diferença de gênero em doenças autoimunes em um conjunto de países específicos. Alguns destes dados foram exemplificados na Figura 5. Além da co-

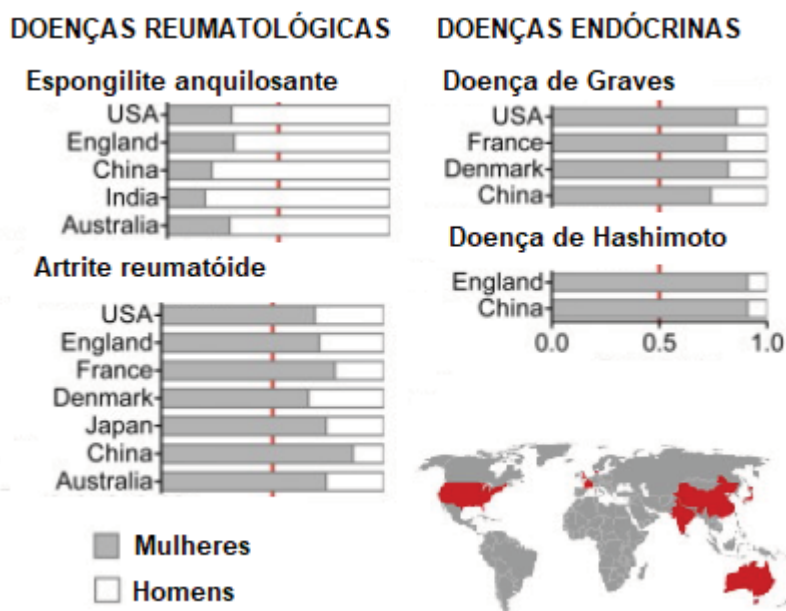


Figura 5. Prevalência de doenças autoimunes em relação ao país e sexo. A figura representa a prevalência da Espondilite anquilosante, Artrite Reumatoide, Doença de Graves e Doença de Hashimoto entre homens e mulheres, nos países representados na cor vermelha do mapa mundial abaixo (Ngo, Steyn et al. 2014) Adaptado. Autorização para utilização: 4491670193113.

leta de dados, esses autores propuseram os possíveis fatores relacionados a maior prevalência dessas doenças em mulheres. Dentre os principais fatores, destacam-se o meio ambiente, fatores genéticos, função hormonal e reprodutiva. A função reprodutiva masculina tem seu início na puberdade e permanece relativamente constante até a andropausa. Diferentemente, nas mulheres a função reprodutiva é alterada drasticamente durante a vida como na puberdade, gravidez e na menopausa. Essas variações hormonais parecem estar envolvidas na modificação do sistema imune em mulheres e conseqüentemente na incidência de algumas doenças autoimunes (Ngo, Steyn et al. 2014).

Os mamíferos apresentam diferença no seu ciclo reprodutivo, variando entre espécies. Em humanos, o ciclo reprodutivo feminino dura em torno de 28 dias, com flutuações hormonais durante o período. Nos primeiros 14 dias, chamado de período folicular, as quantidades de estrógeno e progesterona estão baixas. No dia 12 a quantidade desses hormônios começa a aumentar, estimulando a secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise, culminando na ovulação próximo ao dia 14 (Figura 6A). Durante o período de pós-ovulação, chamado de fase lútea, os níveis de estrogênio e progesterona aumentam rapidamente e depois voltam a níveis muito baixos, quando não há fecundação e inicia-se a menstruação (Emanuele, Wezeman et al. 2002).

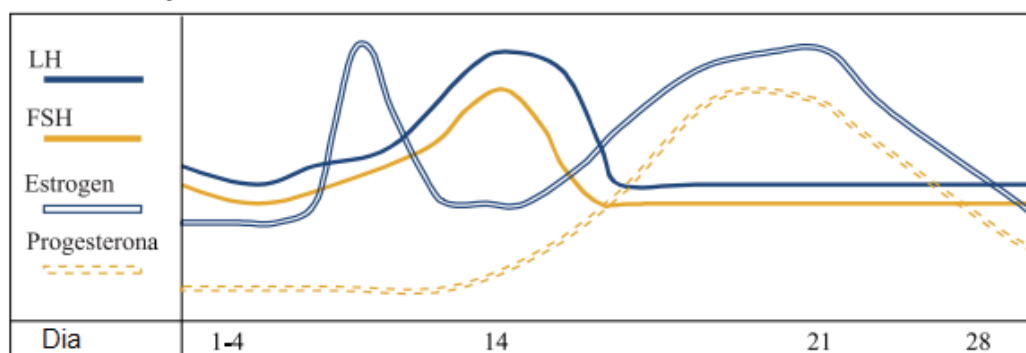
Este ciclo reprodutivo estende-se geralmente até meados dos 40 anos de idade, quando ocorre o declínio progressivo da função ovariana culminando na menopausa. A menopausa caracteriza-se pela interrupção permanente da menstruação, 12 meses de amenorreia, e constitui a transição fisiológica do período reprodutivo para o não reprodutivo. Este período de diminuição de estrógeno e progesterona, além do aumento de FSH, gera sintomas com grande variabilidade em mulheres, como ondas de calor, alterações de humor, perda de libido, entre outros. Além desses sintomas, algumas doenças são mais susceptíveis nessa fase, como a osteoporose (Dempster, Lambing et al. 2012).

Já é descrito na literatura, principalmente em ratas, que os estrógenos tem efeito protetor nos ossos, ao impedir a atividade do RANKL, bloqueando então a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea. A diminuição de estrógenos na menopausa faz com que não ocorra esse efeito protetor,

aumentando a reabsorção óssea, causando osteopenia ou de forma mais severa a osteoporose (Dempster, Laming et al. 2012, Faienza, Ventura et al. 2013)

Diferentemente da mulher, a rata é um animal do tipo poliestro, com ciclos estrais rápidos e sucessivos, com duração de 4-5 dias para 60- 70% dos animais (Byers, Wiles et al. 2012). Nas ratas, o ciclo estral possui quatro fases, denominadas de estro, metaestro, diestro (DE) e proestro (PE). O estro corresponde ao período de ovulação, com duração de 12 h a 24 h, é nesta fase que a progesterona encontra-se em seu nível máximo e as células vaginais apresentam-se cornificadas, com intensa descamação. O metaestro corresponde à fase entre os ciclos, na qual não há ação hormonal identificável e as células vaginais encontram-se proporcionalmente iguais, dificultando sua identificação. Esta fase dura em média 12 h, porém algumas ratas podem ter este ciclo com duração menor que 6 h. O estro corresponde à ação inicial do estradiol sobre o organismo, com níveis de estradiol correspondentes à metade da taxa máxima, além da presença de grande número de leucócitos. Esta fase do ciclo pode durar até 60 h. O PE corresponde ao pico da ação do estradiol, com as células vaginais apresentando-se grandes e nucleadas, sem leucócitos. Esta fase pode durar de 12 h a 18 h e precede a ovulação que ocorre na fase estro (Figura 6B) (Emanuele, Wezeman et al. 2002, Byers, Wiles et al. 2012). A valiação do ciclo estral é um método experimental simples e econômico, que permite verificar a atividade ovariana e pesquisa de doenças relacionadas aos hormônios sexuais. Atrelado a esta metodologia, pode-se utilizar o modelo de ovariectomia, abstendo dos hormônios ovarianos, mimetizando assim o processo de menopausa.

A - Ciclo reprodutivo em mulheres



B - Ciclo reprodutivo em ratas

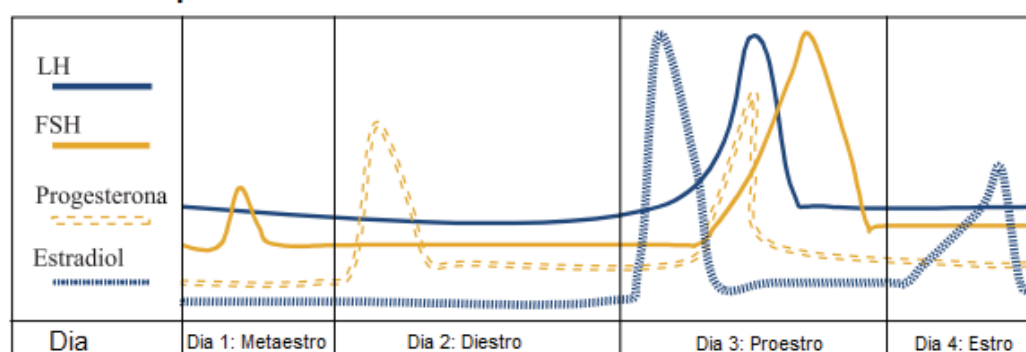


Figura 6. Níveis hormonais no ciclo reprodutivo de mulheres e ratas. Em A está representado o ciclo reprodutivo em mulheres, em 28 dias, com as variações dos hormônios LH, FSH, Estrógeno e Progesterona. Em B está exemplificado o ciclo reprodutivo em ratas, em 4 dias, dividido em metaestro, diestro, proestro e estro. FSH, hormônio folículo estimulante. LH, hormônio luteinizante (Emanuele, Wezeman et al. 2002). Adaptado.

Autorização de utilização: 4491860189316

Em relação as diferenças entre sexos na termorregulação e na resposta febril, diversos estudos em animais experimentais relatam uma diferença na temperatura corporal entre sexos. Na termorregulação há uma diferença na temperatura corporal entre machos e fêmeas, além de diferenças entre as próprias fases do ciclo estral em fêmeas. Ainda, a reposição hormonal em fêmeas também é capaz de modificar a temperatura corporal desses animais quando expostos a diferentes temperaturas de ambiente (Dacks and Rance 2010). Um ponto de relevância clínica desses estudos está ligada a fertilidade em mulheres, onde o aumento da temperatura corporal é utilizado para sinalizar o momento de maior propensão a ovulação (Papaioannou, Aslam et al. 2013).

Na resposta febril, esta diferença entre sexos é melhor relatada e descrita quando comparada a termorregulação. Ratas apresentam resposta febril menor

em relação aos ratos machos, utilizando o LPS como pirogênio (Ashdown, Poole et al. 2007). Esta diferença na resposta febril parece estar envolvida com os hormônios sexuais femininos pois ao se retirar esses hormônios, através da ovariectomia, esta diferença na resposta febril é revertida. Da mesma maneira, ao realizar a reposição hormonal (estrogênio), em ratas OVX, a resposta febril é menor em comparação aos ratos machos (Brito, Radulski et al. 2016). Há grande relevância clínica no estudo da resposta febril neste caso, levando em conta uma possível diferenciação terapêutica entre sexos, embora teórica ainda, visto a evidente diferença de resposta febril entre esses grupos.

Há ainda uma diferença na resposta febril em relação a variação dos hormônios sexuais, por exemplo em mulheres grávidas e na menopausa. Em ratas prenhas, há uma menor resposta febril em comparação com não grávidas. (Harre, Mouihate et al. 2006). Esta diferença pode reduzir a percepção e a intensidade da infecção o que poderia ter consequências importantes para o feto. Mulheres no período pós-menopausa regulam sua temperatura corporal em níveis mais baixos em relação aquelas que realizam reposição hormonal no mesmo período, e este fato ocorre através de um mecanismo distinto de uma febre clássica induzida por infecção (Brooks-Asplund, Cannon et al. 2000).

Poucos são os estudos relacionando a termorregulação e resposta febril em fêmeas, em sua maioria estes são realizados em machos e bastante focados no estudo do LPS e IL-1 β . Nosso laboratório vem realizando esses estudos a fim de identificar o mecanismo de ação de diversos mediadores na termorregulação e na resposta febril, levando em conta as diferenças entre sexos e as variações hormonais.

Considerando as informações apresentadas nesse capítulo, podemos inferir que a febre é um mecanismo de defesa do organismo e é influenciado por hormônios sexuais. Ainda, o sistema RANK/RANKL/OPG participa da resposta febril em machos, além de participar em doenças associadas a hormônios sexuais, com prevalência em mulheres, como a osteoporose. É possível então questionar se o sistema RANK/RANKL/OPG pode atuar de maneira diferente na resposta febril em fêmeas. E, em caso afirmativo, se esse sistema se relaciona com os hormônios sexuais femininos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do RANKL na resposta febril induzida pela administração de LPS em ratas fêmeas comparativamente aos machos e possíveis alterações nesta participação relacionadas ao ciclo estral das fêmeas.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a temperatura corporal normal em ratos e em ratas nas fases Diestro e Proestro, além de ovariectomizadas.
- Avaliação da caracterização da ovariectomia.
- Avaliar a resposta febril induzida por LPS em ratos e em ratas nas fases Diestro e Proestro, além de ovariectomizadas.
- Avaliar o efeito do bloqueador endógeno de RANKL, a OPG, sobre a resposta febril induzida por LPS em ratos e em ratas nas fases Diestro e Proestro, além de ovariectomizadas.
- Avaliar o efeito do bloqueador endógeno de RANKL, a OPG, sobre a resposta febril em ratas ovariectomizadas submetidas a reposição hormonal de estrogênio
- Avaliar a expressão de RANK no hipotálamo de nas fases Diestro e Proestro, além de ovariectomizadas, nas diferentes condições citadas acima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso a ração e água, antes dos experimentos.

Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação com no mínimo 2 dias de antecedência do experimento e permaneceram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram conduzidos entre 07:00 e 19:00 h e os tratamentos foram realizados entre 09:00 e 11:00 h da manhã para evitar diferenças relacionadas a variações circadianas de temperatura.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) sob o protocolo número 1021.

3.2 Esterilização

Os materiais foram autoclavados a 127°C por 30 minutos, esterilizados a 200°C por duas horas ou adquiridos estéreis.

As soluções e diluições de drogas foram preparadas em condições assépticas e em capela de fluxo laminar vertical com lâmpada UV e filtro HEPA.

3.3 Determinação do ciclo estral

Para a determinação do ciclo estral das ratas, utilizamos o método de lavado vaginal a fresco (Marcondes, Miguel et al. 2001). Para tanto, foi

introduzido 10 μ L de solução salina (NaCl a 0,9%) no orifício vaginal do animal utilizando uma micropipeta e ponteiros descartáveis. O conteúdo introduzido foi rapidamente aspirado e colocado em uma lâmina para visualização ao microscópio imediatamente após a coleta (Figura 7).

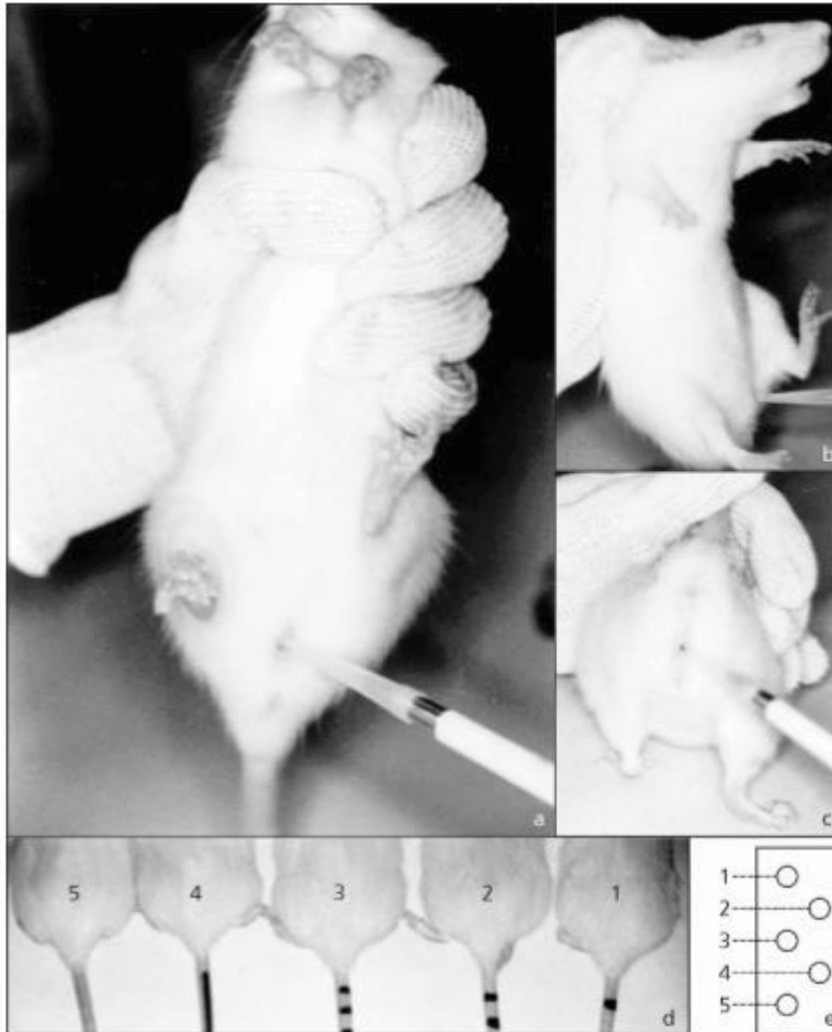


Figura 7. Realização de lavado vaginal em ratas. Em A representa a imobilização do animal. Em B a injeção de soro fisiológico no canal vaginal do animal. Em C a aspiração do conteúdo vaginal. Em D a representação da identificação dos animais. Em E a representação da disposição das amostras na lâmina para posterior análise em microscópio (Marcondes, Miguel et al. 2001).
 Autorização de utilização: 4491670464591.

A figura 8 exemplifica os critérios utilizados para a determinação das diferentes fases do ciclo (Caligioni 2009). A determinação da fase do ciclo estral se deu pela predominância dos tipos celulares apresentados como leucócitos (L), células cornificadas (C) ou nucleadas (N). Na fase PE há maior quantidade

de células nucleadas (Figura 8A) e na fase estro (Figura 8B) predominam as células cornificadas. Já na fase DE há uma predominância de leucócitos (Figura 8D), enquanto na fase metaestro (Figura 8C) há uma quantidade homogênea de todos os tipos celulares mencionados anteriormente (Caligioni 2009).

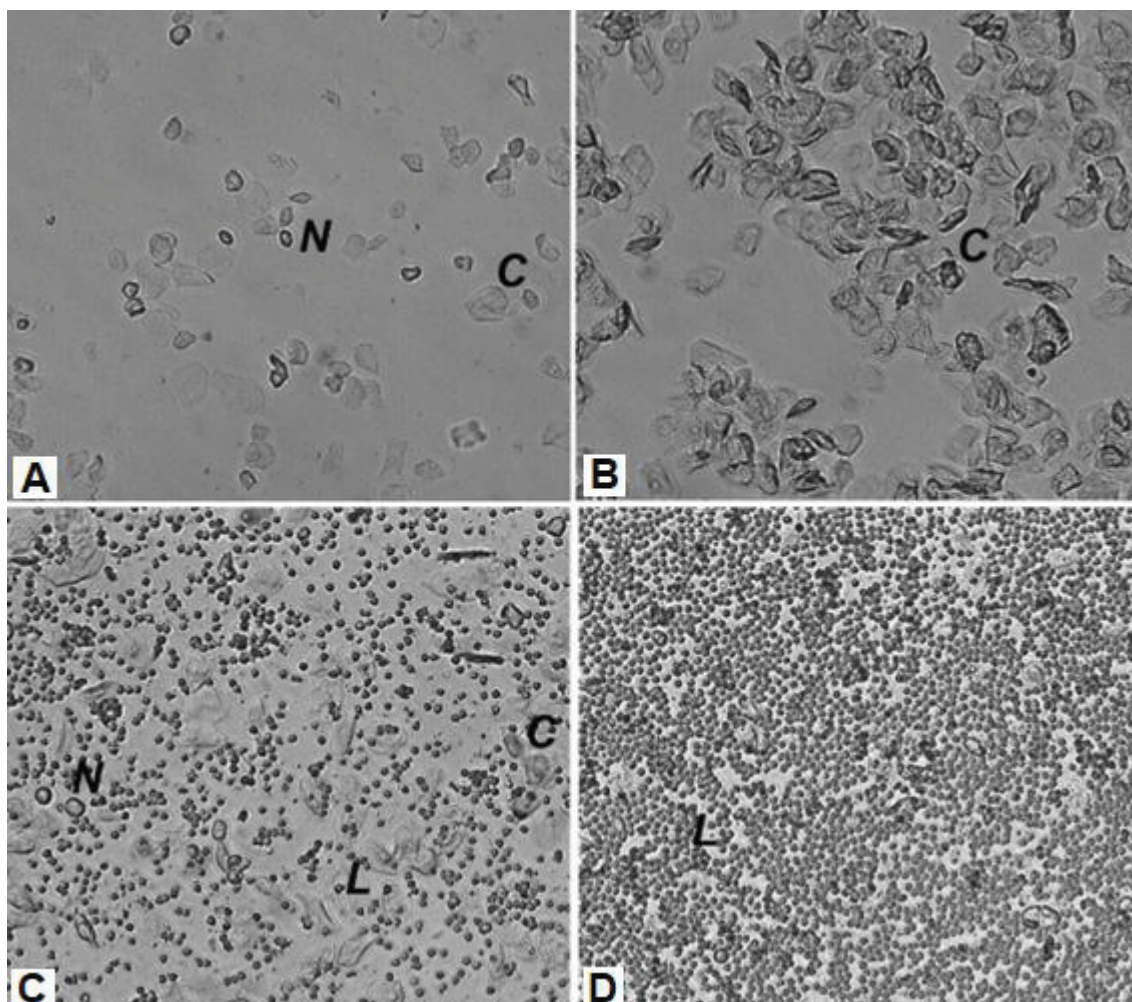


Figura 8. Diferenciação celular nas fases do ciclo estral em ratas. A representa a fase proestro, onde há predominância de células nucleadas (N); B representa a fase estro, onde há a predominância de células cornificadas (C); Em C representa a fase metaestro, onde há quantidades iguais dos três tipos celulares (C, L e N); D representa a fase diestro, onde há maior predominância de leucócitos (L); L, leucócitos; C, células cornificadas; N, nucleadas (Caligioni, 2009).

Autorização de utilização: acesso livre, sem necessidade de autorização.

Esta determinação da fase do ciclo estral foi realizada no dia anterior e ao final de cada experimento. Nos dias dos experimentos, pela manhã, o lavado vaginal não foi realizado para que não ocorresse stress no animal e prejudicasse o experimento. Em nossos experimentos foram selecionados animais nas fases PE e DE pois são as fases de maior e menor quantidade de hormônios sexuais,

em especial o β -estradiol (E2), respectivamente. Além disso, a fase metaestro não foi avaliada devido ao seu curto intervalo de tempo e imprecisão na identificação do ciclo. Em nossos experimentos, aproximadamente 15% das ratas mudaram de ciclo durante o experimento e não puderam ser utilizadas

3.4 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada de acordo com trabalhos anteriores em nosso laboratório, além de trabalhos previamente descritos na literatura (Mouihate, Chen et al. 1998, Brito, Radulski et al. 2016).

Para a cirurgia de ovariectomia e falso-operado, os animais foram pesados e anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilasina (7,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Foi realizada tricotomia e assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia, de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Para a ovariectomia, as trompas foram ligadas com fio cirúrgico Catgut 3-0 e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Em animais controle falso-operados, a cavidade abdominal foi apenas exposta (laparotomia) mas nenhum tecido foi manipulado ou retirado. Posteriormente, em ambos os casos, a incisão foi suturada em camadas. Durante a cirurgia, os animais receberam oxitetraciclina (Terramicina, 400 mg/kg) por via subcutânea (s.c.) como profilaxia cirúrgica. Para as ratas OVX, a confirmação da efetividade da ovariectomia foi realizada após 21 dias através do procedimento de lavado vaginal com confirmação do anestro, que consiste na quase ausência de células vaginais anteriormente citadas (células nucleadas, cornificadas e leucócitos). Além disso, no final dos experimentos, foi avaliado o peso do útero e gordura abdominal das ratas OVX e falso-operadas a fim de avaliar a eficiência do procedimento. A gordura abdominal foi avaliada levando em conta a gordura intraperitoneal, isto é, somente a gordura relativa às vísceras (Hirata, Banin et al. 2015).

3.5 Implante de registrador remoto de temperatura na cavidade peritoneal

Para avaliação da temperatura corporal dos animais, um dia antes do implante na cavidade peritoneal, registradores remotos de temperatura (Figura

9, SubCue dataloggers, Calgary, AB, Canadá) foram programados para iniciar o registro de temperatura no dia do experimento (6 a 7 dias após o procedimento cirúrgico). Em seguida, o ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biocompatível. Para o implante do registrador, no dia seguinte, os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina (60/7,5mg/kg, i.p.). Após tricotomia e antissepsia da pele da região ventral dos animais, foi realizada uma incisão na pele, e posterior incisão da camada muscular e peritoneal, para colocação dos registradores na cavidade peritoneal (Dacks and Rance 2010; Brito, Radulski et al. 2016). Os registradores foram previamente higienizados com solução de hipoclorito de sódio 10% durante 30 min e posterior imersão em solução fisiológica estéril imediatamente antes do implante na cavidade peritoneal, para garantir assepsia da superfície dos mesmos.

Após o implante do registrador, as camadas foram então suturadas separadamente, com fio cirúrgico Catgut 3-0 (camada muscular) e Nylon 3-0 (camada externa, pele). Após a cirurgia, os animais receberam Terramicina (400 mg/kg, s.c.), como profilaxia cirúrgica. NO dia do experimento, as temperaturas foram registradas em intervalos de 15 minutos, por um período mínimo de 7 h, conforme o experimento realizado.



Figura 9. Registrador remoto de temperatura. Fonte: SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá.

3.6 Implante de cânula no ventrículo lateral

O implante da cânula no ventrículo lateral direito dos animais foi realizado com o objetivo de administrarmos OPG por via intracerebroventricular (i.c.v.) (Mouihate, Chen et al. 1998, Brito, Radulski et al. 2016). Este procedimento foi realizado concomitantemente ao implante do registrador

remoto de temperatura na cavidade peritoneal, sob o mesmo efeito anestésico e profilaxia cirúrgica, quando necessário, para a aplicação de droga i.c.v., como a OPG.

As cânulas foram preparadas utilizando-se agulhas descartáveis 30 X 8 mm, que foram fracionadas e polidas até atingirem um comprimento de 13 mm. Antes do implante, as mesmas foram esterilizadas por calor à seco por 30 minutos.

Após tricotomia e antissepsia da pele, os animais foram posicionados e suas cabeças foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900, Tujunga, CA, EUA). Foi administrado por via s.c. 0,2 ml de lidocaína a 2% associado a norepinefrina, na parte superior da cabeça dos animais. Em seguida foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele para exposição da calota craniana. Este procedimento facilita a remoção do periósteo, promovendo uma inibição adicional ao estímulo doloroso, e diminuir o sangramento.

Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral foram de -0,8 mm anteroposterior, -1,5 mm lateralmente e a inclinação da barra incisal de -3,3 mm (Paxinos e Watson, 1986).

As cânulas esterilizadas foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotáxico, e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2,5 mm abaixo da superfície craniana, permanecendo nesta posição que fica a 2 mm acima do ventrículo lateral que será atingido somente durante a injeção. As coordenadas estereotáxicas foram determinadas com base no atlas de Paxinos & Watson (1986).

Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas à calota craniana com acrílico auto-polimerizável, com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana (esterilizados previamente), formando uma prótese para a cânula. Os experimentos foram conduzidos entre 5 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais.

3.7 Protocolos experimentais

Para os experimentos, foram utilizados ratos machos, fêmeas em PE e DE e fêmeas OVX. Todos os experimentos foram conduzidos na temperatura ambiente de $28 \pm 1^\circ \text{C}$ que está na zona de termoneutralidade para ratos (Gordon 1990). Os animais foram transferidos para uma sala climatizada no dia anterior ao experimento para ambientação. O ciclo estral das fêmeas foi determinado conforme descrito anteriormente. Caso durante a determinação do ciclo, avaliássemos que o animal não estaria na fase de interesse, o experimento seria adiado até que isto ocorresse, racionalizando deste modo o uso de animais de experimentação.

O delineamento experimental, incluindo os procedimentos cirúrgicos e determinação do ciclo estral descritos anteriormente são apresentados na Figura 10.



Figura 10. Delineamento experimental. O delineamento representa as 3 semanas dos primeiros procedimentos cirúrgicos (ovariectomia e falso operado). Após a recuperação de 6 dias dos segundos procedimentos cirúrgicos (estereotaxia e implantação do registrador de temperatura). Ainda, representa o dia anterior ao experimento, foi verificado a temperatura corporal normal dos animais e realizado a identificação do ciclo estral. No dia do experimento ocorreram os tratamentos, a realização da febre e a coleta de amostras para posteriores análises (do autor).

A medida da temperatura corporal por registradores remotos iniciou-se às 07:00h da manhã no dia do experimento, e foi permitido o registro da temperatura corporal dos animais por pelo menos 2 h antes de qualquer procedimento, a fim de se obter os níveis basais de temperatura corporal.

No primeiro bloco de experimentos, os animais receberam LPS (*E. Coli*, 50 µg/kg, i.p.) diluído em salina estéril ou o mesmo volume de salina estéril (controle), entre 9 e 11 h da manhã e a temperatura corporal foi avaliada a cada 15 min por 6 h.

Para avaliar uma possível participação de RANKL na resposta febril induzida por LPS, os animais foram tratados com OPG (antagonista de RANKL, 1µg, i.c.v/ 2µL) ou o mesmo volume de veículo (salina) entre 9 e 10 h da manhã e após 30 min os animais receberam a mesma dose de LPS (50 µg/kg, i.p) ou o mesmo volume de veículo. A temperatura corporal dos animais também foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h após a administração do LPS.

Durante estes dois grupos de experimentos, como demonstrado no delineamento experimental (Figura 10), os registradores remotos de temperatura foram programados para iniciar o registro da temperatura no dia anterior ao experimento. Isto nos permitiu avaliar a temperatura corporal normal (Tc) dos animais em diferentes fases do ciclo estral, sem nenhum tratamento e sem necessidade de uso adicional de animais. Estes dados foram apresentados no período de 10 h da manhã até 16 h exemplificando o comportamento da temperatura corporal desses animais no mesmo período em que seriam realizados os experimentos.

Ainda, de maneira aleatória e em torno de 50% do número de animais de cada experimento, foi feito o controle do peso dos animais, a coleta e pesagem do útero e da gordura abdominal dos animais, como um dado adicional da eficácia da ovariectomia.

Para avaliar uma possível participação dos hormônios sexuais, em especial o estradiol, no sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por LPS, os animais foram tratados de forma sub-crônica com β-estradiol (E2, 10 µg / dia, sc) por 5 dias. No dia do experimento, os animais foram pré-tratados com OPG (1µg, i.c.v/ 2µL) ou o mesmo volume de veículo (salina) entre 9 e 11 h da manhã e após 30 min os animais receberam a mesma dose de LPS (50 µg/kg, i.p). A temperatura corporal dos animais também foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h após a administração do LPS.

Ao final dos experimentos, posteriormente a determinação do ciclo estral, o hipotálamo dos animais foi coletado, armazenado a -80°C para posterior

análise da expressão de receptores RANK. A avaliação da expressão de receptores foi realizada pelo ensaio de *Western Blotting*, como descrito a seguir.

Todas as doses de drogas utilizadas basearam-se em estudos prévios em nosso laboratório ou em outros autores (Bastos-Pereira, Fraga et al. 2014, Bastos-Pereira, Leite et al. 2015 Hanada, Leibbrandt et al. 2009, Brito, Radulski et al. 2016).

3.8 Avaliação da expressão de receptores RANK no hipotálamo

As amostras de hipotálamo foram primeiramente homogeneizadas em 1,0 ml de solução tampão (10 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7,5, coquetel de Inibidores de Protease (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e 1% Triton X-100). O material insolúvel foi removido por centrifugação a 17.000 g, a 4 °C durante 20 min e o sobrenadante foi recolhido e aliqotado. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BCA Standart, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). Os extratos dos tecidos foram adicionados ao tampão Laemeli (0,1% de azul de bromofenol, 50% de glicerol, 10% de SDS, fosfato de sódio 1M, pH 7,0), contendo 100 mM de DTT e ebulidos por 5 min. As amostras (100 µg) foram corridas em géis de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% por eletroforese a 80V por aproximadamente 2 h (Laemmli 1970). A transferência se deu por método semi-úmido (sanduiche) para membranas de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol, pH 8,3) a 300 mA por 90 min. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados por imersão da membrana em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 3% (p/v) durante 2 h em geladeira. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário anti-RANK obtido de camundongo, a 66 kDa (1: 250; sc390655, Santa Cruz, Inc., Dallas, EUA), durante toda a noite. No dia seguinte, as membrana foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 0,02%, p/v, NaCl 5 M, Trizma base 1 M, pH 7,5) seguida de incubação do anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000; sc 516102, Santa Cruz, Inc., Dallas, EUA) durante 1 h. Após a lavagem, foi realizada a revelação por quimioluminescência (Kit ECL, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) e visualização em fotodocumentador (Amersham,

Little Chalfont, Reino Unido). A α 1-Tubulina a 50 KDa (1: 2500; sc 13423, Santa Cruz, Inc., Dallas, EUA) foi utilizada como normalizador e as comparações foram realizadas utilizando o grupo salina como padrão. A análise foi realizada por densitometria utilizando o software Scion Image (Scion Corporation, Dana Point, California, EUA).

3.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados referentes à temperatura corporal e variação da temperatura corporal foram avaliados por análise de variância a dois critérios (*ANOVA Two Way*), seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os dados referentes a intensidade de quimioluminescência foram analisados por ANOVA de um critério (*One-way*) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os dados referentes a peso corporal, peso úmido e quantidade de gordura abdominal foram analisados utilizando teste t de Student. O nível de significância aplicado foi sempre de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism version 6.00, San Diego, CA, E.U.A.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da eficácia do modelo de menopausa em ratas

Iniciamos o estudo avaliando alguns parâmetros que confirmassem a eficácia da ligadura e retirada dos ovários em ratas, a ovariectomia. As ratas OVX apresentaram um ganho de peso corporal em torno de 15% maior quando comparadas as ratas Sham, após os procedimentos cirúrgicos, ao longo de 4 semanas (Fig. 11A). Em relação a avaliação da morfologia do útero dos animais, as ratas OVX apresentaram atrofia uterina em comparação com o grupo Sham (Fig. 11D). Este fato pôde ser evidenciado também através do peso do órgão, no qual as ratas Sham apresentaram maior peso do útero quando comparadas as ratas OVX (Fig. 11B). Além disso, foi avaliado também o peso da gordura abdominal destes animais e as ratas OVX apresentam em torno de 38% maior quantidade de gordura em relação as ratas do grupo Sham (Fig. 11C).

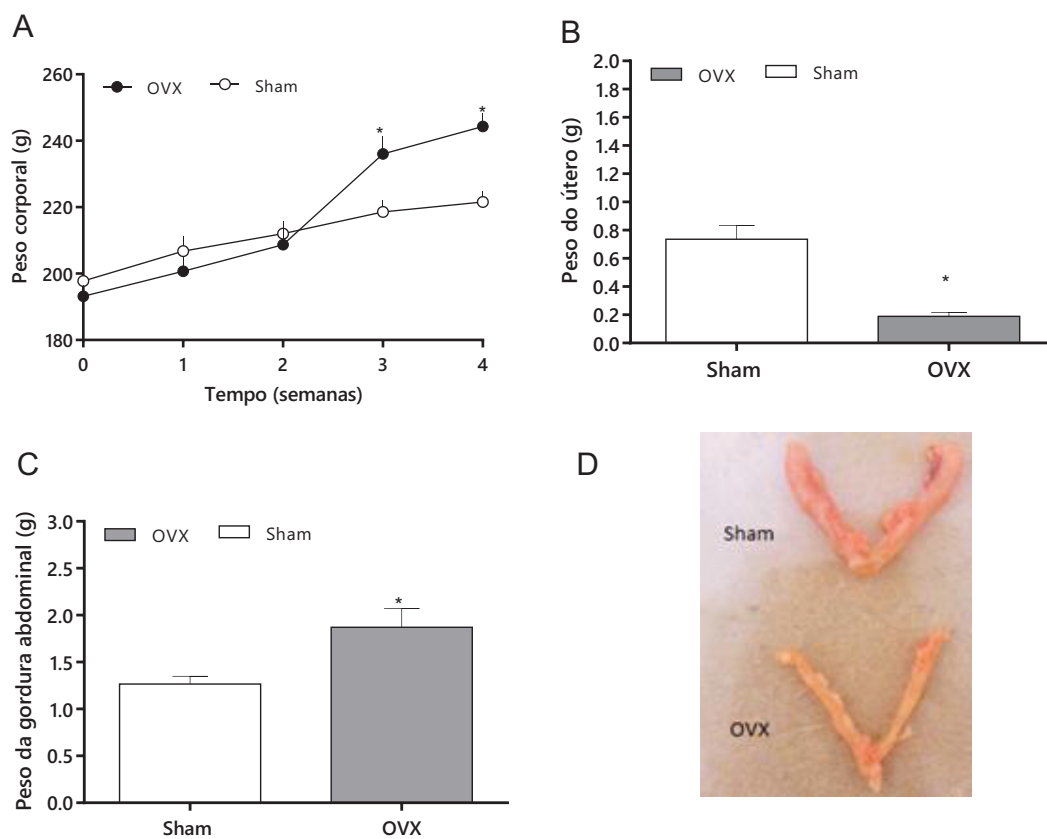


Figura 11. Avaliação dos parâmetros de eficácia da ovariectomia. Os parâmetros peso corporal, peso do útero e peso de gordura corporal foram avaliados em animais ovariectomizados (OVX) e falso-operados (Sham). O ganho de peso corporal (A) foi avaliado semanalmente e ao final de 4 semanas após a cirurgia foi avaliado o peso do útero (B) e a gordura abdominal (C). O painel D mostra uma imagem representativa do útero dos animais de ambos os grupos. Os valores em A-C mostram a média \pm e.p.m. do parâmetro avaliado ($n = 7-12$). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Sham.

4.2 Avaliação da temperatura corporal de ratos machos, fêmeas na fase diestro, proestro e ovariectomizadas

A T_c normal durante o período que ocorreriam os experimentos (das 10 h as 16 h) foi avaliada em ratos machos e fêmeas em PE, DE e OVX no dia anterior a execução de diversos experimentos nos quais os animais seriam tratados. As ratas na fase PE apresentaram T_c significativamente menores em relação aos demais grupos (Machos, OVX e DE) em diferentes horários do dia de maneira geral (Fig. 12A). Não foram detectadas diferenças significativas entre as temperaturas dos ratos machos, fêmeas em DE e OVX.

No dia do experimento, a temperatura basal dos animais foi determinada entre 08:30 e 10:00 h da manhã através das últimas 4 medidas de temperatura anteriores aos tratamentos. Diferentemente da T_c, a temperatura basal leva em conta as manipulações e ambientações necessárias envolvidas na realização dos experimentos. As ratas OVX apresentaram temperatura basal média maior em relação aos demais grupos; Machos, DE e PE (Fig. 12B). Além disso, a temperatura basal das OVX tem dados mais homogêneos em relação aos mesmos grupos citados anteriormente.

Devido a estas diferenças nas temperaturas corporais normais (T_c e T_b) entre os grupos, para os próximos experimentos a resposta febril foi apresentada como variação na temperatura corporal (ΔT) em comparação com os valores basais, evitando assim qualquer tipo de interferente nas análises posteriores.

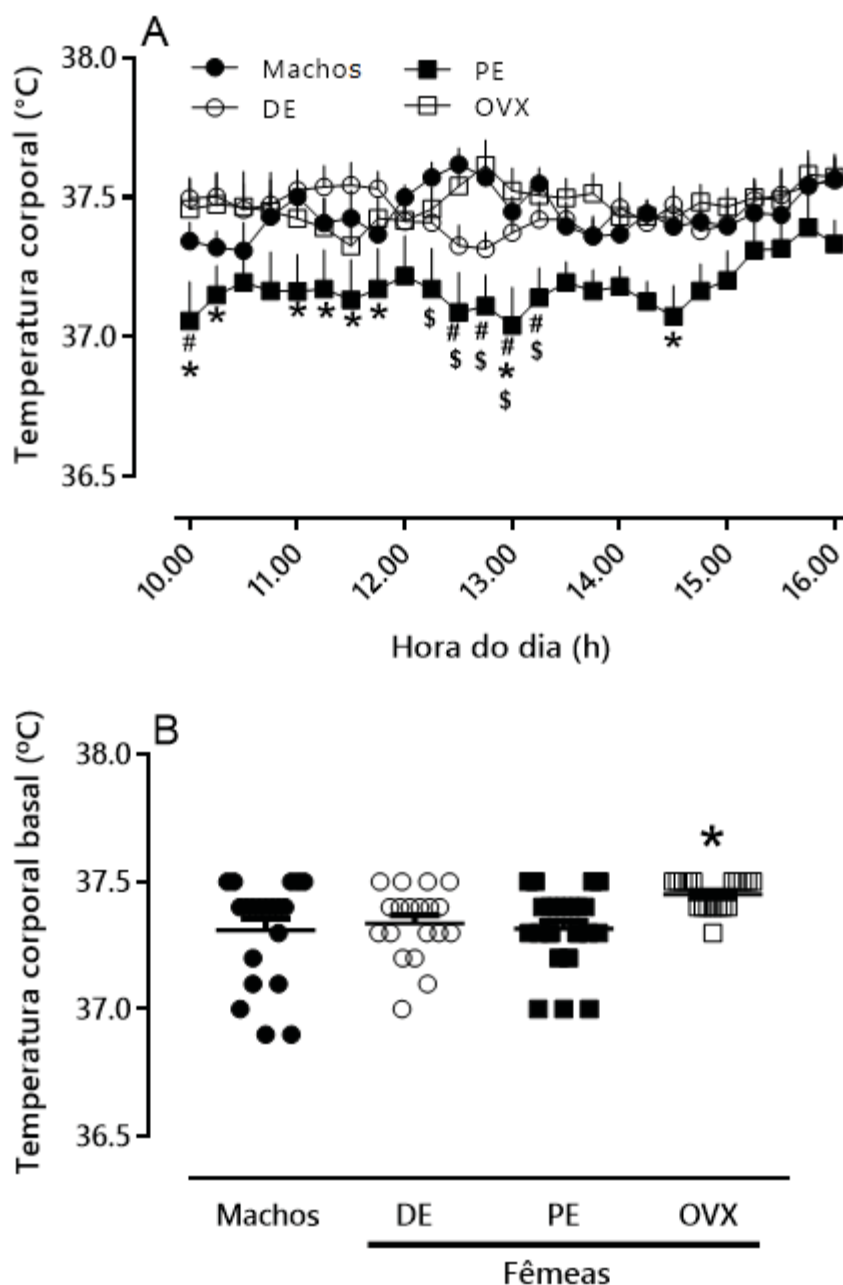


Figura 12. Temperatura corporal e Temperatura corporal basal de ratos machos, fêmeas nas fases proestro, diestro e ovariectomizadas, durante o período claro. A temperatura corporal de ratos machos e fêmeas em DE, PE e OVX foram avaliadas a cada 15 min por 6h. O painel A mostra a temperatura das 10:00 às 16:00 registrada no dia anterior ao experimento. O painel B mostra a temperatura corporal basal determinada pelas quatro medidas de temperatura anteriores a qualquer tratamento, em vários experimentos diferentes. Os valores mostram a média \pm e.p.m. da temperatura central (° C, n = 12-17 em A e 18-24 em B). Em A, \$, #, * P <0,05 em comparação com os grupos machos, DE e OVX. Em B, * P <0,05 em comparação com os grupos machos, DE e PE.

4.3 Avaliação da resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas na fase diestro, proestro e ovariectomizadas

A administração de solução salina intraperitoneal não alterou a temperatura corporal dos animais, em nenhum dos grupos. Em ratos machos, a administração de LPS induziu uma resposta febril que iniciou por volta da 1,5 h após a injeção, atingiu seu pico em torno de 2,5 h e permaneceu alta até a 6 h (Fig. 13A). A mesma dose de LPS em ratas fêmeas, na fase DE ou PE, induziu uma resposta febril a partir da 2 h, atingindo seu pico próximo a 3 h e foi mantida até o final do experimento (Fig. 13A). Fêmeas em ambas as fases, DE e PE, mostraram uma menor resposta febril em relação aos machos (Fig. 13A). No entanto, as fêmeas em PE mostraram uma resposta significativamente reduzida em mais pontos comparado-se com as fêmeas em DE. Foi observado diferença significativas na resposta febril induzida por LPS em fêmeas nas fases DE e PE em apenas 1 ponto, em torno de 5,5 h do experimento.

A resposta febril induzida por LPS em ratas OVX não apresentou diferença em relação a resposta dos animais machos com o mesmo tratamento e dose (Fig. 13B).

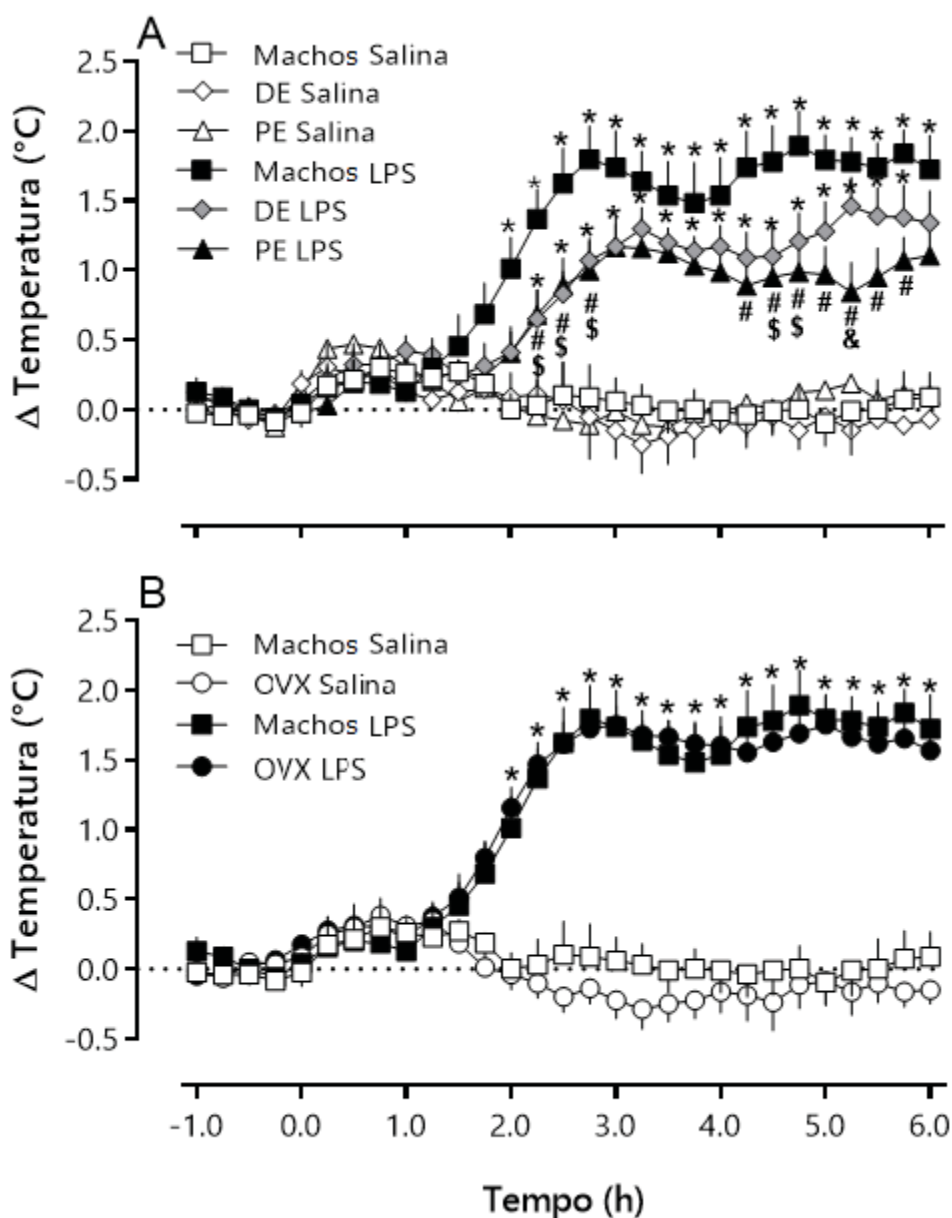


Figura 13. Resposta febril induzida por LPS em ratos machos, fêmeas em proestro, diestro e ovariectomizadas. Ratos machos, ratas em PE, DE e OVX receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de salina e a temperatura corporal foi avaliada durante 6 h. O painel A compara ratos machos e fêmeas na fase DE ou PE, e o painel B comprara ratos machos e fêmeas OVX. Os pontos representam a média \pm e.p.m. da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) (n = 7-11). * p < 0,05 em comparação com o grupo salina; # p < 0,05 grupo PE LPS em comparação ao grupo Macho LPS; \$ p < 0,05 grupo DE LPS em comparação ao grupo Macho LPS; & p < 0,05 grupo PE LPS em comparação ao grupo DE LPS.

4.4 Avaliação do tratamento com osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratos machos

A administração de osteoprotegerina (OPG) em ratos que receberam salina não promoveu alteração significativa na temperatura corporal dos animais. A administração de LPS promoveu uma resposta febril ao longo das 6 h de experimento, com maior intensidade próximo a 3 h. O pré-tratamento com OPG 30 minutos antes do estímulo pirogênico, reduziu significativamente a resposta febril induzida por LPS nos ratos machos (Figura 14). Esta redução significativa iniciou por volta da 3h e permaneceu até o final do experimento.

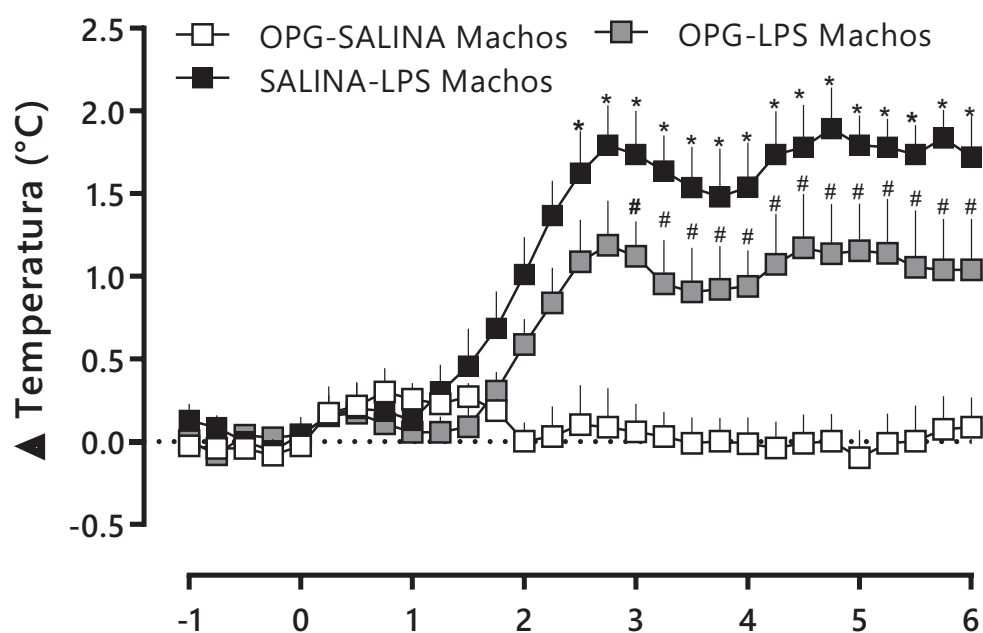


Figura 14. Efeito da OPG na resposta febril induzida por LPS em ratos machos. Ratos machos foram pré-tratados com OPG ($1\mu\text{g} / 2\mu\text{l}$, i.cv.) ou o mesmo volume de salina. Após 30 min, os animais receberam LPS ($50\mu\text{g} / \text{kg}$, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h. Os valores mostram a média \pm e.p.m. da variação na temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) ($n = 6-7$). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OPG Salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OPG-LPS.

4.5 Avaliação do tratamento com osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase proestro

A administração de LPS promoveu uma resposta febril com intensidade moderada, com variação de até 1,5°C, permanecendo até o final do experimento, com seu pico próximo em 2,5 h. O pré-tratamento com o antagonista de RANK, OPG, 30 minutos antes do LPS, não alterou a resposta febril induzida por LPS nestes animais (Figura 15).

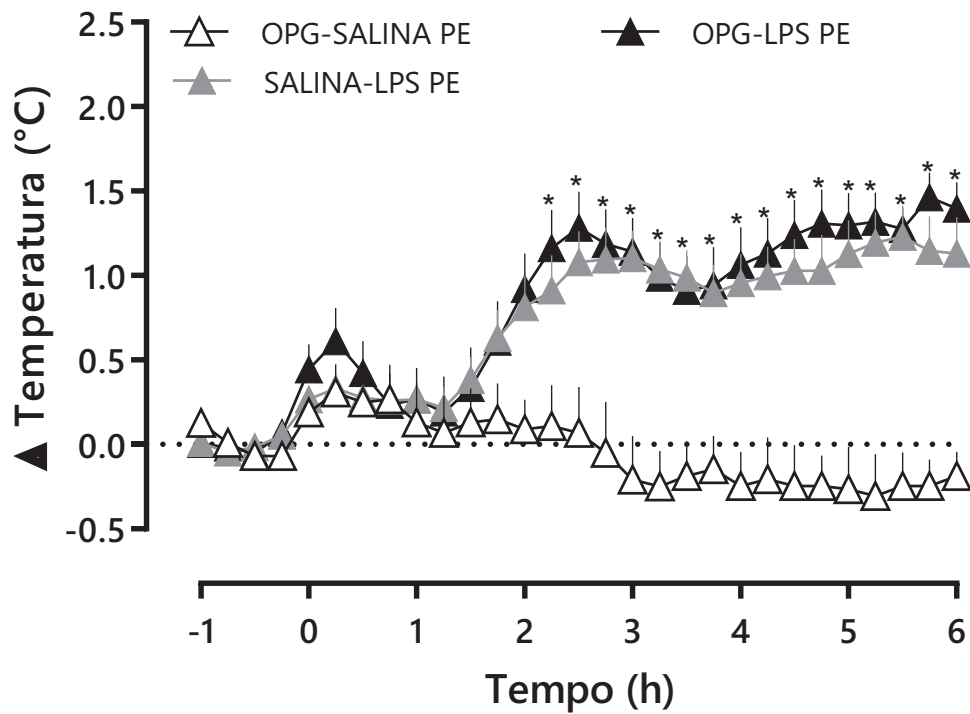


Figura 15. Efeito da OPG na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase PE. Ratas fêmeas na fase PE foram pré-tratadas com OPG ou o mesmo volume de salina. Após 30min, os animais receberam LPS (50 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h. Os valores mostram a média ± e.p.m. da variação na temperatura corporal (°C) (n =9–10). * p < 0,05 quando comparado ao grupo OPG-Salina.

4.6 Avaliação do efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas na fase diestro

A administração de OPG-Salina em ratas falso-operadas no DE não promoveu alteração na temperatura corporal dos animais. A administração de LPS promoveu uma resposta febril com início em 2 h após a administração, maior intensidade próximo a 3 h e permanecendo ao longo do experimento. O pré-tratamento com OPG promoveu uma hipotermia entre a 0 e 1h, seguido de uma redução parcial da resposta febril induzida por LPS, entre a 2^a e a 4^a h. A partir da 4^a h, o tratamento com a OPG não foi capaz de reduzir esta resposta febril (Figura 16).

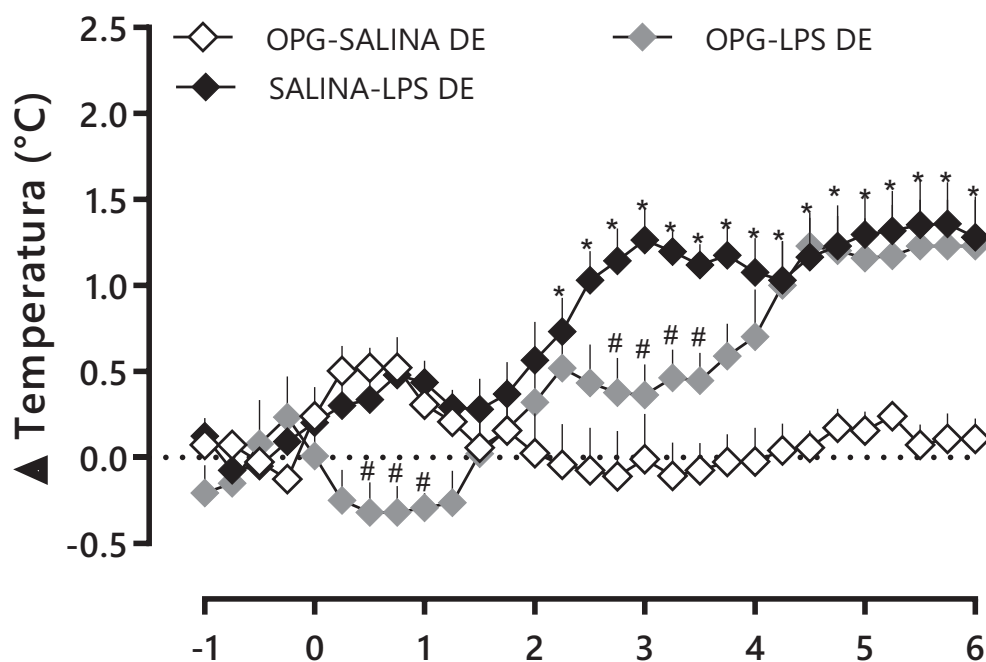


Figura 16. Efeito da OPG na resposta febril induzida por LPS em ratas em DE. Ratas falso-operadas em DE foram pré-tratadas com OPG (1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina. Após 30 min, os animais receberam LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h. Os valores mostram a média \pm e.p.m. da variação na temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) ($n = 7-11$). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OPG-Salina; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OPG-LPS.

4.7 Avaliação do efeito da osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas ovariectomizadas

A administração de OPG-Salina em ratas OVX não promoveu alteração na temperatura corporal dos animais. A administração de LPS promoveu uma resposta febril com início 1,5 h após a injeção, maior intensidade próximo a 3 h e permaneceu ao longo do experimento. O pré-tratamento com OPG reduziu a resposta febril induzida por LPS nas ratas OVX (Figura 17). Esta redução foi intensa, iniciando por volta da 2,5 h e permanecendo até o final do experimento, e com variação em torno de 1°C.

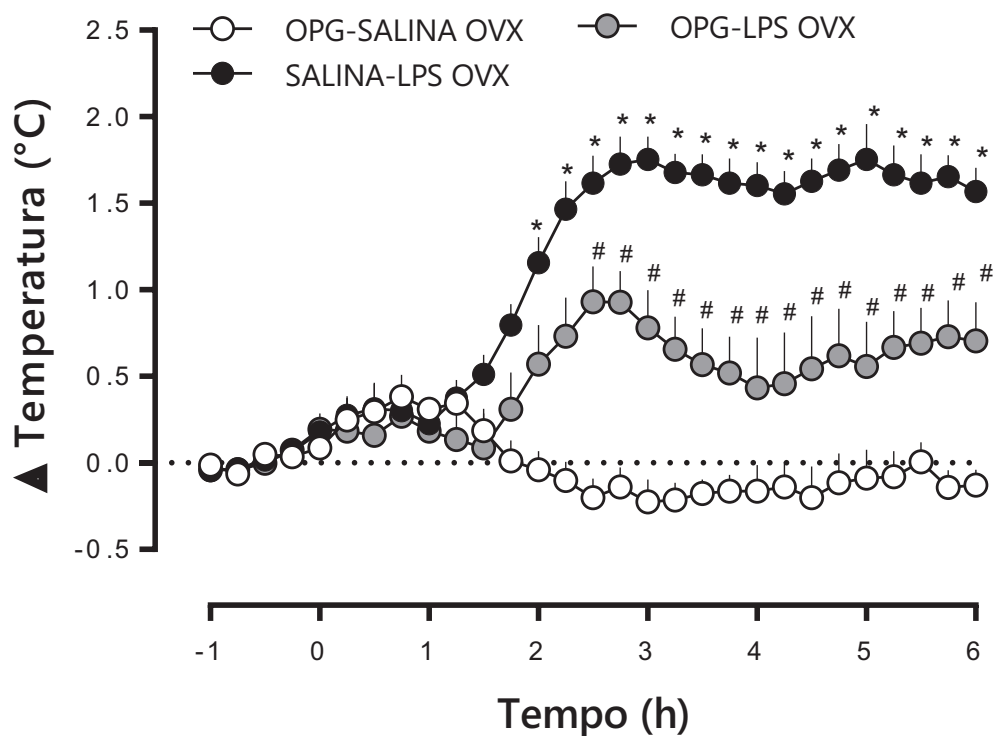


Figura 17. Efeito da OPG na resposta febril induzida por LPS em ratas OVX. Ratas OVX foram pré-tratadas com OPG (1 μ g/ 2 μ l, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina. Após 30 min, os animais receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. A temperatura corporal foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h. Os valores mostram a média \pm e.p.m. da variação na temperatura corporal ($^{\circ}$ C) (n = 8–11). * p < 0,05 quando comparado ao grupo OPG-Salina, # p < 0,05 quando comparado ao grupo OPG-LPS.

4.8 Avaliação do efeito do tratamento com β -estradiol e osteoprotegerina na resposta febril induzida por LPS em ratas ovariectomizadas

A administração de LPS em ratas OVX induziu uma resposta febril intensa, variação próxima de 2°C, que foi reduzida pelo tratamento subcrônico com E2 (Fig. 18). De forma semelhante, o tratamento com OPG reduziu a resposta febril induzida por LPS também em ratas OVX. No entanto, o tratamento combinado E2 e OPG não promoveu uma redução mais proeminente da resposta febril induzida por LPS do que aquela vista com os tratamentos separadamente (Figura 18).

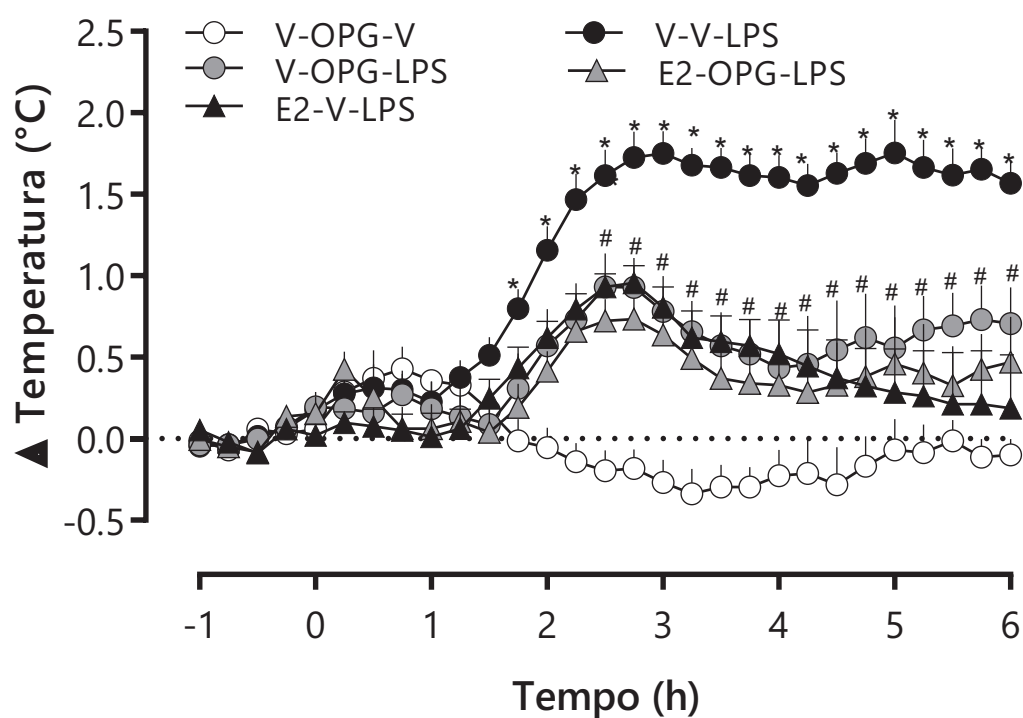


Figura 18. Efeito do tratamento com E2 e OPG em ratas OVX. Ratas OVX foram pré-tratadas com E2 (10 µg/dia, s.c.) ou com veículo (V, óleo de amendoim, s.c.) por 5 dias. No dia do experimento, os animais foram pré-tratados com OPG (1 µg/2 µl, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (i.c.v.) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (i.p.) e a temperatura corporal foi avaliada em intervalos de 15 min por 6 h. Os valores mostram a média ± e.p.m. da variação na temperatura corporal (°C) (n = 8–12). * p < 0,05 quando comparado ao grupo V-OPG-V; # P < 0,05 quando comparado ao grupo V-V-LPS.

4.9 Avaliação da expressão de receptores RANK no hipotálamo de ratas em diestro, proestro e ovariectomizadas

A administração do antagonista de RANK, OPG, em ratas falso-operadas em DE, PE e OVX não alterou a expressão de receptores no hipotálamo quando comparados aos animais do respectivo grupo que receberam somente salina (Figura 19). No entanto, a administração de LPS aumentou significativamente a expressão de RANK no hipotálamo de ratas em PE, mas não em DE ou OVX (Figura 19). Ainda é importante observar que a expressão de RANK em ratas OVX foi significativamente menor do que àquela observada no hipotálamo de ratas falso-operadas em PE (Figura 19).

Resultados similares foram obtidos nos controles de hipotálamos provenientes do experimento em que se fez a reposição hormonal com E₂. A administração de OPG não alterou a expressão de RANK no hipotálamo de ratas OVX quando comparadas aos animais OVX que receberam somente salina (Figura 20). Também não observamos um aumento significativo da expressão de RANK após a administração de LPS em ratas OVX (Figura 20). No entanto, o tratamento sub-crônico de ratas OVX com E₂ promoveu um aumento da expressão de RANK no hipotálamo, similar ao observado em ratas falso-operadas em PE (Figura 20).

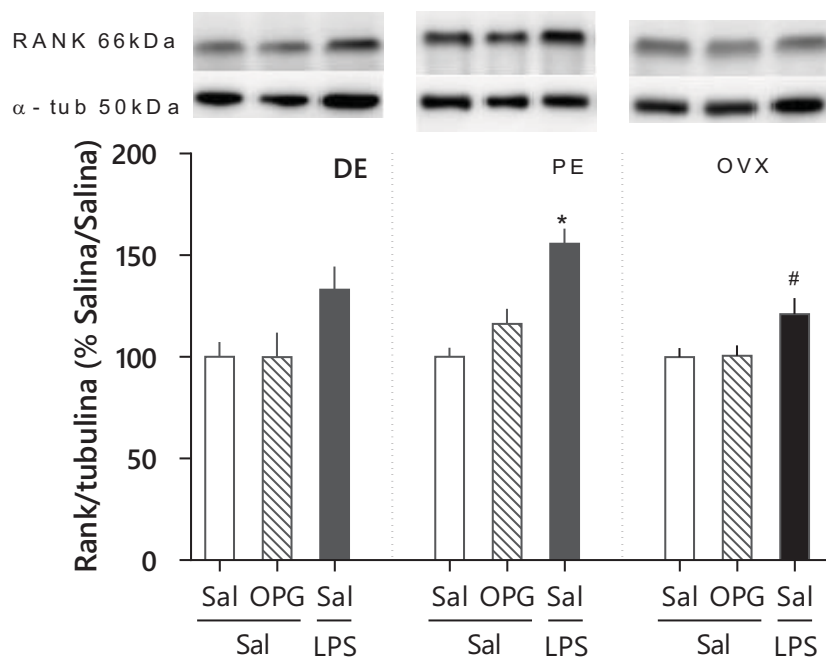


Figura 19. Expressão de RANK no hipotálamo de ratas em DE, PE e OVX. As ratas foram tratadas com OPG (1 μ g / 2 μ l, i.c.v.) ou salina (Sal, i.c.v.) e após 30min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina. O hipotálamo dos animais foi coletado 6 h após a administração do LPS. Os valores mostram a média \pm e.p.m. da razão entre o RANK e a tubulina, em comparação com o grupo Salina/Salina (n = 5). *p<0,05 quando comparado com o grupo Sal-Sal; # p<0,05 quando comparado com o grupo PE Sal-LPS.

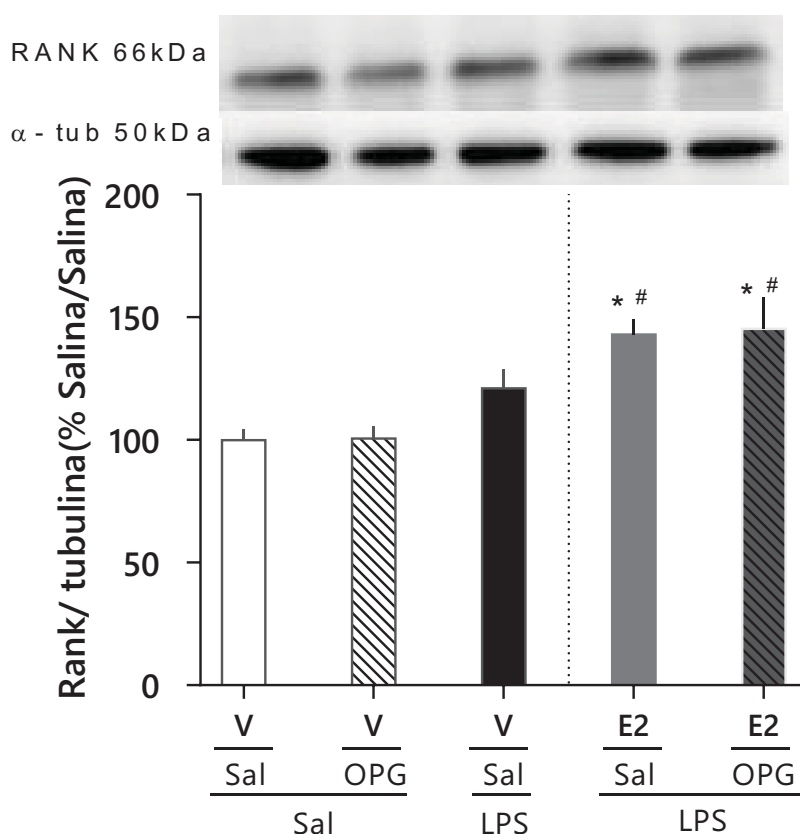


Figura 20: Expressão de RANK no hipotálamo de ratas ovariectomizadas após reposição hormonal. Ratas OVX foram tratadas com E2 (10 µg/dia, s.c.) ou com veículo (V, óleo de amendoim, s.c.) durante 5 dias. No dia do experimento, os animais foram tratados com OPG (1µg/2µl, i.c.v.) ou o mesmo volume de salina (Sal, i.c.v.) e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de solução salina (i.p.). O hipotálamo dos animais foi coletado 6 h após a administração do LPS. Os valores mostram a média ± e.p.m. da razão entre o RANK e a tubulina, em comparação com o grupo Salina/Salina (n = 8). * p < 0,05 quando comparado com o grupo Sal-Sal; # p < 0,05 quando comparado com o grupo OPG- Sal.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o envolvimento do sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por endotoxina bacteriana em ratos machos e fêmeas. Nas fêmeas, foi levando em conta, pelo menos em parte, as variações hormonais envolvidas nas fases do ciclo estral. Além disso, também foi verificado o papel desse sistema em ratas OVX, que é considerado um modelo de menopausa, onde as variações hormonais não mais ocorrem. O estudo mostra que a temperatura corporal durante o dia é semelhante em ratos machos, fêmeas OVX ou na fase DE, porém menor em ratas em PE. No entanto, a temperatura basal determinada nas primeiras horas da manhã, após manipulação, é semelhante em ratos machos e fêmeas ciclando (considerando-se o PE e o DE), porém maior em fêmeas OVX. Em relação a febre, o LPS induz uma resposta febril semelhante em machos e fêmeas OVX, porém menor em fêmeas ciclando (DE e PE). Quanto ao envolvimento deste sistema, a sinalização por RANKL parece estar envolvida na resposta febril induzida por LPS em machos, fêmeas OVX e em DE mas não em ratas em PE. Além disso, a reposição hormonal somente com E2 diminuiu significativamente a participação de RANKL na febre induzida por LPS em fêmeas OVX. A ineficácia do tratamento com OPG na redução da febre induzida por LPS, em ratas PE, não se deve a uma redução da expressão de receptores no hipotálamo, pelo contrário, a expressão de RANK no hipotálamo das fêmeas em PE está aumentada mesmo o antagonista não sendo capaz de reduzir a febre nesta fase. Discutiremos a seguir vários aspectos deste trabalho separadamente que consideramos importante um aprofundamento.

5.1 A ovariectomia como um modelo de menopausa

Os animais OVX são regularmente utilizados para investigar os mecanismos responsáveis pelas complicações relacionadas à menopausa em humanos. No entanto, alguns pontos precisam ser considerados. A indução da ovariectomia não reflete o processo da pós-menopausa tal como ocorre naturalmente, pois este é um processo longo e gradual em que a secreção de estrógeno e progesterona diminuem enquanto FSH e LH aumentam, não cessando abruptamente (Burger, Dudley et al. 2002). Entretanto, a OVX possui uma grande aplicabilidade por conseguir em um curto período de tempo a maioria das características desejadas que se instalam pela deficiência hormonal.

Dentre essas características destacam-se, o aumento o peso corporal e gordura abdominal, atrofia uterina e diminuição de massa óssea, após 8 semanas. Este último muito relacionado a estudos de desordens ósseas (Turner 2001, Jackson, Wohlers et al. 2013).

Para verificar se algumas dessas características relacionadas a diminuição hormonal, bem descritas na literatura, estavam presentes em nossos animais decidimos avaliar seus pesos uterinos, corporais e de gordura abdominal. Os úteros dos animais OVX apresentaram atrofia em relação aos Sham, devido a diminuição dos hormônios ovarianos e consequente perda de função. Os animais OVX apresentaram peso corporal e de gordura abdominal maior em relação aos animais Sham. Como descrito na literatura, esse aumento não se deve exclusivamente a um maior consumo de dieta, mas também a alterações metabólicas como a resistência à insulina e síndrome metabólica. Assim, a OVX também é utilizada como modelo de obesidade (Gower, Munoz et al. 2006, Jackson, Wohlers et al. 2013).

Como já descrito na literatura, o modelo de OVX também pode ser utilizado para análise de doenças relacionadas a homeostase óssea, principalmente no período pós-menopausa em mulheres onde há maior prevalência dessas doenças. O estrógeno tem efeito protetor nos ossos ao inibir o principal ativador de osteoclastos, o RANKL. Além disso, o estrógeno aumenta a atividade da OPG, que tem como principal função inibir do RANKL. Desta forma, a ovariectomia diminuiu ou aboliu este efeito protetor, aumentando a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea, gerando desordem da homeostase óssea, por exemplo a osteoporose (Turner 2001, Diab and Watts 2013). Em nosso estudo, nós não avaliamos os parâmetros de perda óssea, apenas os pesos corporais, de útero e gordura abdominal.

5.2 Influências dos hormônios sexuais na temperatura corporal normal dos ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e nas fases diestro e proestro

Inicialmente, avaliamos se a Tc era diferente entre machos, fêmeas OVX e em diferentes fases do ciclo estral (DE e PE), na fase clara (10h-16h). Escolhemos DE e PE devido a sua menor e maior quantidade de estrógeno,

nestas fases em relação as outras, assim pudemos avaliar o contraponto entre alta e baixa quantidade deste hormônio, além da abstinência do mesmo nas ratas OVX. Além disso, as fases DE e PE são identificadas com mais facilidade e tem duração maior que as demais.

Em nossos resultados, as fêmeas no PE apresentaram menor temperatura corporal em relação aos demais grupos, DE, OVX e machos. Este resultado corrobora com Yochim e Spencer (1976), que relataram uma menor temperatura corporal interna média dos animais em PE em relação as outras fases do ciclo estral, ainda que esta diferença não tenha sido tão proeminente. Estes autores realizaram seus experimentos em uma temperatura ambiente subneutra (23°C), diferente dos nossos experimentos que foram realizados na ZNT. A ZNT corresponde a uma faixa de temperatura ambiente (em torno de 28°C para ratos) onde não há grande alteração na temperatura corporal do animal. Com este conceito, os experimentos na ZNT são isentos da interferência de mecanismos mais completos de termorregulação, como aqueles envolvidos na perda e conservação de calor.

Em relação a temperatura basal, Yochim e Spencer também relataram uma diminuição geral na média de T_c após a ovariectomia, enquanto que estudos prévios do nosso grupo (Brito, Radulski et al. 2016), e do presente estudo mostraram uma temperatura basal (T_b) significativamente maior em fêmeas OVX em comparação com machos ou fêmeas nas fases PE e DE. Embora estes dados possam parecer completamente opostos, mais uma vez estes precisam ser avaliados a luz do conceito de termoneutralidade (Yochim and Spencer 1976).

Em relação a temperatura basal, Dacks e Rance (2010) demonstraram que a ovariectomia pode modificar a zona termoneutra das fêmeas e, conseqüentemente, a temperatura central a diferentes temperaturas ambientes. Esses autores observaram que a zona termoneutra foi deslocada para menores temperaturas após ovariectomia (OVX, 22 a 30°C) em relação às fêmeas OVX suplementadas com E2 (OVX + E2, 26 a 32°C). A zona termoneutra de OVX + E2 é semelhante aos machos. Assim, estes dados sugerem que a ausência específica de E2 é a responsável por esta mudança na zona de termoneutralidade. Dacks e Rance também evidenciaram que, embora a temperatura corporal de ratas OVX e OVX + E2 seja semelhante em

temperaturas ambientes subneutras, em ambiente com temperaturas mais altas, a T_c dos animais OVX são significativamente maiores que aquelas observados em OVX + E2 (Dacks and Rance 2010). Assim, parece que a ovariectomia, e mais especificamente a ausência de estrógeno, prejudica as resposta de compensação ao calor. Portanto, esse estudo apoia nossas observações para as fêmeas em PE, DE e OVX, considerando que nossos experimentos foram realizados na temperatura termoneutra de 28°C. Estes dados em conjunto sugerem que as ratas em diferentes fases do ciclo estral (PE e DE), bem como a ovariectomia podem mudar substancialmente o controle da temperatura corporal em fêmeas.

Além disso, esses mesmos autores, em 2011, avaliaram a termorregulação através da temperatura da pele da cauda, e 14 áreas do cérebro de ratas OVX tratadas ou não com E2, através de imunohistoquímica, afim de estabelecer em qual região ocorria essa diferença hormonal na termorregulação verificada no trabalho anterior. Eles identificaram uma correspondência entre a ativação do MnPO e a vasomotricidade da cauda, e o E2 como um inibidor de ambos os fatores em temperaturas de 31°C, evidenciando um importante papel do MnPO nesta modulação (Dacks, Krajewski et al. 2011).

Além de ser importante compreender estas diferenças de controle de temperatura corporal normal nas diferentes condições hormonais, estes dados também foram importantes para determinarmos como seriam essas diferenças a uma temperatura termoneutra, uma vez que os experimentos com febre seriam conduzidos a esta temperatura. Baseados nestas diferenças, procedemos as análises posteriores sempre avaliando a variação da temperatura corporal, que é a diferença entre a temperatura em um dado momento em relação a temperatura basal, ao invés da análise das temperaturas absolutas (como apresentado na Figura 11) dos animais.

5.3 Influências dos hormônios sexuais na resposta febril induzida pelo LPS em fêmeas ovariectomizadas e nas fases diestro e proestro

A administração de LPS em ratos machos e fêmeas induziu uma resposta febril semelhante à observada em estudos anteriores, sendo a resposta em fêmeas ciclando (sem distinção de fase do ciclo) menor que em machos

(Ashdown, Poole et al. 2007, Brito, Radulski et al. 2016) . No presente estudo avaliou-se ainda a resposta febril induzida pelo LPS nas duas fases do ciclo estral distintas em relação ao estrógeno. As fêmeas em PE e em DE tiveram uma resposta febril similar. No entanto, em comparação com ratos machos, a resposta febril de fêmeas em PE mostrou diferenças significativas em um número menor de pontos de avaliação (tempo) do que as fêmeas em DE. Corroborando resultados anteriores, as fêmeas OVX apresentaram uma resposta febril, semelhante à dos machos (Brito, Radulski et al. 2016). Estes resultados indicam que, aparentemente, os hormônios sexuais femininos, e particularmente E2, modulam a resposta febril induzida por LPS de forma hormônio-dependente. Na abstenção de estrogênio (OVX) e machos, ou em uma diminuição hormonal (DE) há uma maior resposta febril, enquanto que em uma maior quantidade de hormônio (PE) ou com reposição hormonal (Brito, Radulski et al. 2016), essa resposta febril é reduzida. Ainda em relação aos grupos de ratas em PE e DE, foi observado apenas um ponto de diferença estatística entre esses grupos.

Esses estudos relacionando a resposta febril com os hormônios sexuais tem relevância clínica e são de extrema importância, visto que já foram descritos na literatura diferenças na resposta febril em ratas grávidas em comparação com não grávidas. Em grávidas, há uma resposta febril reprimida a desafios imunológicos, principalmente em gravidez tardia. Dado o valor benéfico da febre, onde há um maior trabalho da maquinaria imunológica, sua supressão vem com um alto risco para a mãe e o feto (Harre, Mouihate et al. 2006, Spencer, Mouihate et al. 2008)

5.4 Efeitos do tratamento com osteoprotegerina na resposta febril induzida pelo LPS em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e nas fases diestro e proestro

Um estudo conduzido por Hanada et al. (2009) demonstrou que o RANKL participa da resposta febril induzida pelo LPS em camundongos machos. Ainda, a administração i.c.v. de RANKL resulta em aumento da temperatura em camundongos machos. Estes experimentos foram realizados em animais com deleção específica para RANK em neurônios e astrócitos, no sistema nervoso

central. Além disso, foi verificado que o RANKL é um importante mediador da febre induzida por IL-1 β e TNF- α e recruta prostaglandinas para exercer esse efeito pirogênico (Hanada, Leibbrandt et al. 2009). Em fêmeas, foi verificado apenas que a temperatura corporal normal era maior nos camundongos transgênicos RANK, durante a fase clara, e essa diferença era abolida, após a ovariectomia, sugerindo que esse sistema RANK / RANKL está sob o controle dos hormônios sexuais femininos. Não foi realizado quaisquer tratamentos farmacológico para verificar esse fato.

No presente estudo, confirmamos o resultado obtido por Hanada e colaboradores (2009), mostrando que o RANKL participa da resposta febril induzida por LPS em ratos, uma vez que a OPG reduziu a resposta febril induzida por LPS nesses animais. No entanto, OPG não alterou a resposta febril em ratas falso-operadas em PE. Em ratas na fase DE, uma hipotermia ocorreu logo após a administração de OPG e LPS, seguida por uma redução parcial na febre induzida por LPS. Entretanto, 4 h após a injeção de LPS, a resposta febril induzida por LPS foi idêntica em ambos os grupos, tratado e não tratado com OPG, durante o DE. As fêmeas OVX apresentaram uma redução na resposta febril similar à observada em machos quando tratados com OPG e LPS. Estes resultados sugerem que existe uma conexão entre a participação do RANKL na resposta febril e o estado hormonal do animal.

O papel do sistema RANK/RANKL na febre induzida por LPS parece atuar quando hormônios sexuais estão diminuídos ou abolidos, ou seja, no DE e em OVX, respectivamente. Em contrapartida, quando os hormônios sexuais estão aumentados, como na fase PE, este sistema tem uma regulação diferente na resposta febril induzida por LPS. De nosso conhecimento, este é o primeiro relato que mostra que um mediador da resposta febril participa ou não da resposta febril, dependendo da fase do ciclo estral, e conseqüentemente de variações hormonais. Deste modo, a compreensão destes e de outros mediadores que variam quantitativamente, como prostaglandinas por exemplo (Brito, Radulski et al. 2016), entre as diferentes fases do ciclo, podem ser importantes para o entendimento de porque a resposta febril em fêmeas é menor do que em machos.

5.5 Efeitos do tratamento com β -estradiol e osteoprotegerina na resposta febril induzida pelo LPS em ratas ovariectomizadas

Para confirmar os dados apresentados anteriormente, realizamos o tratamento subcrônico com E2 ou veículo, em animais OVX, afim de verificar se esse hormônio estaria modulando a ação do sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por LPS. Hipotetizamos que, embora a reposição hormonal somente com estrógeno em ratas OVX não caracterizasse uma reposição hormonal que permitisse ao indivíduo um retorno a condição previa, este hormônio poderia ser necessário e suficiente para reverter estas diferenças relacionadas à resposta febril e ao sistema RANK/RANKL entre as ratas OVX e ratas com ciclo estral normal. O tratamento com E2 reduziu a resposta febril induzida por LPS em ratas OVX, já previamente descrito na literatura (Brito, Radulski et al. 2016). Da mesma maneira, o pré-tratamento com OPG reduziu a resposta febril induzida por LPS em animais tratados com veículo (presente estudo). Ao realizar a reposição de E2 e o tratamento adicional com OPG, não houve uma redução adicional da resposta febril, tornando este animal, de certa maneira, bastante parecido com a rata em PE. Obviamente que não esperávamos que a resposta febril induzida por LPS em animais OVX com reposição de E2 tivesse um perfil temporal similar aquela observada em ratas falso-operadas em PE, uma vez que as últimas possuem outros hormônios e estão passando por uma mudança cíclica destes hormônios. Por outro lado, a rata OVX tratada com E2, recebe-o diariamente durante uma semana (portanto não há ciclos e não há outros hormônios sendo repostos), protocolo normalmente utilizados em outros trabalhos encontrados na literatura (Limon-Morales, Soria-Fregozo et al. 2014, Gervais, Mumby et al. 2015). Estes resultados sugerem que o sistema RANK/RANKL é controlado por estrogênios em ratas. Quantidades mais baixas de estrogênios (como durante o DE) ou a ausência desses hormônios (como após a ovariectomia) regulam esse sistema, o que contribui para a resposta febril nas fêmeas. No sentido oposto, o aumento de estrogênios, pelo menos em parte, durante a fase de PE leva ao aumento de OPG, inibindo a ação do RANKL na resposta febril induzida por LPS.

5.6 Quantificações de receptores RANK no hipotálamo de ratas fêmeas ovariectomizadas e nas fases diestro e proestro

Uma vez que observamos que o sistema RANK/RANKL não participa da resposta febril induzida por LPS em ratas durante o PE mas que participa da resposta em ratas em DE ou OVX, decidimos avaliar possíveis razões que pudessem explicar estas diferenças. Para tanto resolvemos comparar os níveis do receptor (RANK) no hipotálamo em diferentes condições hormonais.

A avaliação da expressão do receptor no hipotálamo mostrou que a administração do antagonista OPG não alterou os níveis de RANK em fêmeas OVX ou nas fases PE e DE. A administração de LPS pareceu não induzir uma expressão significativamente aumentada de RANK em ratas em DE ou OVX, porém a expressão de RANK no grupo PE tratado com LPS foi significativamente maior em relação ao grupo controle (salina). Não encontramos dados na literatura que comprovem o aumento da expressão desse receptor em hipotálamo de fêmeas após a administração de LPS. Em resultados anteriores no nosso laboratório, ainda não publicados, realizamos através de imunohistoquímica avaliação de receptores RANK em ratas falso-operadas (sem distinção de fase do ciclo estral) e OVX, após tratamento com LPS, e obtivemos resultado semelhante, porém de forma qualitativa (Brito, 2016, não publicado). Entretanto, no presente estudo mostramos quantitativamente que esta diferença ocorre principalmente no PE. Ainda, avaliamos a expressão de receptores RANK no hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas com E2 de forma subcrônica. A reposição hormonal em ratas OVX foi capaz de aumentar a expressão de receptores tanto no tratamento singular com LPS quanto no tratamento duplo com OPG e LPS. A expressão de receptores nesses animais foi similar aquela observada em ratas na fase do ciclo PE quando tratadas com LPS. Estes dados reforçam a idéia de que a expressão de receptores RANK está ligada aos níveis de estrogênio. No entanto, estes dados ainda sugerem que a ausência de efeito da OPG na resposta febril induzida por LPS em ratas no PE não se deve a modulação negativa da expressão de receptores por estrogênios. De fato, em animais em PE, a expressão de RANK está aumentada após a administração de LPS embora a OPG seja inefetiva em reduzir a febre.

Este dados levantam a possibilidade de que os hormônios femininos, e neste contexto o estrogênio, possam estar modulando a expressão de RANKL e não do receptor RANK. É importante salientar que a OPG, como antagonista endógeno, liga-se ao RANKL e não ao RANK. Assim, uma maior expressão de RANK como esta observada durante o PE, não necessitaria da administração de uma quantidade maior do antagonista.

6. CONCLUSÕES

Os ratas na fase PE apresentam menor temperatura corporal em comparação com os ratos ou fêmeas em DE ou OVX. Além disso, as ratas OVX apresentam maior temperatura basal no período da manhã em relação aos mesmos grupos quando avaliadas na ZTN de temperatura.

A resposta febril induzida pelo LPS é modulada pelos hormônios sexuais, inclusive nas diferentes fases do ciclo estral em ratas (PE e DE).

A participação do sistema RANK/RANKL na resposta febril é alterada por hormônios sexuais femininos, em especial o E2. Deste modo, nossos dados sugerem que o RANKL não participa da resposta febril induzida por LPS em ratas em PE, mas pode participar desta resposta quando estas estão em DE ou são OVX.

O papel do sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril é diferente, portanto, entre machos e fêmeas e varia de acordo com os hormônios sexuais em fêmeas.

Ainda não sabemos o mecanismo pelo qual esse sistema é capaz de interferir na resposta febril em relação ao estrógenos embora saibamos que essa diferença de resposta não se deve a uma maior expressão de RANK no hipotálamo promovida por estrogênios. Ainda serão necessários mais estudos para que possamos entender esse mecanismo.

REFERÊNCIAS

Anderson, D. M., E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert (1997). "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." Nature **390**(6656): 175-179.

Ansar Ahmed, S., W. J. Penhale and N. Talal (1985). "Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action." Am J Pathol **121**(3): 531-551.

Ashdown, H., S. Poole, P. Boksa and G. N. Luheshi (2007). "Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(4): R1667-1674.

Bastos-Pereira, A. L., et al. (2014). "Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response." J Appl Physiol (1985) **116**(9): 1220-1229.

Bastos-Pereira, A. L., et al. (2015). "Central mediators involved in the febrile response induced by polyinosinic-polycytidylic acid: lack of involvement of endothelins and substance P." J Neuroimmunol **278**: 100-107.

Baud'huin, M., F. Lamoureux, L. Duplomb, F. Redini and D. Heymann (2007). "RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases." Cell Mol Life Sci **64**(18): 2334-2350.

Beeson, P. B. (1994). "Age and sex associations of 40 autoimmune diseases." Am J Med **96**(5): 457-462.

Bicego, K. C., R. C. Barros and L. G. Branco (2007). "Physiology of temperature regulation: comparative aspects." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **147**(3): 616-639.

Blatteis, C. M. (2006). "Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management." Pharmacol Ther **111**(1): 194-223.

Blatteis, C. M., L. Xin and N. Quan (1994). "Neuromodulation of fever. A possible role for substance P." Ann N Y Acad Sci **741**: 162-173.

Bouman, A., M. J. Heineman and M. M. Faas (2005). "Sex hormones and the immune response in humans." Hum Reprod Update **11**(4): 411-423.

Brito, H. O., D. R. Radulski, D. B. Wilhelms, A. Stojakovic, L. M. Brito, D. Engblom, C. R. Franco and A. R. Zampronio (2016). "Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1beta in Rats." J Neuroendocrinol **28**(10).

Brooks-Asplund, E. M., J. G. Cannon and W. L. Kenney (2000). "Influence of hormone replacement therapy and aspirin on temperature regulation in postmenopausal women." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(3): R839-848.

Burger, H. G., E. C. Dudley, D. M. Robertson and L. Dennerstein (2002). "Hormonal changes in the menopause transition." Recent Prog Horm Res **57**: 257-275.

Byers, S. L., M. V. Wiles, S. L. Dunn and R. A. Taft (2012). "Mouse estrous cycle identification tool and images." PLoS One **7**(4): e35538.

Caligioni, C. S. (2009). "Assessing reproductive status/stages in mice." Curr Protoc Neurosci **Appendix 4**: Appendix 4I.

Dinarello, C. A. and Canno, S. M. Wolff (1988). "New Concepts on the Pathogenesis of Fever." Oxford University Press **Vol. 10, No. 1 (Jan. - Feb., 1988)**, pp. 168-189(No. 1): 168-189

Dacks, P. A., S. J. Krajewski and N. E. Rance (2011). "Ambient temperature and 17beta-estradiol modify Fos immunoreactivity in the median preoptic nucleus, a putative regulator of skin vasomotion." Endocrinology **152**(7): 2750-2759.

Dacks, P. A. and N. E. Rance (2010). "Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats." Endocrinology **151**(3): 1187-1193.

Dempster, D. W., C. L. Lambing, P. J. Kostenuik and A. Grauer (2012). "Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data." Clin Ther **34**(3): 521-536.

Diab, D. L. and N. B. Watts (2013). "Postmenopausal osteoporosis." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **20**(6): 501-509.

Dinarello, C. A. (1999). "Cytokines as endogenous pyrogens." J Infect Dis **179 Suppl 2**: S294-304.

Emanuele, M. A., F. Wezeman and N. V. Emanuele (2002). "Alcohol's effects on female reproductive function." Alcohol Res Health **26**(4): 274-281.

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

Faienza, M. F., A. Ventura, F. Marzano and L. Cavallo (2013). "Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells." Clin Dev Immunol **2013**: 575936.

Gervais, N. J., D. G. Mumby and W. G. Brake (2015). "Attenuation of dendritic spine density in the perirhinal cortex following 17beta-Estradiol replacement in the rat." Hippocampus **25**(11): 1212-1216.

Gordon, C. J. (1990). "Thermal biology of the laboratory rat." Physiol Behav **47**(5): 963-991.

Gower, B. A., J. Munoz, R. Desmond, T. Hilario-Hailey and X. Jiao (2006). "Changes in intra-abdominal fat in early postmenopausal women: effects of hormone use." Obesity (Silver Spring) **14**(6): 1046-1055.

Hammel, H. T. (1965). "Neurons and temperature regulation. AMRL-TR-65-232." AMRL TR: 1-32.

Hanada, R., T. Hanada, V. Sigl, D. Schramek and J. M. Penninger (2011). "RANKL/RANK-beyond bones." J Mol Med (Berl) **89**(7): 647-656.

Hanada, R., A. Leibbrandt, T. Hanada, S. Kitaoka, T. Furuyashiki, H. Fujihara, J. Trichereau, M. Paolino, F. Qadri, R. Plehm, S. Klaere, V. Komnenovic, H. Mimata, H. Yoshimatsu, N. Takahashi, A. von Haeseler, M. Bader, S. S. Kilic, Y. Ueta, C. Pifl, S. Narumiya and J. M. Penninger (2009). "Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK." Nature **462**(7272): 505-509.

Harre, E. M., A. Mouihate and Q. J. Pittman (2006). "Attenuation of fever at near term: is interleukin-6-STAT3 signalling altered?" J Neuroendocrinol **18**(1): 57-63.

Hasday, J. D., C. Thompson and I. S. Singh (2014). "Fever, immunity, and molecular adaptations." Compr Physiol **4**(1): 109-148.

Hirata, B. K., R. M. Banin, A. P. Dornellas, I. S. de Andrade, J. C. Zemdegs, L. C. Caperuto, L. M. Oyama, E. B. Ribeiro and M. M. Telles (2015). "Ginkgo biloba extract improves insulin signaling and attenuates inflammation in retroperitoneal adipose tissue depot of obese rats." Mediators Inflamm **2015**: 419106.

Horowitz, M. C., Y. Xi, K. Wilson and M. A. Kacena (2001). "Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 9-18.

Jackson, K. C., L. M. Wohlers, R. M. Lovering, R. A. Schuh, A. C. Maher, A. Bonen, T. R. Koves, O. Ilkayeva, D. M. Thomson, D. M. Muoio and E. E. Spangenburg (2013). "Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **304**(3): R206-217.

Kanzaki, H., S. Makihira, M. Suzuki, T. Ishii, A. Movila, J. Hirschfeld, H. Mawardi, X. Lin, X. Han, M. A. Taubman and T. Kawai (2016). "Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF-alpha-Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis." J Immunol **197**(10): 3871-3883.

Kiechl, S., J. Wittmann, A. Giaccari, M. Knoflach, P. Willeit, A. Bozec, A. R. Moschen, G. Muscogiuri, G. P. Sorice, T. Kireva, M. Summerer, S. Wirtz, J. Luther, D. Mielenz, U. Billmeier, G. Egger, A. Mayr, F. Oberhollenzer, F. Kronenberg, M. Orthofer, J. M. Penninger, J. B. Meigs, E. Bonora, H. Tilg, J. Willeit and G. Schett (2013). "Blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus." Nat Med **19**(3): 358-363.

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

Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-176.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature **15** (1970) 680–685.

Lam, J., C. A. Nelson, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum and D. H. Fremont (2001). "Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity." J Clin Invest **108**(7): 971-979.

Leibbrandt, A. and J. M. Penninger (2008). "RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology." Ann N Y Acad Sci **1143**: 123-150.

Limon-Morales, O., C. Soria-Fregozo, M. Arteaga-Silva, M. H. Gonzalez, G. Vazquez-Palacios and H. Bonilla-Jaime (2014). "Hormone replacement with 17beta-estradiol plus dihydrotestosterone restores male sexual behavior in rats treated neonatally with clomipramine." Horm Behav **66**(5): 820-827.

Lum, L., B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlondorff, P. Tempst, Y. Choi and C. P. Blobel (1999). "Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival." J Biol Chem **274**(19): 13613-13618.

Marcondes, F. K., K. J. Miguel, L. L. Melo and R. C. Spadari-Bratfisch (2001). "Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test." Physiol Behav **74**(4-5): 435-440.

Mouihate, A., X. Chen and Q. J. Pittman (1998). "Interleukin-1beta fever in rats: gender difference and estrous cycle influence." Am J Physiol **275**(5 Pt 2): R1450-1454.

Nakamura, K. and S. F. Morrison (2011). "Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering." J Physiol **589**(Pt 14): 3641-3658.

Ngo, S. T., F. J. Steyn and P. A. McCombe (2014). "Gender differences in autoimmune disease." Front Neuroendocrinol **35**(3): 347-369.

Papaioannou, S., M. Aslam, B. H. Al Wattar, R. C. Milnes and T. G. Knowles (2013). "User's acceptability of OvuSense: a novel vaginal temperature sensor for prediction of the fertile period." J Obstet Gynaecol **33**(7): 705-709.

Paxinos, G. & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2a ed., Sydney, Australia, 2005.

Rao, S., S. J. F. Cronin, V. Sigl and J. M. Penninger (2018). "RANKL and RANK: From Mammalian Physiology to Cancer Treatment." Trends Cell Biol **28**(3): 213-223.

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

Romanovsky, A. A., A. I. Ivanov and Y. P. Shimansky (2002). "Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality." J Appl Physiol (1985) **92**(6): 2667-2679.

Spencer, S. J., A. Mouihate, M. A. Galic and Q. J. Pittman (2008). "Central and peripheral neuroimmune responses: hyporesponsiveness during pregnancy." J Physiol **586**(2): 399-406.

Turner, A. S. (2001). "Animal models of osteoporosis--necessity and limitations." Eur Cell Mater **1**: 66-81.

Wada, T., T. Nakashima, N. Hiroshi and J. M. Penninger (2006). "RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease." Trends Mol Med **12**(1): 17-25.

Walsh, M. C. and Y. Choi (2014). "Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond." Front Immunol **5**: 511.

Wong, B. R., R. Josien, S. Y. Lee, B. Sauter, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. Choi (1997). "TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor." J Exp Med **186**(12): 2075-2080.

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, S. I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio (1998). "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro." Endocrinology **139**(3): 1329-1337.

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinoshita, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi and T. Suda (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3597-3602.

Yochim, J. M. and F. Spencer (1976). "Core temperature in the female rat: effect of ovariectomy and induction of pseudopregnancy." Am J Physiol **231**(2): 361-365.

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

Zampronio, A. R., G. E. Souza, C. A. Silva, F. Q. Cunha and S. H. Ferreira (1994). "Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism." Am J Physiol **266**(5 Pt 2): R1670-1674.

Zhao, L., L. Huang and X. Zhang (2016). "Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists." Sci China Life Sci **59**(12): 1241-1258.