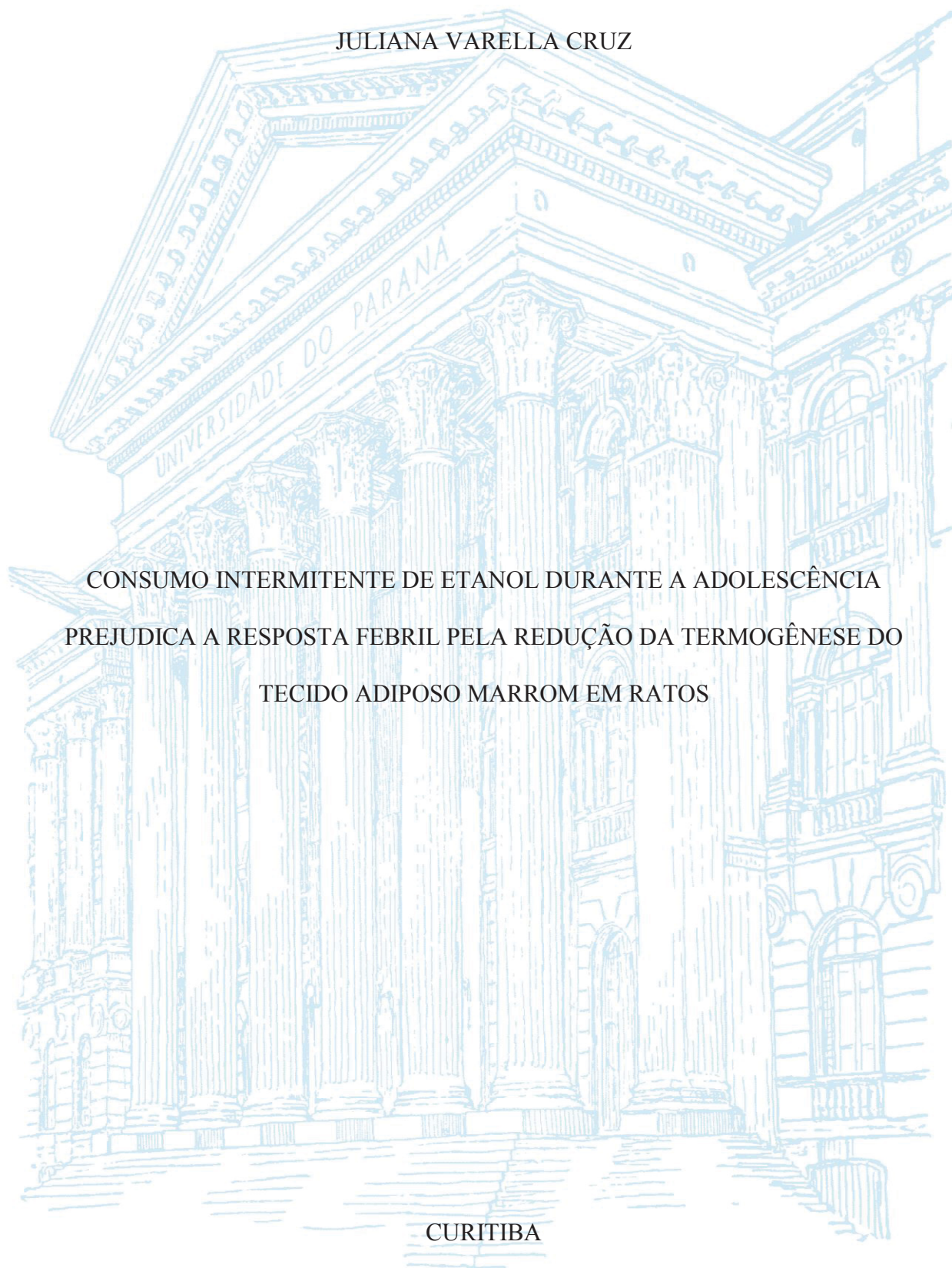


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA VARELLA CRUZ



CONSUMO INTERMITENTE DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA
PREJUDICA A RESPOSTA FEBRIL PELA REDUÇÃO DA TERMOGÊNESE DO
TECIDO ADIPOSEO MARROM EM RATOS

CURITIBA

2019

JULIANA VARELLA CRUZ

CONSUMO INTERMITENTE DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA
PREJUDICA A RESPOSTA FEBRIL PELA REDUÇÃO DA TERMOGÊNESE DO
TECIDO ADIPOSEO MARROM EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Cruz, Juliana Varella

Consumo intermitente de etanol durante a adolescência prejudica a resposta febril pela redução da termogênese do tecido adiposo marrom em ratos. / Juliana Varella Cruz. – Curitiba, 2019.
67 p.: il.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio

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

1. Etanol 2. Febre 3. Termogênese 4. Tecido adiposo marrom I.
Título II. Zamprônio, Aleksander Roberto, 1967- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.7828



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA VARELLA CRUZ** intitulada: **Consumo intermitente de etanol durante a adolescência prejudica a resposta febril pela redução da termogênese no tecido adiposo marrom em ratos**, sob orientação do Prof. Dr. ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após ter 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, 19 de Setembro de 2019.



ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF

Avaliador Externo (FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL)

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara”.

- José Saramago

AGRADECIMENTOS

Á Deus agradeço por me conceder a sabedoria necessária quando precisei e também pela proteção diária. Peço perdão pelos momentos que nem sempre reconheci a Sua presença.

Aos meus pais Hansley e Marcilia, agradeço todos os dias por serem os ouvidos que tanto escutam meus desabafos, dúvidas e incertezas. Obrigada por todos os conselhos, e por todo o apoio e confiança a mim depositados. Sem vocês, nada faria sentido.

Agradeço aos meus irmãos, Marcela e Leonardo, por sempre estarem ao meu lado e por ser a minha torcida. Vocês são pura inspiração para mim. Obrigada.

Obrigada á minha família, especialmente minhas tias Hansledir, Hanslilian e Hanslivian, três mulheres fortes que sempre foram exemplos profissional e acadêmico. Sempre me espelharei em vocês.

Ás minhas avós, Anadir (*in memoriam*) que sempre foi exemplo de resiliência e determinação, sei que de onde estiver estará sempre olhando por nós e sentindo orgulho dos caminhos que tomamos. E Cravenice, por ser aquela que está sempre presente e desejando boa sorte. Serei eternamente grata.

Ás minhas grandes amigas, Susan e Melissa que estiveram presentes desde o começo da minha jornada, e que sempre estiveram ao meu lado me ajudando a acreditar em mim mesma. Obrigada por terem sido as melhores distrações durante esse tempo.

Agradeço especialmente a Isabella Maba, meu grande presente deste mestrado, sem a sua ajuda este trabalho não teria saído. Obrigada pelas conversas existenciais e

pelos ensinamentos. As tardes intermináveis de cirurgias com a sua ajuda nem pareceram tão intermináveis assim.

Ao Luís, outro presente que a vida me concedeu nesses dois anos de mestrado. Obrigada por sempre me ouvir e por sempre arrancar uma gargalhada, mesmo nos dias mais difíceis. Agradeço por sempre ter feito o que estava ao seu alcance para me ajudar.

Obrigada a todos os colegas do laboratório de inflamação e febre, com certeza aprendi muito com todos. Leticia, obrigada pelas conversas e companhias de RU, você fez com que a parte final desse mestrado fosse mais leve.

Agradeço ao meu orientador, Aleksander Zampronio, um cientista admirável. O qual acreditou em mim e sempre me mostrou o melhor caminho a seguir. Obrigada por todos os ensinamentos, carregarei todos eles pelo resto da minha vida.

À minha professora Adriana, que me contagiou com sua paixão pela farmacologia e por ter sido uma grande inspiração para que eu me embrenhasse por essa área maravilhosa.

Ao Diego, pesquisador incrível. Obrigada por ter me acolhido na UFPR e me ensinado tanto.

À UFPR, que me trouxe muitas oportunidades e me fez ver o mundo de maneira mais clara.

Aos funcionários desta universidade, que sempre nos recebem com um sorriso.

À banca, por contribuir com este trabalho. Obrigada.

Aos animais utilizados nesse trabalho, que contribuíram com suas vidas.

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COX-1 – Ciclooxygenase 1

COX-2 – Ciclooxygenase 2

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

CXCL1 - Fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas

DMH - Hipotálamo dorso medial (*dorsal medial hypothalamus*)

DH – Corno dorsal (*dorsal horn*)

DRG – Ganglio da raiz dorsal (*dorsal root ganglia*)

EtOH – Etanol

ET-1 – Endotelina 1

EP₃ – Receptor EP₃ de prostaglandina

i.c.v – Intracerebroventricular

i.p – Intraperitoneal

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

LPS – Lipopolissacarídeo

LPB – Núcleo lateral parabraquial (*lateral parabraquial nucleus*)

L-PGDS - Lipocalina sintase PGD

mPGES-1 – PGE sintase microsomal 1 (*microsomal prostaglandin E₂ synthase 1*)

MnPO - Núcleo pré-óptico mediano (*median preoptic nucleus*)

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófago (*macrophage inflammatory protein - 1 α*)

NF κ B - Fator nuclear κ B (*nuclear factor κ B*)

PAF – Fator de agregação plaquetária (*platelet-activating factor*)

PGD₂ – Prostaglandina D₂

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGT – Transportador de prostaglandina (*prostaglandin transporter*)

PND – Dia pós-natal (*post natal days*)

POA/HA – Área pré-óptica / Hipotálamo anterior (*preoptic area/anterior hypothalamus*)

Poli I:C – ácido poli-inosínico:poli-cetidílico

RANKL - Ligante do receptor ativador do NF- κ B

RMR - Rafe bulbar rostral

SP – Substância P

TAM – Tecido adiposo marrom

TLR4 - Receptor do tipo *Toll* 4

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRP - Receptores de potencial transitório

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do protocolo experimental.....pág.30
- Figura 2:** Efeito do consumo intermitente de EtOH durante a adolescência no peso corporal.....pág.36
- Figura 3:** Temperatura corporal basal dos animais expostos a salina ou EtOH.....pág.37
- Figura 4:** Efeito da exposição intermitente de EtOH durante a adolescência na resposta febril induzida por LPS.....pág.38
- Figura 5:** Efeito da exposição intermitente de EtOH durante a adolescência na resposta febril induzida por PGE₂.....pág.39
- Figura 6:** Efeito da exposição intermitente de EtOH durante a adolescência na massa de TAM.....pág.40
- Figura 7:** Desafio ao frio após exposição intermitente de EtOH.....pág.42
- Figura 8:** Consumo de oxigênio pelo TAM após exposição ao EtOH.....pág.44
- Figura 9:** Histologia do TAM de animais expostos ao EtOH ou salina.....pág.46

RESUMO

O consumo de etanol (EtOH) é um dos principais riscos a saúde a nível mundial, iniciando-se geralmente na adolescência em um padrão de *binge* (consumo episódico em altas quantidades). A adolescência é um período crítico, onde o cérebro passa por diversas interações para atingir a maturação do sistema nervoso central. Existem evidências que o consumo *binge* de EtOH pode levar a modificações nas respostas de defesa inata e adaptativa, incluindo uma redução na resposta febril. O objetivo desse estudo é avaliar a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e prostaglandina E₂ (PGE₂), assim como avaliar os mecanismos de termorregulação em ratos expostos de maneira intermitente ao EtOH durante a adolescência. Ratos Wistar foram tratados com injeção intraperitoneal (i.p) de EtOH (3 g/kg, 25% w/v em salina) ou salina, nos seguintes dias pós-natal (PND): 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37 e 38. No PND 51 os animais receberam um desafio pirogênico (LPS i.p ou PGE₂ i.c.v) para avaliar a resposta febril após exposição ao EtOH. A exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência aboliu a resposta febril por LPS e atenuou a resposta febril por PGE₂ avaliada 12 dias após a última injeção de EtOH. Adicionalmente, a exposição ao EtOH diminuiu o peso corporal e a massa absoluta e relativa de tecido adiposo marrom (TAM). Uma análise mais pormenorizada deste tecido revelou uma redução na atividade mitocondrial particularmente relacionada a uma menor atividade da proteína desacopladora (UCP). Não foram encontradas diferenças morfológicas no tecido. Foram realizados desafios ao frio (PND 49 ou 51) para analisar a termogênese adaptativa e observou-se que o consumo intermitente de etanol na adolescência prejudicou a termogênese adaptativa a 5°C. Nosso trabalho ressalta que o consumo de EtOH intermitente durante a adolescência prejudica a termorregulação pela redução da massa e da funcionalidade do TAM. Essa redução pode durar por um longo período após o término da exposição e

pode afetar não apenas os mecanismos de defesa ao frio, mas também o desenvolvimento da resposta febril adequada durante processos infecciosos.

Palavras chave: EtOH intermitente; Resposta febril; PGE₂; Tecido adiposo marrom; Termogênese adaptativa.

ABSTRACT

Ethanol (EtOH) consumption is one of the main risks to the health worldwide, which generally starts during adolescence in a binge (episodic consumption of high amounts) pattern. This is particularly important since adolescence is a critic period of life where the central nervous system is going through changes to achieve the maturation. There is evidence that binge EtOH consumption can lead to modifications in the innate and adaptive immune response including a reduction in the febrile response. The aim of this study is to evaluate the febrile response induced by lipopolysaccharide (LPS) and prostaglandins E₂ (PGE₂), as well as evaluate the mechanisms of thermoregulation in adolescent rats exposed to EtOH in a binge-like pattern. Male Wistar rats were treated with an intraperitoneal (i.p) injection of EtOH (3g/kg, 25% w/v in saline) or saline in the following post-natal days (PND): 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37 and 38. On PND 51 animals received a pyrogenic challenge (LPS i.p or PGE₂ i.c.v) to evaluate the febrile response after binge drinking in adolescence. Interscapular brown adipose tissue (BAT) was also evaluated on PND 51. Cold challenges were performed (PND 49 or 51) to analyze adaptive thermogenesis. Intermittent EtOH exposure during adolescence abolished the febrile response induced by LPS and attenuated the fever induced by PGE₂ evaluated 12 days after the end of EtOH exposure. Additionally, EtOH consumption during adolescence decreased intrascapular BAT mass and UCP activity in this tissue, resulting in an impaired thermogenesis at 5°C. It was not identified morphological differences in BAT. Our work highlights that binge-like EtOH consumption during adolescence impairs thermoregulation by reducing BAT mass and by altering its functionality and UCP activity. This alteration in BAT may last for a long period after cessation of EtOH

exposure and may affect not only cold-defenses mechanisms as well as the development of febrile response during infectious processes.

Key-words: Binge-like EtOH; Febrile response; PGE₂, Brown adipose tissue; Adaptive thermogenesis.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------|
| 1. Introdução..... | pág.16 |
| 1.1 A termorregulação..... | pág.16 |
| 1.2 A resposta febril..... | pág.19 |
| 1.3 A resposta febril e o consumo de etanol..... | pág.23 |
| 2. Objetivos..... | pág.26 |
| 2.1 Objetivo geral..... | pág.28 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | pág.28 |
| 3. Metodologia..... | pág.29 |
| 3.1 Animais..... | pág.29 |
| 3.2 Drogas..... | pág.29 |
| 3.3 Modelo de exposição ao Etanol..... | pág.29 |
| 3.4 Procedimentos cirúrgicos..... | pág.31 |
| 3.5 Avaliação da resposta febril após exposição ao etanol..... | pág.31 |
| 3.6 Coleta de TAM..... | pág.32 |
| 3.7 Desafio ao frio..... | pág.32 |
| 3.8 Isolamento de mitocôndrias..... | pág.33 |
| 3.9 Consumo de oxigênio..... | pág.34 |
| 3.10 Histologia do TAM..... | pág.35 |
| 3.11 Análises estatísticas..... | pág.35 |
| 4. Resultados..... | pág.36 |
| 4.1 Diferenças no peso corporal de ratos expostos ao EtOH ou salina..... | pág.36 |
| 4.2 Temperatura basal..... | pág.37 |
| 4.3 Efeito da exposição ao EtOH na adolescência na febre induzida por LPS...pág.37 | |
| 4.4 Efeito da exposição ao EtOH na adolescência na febre induzida por PGE ₂ .pág.38 | |

| | |
|--|--------|
| 4.5 Massa de tecido adiposo marrom em animais expostos a salina ou EtOH... | pág.39 |
| 4.6 Efeito do EtOH na termogênese adaptativa..... | pág.41 |
| 4.7 Consumo de oxigênio pelo TAM de animais expostos a salina ou EtOH.... | pág.43 |
| 4.8 Histologia do TAM em animais expostos a salina ou EtOH..... | pág.44 |
| 5. Discussão..... | pág.47 |
| 6. Conclusão..... | pág.56 |
| 7. Referências..... | pág.57 |

1. Introdução

1.1 A termorregulação

Dentre as funções cerebrais para a manutenção da homeostase, os mecanismos de termorregulação tem importância fundamental para que as atividades celulares ocorram de maneira adequada (Morrison e Nakamura, 2018).

Através de termorreceptores cutâneos, que são sensíveis ao frio ou ao calor, o sistema central da termorregulação é capaz de perceber alterações na temperatura ambiente. Esses termorreceptores são receptores de potencial transitório (TRP) e fazem parte de uma família de canais iônicos serão ativados de acordo com a temperatura. Em temperaturas muito quentes, acima de 40°C, temperatura considerada nociva ocorre ativação de TRPV1, TRPV2 e TRPM3. Quando a temperatura estiver entre 20°C e 40°C, são ativados receptores TRPV3, TRPV4, TRPM4 e TRPM5. Em temperatura mais fria, abaixo de 20°C, os receptores TRPM8 e TRPA1 são ativados (Tominaga, 2007; Vriens et al., 2011)

No momento em que esses termorreceptores percebem o aumento da temperatura ambiente, neurônios sensíveis ao calor aumentam as taxas de disparo. O inverso acontece quando os termorreceptores detectam a diminuição da temperatura ambiente, e os neurônios sensíveis ao calor tem a taxa de disparo diminuída. No entanto, os neurônios sensíveis ao frio, aumentam as taxas de disparo nessa condição (Boulant e Dean, 1986).

As informações captadas pelos termorreceptores são transmitidas para o gânglio da raiz dorsal (DRG), que irá repassar essas informações aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal (DH) da medula espinhal. No DH, os neurônios da lamina I recebem os sinais termiais cutâneos, esses neurônios fazem sinapse diretamente com os neurônios do tálamo que projetam para o córtex somatossensorial, levando a percepção

e discriminação da sensação de temperatura. Além disso, os neurônios glutamatérgicos sensíveis ao frio no DH irão ativar neurônios sensíveis de terceira ordem no subnúcleo lateral do núcleo lateral parabraquial (LPB). Os neurônios sensíveis ao calor do DH projetam para neurônios de terceira ordem no subnúcleo dorsal do LPB. Esses sinais termorregulatórios são repassados a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA/HA), onde está a circuitaria em que os sinais cutâneos serão integrados para regular o equilíbrio homeostático (Morrison, 2016).

Na POA/HA existem interneurônios gabaérgicos no subnúcleo pré-óptico mediano (MnPO) e esses interneurônios recebem *inputs* glutamatérgicos provenientes de neurônios sensíveis ao frio. Dessa maneira, ocorre a inibição dos neurônios sensíveis ao calor na área pré-óptica medial (MPA). Essa região é responsável por controlar os mecanismos de produção e conservação de calor, como a vasoconstrição periférica, o tremor muscular e a termogênese do tecido adiposo marrom (TAM). Por outro lado, os interneurônios glutamatérgicos no MnPO quando recebem os *inputs* glutamatérgicos, são excitados. Dessa maneira, os neurônios sensíveis ao calor são ativados e conseqüentemente os mecanismos de produção e conservação de calor são iniciados (Morrison, 2016).

Nos animais endotérmicos existem mecanismos periféricos que auxiliam no aumento da temperatura corporal, especificamente após a liberação de noradrenalina e acetilcolina durante a resposta febril ou situações de estresse (frio intenso, por exemplo) (Evans, 2015; Cannon e Nedergaard, 2004). A noradrenalina induz a termogênese no TAM e a vasoconstrição periférica, já a acetilcolina é responsável por induzir o tremor muscular (Hasday *et al.*, 2014).

Os mecanismos de conservação e/ou produção de calor são de extrema importância para a termorregulação e também para a manutenção da resposta febril. Em

um ambiente com temperatura elevada, ocorre vasodilatação cutânea, aumentando o fluxo sanguíneo epitelial para que o calor metabólico fique mais próximo da superfície corporal, facilitando a transferência de calor corporal para o ambiente (Kregel *et al.*, 1988). Em uma situação contrária, onde a temperatura ambiente está baixa, ocorre a vasoconstrição. A vasoconstrição cutânea resulta na conservação de calor corporal, uma vez que o fluxo sanguíneo epitelial estará diminuído e conseqüentemente a transferência de calor para o ambiente será dificultada (Wallin *et al.*, 2007). Esse mecanismo de vasoconstrição também é importante para a conservação de calor durante a resposta febril.

Para a produção de calor, ocorre o tremor muscular e a termogênese induzida no TAM. O tremor muscular é reconhecido como um mecanismo essencial para a defesa ao frio em temperaturas baixas e no aumento da temperatura corporal durante a febre. O tremor muscular resulta na termogênese principalmente pela ineficiência da utilização de energia no ciclo de ponte cruzada entre os filamentos de actina e miosina e recaptação dos íons de cálcio. Em menor grau, o vazamento de prótons na membrana mitocondrial durante a produção de ATP também resultará na produção de calor pelo tremor (Palmer e Park, 1965; Saper e Breder, 1994).

A termogênese induzida pelo TAM também pode ser chamada de termogênese adaptativa, e é uma função metabólica específica do TAM. A produção de calor neste tecido ocorrerá pela atividade da proteína desacopladora 1 (UCP1), que irá desacoplar a cadeia de prótons na membrana mitocondrial, resultando na liberação de energia como calor (Cannon *et al.*, 2004). O TAM tem grande quantidade de receptores β 3 adrenérgicos e a estimulação desses receptores pela noradrenalina induz a transcrição gênica de UCP1 (Villaroya *et al.*, 2017). Outros mecanismos para a regulação de UCP1 podem ser a interação com ácidos graxos e/ou a sulfinilação (Fedorenko *et al.*, 2012;

Chouchani *et al.*, 2016). Dessa maneira, a ativação da termogênese pelo TAM também é uma resposta importante para a manutenção da resposta febril (Saper *et al.*, 2012).

1.2 A resposta febril

Ao longo da vida, grande parte dos indivíduos estará sujeita a episódios de doenças infecciosas agudas. Essas doenças podem ser causadas por diversos microrganismos e em diferentes locais de infecção. Apesar disso, os sinais e sintomas que ocorrem são bastante similares, incluem febre, hiperalgesia, perda de apetite e sonolência. Esse conjunto de sintomas é conhecido como síndrome de doença, e são uma resposta adaptativa do sistema nervoso central que tem a função de combater a infecção através de alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas (Saper *et al.*, 2012).

A febre terá um custo metabólico elevado para aumentar a temperatura corporal. No entanto, o aumento da temperatura observado durante a febre é importante para reduzir a proliferação bacteriana ou viral e para melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro, pela ativação e proliferação de linfócitos (revisado por Cannon, 2013). Isso pode ocorrer pela interferência da temperatura ou de substâncias produzidas durante a resposta febril, na incorporação de ferro pelas bactérias, no crescimento dos microrganismos e na replicação viral (Garibaldi, 1972; Pieracci and Barie, 2005; Chu *et al.*, 1982; Dalton *et al.*, 2006; Giesendorf *et al.*, 1986).

Por definição a resposta febril é o aumento controlado da temperatura corporal, que será ocasionado pela elevação do ponto de regulação da temperatura localizado no hipotálamo. Essa mudança é induzida por mediadores produzidos durante um processo infeccioso ou inflamatório (Kluger, 1991; Roth and De Souza, 2001).

Um dos principais modelos de indução de resposta febril em animais de laboratório, é a administração de lipopolissacarídeo (LPS) de parede celular de bactérias Gram negativas. O LPS irá atuar em receptores do tipo Toll 4 (TLR4) presentes em macrófagos e células dendríticas (Gay *et al.*, 2006) induzindo a síntese de citocinas. Quando se trata de resposta febril, essas citocinas são chamadas de pirógenos endógenos, e irão levar a mensagem do local de inflamação/infecção à POA/HA para indução de febre (Kluger, 1991). Dentre os pirógenos endógenos reconhecidos encontram-se as citocinas como interleucina (IL)-1 β , IL-1 α , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-8 (ou quimiocina CXCL8), o fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas (CINC ou quimiocina CXCL1), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α (ou quimiocina CCL3) e MIP-1 β (ou quimiocina CCL4), interferon β e γ , ligante do receptor-ativador de NF- κ B (RANKL) e fator de agregação plaquetária (PAF) (Bastos-Pereira *et al.*, 2014; Dinarello *et al.*, 1988; Hanada *et al.*, 2009; Kluger, 1991; Minano *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2008; Steiner and Romanovsky, 2015; Zamprônio *et al.*, 2015; Zamprônio *et al.*, 1994). Dentre estas, algumas como a CXCL8, CXCL1, CCL3 e RANKL parecem ser geradas diretamente no sistema nervoso central (Hanada *et al.*, 2009; Minano *et al.*, 1996; Zamprônio *et al.*, 1994) enquanto as outras podem ser geradas periféricamente.

A produção desses pirógenos irá levar a síntese de mediadores centrais como prostaglandinas E₂, D₂ e F_{2 α} (PGE₂ e PGF_{2 α}) (Coelho *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2009; Milton, 1989), fator liberador de corticotrofina (CRF) (Rothwell, 1989), opioides endógenos (Fraga *et al.*, 2008), substância P (SP) (Reis *et al.*, 2011), endotelina-1 (ET-1) (Fabricio *et al.*, 1998) e endocanabinóides endógenos (Fraga *et al.*, 2016). A síntese desses mediadores resultará em um reajuste do termostato hipotalâmico que passaria a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5-37°C.

As prostaglandinas são os mediadores mais estudados e importantes da resposta febril. São derivadas do ácido araquidônico e são formadas pela ação da ciclo-oxigenase (COX). A administração periférica de LPS induz a expressão de COX-2 no cérebro em células perivasculares e endoteliais ao longo de pequenas vênulas enquanto que a administração de IL-1 β induz a expressão de COX-2 principalmente em células perivasculares (Schiltz and Sawchenko, 2002). Outras enzimas também participam da formação de prostaglandinas, entre elas a PGE sintase 1 (mPGES₁) que forma PGE₂ e a lipocalina sintase PGD (L-PGDS) que forma PGD₂.

Embora existam evidências da participação de outras prostaglandinas na febre, as participações de PGE₂ e do receptor EP₃ parecem ter um papel chave na resposta febril (Engblom *et al.*, 2003; Lazarus *et al.*, 2007; Ushikubi *et al.*, 1998). Estudos anteriores reportaram que camundongos deficientes de mPGES-1, não apresentaram febre e síntese de PGE₂ após a administração de LPS (Engblom *et al.*, 2003). No entanto, estes animais apresentaram febre quando PGE₂ foi administrada diretamente no sistema nervoso central, demonstrando que a capacidade de produzir/conservar calor não estava alterada. Assim, a COX-2 e a mPGES-1 expressas em células endoteliais cerebrais são importantes para a indução de febre uma vez que camundongos com deleção seletiva destas enzimas nas células endoteliais cerebrais não apresentaram febre (Wilhelms *et al.*, 2014).

O receptor de PGE₂ envolvido no processo da resposta febril é o receptor EP₃. Este subtipo de receptor é expresso em grande quantidade no núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (Lazarus *et al.*, 2007), sendo esta a área do hipotálamo (dentro da POA/HA) mais sensível às ações pirogênicas da PGE₂ (Scammell *et al.*, 1996). Já foi reportado, que a deleção genética seletiva de receptores EP₃ no MnPO aboliu a resposta febril induzida por LPS e PGE₂ sugerindo que estes receptores são essenciais para a febre

(Lazarus *et al.*, 2007). Entretanto, PGE₂ formada periféricamente também pode adentrar o sistema nervoso central através do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), uma região desprovida de barreira hemato-encefálica e envolvida na geração de febre, particularmente na fase inicial da resposta febril (Simm *et al.*, 2016).

A temperatura corporal não aumenta indefinidamente após a síntese de prostaglandinas devido a presença de receptores TRPM₂ em uma subpopulação de neurônios hipotalâmicos que são ativados com o aumento da temperatura e previnem o superaquecimento (Song *et al.*, 2016). Estudos recentes sugerem que a PGE₂ é então removida dos tecidos cerebrais através de um transportador específico (PGT, do inglês *prostaglandin transporter*) para o fluido cérebro-espinhal para ser posteriormente metabolizada em outros órgãos como os pulmões (Hosotani *et al.*, 2015).

Os receptores EP₃ no MnPO são expressos em neurônios inibitórios gabaérgicos que inibem as vias descendentes responsáveis pelo aumento da temperatura corporal (Nakamura *et al.*, 2002). Os receptores α e γ EP₃ são acoplados à proteína Gi e, portanto, ao inibirem os neurônios gabaérgicos, promovem uma desinibição de vias descendentes que culminam na elevação da temperatura corporal (Nakamura, 2011). Estes neurônios gabaérgicos projetam-se para o hipotálamo dorso medial (DMH) e para rafe bulbar rostral (RMR). Estas áreas, quando ativadas, ou seja, desinibidas pela ligação da PGE₂ ao receptor EP₃, ativam respostas de produção de calor, como a ativação do TAM e o tremor muscular além de promover a ativação de mecanismos de conservação de calor, como a vasoconstrição cutânea (Saper *et al.*, 2012). A ativação desses mecanismos resulta na febre. A febre é importante para a ativação e proliferação de linfócitos. Além disso, a resposta febril é importante para a sinalização e para o acompanhamento evolutivo de doenças, que podem ser de origem infecciosa ou não (DeWitt *et al.*, 2017).

1.3 A resposta febril e o consumo de etanol

O uso do EtOH é um dos principais riscos à saúde mundial. É fator causal de mais de sessenta tipos de doenças e resulta em aproximadamente 2,5 milhões de mortes por ano. Entre as doenças onde o consumo de EtOH tem um componente importante estão as doenças infecciosas como, tuberculose, vírus humano da imunodeficiência e pneumonia. Independentemente de fatores sociais, o consumo pesado de EtOH está associado a uma maior suscetibilidade a doenças infecciosas (revisado por Rehm, 2011).

Usualmente o consumo de EtOH inicia-se na adolescência (entre 12-14 anos), devido a comportamentos característicos dessa fase da vida, como a busca por novidade e interação social. Os adolescentes têm uma resposta única ao etanol comparado a adultos, de maneira que são menos sensíveis as respostas motora-sedativas do etanol, o que contribui para o consumo de tipo *binge* e apagões (Crews *et al.*, 2016). No entanto, esse consumo aumenta progressivamente entre 18 e 21 anos, frequentemente adotando um padrão de *binge* (Masten *et al.*, 2009). O padrão de *binge* é o consumo intermitente de EtOH em altas doses e é também um fenômeno social com uma alta prevalência entre universitários (Courtney and Polich, 2010). De acordo com o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* dos Estados Unidos, o *binge* é um padrão de consumo que resulta em níveis sanguíneos de EtOH de 0,08 g/dl. Isto é tipicamente encontrado após quatro drinques para mulheres e cinco drinques para homens, em um período de duas horas. Essa quantidade é obviamente variável, pois é necessário levar em conta o teor alcoólico da bebida. No Brasil, 72% dos jovens universitários declararam que o álcool foi a substância mais consumida no último ano, e um terço declarou pelo menos um episódio de consumo em *binge* (SENAD, 2010). O consumo de EtOH em adolescentes é menos frequente do que em adultos, mas a quantidade consumida por

ocasião é consideravelmente maior, com um nível médio de consumo que preenche os critérios de *binge* ou episódio de consumo pesado (Windle, 2016). Refletindo este padrão de alto consumo, o consumo mundial de álcool em 2010 foi de 6,2 L de EtOH puro por pessoa na idade de 15 anos ou superior, o que se traduz em 13,5 g de EtOH puro por dia (W.H.O, 2014).

O consumo de EtOH na adolescência é importante porque este é um período crítico de vida, é quando interações complexas entre fatores genéticos e experiências ambientais remodelam certas áreas cerebrais para o amadurecimento neural (Fine and Sung, 2014). O consumo excessivo de EtOH durante este período leva a mudanças no córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo seguida de disfunção cognitiva e déficits emocionais e de memória (Fowler *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Pascual *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2014).

Além dessas mudanças no sistema nervoso central, o consumo de EtOH também pode alterar as respostas imunes inata e adaptativa (Goral *et al.*, 2008; Jimenez-Ortega *et al.*, 2011) e o padrão de consumo é um fator determinante para que estas mudanças sejam temporárias ou permanentes. Jimenez-Ortega e colaboradores (2011) demonstraram que o consumo intermitente de EtOH diminuiu as populações de linfócitos no linfonodo e no baço mais do que o consumo agudo ou crônico. A liberação de citocinas no sangue foi suprimida após a estimulação com LPS e fitohemaglutinina após a exposição aguda ao EtOH em humanos (Afshar *et al.*, 2015). Por outro lado, a ativação da micróglia e um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e TLR através da ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) foi verificada no cérebro de humanos, ratos e camundongos durante a exposição ao EtOH (Crews *et al.*, 2011). Além disso, a exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência induziu dano cerebral inflamatório caracterizado por níveis elevados de COX-2, NO sintase,

atividade da caspase 3 e morte celular por apoptose. Os animais expostos ao EtOH também apresentaram mudanças comportamentais tais como um desempenho prejudicado no teste de discriminação de objetos, desempenho motor, menor discriminação de objetos familiares e novos e piora na performance da tarefa de caminhar na plataforma (Pascual *et al.*, 2007).

Dessa maneira, estas alterações nos marcadores inflamatórios no sistema nervoso central associadas as mudanças comportamentais levantam a possibilidade de alterações também no processamento da resposta febril.

Estudos anteriores avaliaram os efeitos da exposição fetal ao EtOH. Yirmiya *et al.* (1993) demonstraram que uma dieta líquida de EtOH 5% oferecida às ratas a partir do dia gestacional 8 até o parto diminuiu a resposta febril induzida por LPS na prole adulta (60 dias de idade). O mesmo grupo reportou resultados similares após a administração i.p. de IL-1 β (Yirmiya *et al.*, 1996). Posteriormente, Taylor *et al.* (1999) demonstraram que ratos expostos ao EtOH no período fetal apresentaram menores níveis de IL-1 β no hipotálamo duas horas após o desafio e menor resposta febril, mas, apresentaram uma resposta febril normal após a injeção i.c.v. de PGE₂ (Taylor *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem uma redução na sinalização de IL-1 β ao centro termorregulatório no hipotálamo sem qualquer dano nos mecanismos efetores que controlam a resposta febril após a exposição ao EtOH no período fetal.

Taylor *et al.* (2002) estudaram a influência do EtOH na febre induzida por LPS ou IL-1 β em animais adultos. Os ratos adultos que foram alimentados com uma dieta líquida de EtOH 5% por 14 dias exibiram redução na resposta febril induzida por LPS ou IL-1 β quando administrados por via i.p. No entanto, essa resposta foi normal em ratos que receberam EtOH quando a IL-1 β foi administrada diretamente no sistema

nervoso central (i.c.v.). Estes dados sugerem que o consumo de EtOH de alguma forma interfere na resposta inflamatória ao LPS (Taylor *et al.*, 2002).

Estes prejuízos na resposta febril tanto após a exposição fetal como na vida adulta nos levaram a questionar se o padrão de consumo de EtOH na adolescência (*binge*) também levaria a alterações na resposta febril. Nosso grupo também observou que a exposição ao EtOH no modelo de *binge* na adolescência produziu uma redução na resposta febril induzida por LPS e IL-1 β nos animais 12 dias após a interrupção da exposição ao EtOH (Telles *et al.*, 2017). Estas alterações são similares às aquelas observadas por Yirmiya e colaboradores em animais expostos no período pré-natal (Yirmiya *et al.*, 1993; Yirmiya *et al.*, 1996).

Pascual e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento agudo com EtOH em camundongos adolescentes ativou a produção de citocinas por macrófagos enquanto o tratamento crônico reduziu a expressão de complexos principais de histocompatibilidade e a ativação de células T. Já a exposição *in vitro* de macrófagos ao EtOH reduziu a expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 e suprimiu a atividade do proteossoma levando a supressão da apresentação de antígenos por complexos de histocompatibilidade principal de classe I (D'Souza *et al.*, 2013; Muralidharan *et al.*, 2014). Nestes estudos, a exposição ao EtOH foi feita por um curto período e as mudanças também duraram por pouco tempo. Telles e colaboradores (Telles *et al.*, 2017) demonstraram que os níveis plasmáticos de IL-1 β após a administração i.p. de LPS não foram diferentes entre animais expostos e não expostos ao EtOH durante a adolescência, confirmando que estes macrófagos são funcionalmente similares. Portanto, o intervalo de 12 dias, utilizado por Telles *et al.*, entre a última exposição ao EtOH e a administração de LPS parece ser suficiente para restaurar a funcionalidade dos macrófagos.

Assim, até o momento tem se observado que o consumo de EtOH em diferentes fases da vida e em diferentes modelos de exposição, é capaz de prejudicar a resposta febril. Os trabalhos de Yirmiya e colaboradores (1993, 1996) e de Taylor e colaboradores (1999, 2002) citados anteriormente já demonstraram este prejuízo da resposta febril tanto quando da exposição fetal quanto em animais adultos. No entanto, com relação a exposição durante a adolescência, somente o estudo do nosso grupo de Telles e colaboradores (2017) demonstrou que, na adolescência, o consumo de EtOH causa um prejuízo nesta resposta. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão completamente esclarecidos.

Conforme destacado anteriormente, a resposta febril é um importante mecanismo de defesa contra infecções. Já foi reportado que o consumo de etanol é capaz de suprimir a resposta imune humoral, podendo causar infecções oportunistas (Moreno et al., 2018). Além disso, pessoas que fazem uso crônico de etanol apresentam menor comprometimento com o tratamento de doenças infecciosas (Amirkhanian et al., 2019; Elliot et al., 2018). Portanto, um prejuízo na resposta febril pode ser determinante para um maior risco à infecções em qualquer fase da vida.

Dessa maneira, neste trabalho iremos propor um provável mecanismo pelo qual o consumo de EtOH particularmente na adolescência, fase da vida onde o consumo é excessivo e os estudos são mais escassos, prejudica a resposta febril observada mesmo após a interrupção da exposição. Para caracterizar melhor o estilo de exposição nesta fase da vida, os animais serão expostos ao EtOH em um modelo de *binge* (exposição intermitente).

2. Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar se o prejuízo na resposta febril, após exposição ao EtOH durante a adolescência, é consequência de alterações nos mecanismos de produção de calor.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a resposta febril induzida por LPS e PGE₂ no início da vida adulta, após exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência;
- Avaliar mudanças na termogênese adaptativa no início da vida adulta, após exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência;
- Avaliar alterações no peso, funcionalidade e morfologia do TAM após exposição ao EtOH durante a adolescência.
- Propor um provável mecanismo de ação pelo qual a exposição ao EtOH durante a adolescência é capaz de prejudicar a resposta febril.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos recém-desmamados. Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h da manhã) e temperatura controlada (22 ± 2 °C) com livre acesso à água e ração comercial. Todos os protocolos foram submetidos ao Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e aprovados sob o número 1120.

3.2 Drogas

Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (0111: B4) e prostaglandina E₂ foram adquiridos da Sigma Chemical & Co. (St. Louis, MO, EUA). A cetamina e xilazina foram adquiridas da Syntec Laboratory (Santana da Parnaíba, SP, Brasil). A oxitetraciclina foi adquirida nos Laboratórios Pfizer (São Paulo, SP, Brasil). O cetoprofeno adquirido da Sanofi-Aventis (São Paulo, SP, Brasil) e a lidocaína, da Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil). O etanol foi adquirido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

3.3 Modelo de exposição ao etanol

A Figura 1 mostra de maneira esquemática os procedimentos realizados nos animais, incluindo a exposição ao EtOH, que serão descritos a seguir. Foram administradas doses de 3g/kg de EtOH (25% p/v em solução salina, intraperitoneal) aos ratos no dia pós-natal 25 (PND25, grupo pré-tratado com EtOH) ou solução salina em volume equivalente (grupo controle). Nos dias 26, 29, 30, 33, 34, 37 e 38 os animais

receberam o mesmo tratamento. Esse padrão foi escolhido com base em Lerma-Cabrera (2013) e Forbes *et al.* (2013) por simular um padrão de intoxicação aguda (*Binge*) comum durante a adolescência (Forbes *et al.*, 2013; Lerma-Cabrera *et al.*, 2013). Os experimentos de febre foram realizados 12 dias após a última administração de EtOH ou salina. No dia anterior ao experimento, os animais expostos ao EtOH receberam uma dose adicional de EtOH por via oral (3g/kg) conforme descrito pelos mesmos autores. Estudos prévios demonstraram que esta dose aguda de EtOH *per se* não altera a resposta febril observada no dia seguinte (Telles *et al.*, 2017). Os animais foram pesados antes de cada rodada de injeções para que o volume de EtOH ou salina fosse calculado. A comparação entre os pesos dos animais foi feita nos PND 38 (último dia após a administração intermitente de EtOH), PND 45 (dia da cirurgia de implante de cânula i.c.v e/ou de registrador de temperatura) e PND 51 (dia da injeção de LPS).

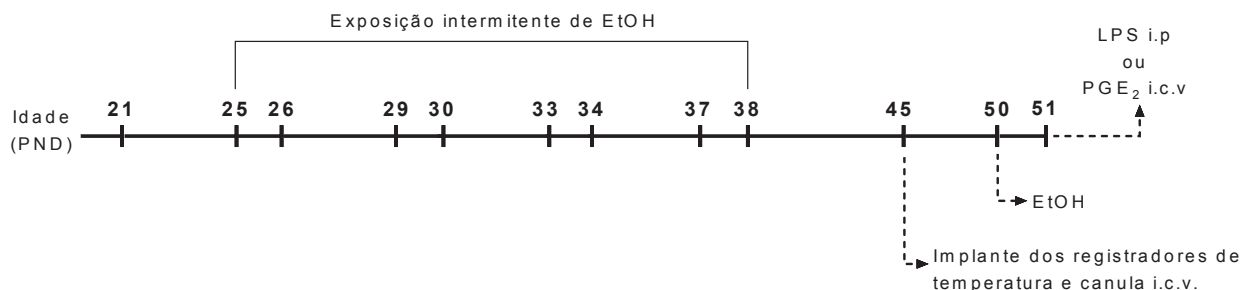


Fig.1: Representação esquemática da exposição ao EtOH no modelo de *binge*. Os animais receberam 3g/kg de EtOH nos dias pós-natais (PND) indicados. Os registradores de temperatura foram implantados e quando necessário, uma cânula intracerebroventricular foi implantada para realizar as injeções i.c.v. No PND 50, os animais receberam uma dose adicional de EtOH por via oral e os experimentos foram realizados no PND 51.

3.4 Procedimentos cirúrgicos

Implante dos registradores remotos de temperatura: Animais expostos ao EtOH ou animais controles, foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, ip) e receberam transmissores remotos para medida de temperatura corporal (Subcue Dataloggers, Calgary, Canadá) conforme descrito anteriormente por Reis *et al.* (2011). Para tanto, após laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediada, transmissores remotos de temperatura previamente programados foram implantados na cavidade peritoneal e a cavidade suturada. Este procedimento ocorreu uma semana (PND45) antes dos experimentos (Fig. 1).

Implante de cânula intracerebroventricular: Sob a mesma anestesia descrita acima, uma cânula permanente (0.8 mm de diâmetro externo, 14 mm de comprimento) de aço inoxidável foi implantada estereotaxicamente no ventrículo lateral de acordo com as seguintes coordenadas: 1,6 mm lateral à linha média, 1,5 mm posterior ao bregma, e 2,5 mm sob a superfície do cérebro, com a barra incisal à 3,3 mm abaixo do zero horizontal (Paxinos e Watson, 1998). Este procedimento ocorreu 1 semana (PND45) antes dos experimentos. Após qualquer procedimento cirúrgico os animais receberam 400 mg/kg de terramicina por via s.c. e 10 mg/kg, i.p. de cetoprofeno (analgésico, no dia da cirurgia e no dia seguinte).

3.5 Avaliação da resposta febril após a exposição ao etanol

Os animais controle e expostos ao EtOH foram aclimatados à temperatura de 28°C (termoneutralidade para ratos) (Gordon, 1990) no dia anterior ao experimento e permaneceram nesta temperatura até o final do experimento. Os registradores remotos foram programados para iniciar a medida da temperatura corporal dos animais às 7 h da manhã e estas foram feitas a cada 15 min. Entre 9 e 11 h da manhã, os animais expostos ao EtOH ou salina receberam então os estímulos pirogênicos: LPS (*E. coli*, 0111:B4, 50

$\mu\text{g/kg}$, i.p) ou PGE_2 (250 ng, i.c.v., 2 μl). Animais controle de ambos os grupos (salina e EtOH) receberam somente salina. A temperatura corporal dos animais continuou sendo registrada pelos aparatos implantados no peritônio, a cada 15 min por 6 h para o LPS e por 2 h para a PGE_2 . Estudos anteriores demonstraram que a dose administrada de LPS e PGE_2 foi capaz de induzir febre nos tempos escolhidos (Telles *et al.*, 2017, Brito *et al.*, 2016). Ao final do experimento os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina conforme descrito acima. Os animais foram mortos por deslocamento cervical. O posicionamento correto das cânulas no ventrículo lateral foi verificado através da injeção de azul de Evans no sítio e avaliação macroscópica dos cortes cerebrais. Animais que apresentaram bloqueio da cânula durante a injeção, posicionamento irregular das cânulas ou temperaturas basais abaixo de $36,7^\circ\text{C}$ ou acima de $37,4^\circ\text{C}$ foram excluídos do estudo.

3.6 Coleta de TAM

Os animais foram eutanasiados com isoflurano. Foi realizado um corte na região dorsal dos animais e em seguida todo o tecido adiposo da região intraescapular foi coletado e o tecido adiposo marrom foi isolado. O TAM de cada animal foi pesado, e também foi realizado o cálculo para a massa relativa de TAM (massa de TAM : peso corporal) (Blaner *et al.*, 2017).

3.7 Desafio ao frio

Para avaliar os mecanismos periféricos envolvidos na resposta febril, os animais de ambos os grupos foram submetidos ao experimento de desafio ao frio. Durante esse experimento os animais foram expostos a temperaturas de 15°C ou 5°C enquanto que os animais controle foram mantidos a 28°C . Em todas as temperaturas ambientes, os

registradores remotos de temperatura estavam programados para medir a temperatura corporal dos animais a cada 15 minutos e essas medidas foram realizadas em um intervalo de tempo de 6 horas. No desafio ao frio a 5°C, os animais foram mantidos sob essa temperatura por apenas 4 h, mas, os registradores continuaram na cavidade abdominal dos animais após o retorno a 28°C, até finalizar o tempo de 6 horas. Essa medida foi tomada a fim de diminuir o sofrimento animal e para avaliar a recuperação da temperatura corporal dos animais (adaptado de Kohlgruber et al., 2018).

3.8 Isolamento de mitocôndrias do TAM

O TAM foi coletado da região intraescapular de animais dos grupos salina e expostos ao EtOH no PND 51. Para tanto os animais foram anestesiados por inalação excessiva de isoflurano, foi feito um corte de aproximadamente 4 cm na região interescapular dos animais e o tecido foi isolado, sendo retirado o máximo de tecido adiposo branco. O tecido foi pesado e em seguida foi lavado em tampão de isolamento gelado contendo 250 mM de sacarose e 5 mM de Tris HCl, pH 7,2 e utilizado para a separação das mitocôndrias. O peso do TAM de animais expostos ou não ao EtOH foi comparado e a massa relativa de TAM em relação ao peso corporal dos animais também foi avaliada.

O isolamento das mitocôndrias do TAM foi feito de acordo com Cannon e Nedergaard (2008). Para tanto, o tecido foi triturado em pedaços pequenos com tesouras apropriadas, lavado e homogeneizado no tampão de isolamento. Durante o processo de isolamento os tecidos foram mantidos a temperatura de 0-2°C. O tecido foi então homogeneizado em um homogeneizador van Potter-Elvehjem. O isolamento das mitocôndrias foi feito por centrifugação diferencial. Inicialmente os homogenizados foram centrifugados a 8500 g por 10 min a 2°C. O sobrenadante resultando, contendo a

porção lipídica foi descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de isolamento contendo 250mM de sacarose e o homogenato centrifugado a 700 g por mais 10 min. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi centrifugado novamente a 8500g durante 10 min. Novamente, o *pellet* contendo as mitocôndrias foi ressuspensionado em tampão de isolamento contendo, 100 mM KCl, 20 mM Tris e 0,2 % de albumina sérica bovina, pH 7,2. O *pellet* resultante foi ressuspensionado mais uma vez em um volume menor desse mesmo tampão. A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo ensaio de Bradford (1976), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

3.9 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido por respirometria de alta resolução (Oroboros Oxigraph-O2 K, Oroboros Instruments, Innsbruck - Áustria). As mitocôndrias (0,075 µg/mL) foram incubadas em tampão contendo 100 mM KCl, 20 mM Tris, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂·7H₂O, 1 mM EDTA e 0,05% albumina sérica bovina, pH 7,2 a 37°C. A atividade respiratória foi medida na presença de Piruvato (2,5 mM) e Malato (1 mM) que são substratos para o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Wang *et al.*, 2019) bem como na presença de ATP (4 mM) que é um nucleotídeo de purina inibidor das proteínas desacopladoras mitocondriais (Macher *et al.*, 2018). O consumo máximo de oxigênio foi avaliado pela adição de carbonil cianeto de 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 1 mM) que é um potente desacoplador inespecífico da fosforilação oxidativa mitocondrial (Shabalina *et al.*, 2014). O consumo de oxigênio foi avaliado como a porcentagem do fluxo de oxigênio por massa, e a atividade da UCP foi calculada pela variação no consumo de oxigênio mitocondrial pela adição de piruvato e malato e após a adição de ATP.

3.10 Histologia do TAM

O TAM intraescapular foi coletado e fixado por aproximadamente 24 horas em formalina 10% e mantido em álcool 70% até o processamento da amostra.

As lâminas contendo os cortes de TAM foram preparadas manualmente pelo Centro Técnico Histopatológico de Curitiba, em seguida o tecido foi corado com Hematoxilina e Eosina. As imagens para análise foram obtidas pelo *scanner* de lâminas Zeiss (Carl Zeiss AG, Oberkochen – Alemanha). As imagens foram analisadas pelos programas VSViewer e imageJ. Foram captadas 10 imagens de campos diferentes de cada lâmina e avaliados o número de núcleos celulares, o número de gotículas (*droplets*) de lipídeos e o tamanho médio das gotículas.

3.11 Análise estatística

Os resultados obtidos para resposta febril e desafio ao frio foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguida por teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O consumo de oxigênio foi avaliado por ANOVA de uma via e Bonferroni *post-hoc*. Nos demais experimentos foi utilizado o teste t de Student. Em todos os casos o nível de significância adotado foi $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Diferenças no peso corporal de ratos expostos ao EtOH

É comum observar diferenças no tamanho e peso de animais tratados com EtOH no modelo de *binge* durante a adolescência. No presente estudo foi possível observar que animais expostos ao EtOH durante a adolescência tiveram uma redução do peso corporal quando comparados aos animais que receberam salina. Essa diferença pode ser observada desde o PND 38 (fig. 2 A), o qual é o último dia do tratamento com EtOH. No PND 45 essa diferença ainda é evidente, sendo este o dia onde ocorreram as cirurgias (fig. 2 B), e essa diferença no peso corporal dos animais ainda foi também significativa no PND 51 (fig. 2 C), 12 dias após a última injeção de EtOH e quando foram feitas todas as avaliações subsequentes.

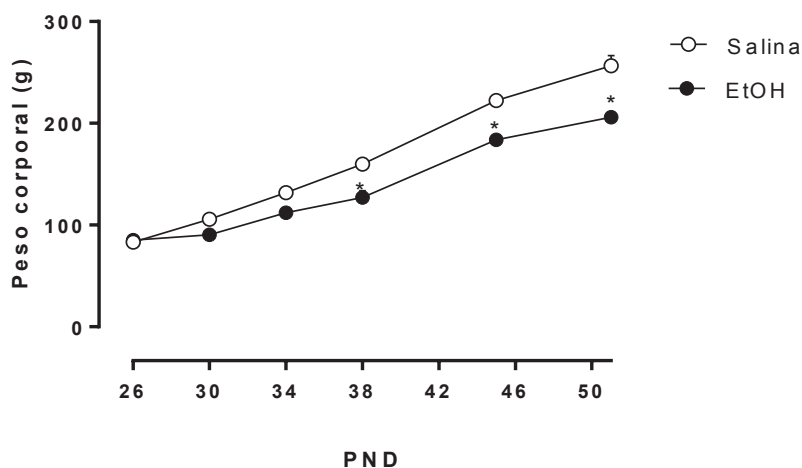


Fig. 2: Efeito do consumo intermitente de EtOH durante a adolescência no peso corporal. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina, como descrito previamente. O peso corporal (g) foi determinado antes de cada rodada de injeções nos dias pós-natal (PND) 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 45 e 51. Dados expressos como média \pm e.p.m (n=6-7). *Diferente do grupo salina, $p < 0,05$. Analisado por ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni post-hoc.

4.2 Temperatura basal

Para avaliar se a exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência poderia causar alguma alteração nos valores da temperatura corporal basal dos animais, nós avaliamos a temperatura corporal previamente a exposição aos pirogenos. Observamos que a administração intermitente de EtOH durante a adolescência, não foi capaz de alterar a temperatura basal dos animais no início da vida adulta quando comparado aos animais que receberam salina (fig. 3).

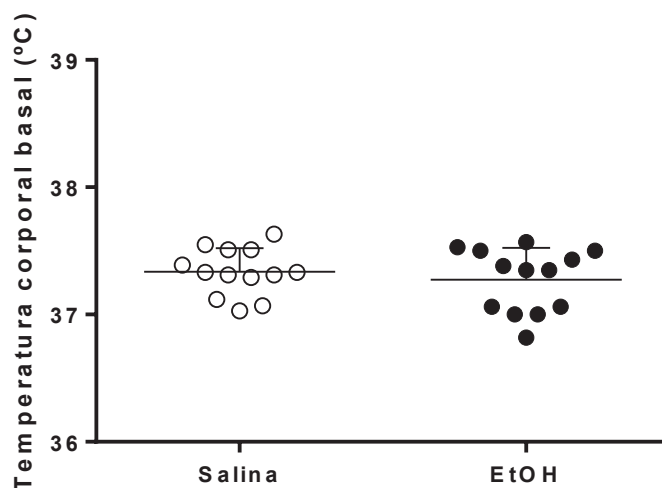


Fig. 3: Temperatura corporal basal de animais expostos a salina ou EtOH durante a adolescência.

Os animais foram expostos ao EtOH durante a adolescência enquanto que animais controles receberam salina conforme descrito anteriormente. A temperatura corporal foi avaliada 12 dias após a última exposição. Dados apresentam a média \pm e.p.m (n=13) da temperatura corporal (°C) antes de qualquer tratamento com pirógenos. Analisado por teste t não pareado.

4.3 Efeito do consumo de EtOH durante a adolescência na febre induzida por LPS

Após administração i.p de salina não houve nenhuma alteração significativa na temperatura corporal de animais expostos a salina ou EtOH durante a adolescência. Mas, como esperado, após injeção i.p de LPS a temperatura corporal dos animais previamente expostos à salina aumentou, esse aumento da temperatura corporal se deu a

partir da segunda hora após a injeção e durou até a sexta hora. Nos animais que receberam o EtOH de maneira intermitente na adolescência, a administração de LPS não foi capaz de causar mudanças significativas na temperatura corporal (fig.4).

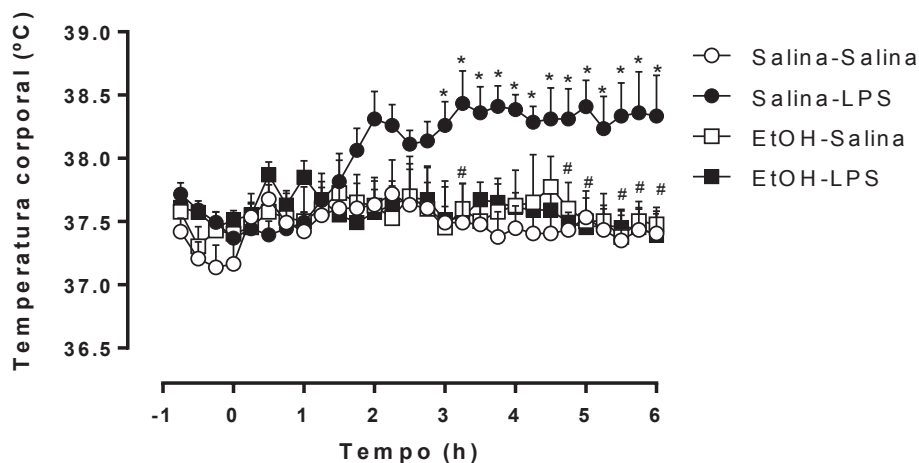


Fig. 4: Efeito do consumo intermitente de EtOH na adolescência na febre induzida por LPS. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina durante a adolescência, como descrito anteriormente e no PND 51 receberam uma injeção de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg/kg) ou veículo (salina) por via intraperitoneal. Dados expressos como média ± e.p.m da temperatura corporal (°C) durante 6 h (n=4-7). *p<0,05, diferente do respectivo grupo controle (salina). #p<0,05, diferente do grupo Salina-LPS. Analisado por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido de Bonferroni *post-hoc*.

4.4 Efeito da exposição ao EtOH durante a adolescência na febre induzida por PGE₂

A injeção i.c.v de salina em ambos os grupo não causou nenhuma alteração na temperatura corporal. Os animais que receberam salina na adolescência e no PND 51 receberam PGE₂ por via i.c.v. tiveram um aumento significativo da temperatura corporal de aproximadamente 0,7 °C, trinta minutos após a injeção. No entanto, os animais

expostos ao EtOH na adolescência e que receberam PGE₂ apresentaram um aumento de apenas 0,3 graus na temperatura corporal no mesmo tempo (fig.5).

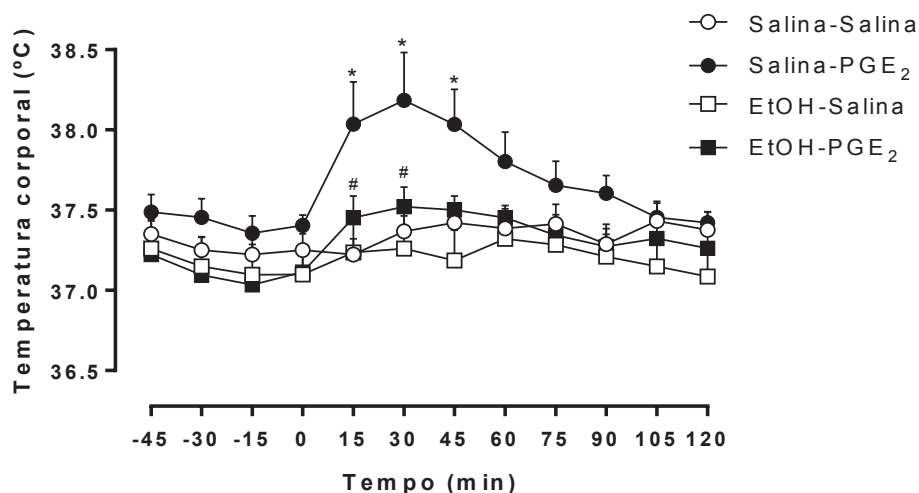


Fig. 5: Efeito da exposição intermitente de EtOH durante a adolescência na resposta febril induzida por PGE₂. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina durante a adolescência, como descrito anteriormente e no PND 51 receberam uma injeção i.c.v de prostaglandina E₂ (PGE₂, 250 ng) ou veículo (salina). Dados expressos como média ± e.p.m da temperatura corporal (°C) durante 2 horas (n=6-11). *p<0,05, diferente do respectivo grupo controle (salina). #p<0,05, diferente do grupo Salina-PGE₂. Analisado por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido de Bonferroni *post-hoc*.

4.5 Massa de tecido adiposo marrom em animais expostos a salina ou EtOH

Com os resultados da resposta febril induzida por PGE₂, onde a febre foi atenuada pelo consumo de EtOH na adolescência, a hipótese que surgiu foi que a exposição intermitente de EtOH na adolescência poderia estar alterando os mecanismos descendentes de produção de calor ativados por este eicosanóide. Para avaliar essa possibilidade, o TAM intraescapular foi coletado e pesado e foi calculada a razão de massa de TAM:peso corporal dos animais de ambos os grupos.

Foi possível observar a diferença da massa de TAM entre os grupos logo após a coleta (fig. 6 A, B). Os animais expostos ao EtOH apresentaram uma massa de TAM significativamente menor em relação aos animais salina (fig. 6 C). Quando a massa do TAM foi expressa pela razão entre a massa de TAM:peso corporal, também observamos que a administração intermitente de EtOH na adolescência produziu uma diminuição significativa desta razão (fig. 6 D).

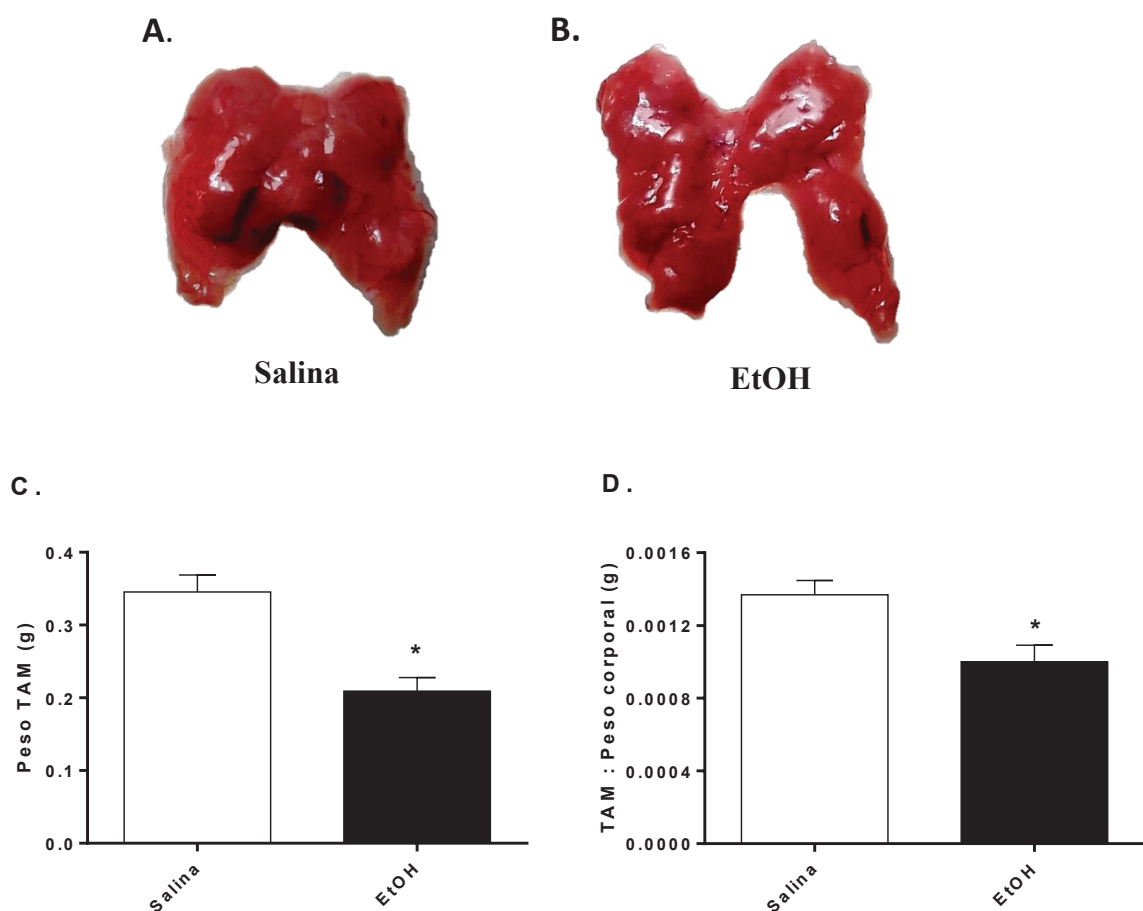


Fig. 6: Efeito da exposição intermitente de EtOH na adolescência na massa de tecido adiposo marrom. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina durante a adolescência, como descrito anteriormente e no PND 51 foi coletado o tecido adiposo marrom (TAM) dos animais de ambos os grupos. Uma amostra de TAM retirado dos animais salina (A) e EtOH (B) é mostrado. Massa do TAM

(C) e a razão TAM:peso corporal (D) de animais que receberam salina ou EtOH. Dados expressos como média \pm e.p.m (n=14-13). *p<0,05, diferente do grupo salina. Analisado por teste t não pareado.

4.6 Efeito do EtOH na termogênese adaptativa

A termogênese adaptativa é uma função metabólica específica do TAM, assim, para avaliar se a diminuição na massa de TAM seria suficiente para interferir nos mecanismos de defesa ao frio (produção de calor), os animais de ambos os grupos foram submetidos ao desafio ao frio em três temperaturas ambientes distintas: 28°C (zona de termoneutralidade para comparação), 15°C e 5°C.

Na temperatura ambiente de 28°C nenhuma diferença na temperatura corporal de animais de ambos os grupos foi encontrada (fig. 7A). De maneira similar, na temperatura ambiente de 15°C os animais também não apresentaram diferenças significativas quando comparados (fig. 7B). No entanto, quando os animais foram expostos a temperatura de 5°C, os animais que foram previamente expostos a salina conseguiram manter uma temperatura homeostática, enquanto os animais que receberam EtOH na adolescência tiveram uma diminuição significativa na temperatura corporal, não conseguindo manter uma temperatura adequada e passaram para um estado de hipotermia. Quando comparada a diminuição da temperatura corporal dos animais do grupo salina e do grupo EtOH a 5°C, foi possível perceber uma diferença de 1,1°C na segunda hora e meia após a exposição ao frio (fig. 7 C). É importante enfatizar que nesse experimento, diferente dos anteriores, os animais foram expostos a 5°C apenas durante 4 h, para minimizar o sofrimento animal. Ambos os grupos retornaram para a temperatura de 28°C após o desafio ao frio para se recuperarem, e inclusive os animais do grupo EtOH foram capazes de retornar ao estado homeotérmico.

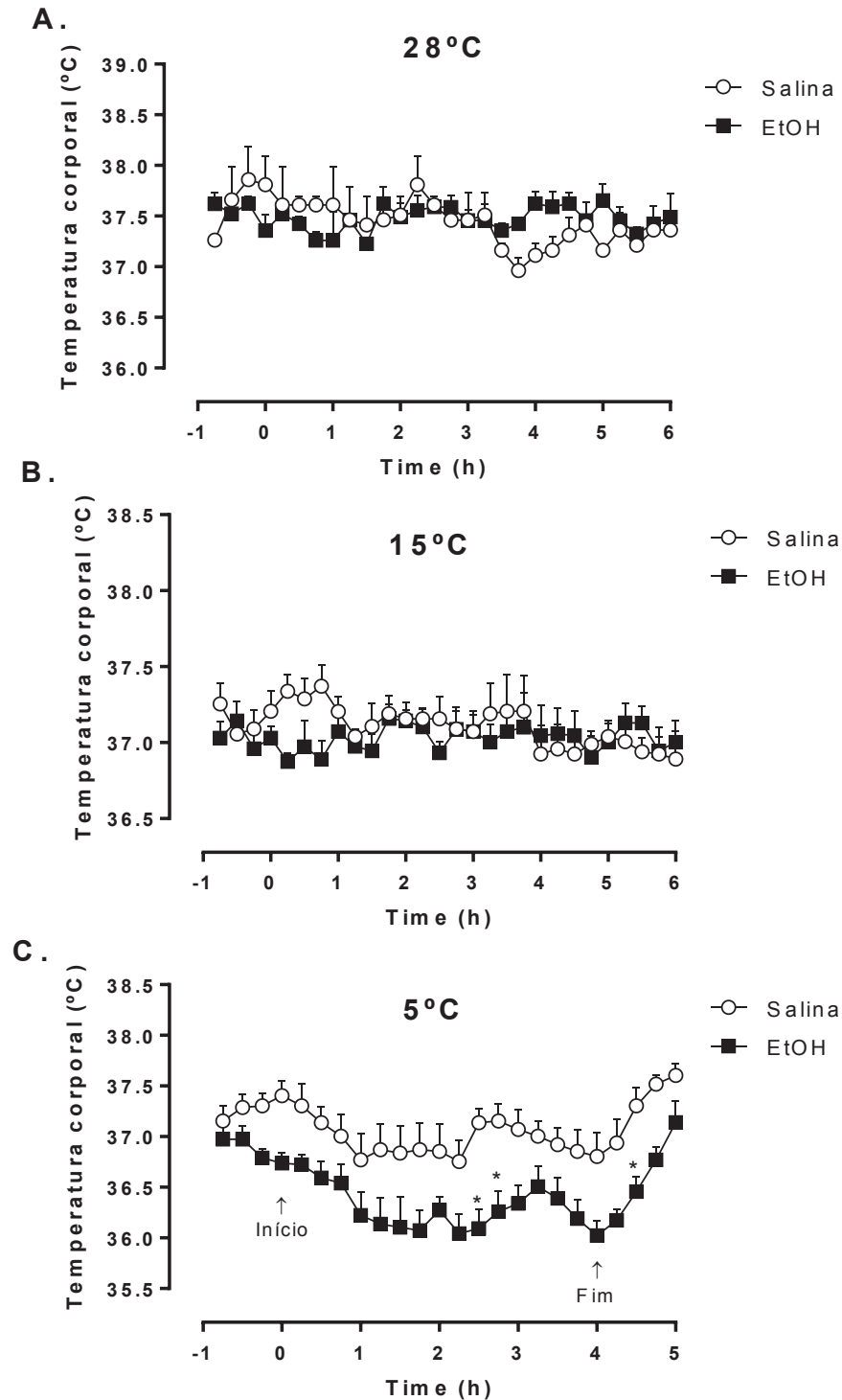


Fig. 7: Desafio ao frio após exposição intermitente ao EtOH na adolescência. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina durante a adolescência, como descrito previamente. No PND 49 ou 51, a temperatura corporal dos animais do grupo salina e EtOH foi medida na zona termoneutra (28°C, A), na temperatura ambiente de 15°C (B) ou na temperatura ambiente de 5°C (C) pelos tempos indicados. O início e o fim da exposição ao frio na temperatura de 5°C são mostrados (C). Dados expressos como

média \pm e.p.m da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$, $n=6-10$). $*P<0,05$, diferente do grupo salina. Analisado por ANOVA de medidas repetidas, seguido por Bonferroni *post-hoc*.

4.7 Consumo de oxigênio pelo TAM de animais expostos a salina ou EtOH

Além da massa do TAM procuramos também avaliar a funcionalidade deste tecido. Para tanto, avaliamos a atividade mitocondrial desse tecido por respirometria de alta resolução.

Assim, após o isolamento de mitocôndrias do tecido, foi possível observar que os animais que receberam EtOH na adolescência obtiveram menor consumo de oxigênio após a adição dos substratos para o complexo I da cadeia respiratória piruvato e malato, quando comparados com os animais que receberam salina (fig. 8A). Da mesma forma, a adição do inibidor de UCP, ATP apresentou um consumo de oxigênio menor em animais expostos ao EtOH na adolescência. Já a adição de um desacoplador inespecífico da cadeia respiratória mitocondrial, o FCCP, não apresentou diferença significativa em mitocôndrias provenientes de animais expostos ao EtOH em relação aos animais salina.

A atividade da UCP, calculada pela variação no consumo de oxigênio mitocondrial quando da adição de piruvato e malato e após a adição de ATP, demonstrou que os animais do grupo EtOH apresentam atividade de UCP diminuída em relação aos animais do grupo salina (fig. 8B).

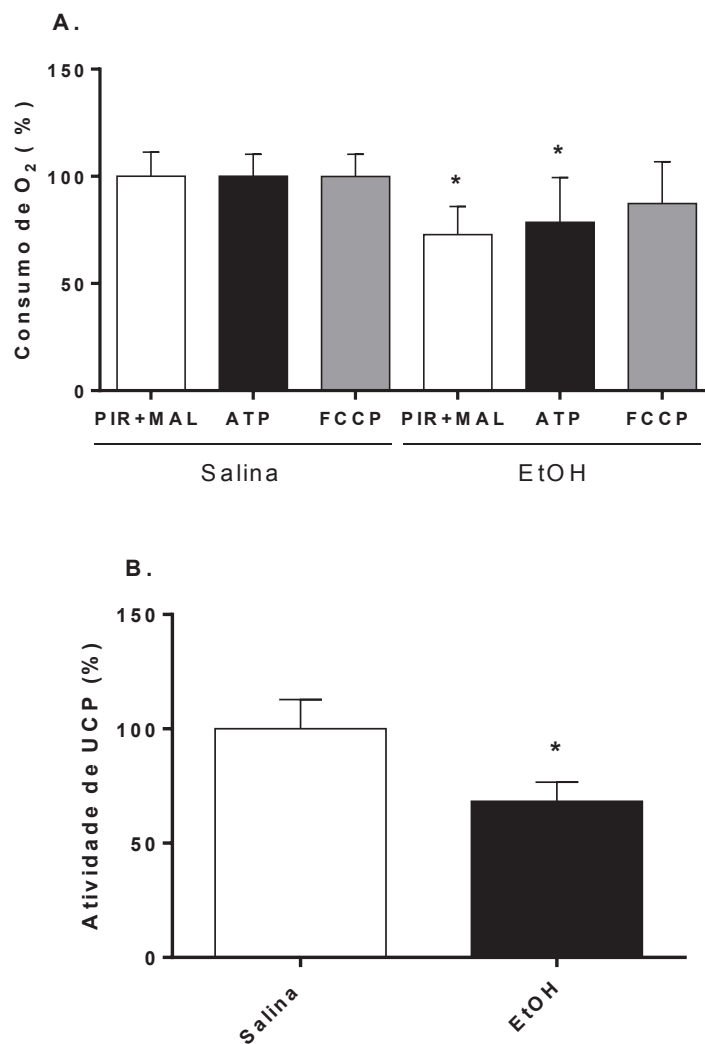


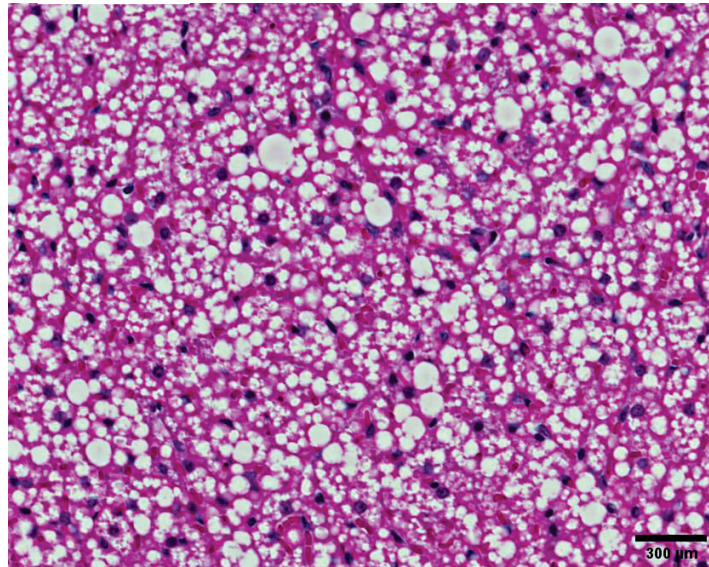
Fig. 8: Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias provenientes do TAM e atividade da UCP mitocondrial após exposição ao EtOH. Os animais foram expostos ao EtOH ou salina durante a adolescência, como descrito anteriormente. No PND 51, foi realizada a coleta de TAM. As mitocôndrias do tecido foram isoladas e analisadas por respirometria de alta resolução. Foi avaliado o consumo de oxigênio (A) e a atividade de UCP (B) (n=15). Dados expressos como média \pm e.p.m. Analisado por ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni *post-hoc* (A) e teste t de Student não pareado (B). *P<0,05, diferente do grupo salina.

4.8 Histologia do TAM em animais expostos a salina ou EtOH

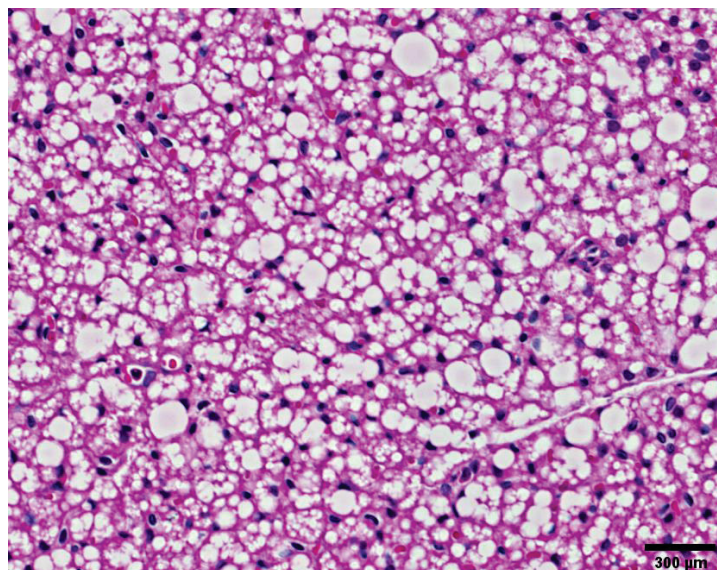
A análise histológica do TAM foi realizada para verificar se a exposição ao EtOH durante a adolescência é capaz de, além de alterar a funcionalidade do tecido, causar alterações na sua morfologia. Após comparar as lâminas histológicas dos animais

de ambos os grupos, observamos que o consumo intermitente de EtOH não foi capaz de causar alterações evidentes na morfologia geral do TAM (fig. 9 A-B). Com relação aos aspectos quantitativos da análise morfológica, o número de núcleos celulares por campo, a quantidade de gotículas de lipídeo presentes no tecido bem como o tamanho médio dessas gotículas de lipídeo também não foi diferente quando os grupos foram comparados (fig. 9 C-E, respectivamente).

A. Salina



B. EtOH



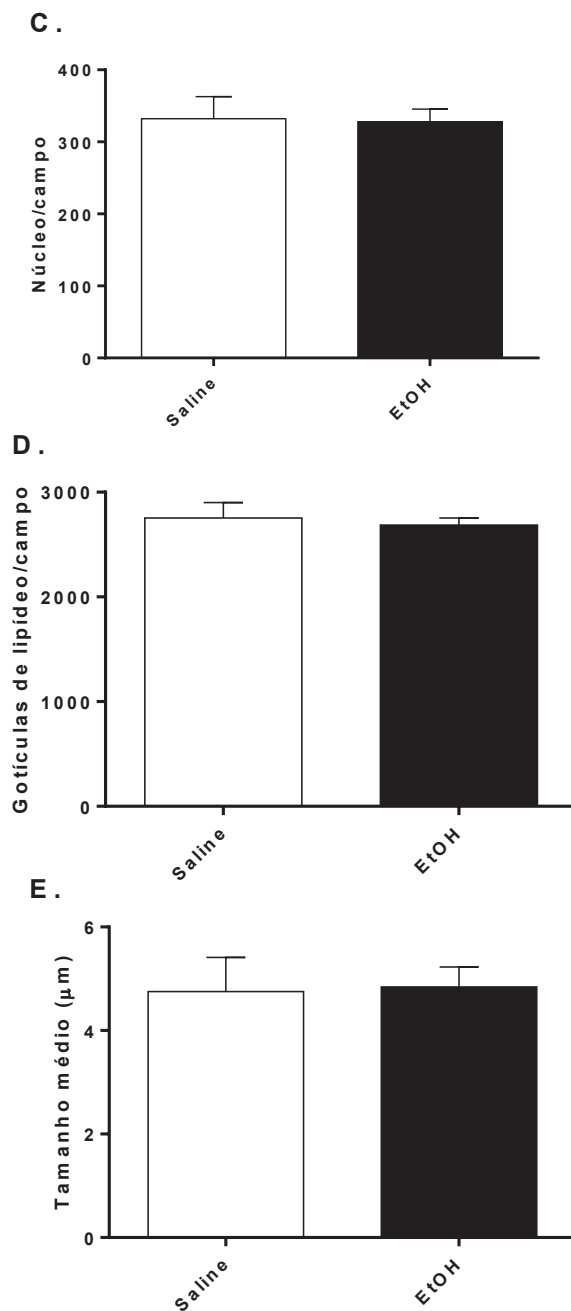


Fig. 9: Histologia do TAM de animais expostos ao EtOH ou salina. Os animais que foram previamente expostos ao EtOH ou salina, foram eutanasiados e o TAM dos animais de ambos os grupos foram coletados. Lâmina histológica representativa do grupo salina (A) e do grupo EtOH (B). Avaliação da quantidade núcleos celulares por campo (C), quantidade de gotículas de lipídeo por campo (D) e o tamanho médio das gotículas de lipídeo (E). Foram analisados 10 campos diferentes por lâmina ($n=4-6$). Dados expressos como média \pm e.p.m. Analisado por teste t não pareado.

5. Discussão

Nesse trabalho foi demonstrado que o consumo de EtOH durante a adolescência no padrão de consumo tipo *binge*, é capaz de abolir a resposta febril induzida por LPS e atenuar a febre induzida por PGE₂. Também reportamos que esse consumo é capaz de diminuir a massa de tecido adiposo marrom bem como sua funcionalidade diminuindo a atividade da UCP. Apesar de não alterar a temperatura corporal dos animais em ambiente termoneutro, quando os animais são expostos à baixa temperatura é possível perceber que seus mecanismos de defesa ao frio estão prejudicados.

Como esperado, o peso corporal dos ratos aumenta de maneira proporcional com a idade. Previamente, Nelson *et al.* (2016) realizou um estudo comparando diversos modelos de exposição ao EtOH, bem como vias de administração. Nesse estudo foi reportado que ratos expostos ao EtOH (3g/kg) por injeção i.p apresentaram redução do consumo de comida, menor preferência por dietas ricas em gordura, e também composição de gordura visceral e peso corporal diminuídos, quando comparados a outros modelos de intoxicação por EtOH. No presente estudo nós demonstramos que o consumo intermitente de EtOH durante a adolescência, prejudicou o crescimento que geralmente ocorre nessa fase da vida dos animais. Apesar desses animais expostos ao EtOH receberem mais calorias, ainda apresentam peso corporal menor em relação aos animais que receberam salina. Ainda, os animais expostos ao EtOH não são capazes de recuperar o peso, mesmo após doze dias do término da exposição ao EtOH. Em um estudo recente, Matthews e Mittleman (2017) compararam o ganho de peso corporal em ratos envelhecidos, adultos e adolescentes após administração crônica de EtOH. Foi observado que enquanto os ratos adolescentes continuaram a ganhar peso, os adultos e envelhecidos tiveram seu peso corporal diminuído em aproximadamente 20% (Matthews e Mittleman, 2017). O estudo de Matthews e Mittleman não permite

comparação entre os animais expostos a salina ou EtOH, uma vez que os animais do grupo salina receberam uma ração diferenciada, para que recebessem a mesma quantidade de calorias. É plausível que animais adolescentes ganhem mais peso do que os adultos e envelhecidos, estando ou não expostos ao EtOH, uma vez que estes animais estão em fase de crescimento. Em nosso estudo, percebemos que os animais expostos ao EtOH durante a adolescência continuam a ganhar peso após a exposição intermitente, porém esse ganho de peso não se iguala ao ganho de peso dos animais que receberam salina. Outros fatores a serem considerados nesse resultado, são a ataxia e “ressaca” causadas pelo EtOH, podendo diminuir o comportamento de alimentação desses ratos.

No presente trabalho apresentamos que a exposição ao EtOH durante a adolescência no modelo de *binge* não altera a temperatura corporal basal. Esse resultado confirma dados anteriores do nosso grupo, onde reportamos que o ritmo circadiano de variação da temperatura corporal do animal não está alterado após exposição ao EtOH (Telles *et al.* 2017). No entanto, Taylor *et al.* (2002) reportou que após 14 dias de exposição ao EtOH, ratos adultos exibiram alteração no ritmo circadiano da temperatura corporal, particularmente durante o ciclo escuro. Acreditamos que a principal razão da diferença entre esses resultados, se deve ao fato de que em nossos estudos a temperatura basal e circadiana foi avaliada após 12 dias da última injeção de EtOH, enquanto Taylor *et al.* (2002) realizaram a medida da temperatura imediatamente após o término da exposição ao EtOH. Sendo assim, é possível que esses 12 dias de interrupção na exposição ao EtOH sejam suficientes para que o ritmo circadiano da temperatura corporal se reestabeleça. Adicionalmente, nesse mesmo estudo de Taylor *et al.* (2002), ratos adultos expostos ao EtOH apresentaram resposta febril atenuada após administração de LPS ou IL-1 β . Taylor *et al.* (1999) mostraram ainda que ratos expostos ao EtOH na fase fetal e quando expostos a injeção i.c.v de IL-1 β na fase

adulta, também apresentavam resposta febril prejudicada. Ademais, os níveis hipotalâmicos de IL-1 β também se mostravam diminuídos. No nosso estudo, corroboramos os resultados de Taylor *et al.* (2002) e Telles *et al.* (2017), quando após induzir febre pela administração de LPS, os ratos que haviam sido expostos ao EtOH na adolescência não apresentaram nenhuma diferença na temperatura corporal, e os animais que foram previamente expostos a salina apresentaram um aumento significativo da temperatura corporal.

Até o momento, é possível perceber que independentemente da via de administração e da idade em que o animal é exposto ao EtOH, este pode prejudicar o desenvolvimento de uma resposta febril adequada frente a um estímulo. A partir de estudos anteriores, do mesmo grupo citado acima, começou-se a elucidar os mecanismos pelos quais o EtOH altera a resposta febril. Em animais expostos ao EtOH na fase fetal, a administração central de PGE₂ induziu uma resposta febril normal na vida adulta (Taylor *et al.*, 1999). Estes autores concluíram que a exposição fetal ao EtOH alterou a capacidade desses animais de produzir uma resposta apropriada a infecções, possivelmente por uma produção diminuída de citocinas. No entanto, sua capacidade de produção de calor não foi prejudicada visto que, após a administração de PGE₂, um dos mediadores finais da resposta febril, os animais produziram uma resposta febril inalterada.

No presente estudo, nós demonstramos que a situação pode ser diferente quando o EtOH é administrado intermitentemente na adolescência. A exposição intermitente de EtOH durante a adolescência, também atenuou a resposta febril induzida pela administração i.c.v. de PGE₂. Assim, diferente de trabalhos anteriores, este resultado sugere que esse modelo de exposição ao EtOH afeta também os mecanismos termogênicos da resposta febril mais do que a produção de mediadores pirogênicos.

Estes dados estão de acordo com estudos anteriores do nosso grupo onde observamos que a administração intermitente de EtOH na adolescência não alterou os níveis plasmáticos de IL-1 β em animais que receberam LPS por via intraperitoneal (Telles *et al.*, 2017). A ativação dos receptores EP₃ pela PGE₂ na circuitaria de termorregulação, mais especificamente na área POA/HA, irá desencadear a resposta febril. A produção (tremor muscular e ativação do TAM) e conservação (vasoconstrição) de calor em animais endotérmicos são controladas no hipotálamo. Enquanto a MnPO possui vias glutamatérgicas que estimulam o DMH para a produção e a rafe pávido rostral para a conservação de calor, a MPO possui neurônios gabaérgicos (inibitórios) que inibem estas vias. Estes neurônios gabaérgicos presentes na MPO são sensíveis a temperatura, especificamente ao calor. Assim, a ativação destes neurônios por uma elevação da temperatura corporal desencadeia a inibição tanto da produção como na conservação de calor. Estes neurônios gabaérgicos presentes na MPO também possuem receptores EP₃ para PGE₂ que é um receptor acoplado a proteína G_i, sendo assim, é um receptor inibitório. Quando ocorre a ligação da PGE₂ ao EP₃, ocorrerá a inibição destes neurônios gabaérgicos e conseqüentemente a desinibição dos mecanismos de produção e conservação de calor, para que ocorra o aumento da temperatura corporal (para uma revisão ver Morrison, 2016). Já foi reportado que camundongos *knock-out* para COX-2 não apresentavam resposta febril após administração de LPS i.p (Steiner *et al.*, 2005), além disso, a deficiência de receptores EP₃ em camundongos também resultou na deficiência de febre (Oka *et al.*, 2003). Dessa maneira, a PGE₂ é considerada um mediador lipídico chave para o desenvolvimento da resposta febril. No presente estudo, nós não avaliamos outros possíveis mediadores da resposta febril além das prostaglandinas. No entanto, dado a importância destes prostanóides na febre e a demonstração de que o consumo de EtOH reduz a resposta febril induzida por PGE₂ é

certo que a respostas febris de diferentes origens (fúngica, viral ou bacteriana) serão alteradas por este consumo.

A termogênese produzida pelo TAM é essencial para a termorregulação e para o gasto total de energia (Masand *et al.*, 2018). As vias descendentes provenientes do DMH são noradrenérgicas e a estimulação de receptores β_3 adrenérgicos no TAM induz a transcrição da UCP1 (Cypress *et al.*, 2015; Villarroya *et al.*, 2017). A UCP1 irá desacoplar a fosforilação oxidativa de ácidos graxos na mitocôndria e ao invés de produzir ATP essas mitocôndrias passarão a produzir calor (Nicholls, 2001). Blaner *et al.* (2017) demonstrou que camundongos adultos após receberem uma dieta crônica líquida de EtOH apresentavam redução da massa de TAM e uma temperatura corporal diminuída a meia-noite (ciclo escuro). Nossos dados sugeriam que os mecanismos termorregulatórios dos animais expostos ao EtOH na adolescência estavam alterados, assim, decidimos investigar o TAM. Inicialmente, corroboramos os resultados obtidos por Blaner *et al.* (2017), ou seja, os animais que foram expostos ao EtOH na adolescência apresentaram também uma massa reduzida de TAM quando comparado com os animais salina. Assim, estes dados sugerem que a exposição ao EtOH, tanto crônica em ratos adultos quanto intermitente em ratos adolescentes podem reduzir a massa de TAM nos animais. É importante salientar que, em nosso modelo demonstramos que mesmo a interrupção da exposição do EtOH nos animais por 12 dias não permite a recuperação desta redução do TAM. Adicionalmente, para verificar se o TAM não estava diminuído como uma consequência da redução do peso corporal, calculamos a razão entre TAM e peso corporal, e observamos que a massa de TAM ainda está diminuída quando os valores são expressos dessa forma. Em conjunto, estes dados sugerem que a exposição ao EtOH, seja de maneira crônica ou de maneira

intermitente durante a adolescência pode promover uma redução da massa de TAM que pode permanecer por um período prolongado após sua interrupção.

Como mencionado anteriormente, o TAM é capaz de aumentar o desacoplamento mitocondrial para a produção da termogênese adaptativa em resposta a estimulação adrenérgica (Mahdaviyani *et al.*, 2015). Esses dados, portanto, nos levaram a avaliar a termogênese adaptativa desses animais. Para tal, os ratos de ambos os grupos foram expostos ao desafio ao frio em temperaturas de 15°C e 5°C. A zona termoneutra dos ratos é de 28°C, nessa temperatura os animais não necessitam ativar seus mecanismos de produção de calor, portanto a temperatura corporal normal pode ser controlada apenas por mecanismos de conservação de calor, ou seja, pela vasoconstrição e vasodilatação que possibilitam o aumento ou diminuição da troca de calor com o ambiente. Quando a temperatura ambiente está abaixo de 28°C, os mecanismos de produção de calor (termogênese pelo TAM e tremor muscular) podem ser ativados quando a capacidade de vasoconstrição estiver no seu limite máximo. E quando a temperatura ambiente estiver acima de 28°C, outros mecanismos de perda de calor (sudorese, ofegação) poderão ser ativados quando ocorrer a vasodilatação máxima (Romanovsky *et al.*, 2002). Dessa maneira, a temperatura ambiente do biotério (22°C) já pode ser suficiente para ativar a termogênese adaptativa pelo TAM (Masand *et al.*, 2018). Nossos dados sugerem que o consumo *binge* de EtOH durante a adolescência não é capaz de alterar a termogênese adaptativa a 15°C, mas quando os animais são expostos a uma temperatura mais severa, como a 5°C, os animais tratados com EtOH não foram capazes de manter uma temperatura corporal inalterada, atingindo um estado de hipotermia, enquanto os animais do grupo salina conseguiram manter uma temperatura corporal relativamente constante, por mais que tenham um alto gasto energético. Ricquier e colaboradores (1986) demonstraram que uma rápida expressão de

mRNA de UCP1 ocorre após estimulação do TAM pela exposição ao frio. Como mencionado anteriormente, a ativação de UCP1 é capaz de desacoplar o gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial, liberando energia em forma de calor (Kajimura e Saito, 2014). Klaus e colaboradores (1998), utilizaram camundongos transgênicos, portadores de UCP associada à cadeia de toxina A de difteria (UCP-DTA), fazendo com que nesses animais o tecido adiposo marrom estivesse com sua funcionalidade diminuída, e reportaram que esses camundongos transgênicos apresentaram uma menor temperatura corporal, aproximadamente 0.9°C mais baixa, quando comparados ao grupo controle, porém não houve diferenças no consumo total de oxigênio quando compararam os animais UCP-DTA com os animais controle, sem levar em consideração o peso desses animais (Klaus *et al.*, 1998). Estes dados em conjunto sugerem que a redução na massa do TAM ocasionada pela exposição intermitente ao EtOH na adolescência pode, além de prejudicar a resposta febril, prejudicar as defesas ao frio em situações onde este a atividade deste tecido é demandada como em baixas temperaturas.

O passo seguinte foi avaliar se havia somente uma redução na massa do TAM ou se sua função também poderia estar alterada pela exposição ao EtOH. Os estudos relacionados a respirometria em mitocôndrias isoladas de animais expostos ou não ao EtOH demonstraram uma menor atividade das mitocôndrias tanto quando expostas ao piruvato e malato, ativadores naturais da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial tanto quanto ao ATP, um inibidor de UCPs. Quando calculamos a atividade da UCP baseados nestes dados, observamos uma diminuição da atividade da UCP em animais expostos ao EtOH. Como esperado, a adição de um desacoplador inespecífico da cadeia transportadora de elétrons, o FCCP, produziu resultados similares tanto em animais salina como em animais expostos ao EtOH demonstrando a viabilidade similar das duas

preparações. Estes dados sugerem que além da redução absoluta e relativa ao peso corporal da massa do TAM, a exposição ao EtOH durante a adolescência reduz também a funcionalidade deste tecido reduzindo a atividade da UCP. Já foi demonstrado que, a UCP1 é uma proteína desacopladora exclusiva do TAM, mas outras proteínas desacopladoras como a UCP3 também estão presentes neste tecido (Wang *et al.*, 2019). Portanto, nossos dados não nos permitem definir qual proteína desacopladora está sendo afetada pela administração de EtOH.

É importante salientar que nossos dados não nos permitem avaliar se a redução da atividade da UCP deve-se a uma redução na expressão destas proteínas ou somente em sua atividade. A atividade da UCP1 mitocondrial do TAM é controlada post-translacionalmente por proteínas chamadas sirtuínas (Sirt), particularmente a Sirt5 (Wang *et al.*, 2019). A Sirt5 é responsável pela desuccinilação de resíduos de lisina presentes na UCP1, aumentando sua atividade. Não encontramos dados na literatura sobre os efeitos da ingestão de EtOH sobre a Sirt5 mas You *et al.* (2008), demonstraram que a administração crônica de EtOH para camundongos adultos reduziu a expressão de Sirt1 no fígado e sugeriram que esta redução está relacionada ao aparecimento da esteatose hepática. Portanto, é possível que a exposição ao EtOH durante a adolescência reduza os níveis de Sirt5 no TAM promovendo uma redução na atividade da UCP. Corroborando esta hipótese de que a exposição ao EtOH estaria alterando mais a atividade do que a expressão de UCP, Blaner *et al.* (2017) demonstraram que não houve diferença na expressão de mRNA de UCP1 quando compararam camundongos expostos ao EtOH com camundongos expostos a salina. Estudos adicionais precisam ser feitos para confirmar esta hipótese.

Ainda, em nosso trabalho demonstramos que o consumo de EtOH durante a adolescência não é capaz de alterar a morfologia do TAM. No entanto, o tecido foi

coletado e avaliado após 12 dias da última injeção de EtOH, o que pode ser suficiente para a recuperação morfológica do tecido, uma vez que Blaner e colegas (2017) demonstraram que o consumo de EtOH por camundongos adultos foi capaz de diminuir o tamanho das gotículas de lipídeo e a quantidade de triglicerídeos no TAM. Assim, é bastante provável que o EtOH, imediatamente após a exposição, seja capaz de reduzir ainda mais a capacidade termogênica do TAM por reduzir, além da atividade da UCP, a quantidade de substrato para geração de calor.

Outros mecanismos de produção e conservação de calor (termogênese por tremor e vasoconstrição) podem estar alterados concomitantemente com esta alteração no TAM. Essa possibilidade poderá ser avaliada em futuras investigações.

Assim, nossos resultados não sugerem que a exposição intermitente de EtOH é capaz de ter um efeito direto no metabolismo de lipídeos do TAM, mas, certamente sugerem que essa exposição na adolescência pode alterar a atividade de proteína UCP e que isto prejudica as defesas ao frio dos animais, o que implica em uma pior adaptação do indivíduo ao meio. Além disso, o prejuízo da funcionalidade do TAM terá como consequência o prejuízo da resposta febril, uma vez que a termogênese produzida pelo TAM é essencial para o aumento da temperatura corporal durante a febre. Considerando que a resposta febril é um mecanismo importante de defesa contra infecções, uma vez que o aumento da temperatura corporal auxilia na ativação e proliferação de linfócitos (Cannon, 2013), nossos resultados podem explicar, pelo menos em parte, a maior suscetibilidade de indivíduos que consomem EtOH a estas doenças de caráter infeccioso, como tuberculose, HIV e pneumonia (Rehm, 2011).

6. Conclusão

O presente trabalho mostrou que a exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência reduz o peso corporal dos ratos. Ainda, ratos expostos ao EtOH durante a adolescência de maneira intermitente não apresentaram resposta febril após exposição ao LPS e a PGE₂, e isso pode ocorrer como consequência do prejuízo na termogênese adaptativa.

A exposição ao EtOH de maneira intermitente durante a adolescência também levou a redução da massa total e relativa de TAM, prejudicando a termogênese não associada a tremores que é induzida neste tecido. Concomitantemente a redução da massa do tecido, a exposição ao EtOH promoveu ainda uma redução na atividade da UCP mitocondrial no TAM, reduzindo assim sua capacidade funcional. Deste modo, esta redução, tanto da massa como da funcionalidade do TAM, pode contribuir para a redução na resposta febril em animais expostos ao EtOH, bem como prejudicar as defesas ao frio dos indivíduos, o que poderia levar a uma maior predisposição a quadros de hipotermia.

As alterações observadas na resposta febril e na termogênese adaptativa duraram até o início da vida adulta, dessa maneira, o consumo de EtOH durante a adolescência pode levar a consequências importantes em relação à percepção e a suscetibilidade à doenças infecciosas durante essa fase da vida.

7. Referências

- Afshar, M., Richards, S., Mann, D., Cross, A., Smith, G.B., Netzer, G., Kovacs, E., Hasday, J., 2015. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. **Alcohol** 49(1), 57-64.
- Agrawal, R.G., Hewetson, A., George, C.M., Syapin, P.J., Bergeson, S.E., 2011. Minocycline reduces ethanol drinking. **Brain Behav Immun** 25 Suppl 1, S165-169.
- Amirkhanian, Y. A., Kelly, J. A., Tarima, S. S., Kuznetsova, A. V., DiFranceisco, W. J., Musatov, V. B., Yakovlev, A. A., McAuliffe, T. L., 2019. Prevalence of alcohol use and factors associated with problem drinking in social networks of people living with HIV infection in St. Petersburg, Russia. **AIDS Educ. Prev.** 31(4):380-393.
- Bastos-Pereira, A.L., Fraga, D., Ott, D., Simm, B., Murgott, J., Roth, J., Zampronio, A.R., 2014. Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. **J Appl Physiol** (1985) 116(9), 1220-1229.
- Bastos-Pereira, A.L., Leite, M.C., Fraga, D., Zampronio, A.R., 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.
- Boulant, J.A., 2006. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol** 100(4), 1347-1354
- Blaner, S. W.; Gao, M. A.; Jiang, H.; Dalmer T. R. A.; Hu X. J.; Ginsberg, H. N.; Clugston, R. D., Chronic alcohol consumption decreases brown adipose tissue mass and disrupts thermoregulation: a possible role for altered retinoid signaling. **Scientific Reports.** 7:43474 March 2017.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72:248-54, May 1976.

Breder, C. D; Saper C. B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res.** 713, 64-69. 1996.

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

Cannon, J.G. Perspective on fever: the basic science and conventional medicine. **Complement Ther Med** 21 Suppl 1, S54-60, 2013.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev.** 84:277–359 2004.

Cannon, B., Nedergaard, J. Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues, **Methods Mol. Biol.** 456 109–121, 2008.

Chu, C.M., Tian, S.F., Ren, G.F., Zhang, Y.M., Zhang, L.X., Liu, G.Q. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature. **J Virol** 41(2), 353-359, 1982.

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

Courtney, K.E., Polich, J., 2010. Binge drinking effects on EEG in young adult humans. **International journal of environmental research and public health** 7(5), 2325-2336

Crews, F.T., Zou, J., Qin, L., 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. **Brain Behav Immun** 25 Suppl 1, S4-S12.

Crews, T. F., Vetreno, R. P., Broadwater, M. A. e Robinson, D. L. – Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behaviour. **Pharmacological reviews** 68:1047-1109, Outubro 2016.

Curtis, B.J., Hlavin, S., Brubaker, A.L., Kovacs, E.J., Radek, K.A., 2014. Episodic binge ethanol exposure impairs murine macrophage infiltration and delays wound closure by promoting defects in early innate immune responses. **Alcohol Clin Exp Res** 38(5), 1347-1355

Cypress, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toller, C. et al., Activation of human brown adipose tissue by a $\beta 3$ adrenergic receptor agonist. **Cell Metab.** 21:33-38, 2015.

D'Souza, A.J., Desai, S.D., Rudner, X.L., Kelly, M.N., Ruan, S., Shellito, J.E., 2013. Suppression of the macrophage proteasome by ethanol impairs MHC class I antigen processing and presentation. **PLoS One** 8(2), e56890.

Dalton, R.M., Mullin, A.E., Amorim, M.J., Medcalf, E., Tiley, L.S., Digard, P. Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes. **Virol J** 3, 58, 2006.

De Luca, L.A. Jr.; Almeida, R.L.; David, R.B; de Paula, P.M.; Andrade, C.A.; Menani, J.V. Participation of $\alpha 2$ -adrenoceptors in sodium appetite inhibition during sickness behavior following administration of lipopolysaccharide. **J Physiol.** 15; 594 (6):1607-16 March 2016.

DeWitt, S., Chavez, A. S., Perkins, J., Long, B., Koefman A., 2017. Evaluation of fever in the emergency department. **Am. J. Emerg. Med.** 35, 1755-1758.

de Oliveira, B.M.T., Telles, T., Lomba, L.A., Correia, D., Zampronio, A.R., 2017. Effects of binge-like ethanol exposure during adolescence on the hyperalgesia observed during sickness syndrome in rats. **Pharmacol Biochem Behav** 160, 63-69.

Duncan, M., Galic, M.A., Wang, A., Chambers, A.P., McCafferty, D.M., McKay, D.M., Sharkey, K.A., Pittman, Q.J., 2013. Cannabinoid 1 receptors are critical for the innate immune response to TLR4 stimulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 305(3), R224-231

Elliott, J. C., Shalev, N., Hasin, D. S., 2018. Heavy drinking and treatment among HIC/HCV co-infected patients. **J. Subst. Abus. Alcohol** 6(2) pii: 1079.

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

Elmqvist, J. K.; Scammell T. E.; Saper, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends Neurosci.** 20, 565-570. 1997

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

Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., Gascon, M.S., Blanco, A., Guerri, C., 2008. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. **Mol Immunol** 45(7), 2007-2016.

Fine, J.G., Sung, C., 2014. Neuroscience of child and adolescent health development. **Journal of counseling psychology** 61(4), 521-527.

Fraga, D., Machado, R.R., Fernandes, L.C., Souza, G.E., Zampronio, A.R., 2008. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 294(2), R411-42

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

Forbes, A., Cooze, J., Malone, C., French, V., Weber, J.T., 2013. Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. **Alcohol** 47(2), 95-102.

Garibaldi, J.A. Influence of temperature on the biosynthesis of iron transport compounds by *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol** 110(1), 262-265, 1972.

Gay, N.J., Gangloff, M., Weber, A.N., 2006. Toll-like receptors as molecular switches. **Nat Rev Immunol** 6(9), 693-698.

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

Giesendorf, B., Bosch, F.X., Orlich, M., Scholtissek, C., Rott, R. Studies on the temperature sensitivity of influenza A virus reassortants nonpathogenic for chicken. **Virus Res** 5(1), 27-42, 1986.

Goral, J., Karavitis, J., Kovacs, E.J., 2008. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. **Alcohol** 42(4), 237-247.

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

Hanson, D.F., 1997. Fever, temperature, and the immune response. **Ann N Y Acad Sci** 813, 453-464.

Hosotani, R., Inoue, W., Takemiya, T., Yamagata, K., Kobayashi, S., Matsumura, K., 2015. Prostaglandin transporter in the rat brain: its localization and induction by lipopolysaccharide. **Temperature** (Austin) 2(3), 425-434.

Jimenez-Ortega, V., Fernandez-Mateos, M.P., Barquilla, P.C., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I., 2011. Continuous versus discontinuous drinking of an ethanol liquid

diet in peripubertal rats: effect on 24-h variation of lymph node and splenic mitogenic responses and lymphocyte subset populations. **Alcohol** 45(2), 183-192.

Jochum, T., Boettger, M.K., Burkhardt, C., Juckel, G., Bar, K.J., 2010. Increased pain sensitivity in alcohol withdrawal syndrome. **Eur J Pain** 14(7), 713-718.

Kajimura, S., Saito, Masayuki. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. **Annual Rev. Physiology**. 76:225-249 February 2014.

Klaus, S., Munzberg, H., Truloff, C. & Heldmaier, G. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. **Am J Physiol** 274, 287–293 1998.

Kluger, M.J., Ringler, D.H., Anver, M.R., 1975. Fever and survival. **Science** 188(4184), 166-168.

Kohlgruber, A. C., Gal-Oz, S. T., LaMarche, N. M., ... , Brenner, M. B., Lynch, L. $\gamma\delta$ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. **Nat. Immun.** 19 : 464-474, 2018.

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

Lerma-Cabrera, J.M., Carvajal, F., Alcaraz-Iborra, M., de la Fuente, L., Navarro, M., Thiele, T.E., Cubero, I., 2013. Adolescent binge-like ethanol exposure reduces basal alpha-MSH expression in the hypothalamus and the amygdala of adult rats. **Pharmacol Biochem Behav** 110, 66-74.

Macher, G., Koehler, M., Rupprecht A., Kreiter, J., Hinterdorfer, P., Pohl, E. E. Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. **Biomenbranes**. 1860:664-672, 2017.

Mahdaviani, K., Benador, I., Shirihai, O. Assessment of brown adipocyte thermogenic function by high-throughput respirometry. **Bio. Protoc.** November 2015.

Masand, R., Paulo, E., Wu, D., Wang, Y., Swaney D. L., Jimenez-Morales, D., Krogan, J. N., Wang, B. Proteome imbalance of mitochondrial electron transport chain in brown adipocytes leads to metabolic benefits. **Cell Metabolism** 27, 616-629 March 6, 2018.

Masten, A.S., Faden, V.B., Zucker, R.A., Spear, L.P., 2009. A developmental perspective on underage alcohol use. **Alcohol Res Health** 32(1), 3-15.

Matthews, D. B., Mittleman, G. Age-dependent effects of chronic intermittent ethanol treatment: Gross motor behavior and body weight in aged, adult and adolescent rats.

Neuroscience Letters 657:146-150 September 2017.

Morrison, S. F. , Central neuron control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Auton Neurosci.** 196:14-24 April 2016.

Muralidharan, S., Ambade, A., Fulham, M.A., Deshpande, J., Catalano, D., Mandrekar, P. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance. **J Immunol** 193(4), 1975-1987, 2014.

Moreno, R. M., Jimenez, V. Jr., Monroy, F. P., 2019. Impact of binge alcohol intoxication on the humoral response during *Burkholderia spp.* Infections. **Microorganisms** 7(5), 125.

Nakamura, K., 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 301(5), R1207-1228.

Nakamura, K., Matsumura, K., Kaneko, T., Kobayashi, S., Katoh, H., Negishi, M., 2002. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. **J Neurosci** 22(11), 4600-4610.

Nelson, N. G., Suhaidi, F. A., DeAngelis R. S., Nu-Chu, L., 2016. Appetite and weight gain suppression effects of alcohol depend on the route and pattern of administration in Long Evans rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 124–133.

Nicholls, D. G. A history of UCP1. **Biochemical Society Transactions** 29, 751-755 2001.

Organization, W.H., 2014. Global status report on alcohol and health 2014. **Global Status Report**, 1-392.

Oka, T., Oka, K., Kobayashi T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C. B., 2003. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. **J. Physiol.** 551:945-954.

Paxinos, G., Watson, C., The rat brain in extereotaxic coordinates. **Academic Press**, San Diego 1998.

Pieracci, F.M., Barie, P.S. Iron and the risk of infection. **Surg Infect** (Larchmt) 6 Suppl 1, S41-46, 2005.

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

Rehm, J., 2011. The risks associated with alcohol use and alcoholism. **Alcohol Res Health** 34(2), 135-143.

Ricquier, D., Bouillaud, F., Toumelin, P., Mory, G., Bazin, R., Arch, J., Pénicaud, L. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. **J. Biological Chemistry** 261 (30) 13905-13910 October 25, 1986.

Romanovsky, A. A.; Simons, C.T.; Kulchitsky, V. A. “Biphasic” fevers often consist of more than two phases. **Am. J. Physiol** 275, R323-R331, 1998.

Roth, J., De Souza, G.E., 2001. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res** 34(3), 301-314.

Saper, C. B., Romanovsky A. A., Scammell, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat. Neuroscience** 10.1038/nn.3159 26 July 2012.

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

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

Shabalina, I.G., Vrbacký, M., Pecinová, A., Kalinovich, A.V., Drahotka, Z., Houštěk, J., Mráček, T., Cannon, B., Nedergaard, J., 2014. ROS production in brown adipose tissue in mitochondria: The question of UCP1-dependence. 1837, 2017-2030.

Shumilla, J.A., Liron, T., Mochly-Rosen, D., Kendig, J.J., Sweitzer, S.M., 2005. Ethanol withdrawal-associated allodynia and hyperalgesia: age-dependent regulation by protein kinase C epsilon and gamma isoenzymes. **J Pain** 6(8), 535-549.

Steiner, A. A., Rudaia, A. Y., Robins, J. R., Dragic, A. S., Langenbach, R., Romanovsky, A. A., 2005. Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289: R1253-1257

Taiwo, Y.O., J.D. Levine, Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Res.** 458(2): p. 402-6 1988.

Taylor, A.N., Tio, D.L., Heng, N.S., Yirmiia, R., 2002. Alcohol consumption attenuates febrile responses to lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in male rats. **Alcohol Clin Exp Res** 26(1), 44-52.

Taylor, A.N., Tio, D.L., Yirmiya, R., 1999. Fetal alcohol exposure attenuates interleukin-1beta-induced fever: neuroimmune mechanisms. **J Neuroimmunol** 99(1), 44-52.

Telles, T.M.B.B., Oliveira, B.M.T., Lomba, L.A., Leite-Avalca, M.G., Correia, D., Zamprônio, A.R., 2017. Effects of binge-like ethanol exposure during adolescence on the febrile response in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research** 41(3), 507-515.

Tominaga, M. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Chapter 20: The role of TRP channels in thermosensation. **CRC press/Taylor and Francis**, 2007.

Villarroya F., Peyrou, M., Giralt, M. Transcriptional regulation of uncoupling protein-1 gene. **Biochimie** 134:86-92, 2017.

Vriens, J., Owsianik, G., Hoffmann, T., Philipp, S. E., ...Nilius, B., Voets, T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. **Cell Press** 70:3 P482-494, 2011.

Wang, G., Meyer, J. G., Cai, W., Newgard, C., Schilling, B., Kahn, C. R. Regulation of UCP1 and mitochondrial metabolism in brown adipose tissue by reversible succinylation. **Molecular Cell**. 74 1-14, May 2019.

Windle, M., 2016. Drinking Over the Lifespan: Focus on Early Adolescents and Youth. **Alcohol research : current reviews** 38(1), 95-101.

Wilhelms, D.B., Kirilov, M., Mirrasekhian, E., Eskilsson, A., Kugelberg, U.O., Klar, C., Ridder, D.A., Herschman, H.R., Schwaninger, M., Blomqvist, A., Engblom, D., 2014. Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. **J Neurosci** 34(35), 11684-11690

Yirmiya, R., Pilati, M.L., Chiappelli, F., Taylor, A.N., 1993. Fetal alcohol exposure attenuates lipopolysaccharide-induced fever in rats. **Alcohol Clin Exp Res** 17(4), 906-910.

Yirmiya, R., Tio, D.L., Taylor, A.N., 1996. Effects of fetal alcohol exposure on fever, sickness behavior, and pituitary-adrenal activation induced by interleukin-1 beta in young adult rats. **Brain Behav Immun** 10(3), 205-220.

You, M., Liang, X., Ajmo, J. M., Ness, G. C. Involvement of mammalian sirtuin1 in the action of ethanol in liver. **Am J Physiol**. 294(4) G892-G898, 2008.

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

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