

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LUIS ALEXANDRE LOMBA

ENDOTELINA-1 NA SÍNDROME DE DOENÇA INDUZIDA POR ENDOTOXINA EM
RATOS

CURITIBA
2020

LUIS ALEXANDRE LOMBA

ENDOTELINA-1 NA SÍNDROME DE DOENÇA INDUZIDA POR ENDOTOXINA EM
RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto
Zampronio

CURITIBA
2020

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

Lomba, Luis Alexandre
Endotelina-1 na síndrome de doença induzida por endotoxina em ratos.
/ Luis Alexandre Lomba. – Curitiba, 2020.
94 p.: il.

Orientador: Aleksander Roberto Zampronio

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

1. Endotelina-1. 2. Endotoxina. 3. Hiperálgia. 4. Anedonia. 5.
Receptores de endotelina. I. Título. II. Zampronio, Aleksander Roberto,
1967-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 571.95



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 tese de Doutorado de LUIS ALEXANDRE LOMBA intitulada: ENDOTELINA-1 NA SÍNDROME DE DOENÇA INDUZIDA POR ENDOTOXINA EM RATOS, sob orientação do Prof. Dr. ALEXSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 29 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica
13/10/2020 08:26:51.0
ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
13/10/2020 09:04:41.0
AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
06/10/2020 11:13:35.0
ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
06/10/2020 09:25:50.0
LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE GUARULHOS)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao professor Aleksander pelo aprendizado durante estes sete anos. Estou certo de que sua orientação transformou minha maneira de pensar e sua ajuda foi essencial para que eu me mantivesse no programa.

Aos meus amigos de Felipe, Bruna Soley, Isabela que me deram muito apoio e incentivo, e aos amigos que fiz durante a pós-graduação Amanda, Bruna Mariana, Adriano, Carol e Lorraine. Quero agradecer especialmente à minha amiga Juliana pela empatia, você é inspiradora. Serei sempre grato a vocês.

Ao departamento de farmacologia pelas considerações e suporte no que foi possível e às pessoas direta ou indiretamente ligadas a este trabalho.

Aos animais que possibilitaram este e tantos outros estudos, certamente devido a nossa compreensão bastante limitada sobre a vida.

Apesar de certas dificuldades agradeço meu privilégio e contexto social que me beneficiaram e permitiram frequentar a pós graduação em uma Universidade Pública, sonho inalcançável para a maioria em nosso país.

Muito Obrigado.

Os imorais falam de nós
do nosso gosto, nosso encontro, da nossa voz
Os imorais se chocam por nós
por nosso brilho, nosso estilo, nossos lençóis.

Mas um dia, eu sei, a casa cai.
E então a moral da estória
vai estar sempre na glória
De fazermos o que nos satisfaz.

Zélia Duncan – Imorais.

RESUMO

A síndrome da doença é uma resposta adaptativa que pode ser distinguida por sinais e sintomas característicos, como febre, hiperalgesia generalizada, hipolocomoção, apatia e sono. A endotelina-1 (ET-1) é produzida por estímulos inflamatórios, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), e está envolvida na patogênese da inflamação e da dor por meio da ação dos receptores ET_A e ET_B. A ET-1 também induz febre por ação em receptores ET_B no hipotálamo. No entanto, pouco é conhecido sobre a participação da ET-1 produzida no sistema nervoso central (SNC) nos outros fenômenos da síndrome da doença. O presente estudo investigou o papel da ET-1 nas respostas da síndrome da doença, incluindo hiperalgesia, anedonia e hipolocomoção, bem como reavaliou o envolvimento de receptores ET_A na resposta febril induzida por LPS em ratos *Wistar*. A hiperalgesia mecânica foi avaliada com o analgésímetro eletrônico Von Frey e a hiperalgesia térmica com a placa aquecida. A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de ET-1 induziu hiperalgesia mecânica e térmica em ratos, que foi reduzida pelo antagonista do receptor ET_A BQ123 e exacerbada pelo antagonista do receptor ET_B, BQ788. O tratamento dos animais com o inibidor da ciclooxigenase (COX) indometacina não alterou a hiperalgesia induzida por ET-1. A administração intraperitoneal (i.p.) de LPS induziu hiperalgesia mecânica e térmica nos animais. Tanto o BQ123 quanto o BQ788 aboliram essa hiperalgesia mecânica, mas a resposta térmica foi apenas parcialmente bloqueada. Para se avaliar se este comportamento nociceptivo depende da ativação dos receptores de ET-1 no hipotálamo foi feito o tratamento com os antagonistas diretamente nesta região. O bloqueio dos receptores ET_A no hipotálamo também aboliu a hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS, e o antagonista do receptor ET_B não influenciou essa resposta. Além da hiperalgesia, a administração i.p. de LPS também induziu anedonia, refletida na menor preferência pela sacarose e redução da atividade locomotora no teste do campo aberto. Ambos os antagonistas restauraram a atividade locomotora, mas apenas o BQ788 reverteu a redução da preferência pela sacarose. Concomitantemente a estas respostas, diferentes doses de LPS induziu febre nos animais. A administração do LPS (10 ou 200 µg/kg, i.p.) produziu febre nos ratos. O pré-tratamento (30 min antes) ou o pós-tratamento (2 h após a administração de LPS) dos animais com o antagonista ET_A BQ123 não alterou a resposta febril induzida por baixas doses de LPS corroborando os resultados anteriores. No entanto, o pós-tratamento dos animais com este antagonista, reduziu a febre induzida por alta dose de LPS. Esses resultados indicam que ET-1 e os receptores ET_A e ET_B estão envolvidos em várias respostas relacionadas à síndrome da doença, incluindo hiperalgesia mecânica e térmica induzida tanto pela ET-1 quanto pelo LPS. Outros comportamentos ligados à infecção como a anedonia e hipolocomoção além da febre induzidas por LPS também envolvem a participação deste peptídeo. Além disso, os receptores ET_A participam da resposta febril induzida por altas doses de LPS, provavelmente em uma fase mais tardia da resposta.

Palavras chave: Endotelina-1, endotoxina, hiperalgesia, anedonia, receptores de endotelina.

ABSTRACT

The sickness syndrome is an adaptive response that can be distinguished by characteristic signs and symptoms, such as fever, generalized hyperalgesia, hypolocomotion, apathy and sleep. Endothelin-1 (ET-1) is produced by inflammatory stimuli, including lipopolysaccharide (LPS), and is involved in the pathogenesis of inflammation and pain through the action of ET_A and ET_B receptors. ET-1 also induces fever by action at ET_B receptors in the hypothalamus. However, little is known about the participation of ET-1 produced in the central nervous system in other phenomena of the sickness syndrome. The present study investigated the role of ET-1 in the responses of the sickness syndrome, including hyperalgesia, anhedonia and hypolocomotion, as well as re-evaluated the involvement of ET_A receptors in the febrile response induced by LPS in Wistar rats. Mechanical hyperalgesia was assessed with the Von Frey electronic analgesiometer and thermal hyperalgesia in the hot plate. Intracerebroventricular (i.c.v.) administration of ET-1 induced mechanical and thermal hyperalgesia in rats, which was reduced by the ET_A receptor antagonist BQ123 and exacerbated by the ET_B receptor antagonist, BQ788. The treatment of animals with the cyclooxygenase inhibitor (COX) indomethacin did not alter ET-1-induced hyperalgesia. Intraperitoneal (i.p.) administration of LPS induced mechanical and thermal hyperalgesia in animals. Both BQ123 and BQ788 abolished this mechanical hyperalgesia, but the thermal response was only partially blocked. To assess whether this nociceptive behavior depends on the activation of ET-1 receptors in the hypothalamus, treatment with antagonists was carried out directly in this region. Blocking of ET_A receptors in the hypothalamus also abolished LPS-induced mechanical hyperalgesia, and the ET_B receptor antagonist did not influence this response. In addition to hyperalgesia, i.p. injection of LPS also induced anhedonia, reflected in the lower preference for sucrose and reduced locomotor activity in the open field test. Both antagonists restored locomotor activity, but only BQ788 reversed the reduction in preference for sucrose. Concomitantly with these responses, different doses of LPS induced fever in the animals. Administration of LPS (10 or 200 µg / kg, i.p.) produced fever in the rats. The pre-treatment (30 min before) or the post-treatment (2 h after the injection of LPS) of the animals with the antagonist ET_A BQ123 did not alter the febrile response induced by the low dose of LPS corroborating the previous results. However, the post-treatment of the animals with this antagonist, reduced the fever caused by the higher doses of LPS tested. These results indicate that ET-1 and the ET_A and ET_B receptors are involved in several responses related to the sickness syndrome, including mechanical and thermal hyperalgesia induced by both ET-1 and LPS. Other behaviors linked to infection such as anhedonia and hypolocomotion in addition to fever induced by LPS also involve the participation of this peptide. Moreover, ET_A receptors participate in the febrile response induced by high doses of LPS, probably in a later phase of this response.

Keywords: Endothelin-1, endotoxin, hyperalgesia, anhedonia, endothelin receptors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SÍNTESE DE CITOCINAS EM RESPOSTA AO LPS	20
FIGURA 2 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA SÍNTESE E AÇÃO DA ET-1 NOS RECEPTORES ET _A E ET _B	35
FIGURA 3 - ET-1 E SEUS RECEPTORES SÃO ENCONTRADOS AO LONGO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA DOR	36
FIGURA 4 - ET-1 INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM RATOS	47
FIGURA 5 - EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1	49
FIGURA 6 - EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NO LIMIAR MECÂNICO E NO TEMPO DE LATÊNCIA TÉRMICO EM RATOS	51
FIGURA 7 - EFEITO DA INDOMETACINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1	53
FIGURA 8 - EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELO LPS.	55
FIGURA 9 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE BQ123 OU BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS	57
FIGURA 10 - EFEITOS DO BQ123 E BQ788 NA PREFERÊNCIA DE SACAROSE E ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA	59
FIGURA 11 - EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR BAIXA DOSE DE LPS.	61
FIGURA 12 - EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR ALTA DOSE DE LPS.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ADPC - difosfato de adenosina
AMP_C – monofosfato de adenosina cíclico
BHE – Barreira Hematoencefálica
BK - Bradicinina
BQ123 – Antagonista seletivo do receptor ET_A
BQ788 – Antagonista seletivo do receptor ET_B
CARD (*caspase activation and recruitment domains*)
Ca²⁺ - Cálcio
COX – Ciclo-oxigenase
CINC - fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas
CRF – Fator liberador de corticotrofina (do inglês *Corticotropin releasing factor*)
CXCL1 – Quimiocina Ligante 1 do motivo CXC (do inglês *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*)
CXCR2 – Receptor 2 de quimiocina motivo CXC (do inglês *C-X-C Motif Chemokine Receptor 2*)
DAG – Diacilglicerol
DAMP – Padrão molecular associado ao dano (do inglês *damage-associated molecular pattern*)
ECE – Enzima conversora de endotelina
E.g - *exempli gratia*
EPAC1 — Proteína trocadora diretamente ativada por AMPc (do inglês *Exchange + + + protein directly activated by cAMP*)
EPM – Erro padrão da média
ET-1 – Endotelina-1
ET_A – Receptor de endotelina subtipo A
ET_B – Receptor de endotelina subtipo B
EP₃ – Receptor de prostaglandina E₂
g - gramas
GFAP - *glial fibrillary acidic protein*

HPA - eixo hipotálamo-pituitária-
I.C.V – Intra- cérebro ventricular
I.M. - Intramuscular
IP - intraperitonal
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do ingles *International association for the study of pain*)
IKK – Quinase do inibidor do NF-κB (do ingles *IκB kinase*)
IL – Interleucina
IP3 – Inositol trifosfato
IRF3 (*interferon regulatory factor-3*)
IRAK – Quinase associada ao receptor de IL-1 (do ingles *IL-1 receptor-associated kinase*)
LGP₂ – Proteína LGP₂ (do inglês *Laboratory of Genetics and Physiology 2*)
LPS – Lipopolissacarídeo
MAL – adaptador tipo MyD88 (do inglês *MyD88 adapter-like*)
MDA5 – gene 5 associado a diferenciação de melanoma (do ingles *Melanoma differentiation-associated gene 5*)
MIP - proteína inflamatória de macrófago
MyD88 – proteína de diferenciação mielóide (do ingles *Myeloid differentiation protein*)
NFκB – fator nuclear κB (do ingles *Nuclear Fator nuclear κB*)
NLR – receptor do tipo Nod (do inglês *Nod like receptor*)
NMDA – N-metil D-aspartato
OCV – órgão circunventriculares
PAF - fator de agregação plaquetária
PAMP – padrão molecular associado à patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*)
PG - Prostaglandina
PIP2 – Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKA – Proteína quinase A
PRR – Receptor de reconhecimento padrão (do inglês *pattern recognition receptor*)
RANKL - ligante do receptor-ativador de NF-κB
RLR – Receptor do tipo Rig (do inglês *Rig like receptor*)
RNA – Ácido ribonucléico

s - segundos

SNC – Sistema nervoso central

SNP- Sistema nervoso periférico

SP – Substância P

TAK-1 (TGF- β -activated Kinase 1)

TICAM-1 – molécula adaptadora do receptor do tipo Toll 1 (do inglês *Toll like receptor adaptor molecule 1*)

TIR – receptor Toll/IL-1 (do inglês *Toll/IL-1 receptor*)

TLR - receptor do tipo Toll (do inglês *Toll like receptor*)

TRP - receptores de potencial transitório

TNF- α – Fator de necrose tumoral α (do inglês *Tumor necrosis factor - α*)

TRAM – molécula adaptadora do receptor do tipo Toll 2 (do inglês *Toll like receptor adaptor molecule 2*)

TRAF-6 - TNFR-associated factor 6

VEH – Veículo

VRM - bulbo rostroventral (do inglês *ventral rostral medulla*)

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento
± - mais ou menos
≤ - maior ou igual a
μ - micro
DA – Dalton
K – kilo
p – p valor
α - alfa
β - beta
γ - delta
κ - kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A ATIVAÇÃO DO TLR-4 E VIAS DE SINALIZAÇÃO	18
1.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA PERIFERIA COMO RESPOSTA AO LPS..	19
1.3 O COMPORTAMENTO DE DOENÇA	20
1.4 A RESPOSTA FEBRIL.....	23
1.5 A HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA	25
1.6 O SISTEMA ENDOTELINÉRGICO E OS FENÔMENOS DA SÍNDROME DE DOENÇA.....	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS	40
3.2 ESTERELIZAÇÃO	40
3.3 DROGAS	40
3.4 IMPLANTE DE CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL E NO HIPOTÁLAMO	41
3.5 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA	42
3.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FEBRIL.....	43
3.7 MOVIMETAÇÃO ESPONTÂNEA.....	44
3.8 TESTE DA PREFERÊNCIA PELA SACAROSE	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NO LIMAR MECÂNICO E NO TEMPO DE LATÊNCIA TÉRMICO BASAL.....	50
4.2 ET-1 INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM RATOS	46
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1.....	48

4.4 EFEITO DA INDOMETACINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1.....	52
4.5 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELO LPS.....	54
4.6 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAHIPOTALÂMICA DE ET-1.....	56
4.7 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NO TESTE DE PRERÊNCIA PELA SACAROSE E MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	58
4.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR BAIXA DOSE LPS.....	60
4.9 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR ALTA DOSE LPS.....	62
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÃO.....	73
7 REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico nos protege de doenças causadas por diversas substâncias nocivas, reconhecendo e combatendo bactérias, vírus e toxinas, bem como ao limitar a ação e remover corpos estranhos e células malignas do organismo.

A resposta imune é classificada em resposta imune não específica ou inata e resposta imune específica ou adaptativa. Quando o organismo é invadido por microorganismos patogênicos, estes encontram na “linha de frente” da resposta imune inata células fagocíticas, representadas por monócitos, macrófagos residentes e pelas células de Kupffer, no fígado, produzindo uma resposta não específica. Estas células expressam uma família de receptores denominada genericamente como receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptor*, PRR) que incluem receptores de tipo RIG (RLR) e do tipo NOD (NLR) e do tipo *Toll* (TLR) (VIDYA et al., 2018).

PRR são encontrados na superfície celular (e.g. TLR-4), no citoplasma (NLR) e também no endossomo (e.g. TLR-3) (MEDZHITOV, 2001). Estes receptores são especializados em reconhecer diferentes padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) e também padrões moleculares associados ao dano (DAMP) que são moléculas relacionados aos microorganismos e a componentes de apoptose ou dano celular, respectivamente (VIDYA et al., 2018).

Os RLR estão localizados no citosol e são especializados em reconhecer RNA (HARTMANN, 2017). Esta família de receptores engloba três membros: RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) e LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). Todos os RLR têm um domínio α -hélice central e um domínio carboxi-terminal que juntos são responsáveis por detectar RNA. RIG-I e MDA5, adicionalmente, têm dois domínios CARD (*caspase activation and recruitment domains*) amino terminais, que medeiam a transdução após o reconhecimento do ácido ribonucleico (RNA). Logo após a descoberta dos RLR, estudos com camundongos *knock-out* para estes receptores demonstraram que estas proteínas são essenciais para a defesa contra infecções virais (KATO et al., 2006).

Os NLR são encontrados no citoplasma e desempenham um papel crucial na resposta imune inata reconhecendo estruturas microbianas como peptidoglicano, flagelina, o RNA viral, fungos; bem como o trifosfato de adenosina (ATP), cristais de colesterol, ácido úrico e fatores ambientais como amianto, sílica e a radiação

ultravioleta produzindo uma resposta inflamatória por ativar fatores de transcrição (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Os TLR, particularmente, são especializados no reconhecimento tanto de antígenos bem como de moléculas próprias oriundas de células danificadas (LEMAITRE et al., 1996) e falhas neste reconhecimento são sabidamente associadas a diversas doenças autoimunes (FARRUGIA; BARON, 2017).

Assim, de maneira geral podemos definir que, dentre estes receptores, os NLR, estão mais relacionados com a apoptose bem como a regulação da resposta inflamatória (VELLOSO et al., 2019), os RLR com o reconhecimento da replicação viral dentro das células (CHAN; GACK, 2015; LOO; GALE JR, 2011) e os TLR, então, em alertar o sistema imune contra diversos PAMP como ácido nucléico (MAJER; LIU; BARTON, 2017) e lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (PARK; LEE, 2013).

Em mamíferos são expressos ao menos dez subtipos de TLR (VIDYA et al., 2018) e cada um possui uma habilidade única de reconhecer PAMP específicos: o receptor TLR-2 reconhece peptídeoglicanos de bactérias Gram positivas, enquanto que o LPS, que é um glicolípido hidrofóbico ligado a uma cadeia de carboidrato longa e ramificada presente na parede celular de bactérias Gram negativas, é agonista do receptor TLR-4 (PARK; LEE, 2013). No caso do LPS, sua porção lipídica a responsável pela maior parte dos efeitos imunológicos (TRENT et al., 2006).

São crescentes as evidências que sugerem a importância dos TLR e seus ligantes em várias patologias como a inflamação e as doenças auto-imunes. Ligantes dos receptores TLR-3, TLR-4 e TLR-9 exacerbam a resposta alérgica e inflamatória das vias aéreas em camundongos (CLARKE et al., 2013) e a deficiência na expressão do TLR-4 predispõe, por exemplo, à infecção por *Candida albicans* (NETEA et al., 2002). A hiperexpressão destes receptores em células imunes durante a sepse está associada ao dano e insuficiência de órgãos (TSUJIMOTO et al., 2008).

O LPS, o mais conhecido agonista de receptores TLR-4, é a ferramenta laboratorial aplicada neste e em diversos estudos para mimetizar a resposta inflamatória produzida por uma infecção bacteriana. Assim, será detalhado o mecanismo pelo qual esta resposta é produzida.

1.1 A ATIVAÇÃO DO TLR-4 E VIAS DE SINALIZAÇÃO

O TLR-4 é uma proteína transmembrana que ao reconhecer o LPS forma um complexo receptor-PAMP que a dimeriza. O domínio transmembrana extracelular rico em repetições de leucina é responsável pela ligação com o LPS, efetivamente. O domínio citosólico tem grande homologia com o domínio de sinalização citosólico do receptor de interleucina (IL)-1 (KAWASAKI; KAWAI, 2014), que também produz sua resposta via ativação do fator nuclear- κ B (NF κ B) provendo a expressão de genes inflamatórios como os de citocinas (incluindo a própria IL-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2).

Assim, o LPS promove a indução de uma cascata citoplasmática de sinalização recrutando diversas moléculas adaptadoras no interior da célula contendo o domínio TIR (TOLL/IL-1 receptor). Dentre estas moléculas está a proteína Myd88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) (MUZIO et al., 1997), a MAL (*MyD88 adaptor-like*) também chamada de TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) (HORNG et al., 2002), a TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon β*) ou TICAM-1 (*TIR domain-containing adaptor molecule-1*) (YAMAMOTO et al., 2003) e finalmente TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) ou TICAM-2 (OSHIUMI et al., 2003). Para uma resposta robusta, o TLR requer o recrutamento destas quatro moléculas adaptadoras.

São duas as possíveis vias de sinalização intracelular dos TLR, sendo uma via dependente de Myd88 e uma independente de Myd88 (FIG 1)

A via dependente de MyD88 é utilizada por todos os subtipos, exceto o TLR-3, que utiliza a via independente de MyD88. O TLR4 inicia a sinalização intracelular através de ambas: a via TIRAP-MyD88, que ativa precocemente o NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-12; e a via TRIF – TRAM, que ativa o fator de transcrição IRF3 (*interferon regulatory factor-3*) que regula os genes que codificam interferons (IFN) tipo I.

A estimulação da molécula MyD88 gera as mudanças conformacionais necessárias para promover a associação entre seu domínio TIR e o TLR na sua porção citoplasmática, recrutando a quinase IRAK-4 (IL-1R-associated kinase 4) responsável pela fosforilação e consequente ativação da IRAK-1 que, uma vez fosforilada, se dissocia da MyD88, ativando então, a TRAF-6 (TNFR-associated factor

6). Esta proteína adaptadora torna-se ativa a partir desta via e fosforila a TAK-1 (TGF- β -activated Kinase 1) (MUZIO et al., 1997).

A ativação da TAK-1 como resultado da sua fosforilação ativa as quinases do inibidor do NF- κ B (IKK) α e IKK β que formam um complexo com IKK γ (NEMO). Este complexo é essencial para a resposta ao LPS pois vai catalisar a fosforilação de uma proteína citoplasmática, a I κ B, que é uma proteína inibitória que se encontra ligada ao NF κ B. A fosforilação da I κ B permite a ligação com a ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, resultando na sua degradação pelo complexo proteossoma 26S e, finalmente, liberando o NF κ B ativo (ZANDI et al., 1997), que permite sua translocação núcleo e sua ligação a genes específicos, promovendo a expressão destes genes. Dentre estes genes, estão os genes inflamatórios já citados, como os das citocinas e COX-2.

Já a via independente de Myd88 ativa a produção e secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A subsequente ligação do TNF- α nos seu receptor leva à ativação de mais NF- κ B. Assim, esta via também chamada TRIF-TRAM também, é responsável pela fase tardia da resposta do NF- κ B através da secreção de IRF3 e TNF- α (BARTON; MEDZHITOV, 2003). Esta via está também envolvida na síntese de IFN e modulação da replicação viral.

1.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA PERIFERIA COMO RESPOSTA AO LPS

Comentado [AZ1]: Acho isso muito engraçado. Periferia do corpo? Eu tiraria isso.

Monócitos e macrófagos expressam TLR-4 em suas membranas e são as principais células capazes de sintetizar várias citocinas com diferentes cinéticas de liberação em resposta ao LPS.

Esta síntese já foi estudada em diferentes células monocíticas, tanto de murinos quanto humanas (KUBIN; CHOW; TRINCHIERI, 1994; ROSSOL et al., 2011) como a síntese de TNF- α (WANIDWORANUN; STROBER, 1993), IL-1 β (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011), IL-6 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014) e IL-12 (TRINCHIERI, 1995).

A IL-1 β , *per se*, é capaz de induzir sua própria síntese bem como a de outras citocinas como a IL-6 e o TNF- α , potencializando a resposta (TODA et al., 2002).

Citocinas agem de maneira autócrina, nas células responsáveis pela sua síntese, ou de maneira parácrina, quando nas células adjacentes. Produzidas apenas

em certas condições, estes peptídeos são biologicamente ativos em concentrações bastante baixas (nanomolar a picomolar) agindo em seus respectivos receptores que vão, então, induzir genes e potencializar a resposta inflamatória (SCAPIGLIATI; BUONOCORE; MAZZINI, 2006).

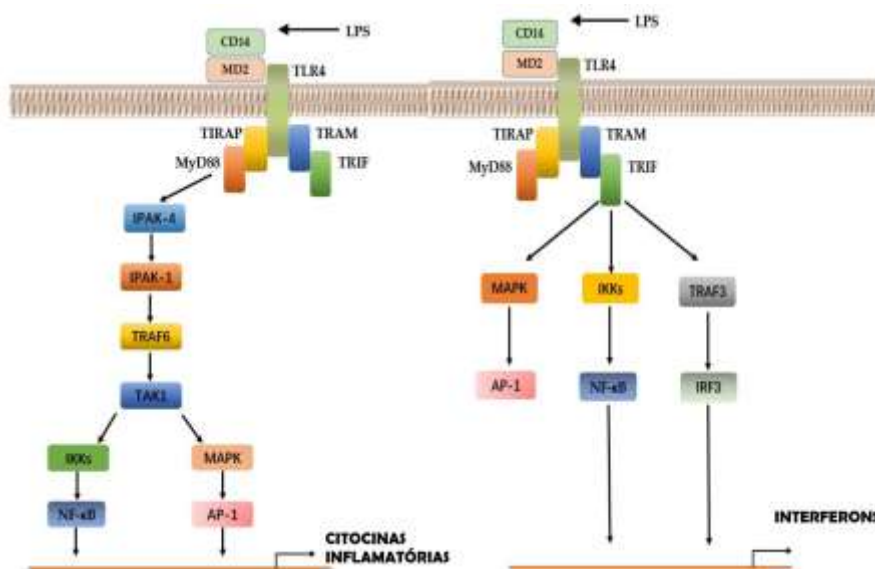


FIG 1 SÍNTESE DE CITOCINAS EM RESPOSTA AO LPS: As células que expressam o TLR-4 rapidamente reconhecem LPS e ativa as possíveis vias de sinalização intracelular que promovem a ativação de genes e síntese de citocinas e proteínas pró-inflamatórias. (FONTE: adaptado de LU; YEH; OHASHI, 2008)

1.3 O COMPORTAMENTO DE DOENÇA

Quando alguma substância que induz a síntese de citocinas, como o LPS, é perifericamente administrada nós podemos observar, tanto em animais como em humanos, o surgimento de sintomas comuns do processo infeccioso, como fadiga, perda de apetite, dor muscular e nas articulações.

Esta hipótese de que a inflamação sistêmica poderia alterar o comportamento já foi sugerida por William Osler no século XIX, quando propôs a apatia como critério

Comentado [AZ2]: Aqui vc chama de comportamento de doença. Até concordo que a maioria das resposta é comportamental mas a febre nao é um comportamento. Neste texto, eu dividiria o que é comportamento e o que não é.

diagnóstico para a “septicemia progressiva” (OSLER, 1912). Esta teoria foi demonstrada em pesquisas posteriores em que a alteração de humor induzida por citocinas pró-inflamatórias ou o tratamento de doenças virais e câncer com citocinas também induzia depressão (CAPURON; MILLER, 2004).

Estes componentes psicológicos e comportamentais da infecção representam, juntamente com a resposta febril, uma estratégia de sobrevivência altamente organizada, denominada síndrome de doença (*sickness syndrome*) (DANTZER, 2004). Nos anos 60, Ned Miller demonstrou que ratos que receberam LPS perderam o interesse nas recompensas em testes de condicionamento. Além disso, este autor descreveu como “paralisia da iniciativa” a sensação que sentiu quando estava gripado (MILLER, 1964). Mas apenas em 1988, Benjamin Hart descreveu o comportamento de doença como um estado de sonolência, depressão e inatividade (e.g. diminuição da movimentação espontânea) que permitiria o uso da energia para o gasto metabólico associado à febre e ao combate a infecção (HART, 1988). Hart descreveu neste estudo que esta condição é comum em muitos mamíferos, incluindo o homem.

Alguns estudos se dedicaram a explicar como estas citocinas conseguem promover alterações comportamentais e febre ao agir no sistema nervoso central (SNC), já que são peptídeos grandes e hidrofílicos, características que não as permitem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (DANTZER, 2001).

As duas principais teorias tratam de uma rota neural, que se dá pela sinalização aferente periférica que parte do local inflamado, teoria esta já demonstrada através da vagotomia subdiafrágica em animais (KOBZYCKA et al., 2019; LUHESHI et al., 2000); ou da via humoral, que evidencia a produção de citocinas pró-inflamatórias por células fagocíticas expressas no órgão circunventricular (OCV) e no plexo coróide, propagando este sinal imune ao parênquima cerebral (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Independentemente da maneira, temos como resultado uma regulação fina entre o processo infeccioso e o comportamento. A administração de LPS periféricamente mimetiza sintomas como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), anorexia e redução da atividade motora (comportamento de doença) (BELLAVANCE; RIVEST, 2014; HENNESSY; DEAK; SCHIML, 2014) e também a resposta febril.

Usualmente assumimos que o sistema imune e o comportamento social são processos distintos, mas temos cada vez mais evidências de que o cérebro reconhece

moléculas sinalizadoras do processo infeccioso e regula não só os sintomas de doença, mas também o comportamento social (EISENBERGER; MOIENI, 2020; MOIENI; EISENBERGER, 2018). Esta relação entre a resposta inflamatória e o comportamento social pode ter proporcionado uma grande vantagem para a sobrevivência. O comportamento de doença se mostra particularmente importante pois permite que o indivíduo, por ora mais suscetível, ajuste o comportamento para que sobreviva a este período de vulnerabilidade.

Para isso, espécies que vivem em sociedade reduzem a mobilidade, inclusive para a procura de alimento, com objetivo de poupar energia e também identificar e evitar experiências sociais ameaçadoras (EISENBERGER et al., 2009). A hiperalgesia generalizada tem um caráter protetivo ao restringir ainda mais mobilidade. Assim, posto que a resposta inflamatória modula o comportamento social, temos que o comportamento social também é um potente modulador da resposta imune.

Dada a importância do vínculo social para a sobrevivência de diversas espécies, incluindo a humana (LIEBERWIRTH; WANG, 2014), e que o isolamento compromete a sobrevivência por aumentar o risco de predação e infecção, trabalhos recentes sugerem que o sistema imune responde ao isolamento induzindo genes pró-inflamatórios e a síntese de citocinas na tentativa de preparar o corpo para esta situação vulnerável (COLE et al., 2007). As evidências que temos quanto ao isolamento social e à diminuição da movimentação espontânea são de estudos realizados com ratos adultos, em que a administração sistêmica de LPS reduziu o interesse destes ao serem apresentados a novos ratos (BLUTHE; DANTZER; KELLEY, 1992).

Pesquisas com animais e humanos mostram que agentes estressores como separação e isolamento (YANG et al., 2013), derrota social (WEBER; GODBOUT; SHERIDAN, 2017) e rejeição (SLAVICH et al., 2010) ativam a resposta pró-inflamatória transitoriamente ou até por um longo período (EISENBERGER; MOIENI, 2020) mostrando a capacidade que o comportamento tem em modular a resposta inflamatória. Alguns estudos já foram conduzidos para entender a base molecular envolvida nestes sintomas do comportamento de doença. O pré-tratamento com inibidor seletivo da recaptção de serotonina reverteu a prostração produzida pelo LPS, enquanto que inibidores da recaptção de norepinefrina e dopamina parecem não influenciar este comportamento de doença (DELLAGIOIA et al., 2013;

HANNESTAD et al., 2011) evidenciando novamente que alterar o comportamento (como o do tipo depressivo) modula a resposta inflamatória.

A hiperalgesia é classicamente mais estudada dentre os comportamentos que são resultado da inflamação, mas atualmente vemos que outros comportamentos são, da mesma maneira, importantes na modulação desta resposta. Apesar de termos também na literatura grandes avanços nos estudos de dor, estudos com os outros comportamentos como anedonia e atividade locomotora são escassos.

Por outro lado, a resposta febril, apesar de não ser um comportamento e sim um sinal da síndrome de doença que acompanha os outros comportamentos, tem elucidada de maneira mais clara seu mecanismo de ação e moléculas capazes de induzi-la.

Deste modo, nos subitens subsequentes iremos sumarizar o conhecimento atual sobre dois dos fenômenos mais estudados na síndrome de doença: a resposta febril e a hiperalgesia.

1.4 A RESPOSTA FEBRIL

A febre é definida como o aumento controlado da temperatura corporal considerada normal devido a um reajuste do controle hipotalâmico, por ação de mediadores da resposta imune (KLUGER, 1991). Desde a antiguidade se discute a importância da febre, gerando grande discussão sobre seu benefício no processo de recuperação do organismo (MACKOWIAK, 1998).

O trabalho de Kluger foi um dos primeiros a demonstrar que, durante a infecção causada pela injeção de cepas da bactéria Gram negativas *Aeromonas hydrophila*, lagartos tendiam a procurar um ambiente mais quente para aumentar sua temperatura corporal, e que impedir esse comportamento aumentava a mortalidade dos animais (KLUGER; RINGLER; ANVER, 1975). Este autor também mostrou que a supressão farmacológica deste comportamento com salicilato reduziu a taxa de sobrevivência (BERNHEIM; KLUGER, 1976). Alterações comportamentais com o objetivo de aumentar a temperatura corporal já foram descritas em diferentes espécies, incluindo artrópodes (HASDAY; THOMPSON; SINGH, 2014).

Como descrita anteriormente, a resposta imune é caracterizada pelo rápido reconhecimento da PAMP ou DAMP por TLR, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, agora nomeadas pirogênios endógenos, que vão alterar o controle da temperatura no SNC. São reconhecidas como pirogênios endógenos as citocinas: 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) (DANTZER, 2001; DINARELLO; CANNON; WOLFF, 1988; KLUGER et al., 1995; SOARES et al., 2008, 2009; ZAMPRONIO et al., 1994)

Esta alteração no controle da temperatura se dá seja por suas ações nos receptores do nervo vago, ou pela ação nos órgãos circunventriculares, uma série de pequenas áreas ao redor do sistema ventricular encefálico que é ricamente vascularizada e de permeabilidade única devido à ausência da BHE.

As citocinas periféricas induzem à síntese e liberação de mediadores centrais como prostaglandinas (PG) E₂ (pela indução conjunta de COX₂ e prostaglandina E sintase 1) (PECCHI et al., 2009; ROTH; BLATTEIS, 2014), fator liberador de corticotrofina (CRF) (ROTHWELL, 1989), opióides 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) resultando em um reajuste no ponto de regulação da temperatura. Este reajuste promove alteração nos disparos dos neurônios hipotalâmicos que passam a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5-37°C.

Algumas citocinas, entretanto, parecem ser sintetizadas diretamente no SNC como a CXCL8 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*), IL-8, CXCL1/CINC-1 (Interleucina-8/cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1) e MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) (MIÑANO et al., 1996; SOARES et al., 2008; ZAMPRONIO et al., 1994).

As PG são derivadas do ácido araquidônico por ação da COX e são certamente a classe de mediadores centrais mais relevantes para a febre, bem como outros sintomas do comportamento de doença (PECCHI et al., 2009). Existem duas isoformas de COX: a COX₁ que é constitutivamente ativa em muitos tecidos e a COX₂ que é induzida principalmente durante a resposta inflamatória e febril. A administração

Comentado [AZ3]: abreviaturas sem significado.

periférica de LPS induz a expressão de COX₂ no cérebro, em células perivasculares e endoteliais ao longo de pequenas vênulas (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2002). Várias outras enzimas participam da formação de prostaglandinas e entre elas a PGE sintase 1 (mPGES₁) que forma PGE₂.

Com a síntese de PG inicia-se também a síntese de moléculas inflamatórias na micróglia e astrócitos, que vão sustentar a reposta de febre, e outros efeitos neurológicos do comportamento de doença (D'MELLO et al., 2013).

Embora existam evidências da participação de outras PG, as participações da PGE₂ e do receptor EP₃ parecem ser essenciais na febre (LAZARUS ET AL. 2007 E USHIKUBI ET AL. 1998). Este receptor é expresso em grande quantidade no núcleo pré-óptico mediando (MnPO), área hipotalâmica fundamental para a resposta febril e especialmente sensível a ação deste mediador (SCAMMELL et al., 1996).

Os neurônios no MnPO que expressam receptores EP₃ são gabaérgicos inibitórios, inibindo ativamente as vias descendentes responsáveis pelo aumento da temperatura corporal (NAKAMURA et al., 2002). Estes receptores, particularmente os α e γ EP₃, são acoplados à proteína Gi e uma vez ativados pela PG desinibem as vias descendentes.

Estes neurônios gabaérgicos projetam-se para o hipotálamo dorso medial e para rafe bulbar rostral que, quando ativadas (desinibidas), ativam respostas de produção de calor como a ativação do tecido adiposo marrom e tremor muscular e de conservação de calor como a vasoconstrição periférica, que resulta em febre (NAKAMURA, 2011). O aumento da temperatura é controlado pois receptores de potencial transitório (TRP) M₂ expressos em uma subpopulação de neurônios hipotalâmicos são ativados com o aumento da temperatura, prevenindo o superaquecimento (SONG et al., 2016).

1.5 A HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA

A dor, denominada como dor nociceptiva, pode ocorrer através da ativação de receptores presentes em fibras nociceptivas. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é “uma experiência sensorial e

Comentado [AZ4]: Você descreveu neste capítulo, hiperalgesia de maneira geral. Não falou nada sobre a HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA. Se deixar assim será criticado por isso. Poderia pelo menos mostrar que citocinas e prostaglandinas estão envolvidas na hiperalgesia da síndrome de doença propriamente dita.

emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (LOESER; TREEDE, 2008).

As fibras nociceptivas tem diferenças anatômicas que influenciam diretamente a condução do estímulo, podendo ser do tipo C ou A δ . As fibras A δ são finamente mielinizadas, com diâmetro e condução média, enquanto as fibras C são amielinizadas, de pequeno diâmetro e, portanto, com baixa velocidade de condução.

Os receptores presentes nestas fibras nociceptivas são especializados de tal forma, que se tornaram sensíveis aos estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Estes receptores ou nociceptores são definidos pela IASP como receptores sensitivos de alto limiar do sistema nervoso somatosensorial periférico, capazes de codificar e transmitir estímulos nociceptivos através da atividade elétrica (LOESER; TREEDE, 2008).

A atividade elétrica é amplificada pela abertura dos canais de sódio, gerando um potencial de ação, que se propaga no neurônio nociceptivo aferente primário até seu corpo celular no gânglio da raiz dorsal e trigeminal. Os neurônios nociceptivos aferentes primários adentram a medula pelo corno dorsal até as lâminas superiores I e II do corno dorsal da medula espinhal e liberam neurotransmissores como SP (HUNT; ROSSI, 1985) e aminoácidos excitatórios (AANONSEN; LEI; WILCOX, 1990) a fim de ativar neurônios secundários. Neste processo pode ocorrer o que a IASP define como uma “maior responsividade dos neurônios nociceptivos no SNC à sua entrada aferente normal” caracterizando a sensibilização central (LOESER; TREEDE, 2008).

A primeira evidência de um componente de hipersensibilidade central foi fornecida em 1983 (WOOLF, 1983). As respostas eletrofisiológicas de neurônios motores α de ratos foram usadas para medir a resposta ao sistema nociceptivo, neste caso a resposta reflexa do *flinching*, provocado por estímulos nociceptivos.

Estímulos térmicos nocivos geram uma inflamação leve da pata que promove o aumento duradouro da excitabilidade dos neurônios motores, aumentando a sensibilidade. Os neurônios motores passam a não ser mais específicos para estímulos nociceptivos e podem ser ativados por estímulos como o toque leve e que ocorre devido a mudanças no SNC.

Após a primeira demonstração de sensibilização central, alterações virtualmente idênticas foram descritas em diferentes estudos com neurônios nas

Comentado [AZ5]: Os receptores NAO sao os nociceptores. O nociceptor é a terminação nervosa livre. Os receptores são as proteínas na membrana da célula

lâminas I e V do corno dorsal da medula (COOK; WOOLF; WALL, 1986), bem como no tálamo (DOSTROVSKY; GUILBAUD, 1990) e amígdala (NEUGEBAUER; LI, 2003).

Mais recentemente imagens de encefalografia mostraram, em voluntários saudáveis, que outras estruturas cerebrais também estão implicadas no processamento central da dor (núcleo parabraquial da da PAG, córtex pré-frontal) e que também mostram mudanças compatíveis com o aumento da sensibilidade correspondente à sensibilização central (MAIHÖFNER et al., 2010).

A sensibilização central é induzida após estímulos nociceptivos intensos, repetidos e sustentados (HSIEH et al., 2018). A lesão do tecido periférico não é necessária; no entanto, o nível de estímulo nociceptivo que produz lesão do tecido quase sempre induz sensibilização central.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório primário na via da dor que ativa os receptores NMDA. Esta é uma etapa essencial para iniciar e manter a sensibilização central e a hipersensibilidade à dor após lesão de tecido e nervo. A ativação dos receptores NMDA aumenta a eficácia sináptica e causa o influxo de Ca^{2+} , que pode ativar as vias de sinalização intracelular que iniciam e mantêm a sensibilização central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; REN et al., 1992)

De forma ascendente, o neurônio de segunda ordem é ativado e transporta a mensagem nociceptiva para o SNC pela via espinotalâmica (ao tálamo e córtex somatossensorial) onde os aspectos sensoriais e discriminativos da dor serão processados (KUNER, 2010) e a rota espinoparabraquial (ao córtex insular e cíngulo através da amígdala) contribuindo para o componente emocional de percepção da dor (BASBAUM et al., 2009).

Esta transmissão ascendente também é responsável pela ativação dos neurônios no RVM e substância cinzenta periaquedutal (PAG) que são estruturas relacionadas ao mecanismo descendente de controle da dor

O LPS é também usado como modelo de hiperalgesia já que induz mediadores inflamatórios como bradicinina (BK) (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993), TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (POOLE et al., 1999) que podem sensibilizar os terminais de neurônios nociceptivos periféricos. Alguns destes mediadores como a BK, TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzem a expressão de COX-2 e conseqüentemente de PG, que em última análise, levam ao estabelecimento da hiperalgesia através do aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofostato cíclico (AMPc). A sinalização por AMPc

Comentado [AZ6]: Nunca ouvi este termo. E esta abreviatura não está na lista.

Comentado [AZ7]: abreviatura apareceu antes mas só foi definida agora.

desempenha um papel fundamental na sinalização da dor (HURTADO DEL POZO et al., 2019).

Camundongos deficientes em adenilato ciclase, responsável para conversão de ATP em AMP_c, estão protegidos contra a dor inflamatória (WEI et al., 2002). A contribuição da proteína quinase A (PKA) para dor tem sido também extensivamente estudada por ser ativada por AMP_c (ALEY; LEVINE, 1999; TAIWO; LEVINE, 1991).

Já a proteína trocadora diretamente ativada por AMP_c (Epac1) é uma descoberta mais recente que participa da sinalização por AMP_c (SINGHMAR et al., 2016). Epac 1 também é requerida para dor inflamatória.

É importante salientar que a maioria das citocinas envolvidas na dor inflamatória, como a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α , (VANDERWALL; MILLIGAN, 2019) e as PG (KAWABATA, 2011), também estão envolvidas na resposta febril, discutida acima.

Embora a participação destes mediadores sejam conhecidos no sítio inflamatório, o mesmo não ocorre em nível sistêmico. Quando o LPS ou alguns destes mediadores atingem a circulação, os indivíduos experimentam uma hiperalgesia generalizada e, embora esses mecanismos não sejam claros, sua função como mecanismo protetor, como descrito anteriormente, é reconhecida. A injeção intraperitoneal, portanto sistêmica e não local, de LPS ou de citocinas como IL-1 β e TNF- α também aumenta a sensibilidade nociceptiva em roedores sugerindo que um processo hiperalgésico sistêmico está ocorrendo (MAIER et al., 1993; WATKINS et al., 1995). Duncan et al., (2013) demonstraram também que o LPS administrado por via intraperitoneal poderia induzir concomitantemente hiperalgesia térmica e febre (DUNCAN et al., 2013).

A administração intratecal de LPS (1 μ g) em ratos também induziu uma hiperalgesia que durou aproximadamente 4 h. Concomitantemente houve um aumento dos níveis de IL-1 β e IL-6 na medula espinhal dorsal (LORAM et al., 2011).

Em 2012, Yoon et al. demonstraram que a administração intraperitoneal de altas doses de LPS (1 mg/kg) induziu hiperalgesia térmica 6 e 9 h e hiperalgesia mecânica 6, 9 e 12 h após a administração do estímulo (YOON et al., 2012). Paralelamente, os autores demonstraram que também ocorreu uma resposta febril que foi evidente até 24 h após a administração. Os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e RANTES em ambos, gânglio dorsal e medula espinhal apresentaram-se aumentados (YOON; PATEL; DOUGHERTY, 2012). Estes dados

Comentado [AZ8]: Inclui este trecho que tirei do seu projeto e fala do envolvimento de LPS, citocinas e prostaglandinas na hiperalgesia da síndrome de doença. As referencias estou enviando em anexo.

corroboram o envolvimento de citocinas, particularmente aquelas geradas durante a febre, na hiperalgesia mecânica e térmica ao LPS.

Já foi também demonstrado também que a injeção i.c.v. de LPS induziu hiperalgesia térmica e mecânica na pata traseira de ratos 6 h e 24 h após a administração (WALKER et al, 1996). Esta resposta foi acompanhada por uma resposta febril, como era esperado. Todas estas respostas foram abolidas pela administração central de antagonista de receptores B₂ de bradicinina HOE140 e pelo inibidor de COX indometacina (WALKER et al, 1996). Estes dados sugerem que a hiperalgesia térmica e mecânica observada durante a síndrome de doença envolve mecanismos centrais e a participação de bradicinina e prostaglandinas.

Quando o LPS foi injetado por via endovenosa também se observou uma hiperalgesia inicial seguida após algumas horas por hipoalgesia (HORI et al., 2000). Outros estudos demonstraram que, mesmo em doses relativamente baixas, a injeção intravenosa de LPS promoveu uma diminuição da latência ao calor nocivo (ABE et al., 2001). De maneira similar, inibidores de COX administrados na PO/HA inibiram esta resposta sugerindo a participação central de PG nesta resposta de maneira similar ao que ocorre na resposta febril. É interessante observar ainda que a área MnPO do hipotálamo projeta-se para a PAG que é conhecida por mediar respostas antinociceptivas (RIZVI et al., 1996; USCHAKOV et al., 2007).

Existem também evidências da participação de receptores EP₃ nesta hiperalgesia induzida por LPS, embora não esteja definido que os receptores envolvidos estejam no SNC. Animais *knock-out* para receptores EP₃ apresentaram uma hiperalgesia reduzida após a administração sistêmica de LPS (UENO et al., 2001). Em adição, a injeção i.c.v. de PGE₂ reduziu a latência de retirada da pata e aumentou a taxa de disparo de neurônios trigeminais espinais para o *pinching* nocivo (HORI et al., 2000). Este efeito de hiperalgesia é replicado pela injeção i.c.v. de um agonista de EP₃ (HORI et al., 2000) portanto o envolvimento de citocinas e PG na hiperalgesia induzida pela administração periférica de LPS está relativamente bem documentado.

Assim, a resposta febril e a hiperalgesia possuem muitos mediadores comuns e, portanto, não é surpresa que estejam presentes em patologias que possuem a síndrome de doença como característica, como o caso de infecções bacterianas.

Além destes mediadores que tem seu papel relativamente reconhecido, como descrito acima na resposta febril e na hiperalgesia, um outro mediador que parece

estar envolvido tanto na febre como em respostas nociceptivas em geral é a ET-1 (FABRICIO et al., 1998; HANS; SCHMIDT; STRICHARTZ, 2009). No entanto, diferentemente dos outros mediadores, seu papel, particularmente nos comportamentos relacionados à síndrome de doença (hiperalgesia, anedonia e hipolocomoção), não é conhecido e será objeto de estudo neste trabalho. Estudos iniciais da atividade fisiopatológica da ET-1 ampliaram o interesse no envolvimento deste sistema em outras doenças, não só em função da sua capacidade vasoativa, mas como algogênico, e por sua capacidade de modular a dor. A síntese e liberação de ET-1 se dá em diversos tipos celulares e pode ser aumentada ou diminuída por vários fatores tanto fisiológicos como patológicos. O óxido nítrico (NO) e o peptídeo natriurético atrial, por exemplo, inibem sua produção (CARDUCCI; JIMENO, 2006) enquanto que fatores de crescimento, angiotensina II, norepinefrina, vasopressina, bradicinina, o estresse mecânico, o dano tecidual, a hipóxia e as citocinas pró-inflamatórias induzem a sua síntese (AHN et al., 1998; KOPETZ; NELSON; CARDUCCI, 2002; PIERRE et al., 1997). (RUBANYI; POLOKOFF, 1994). Sabemos que a ET-1 plasmática está aumentada em muitas condições patológicas nas quais estes fatores também participam e que tem a dor como um dos sintomas.

Estudos iniciais em animais de experimentação demonstraram que administração periférica de ET-1 produziu dor e hiperalgesia em camundongos e ratos, respectivamente (FERREIRA; ROMITELLI; DE NUCCI, 1989). Subsequentemente, Raffa e colaboradores corroboraram estes resultados confirmando que a administração sistêmica de ET-1 (por via i.p.) induziu nocicepção em camundongos, e que esta resposta dependia tanto da ativação dos receptores ET_A como de ET_B (RAFFA; SCHUPSKY; JACOBY, 1996). A administração periférica de ET-1 também produziu dor e hiperalgesia mecânica e térmica em humanos (HANS et al., 2007).

Estudos subsequentes, entretanto, mostraram que a ET-1 pode exercer diferentes ações no local da injeção, tanto pronociceptivos como antinociceptivos. Piovezan et al. mostraram que ET-1 produz hiperalgesia mediada por receptores ET_A, e que a ativação concomitante de receptores ET_B pode limitar essa resposta em camundongos (PIOVEZAN et al., 2000). De maneira similar, Khodorova et al. mostraram que a ativação periférica e local dos receptores ET_A induziu nocicepção, e que a ativação do receptor ET_B inibiu essa resposta (KHODOROVA et al., 2002). Em trabalhos posteriores, foi demonstrado que este efeito antinociceptivo foi

Comentado [AZ9]: Acrescentar,:

Raffa RB, Jacoby HI. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. *Life Sci.* 1991;48(17):PL85-PL90. doi:10.1016/0024-3205(91)90130-4

relacionado à ativação de receptores ET_B nos queratinócitos por produzir uma subsequente liberação de β-endorfina (HUNG et al., 2012).

No entanto, Motta et al. mostraram que em ratos, uma injeção intraplantar de ET-1 induziu uma resposta nociceptiva seguida de hiperalgesia mecânica e térmica de desenvolvimento lento e de longa duração (MOTTA et al., 2009). Este estudo demonstrou ainda que receptores TRPV1 contribuem seletivamente para a hiperalgesia térmica mas não para a nocicepção induzida por ET-1, e que ambos os receptores contribuíram para o estabelecimento da hiperalgesia. Em estudos subsequentes, foi demonstrado em ratos que ambos os receptores participam da hiperalgesia induzida por ET-1 (MOTTA et al., 2009). Em todos esses estudos, a ET-1 foi administrada em uma faixa de dose que variava entre 0,3 a 10 pmol. Estes estudos sugeriram que, pelo menos quando se está considerando a produção periférica de ET-1, o papel dos receptores ET_A está claramente mais relacionado à hiperalgesia, enquanto que o receptor ET_B parece um papel mais complexo de modulação desta resposta. A participação de receptores ET_B na indução de hiperalgesia periférica parece ocorrer em algumas condições onde há um aumento da sua expressão, como no modelo de ligadura do nervo espinhal ou pela administração de LPS em articulações previamente sensibilizadas com carragenina (DE-MELO et al., 1998).

Quanto ao envolvimento da ET-1 produzida no sistema nervoso central, os estudos de Nikolov et al. mostraram inicialmente que a administração i.c.v. de ET-1 em camundongos (0,625-5 pmol) produziu um efeito antinociceptivo no teste da placa quente (NIKOLOV et al., 1992). Posteriormente, Hasue et al. mostraram que injeções de doses mais altas de ET-1 (3-10 pmol, i.c.v.) em camundongos aumentaram o limiar de retirada da pata no teste da placa quente 30 e 60 min após a administração, e esse efeito foi bloqueado pela administração de BQ123 (HASUE et al., 2004). Esses autores também demonstraram que o antagonista dos receptores ET_B BQ788 induziu antinocicepção e potencializou o efeito antinociceptivo da ET-1. Esses estudos em conjunto sugeriram que a ET-1 também pode ter ações antinociceptivas e pronociceptivas no sistema nervoso central. No entanto, ao contrário do que se observava perifericamente, a ativação do receptor ET_A promoveu ações antinociceptivas, uma vez que o aumento do limiar térmico de retirada da pata induzido por ET-1 foi bloqueado por BQ123, e a ativação do receptor ET_B estaria envolvida em ações pronociceptivas, pois o BQ788 aumentou a mesma resposta.

Comentado [AZ10]: Motta EM, Chichorro JG, Rae GA. Role of ET(A) and ET(B) endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. *Neurosci Lett.* 2009;457(3):146-150. doi:10.1016/j.neulet.2009.03.055

Essas possibilidades foram apoiadas por um estudo anterior, de D'Amico et al. 1996, que relatou o efeito antinociceptivo da ET-1 quando injetada diretamente na PAG, uma área reconhecidamente associada à modulação de respostas nociceptivas (D'AMICO et al., 1996). Essas ações opostas podem estar relacionadas às ações diferenciais da ET-1 nos seus dois subtipos de receptor mas, primeiramente, variações anatômicas na expressão dos receptores também devem ser levadas em consideração.

Perifericamente, o receptor ET_B é expresso principalmente em células endoteliais (GHONEIM et al., 1993), no músculo liso vascular (SHETTY et al., 1993), em macrófagos (SAKURAI-YAMASHITA et al., 1997) e em queratinócitos na derme e na epiderme (onde as terminações periféricas dos nociceptores estão localizadas) (HUNG et al., 2012). Por outro lado, o receptor ET_A é expresso nas terminações nervosas nociceptivas propriamente ditas, bem como nos axônios e nos corpos celulares dos nociceptores localizados no DGR (POMONIS et al., 2001). Em contraste, no DRG, os receptores ET_B são encontrados exclusivamente nas células gliais e células de Schwann que são responsáveis pela mielinização das fibras nociceptivas, mas não nos nociceptores propriamente ditos. A proporção ET_A/ET_B é de 60:40. Estudos subsequentes de Hung et al. também sugeriram que a superexpressão de receptores de ET-1 nos astrócitos (mas não nas células endoteliais) reduziu a fase inflamatória da nocicepção induzida por formalina em camundongos (HUNG et al., 2012). Os astrócitos são reguladores chave do sistema imunológico inato e adaptativo durante o processo infeccioso, com evidências tanto *in vivo* quanto *in vitro* (OWENS; KRIEGSTEIN, 2002). A exposição ao LPS promove neuroinflamação e ativação dos astrócitos, já descrita em ratos, em áreas como hipocampo e córtex pré-frontal (HUANG et al., 2015). Uma vez ativados os astrócitos passam a expressar altos níveis de ET-1 e um simultâneo aumento na expressão de seus receptores, principalmente receptores ET_B (JIANG et al., 1993; KALLAKURI et al., 2010; KOYAMA; MICHINAGA, 2012). Assim, é possível que a mudança na expressão dos receptores ET_B promovida em algumas condições patológicas, alterem seu papel na hiperalgesia. Mais estudos são necessários para esclarecer este ponto.

Deste modo, detalharemos um pouco melhor as características do sistema endotelinérgico no sentido de contribuir com o entendimento das discussões posteriores.

1. 6 O SISTEMA ENDOTELINÉRGICO E OS FENÔMENOS DA SÍNDROME DE DOENÇA

Endotelinas são uma família de peptídeos naturalmente presentes no organismo e reguladas de maneira autócrina devido a fatores fisicoquímicos como fluxo sanguíneo (MALEK; IZUMO, 1992), estiramento mecânico (MACARTHUR et al., 1994) ou pH (WESSON; SIMONI; GREEN, 1998), implicando na produção de fatores de crescimento (MATSUURA et al., 1998; PEIFLEY; WINKLES, 1998) e relacionados a diversos processos fisiológicos e patológicos.

Até o momento são conhecidos, em humanos, 3 peptídeos distintos (ET-1, ET-2 e ET-3) com 21 aminoácidos cada e que são produto de genes distintos, localizados nos cromossomos 6, 1 e 20, respectivamente (BLOCH et al., 1991). Os genes para os três peptídeos de ET são também encontrados em tecidos suínos e bovinos, sugerindo que estão presentes em mamíferos de maneira geral (SAIDA; MITSUI; ISHIDA, 1989). A ET-1, especificamente, foi isolada e sequenciada pela primeira vez em 1988, a partir do sobrenadante de células endoteliais da aorta suína, por Yanagisawa e colaboradores (YANAGISAWA et al., 1988). ET-2 e ET-3 foram isoladas em consequência do isolamento do gene da ET-1 (INOUE et al., 1989).

ET são amplamente distribuídas, sendo que a ET-1 é a mais abundante dentre elas (MASAKI, 1993). São sintetizadas e secretadas por diferentes tipos celulares como macrófagos, leucócitos (LÜSCHER; BARTON, 2000), astrócitos (HOSTENBACH et al., 2016), micróglia (SPECIALE et al., 1998), cardiomiócitos e células endoteliais (MASAKI, 1993).

A ET-1 é produzida a partir de um pré-peptídeo, chamado pré-proendotelina-1, o precursor protéico grande de 200 aminoácidos que uma vez clivado produz a *big-endotelina-1* que é a forma circulante, porém não funcional (RUBANYI; POLOKOFF, 1994). A conversão na forma biologicamente ativa é enzimática. Assim, a etapa passo limitante para a síntese da ET-1 é a ação das enzimas conversoras de endotelina (ECE) (HUNTER; TURNER, 2006), que permite sua ação biológica. A ET-1 é rapidamente degradada por proteases extracelulares e o seu tempo de meia vida plasmática é de 7 minutos (RUBIN; LEVIN, 1994).

A ET-1 age via dois receptores que são codificados por dois genes distintos, localizados nos cromossomos 4 e 13 (SAKURAI; YANAGISAWA; MASAKI, 1992) e

bastante homólogos, principalmente na porção transmembrana. Os domínios 2 e 5, em particular, parecem ser essenciais para especificidade do receptor (BOIVIN et al., 2004). A sequência de aminoácidos destes receptores difere entre humanos e outras espécies, com uma diferença de 9% na sequência do ET_A e de 12% do ET_B humano, quando comparado com os de ratos (DAVIE et al., 2002).

Estes receptores apresentam diferente seletividade ao ligante. A ET-1 e a ET-2 tem maior afinidade pelo receptor ET_A do que a ET-3, enquanto que os três ligantes tem afinidade semelhante pelo receptor ET_B (SAKURAI; YANAGISAWA; MASAKI, 1992)

Os receptores ET_A e ET_B compartilham a mesma via G_{q/11} de sinalização (HOUDE; DESBIENS; D'ORLÉANS-JUSTE, 2016) (FIG 2). Assim, a ação da ET nestes receptores promove a ativação da fosfolipase C, que age na molécula fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) que gera inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol. O IP3 vai então se ligar ao seu receptor no retículo endoplasmático liberando Ca²⁺ no citosol (HOUDE; DESBIENS; D'ORLÉANS-JUSTE, 2016). Os receptores ET_B podem ainda estar associados a G_s e G_i, que promovem ativação ou inibição da adenilato ciclase, respectivamente, alterando assim os níveis de AMPc (DAVENPORT et al., 2002).

Comentado [AZ11]: Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):219-226. doi:10.1124/pr.54.2.219

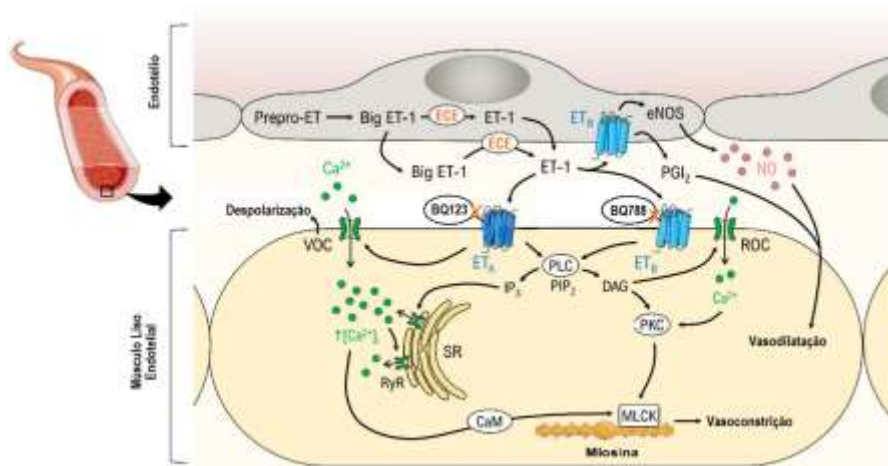


FIG 2 ESQUEMA SIMPLIFICADO DA SÍNTESE E AÇÃO DA ET-1 NOS RECEPTORES ET_A E ET_B : A ET-1 sintetizada por ação das enzimas conversoras de ET agirá nos receptores acoplados à proteína G, ativando a fosfolipase C (PLC) que processa fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ age no seu receptor presente no retículo endoplasmático (SR) liberando cálcio (Ca²⁺) no citosol. Calmodulina (CaM), Quinase miosina de cadeia leve (MLCK), proteína quinase (PK) (FONTE: adaptado de KRÜGER 2020).

Esta é a via clássica de sinalização da ET-1. Sabemos entretanto que a ativação do receptor ET_A nas células de miócitos ventriculares e células intersticiais da medula renal gera a síntese de DAG pela desfosforilação do ácido fosfatídico (CLERK; SUGDEN, 1997; FRIEDLAENDER et al., 1993). Nas células tumorais, estimula tirosina quinase resultando da indução da via MAPK/ERK (NELSON et al., 2003).

Quanto ao receptor ET_B já foi demonstrado que ativa a via PI3-K/Akt (KHIMJI; ROCKEY, 2010). Os dois subtipos de receptores são desensibilizados rapidamente, em aproximadamente 4 minutos (FREEDMAN et al., 1997). A ET-1 e seus receptores são encontrados ao longo de toda a via de sinalização da dor (FIG 3).

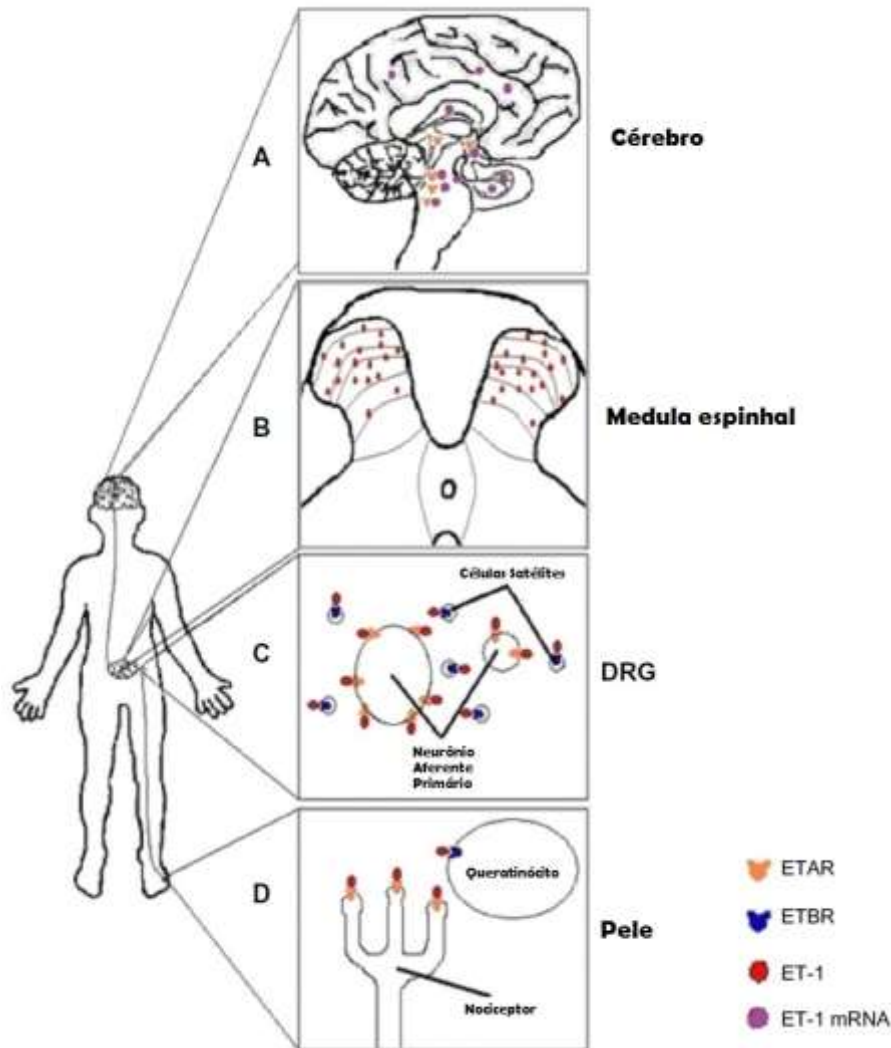


FIG 3: ET-1 E SEUS RECEPTORES SÃO ENCONTRADOS AO LONGO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA DOR: A ET e seus receptores são encontrados no hipocampo, amígdala, hipotálamo, núcleos da rafe, *locus ceruleus*, medula e diversos tipos celulares. (FONTE: adaptado de SMITH et al., 2014)

Comentado [AZ12]: Esta figura não pode aparecer com as palavras em inglês. E ainda vão te questionar se vc tem autorização para usar tanto esta quanto as outras duas figuras. Mesmo citando a fonte.

Em 1998, Fabrício e colaboradores demonstraram que, além da injeção i.c.v. de ET-1 induzir febre, a resposta febril induzida por LPS poderia ser bloqueada pelo antagonista de receptores ET_B BQ788 mas não pelo antagonista de receptores ET_A BQ123, sugerindo que a ET-1 participaria da resposta febril induzida por endotoxina somente através da ativação de receptores ET_B. Outros estudos posteriores também evidenciaram a atividade pirogênica da ET-1 (BRITO et al., 2020, 2016; SOARES et al., 2009). No entanto, embora a ET-1 participe da febre induzida por LPS (FABRICIO et al., 1998) demonstramos anteriormente que este mediador não participa da resposta febril induzida pelo ácido poliinosínico: policitidílico (Poli I:C) em ratos (BASTOS-PEREIRA et al., 2015). Mais recentemente, estudos realizados em nosso laboratório, demonstraram que este peptídeo também está envolvido na resposta febril induzida por LPS em ratas através de receptores ET_B, mas não em ratas ovariectomizadas sugerindo que o sistema endotelinérgico poderia estar sob forte controle dos hormônios sexuais femininos (COELHO et al., 2020).

No entanto, em estudos recentes em nosso laboratório observamos que a resposta febril observada durante a sepse no modelo de ligadura e punção do ceco, é acompanhada pela ativação de um importante mecanismo de conservação de calor que é a vasoconstrição cutânea (LEITE-AVALCA et al., 2016). Esta vasoconstrição cutânea foi bloqueada pelo tratamento dos animais com o antagonista de receptores ET_A BQ123 administrado diretamente no sistema nervoso central (LEITE-AVALCA, 2018). Estes dados sugeriram que, além dos receptores ET_B, os receptores ET_A também poderiam estar envolvidos na resposta febril induzida por LPS

Embora a ET-1 esteja envolvida na resposta febril, que é um componente importante na síndrome de doença, e o sistema endotelinérgico esteja presente nas vias de sinalização de dor, como mostrado na figura 3, não encontramos estudos que avaliem o papel deste mediador na hiperalgesia e em outros comportamentos relacionados especificamente na síndrome da doença. De maneira geral, isto é bastante surpreendente uma vez que periféricamente já está bem estabelecida a participação da ET-1 nos processos de dor inflamatória (FERREIRA; ROMITELLI; DE NUCCI, 1989; HANS et al., 2007; RAFFA; JACOBY, 1991); (RAFFA; SCHUPSKY; JACOBY, 1996).

Diante destes dados, a hipótese deste trabalho é avaliar o papel da ET-1 central em doses pirogênicas na hiperalgesia, hipolocomoção e anedonia, bem como investigar sua participação via receptor ET_A na febre endotoxêmica.

Comentado [AZ13]: Acrescentar,:

Raffa RB, Jacoby HI. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. *Life Sci.* 1991;48(17):PL85-PL90. doi:10.1016/0024-3205(91)90130-4

2 OBJETIVOS

Durante a síndrome de doença, a resposta febril ocorre concomitante a outros comportamentos característicos como hiperalgesia, hipolocomoção e anedonia. Como a injeção central de ET-1 causa febre, o presente estudo investigou se doses pirogênicas de ET-1 administradas no SNC também poderiam induzir hiperalgesia, quais os receptores envolvidos e o possível envolvimento das PG nessa resposta. Adicionalmente, objetivamos investigar se a ET-1 produzida no SNC, também participa da hiperalgesia, anedonia e hipolocomoção que são observadas durante a síndrome de doença induzida por endotoxina bacteriana em ratos. Como alguns estudos sugeriram que a hiperalgesia induzida por LPS envolve a produção de prostaglandinas no hipotálamo, avaliamos o envolvimento da ação das endotelinas nesta estrutura para o desenvolvimento de hiperalgesia. Por fim, reavaliamos o papel dos receptores ET_A na febre induzida por endotoxina bacteriana.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar uma curva dose-resposta para os efeitos da ET-1 administrada i.c.v na hiperalgesia mecânica e térmica.
2. Avaliar o efeito da administração i.c.v. dos antagonistas de receptores ET_A (BQ123) ou ET_B (BQ788) na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela administração i.c.v de ET-1.
3. Avaliar o efeito dos antagonistas ET_A (BQ123) e ET_B (BQ788) no limiar mecânico e térmico basal.
4. Avaliar o envolvimento das prostaglandinas na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela administração i.c.v de ET-1.
5. Avaliar o efeito da administração i.c.v. dos antagonistas de receptores ET_A (BQ123) ou ET_B (BQ788) na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela administração i.p. de LPS.

6. Avaliar o efeito dos antagonistas de receptores ET_A (BQ123) ou ET_B (BQ788) administrados diretamente no hipotálamo na hiperalgisia mecânica induzida pela administração i.p. de LPS. Avaliar o efeito da administração i.c.v. dos antagonistas de receptores ET_A (BQ123) ou ET_B (BQ788) no consumo de sacarose e na redução da movimentação espontânea induzida pela administração i.p. de LPS.
7. Avaliar o efeito do pré-tratamento com BQ123 sobre a resposta febril induzida por diferentes doses de LPS i.p..
8. Avaliar o efeito do pós-tratamento com BQ123 sobre a resposta febril induzida por baixa e alta dose de LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com pelo menos 60 dias de idade pesando entre 180 e 200 g. Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7h da manhã) e temperatura controlada ($21\pm 1^\circ\text{C}$) com livre acesso à água e ração comercial. Todos os protocolos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, certificado 1024 e medidas foram tomadas para reduzir tanto o sofrimento quanto o número de animais.

Comentado [AZ14]: Acho que teve outro para a febre

Comentado [AZ15]: Embaixo vc já fala isso, inclusive que é oxitetraciclina e nao terramicina.

3.2 ESTERELIZAÇÃO

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C por 30 min, esterilizados em calor seco a 200°C por 2 h, ou adquiridos estéreis. As soluções e diluições das drogas foram preparadas em condições assépticas em capela de fluxo laminar.

3.3 DROGAS

ET-1, LPS de *E. coli* 0111: B4 e indometacina foram adquiridos da Sigma Chemicals (São Paulo, SP, Brasil). O antagonista seletivo do receptor ET_A BQ123 (ciclo-Asp-Pro-Val-Leu-Trp, peso molecular: 632,68, pureza $\geq 99\%$) ou o antagonista seletivo do receptor ET_B BQ788 [(2,6-Dimetilpiperidinocarbonil- γ -Metil-Leu-Nin-(Metoxicarbonil) -D-Trp-D-Nle, N- [N- [N - [(2,6-Dimetil-1-piperidinil) carbonil] -4-metil-L-leucil] -1- (metoxicarbonil) -D-triptofano] -D-norleucina], peso molecular: 663,78, pureza $\geq 95\%$] também foram adquiridos na Sigma Chemicals (São Paulo, SP, Brasil) (ALEXANDER et al., 2019). Cetamina, xilazina e cloridrato de oxitetraciclina foram

adquiridos da Syntec do Brasil Ltda (Santana da Parnaíba, SP, Brasil), o cetoprofeno dos laboratórios da Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil), Halotano do laboratório Cristália (São Paulo, SP, Brasil). A indometacina foi diluída em tampão Tris, pH 8,4 e todos os demais em cloreto de sódio 0,9% estéril.

3.4 IMPLANTE DE CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL E NO HIPOTÁLAMO

Os animais foram anestesiados com 90 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina intraperitonealmente (i.p.). Uma cânula guia de aço inoxidável (14 mm de comprimento, 0,8 mm de diâmetro externo) foi implantada para as injeções i.c.v. ou com 0,55 mm de diâmetro externo para as injeções intra-hipotálamo usando um dispositivo estereotáxico no ventrículo lateral (1,6 mm lateral à linha média, 1,5 mm posterior ao bregma e 2,5 mm abaixo da superfície do crânio) ou no hipotálamo anterior (0,6 mm lateral à linha média, 7,7 mm anterior à linha interaural e 6,5 mm abaixo da superfície do crânio) (PAXINOS; WATSON; EMSON, 1998) pelo menos 1 semana antes de qualquer procedimento. A cânula foi fixada ao crânio com dois parafusos de aço inoxidável e cimento acrílico odontológico. No dia da cirurgia, os animais receberam cetoprofeno (20 mg/kg, i.p.) e cloridrato de oxitetraciclina (400 mg / kg, por via intramuscular).

Os estímulos e tratamentos foram administrados assepticamente por meio de uma agulha de calibre 30G conectada por um tubo de polietileno-10, em um volume de 2 µl para a injeção i.c.v. e 0,5 µl para intra-hipotalâmica. Uma bomba eletrônica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) controlava o fluxo das injeções no hipotálamo. Após o experimento, cada rato foi injetado com azul de Evans (2,5% em solução salina) no ventrículo lateral (2 µl) ou no hipotálamo (0,5 µl) c. Para o ventrículo lateral, os cérebros foram removidos e o local do corante foi verificado macroscopicamente. Para as injeções intra-hipotálamo, os animais foram anestesiados com halotano, perfundidos transcardiacamente com solução salina 0,9% seguido de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram então removidos e mantidos no paraformaldeído 4% por 6 horas, seguido de glicose a 30% por uma noite. Os cérebros foram então cortados em 40 µm e a posição da cânula foi verificada em microscopia de luz. Os animais que apresentaram deslocamento da cânula, bloqueio

na injeção ou padrões anormais de ganho/perda de peso corporal após a cirurgia foram excluídos do estudo.

3.5 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA

A avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica foi feita durante o ciclo claro, entre 8h e 16h, em experimentos separados. A hiperalgesia mecânica foi avaliada por meio do aparelho eletrônico de von Frey (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (DE OLIVEIRA et al., 2017). Os animais foram colocados individualmente em uma plataforma de tela de arame, 1 h antes do experimento. Após este período, uma força linear crescente foi aplicada à pata traseira até que a resposta de retirada da pata fosse observada. O limiar mecânico (em gramas) foi calculado como o valor médio de três respostas de retirada semelhantes antes e em tempos específicos após a administração de LPS i.p. ou a administração i.c.v de ET-1.

A hiperalgesia térmica foi avaliada em um aparelho de placa quente (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a uma temperatura constante de 48°C (CAHILL; DRAY; CODERRE, 1998). A latência de retirada da pata (em segundos) foi determinada antes de qualquer tratamento e foram considerados comportamentos nociceptivos lambeo, chacoalhar ou retirar a pata. Apenas animais com basal acima de 35 segundos foram usados e o tempo de corte foi de 50 segundos para evitar dano tecidual da pata dos animais. A latência foi avaliada em tempos específicos após a administração de LPS i.p ou a administração i.c.v de ET-1. Para avaliar os efeitos dos antagonistas do receptor ET_A e ET_B nos limiares basais, os animais receberam o antagonista do receptor ET_A BQ123 (3 pmol, i.c.v.) ou o antagonista do receptor ET_B BQ788 (3 pmol, i.c.v.) ou veículo.

Após determinar o limiar mecânico e a latência térmica basais, foram injetadas lentamente as doses de 0,1, 0,3 ou 1 pmol de ET-1 ou veículo (solução salina) por via i.c.v. em um volume de 2 µl. O limiar mecânico e a latência térmica foram avaliados a cada hora até 5 h após a administração.

Para avaliar a participação dos antagonistas na resposta ao tratamento com ET-1, os animais receberam o BQ123 (3 pmol, i.c.v.) ou o BQ788 (3 pmol, i.c.v.) e, 30 minutos depois, eles receberam ET-1 (0,3 pmol, i.c.v.) ou LPS (50 µg/kg, i.p.). Para avaliar a

Comentado [AZ16]: o que foi realmente analisado. chacoalhar, retirar... E o tempo de corte????

Comentado [AZ17]: Tem certeza que isso foi utilizado como critério? Se vc olhar nos gráficos, tem muitas basais com 40 segundos e até mais. Acho melhor simplesmente retirar isso.

participação das prostaglandinas na hiperalgesia mecânica e térmica induzida por ET-1, os animais foram tratados com indometacina (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (tampão Tris, pH 8,4). Após 30 min, eles receberam ET-1 (0,3 pmol i.c.v.).

A dose de LPS foi baseada em estudos anteriores nos quais eles induziram uma resposta febril e hiperalgesia (Telles et al., 2017; de Oliveira et al., 2017). A dose de BQ788 utilizada foi capaz de reduzir a resposta febril (Fabricio et al. 1998), e o BQ123 foi usado em uma dose equimolar.

Para avaliar se, de maneira similar às PG, a ET-1 estaria atuando no hipotálamo para produzir hiperalgesia, os animais receberam injeção intrahipotalâmica de BQ123 ou de BQ788 (0,3 pmol/0,5 µl) ou o mesmo volume de solução salina e após 30 min eles receberam LPS (50 µg/kg, ip). Neste experimento foi avaliada somente a hiperalgesia mecânica, a cada hora por 5 h.

3.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FEBRIL

Quando os animais foram destinados aos experimentos de febre, concomitantemente ao implante das cânulas i.c.v. e sob a mesma anestesia com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.), foram implantados transmissores remotos para medida de temperatura corporal (*Subcue Dataloggers*, Calgary, Canadá). Para isso, após laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana, transmissores previamente programados foram implantados na cavidade peritoneal e a cavidade suturada em condições assépticas conforme descrito anteriormente (FRAGA et al., 2008). Seis dias após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram aclimatados à temperatura ambiente de 28°C (termoneutralidade para ratos) (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos nesta temperatura até o final do experimento que ocorreu no dia seguinte. 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. Nas duas primeiras horas do dia experimento (da 7 às 9 h da manhã) foi registrada a temperatura basal dos animais. Entre 9 e 11 h da manhã, os animais receberam LPS (10 µg/kg ou 200 µg/kg, i.p.). Dois protocolos distintos de tratamento com o

antagonista de receptor ET_A , BQ123 (3 pmol, i.c.v., 2 μ l) foram feitos: o pré-tratamento, onde o antagonista foi administrado 30 min antes da administração do LPS ou o pós-tratamento, onde o antagonista foi administrado 2 h após a administração do LPS. Animais controle receberam somente salina. A temperatura corporal dos animais foi avaliada pelos registradores implantados no peritônio por mais 6 h.

3.7 MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Este teste tem o objetivo de avaliar outro importante comportamento associado à síndrome de doença, que é a diminuição da movimentação. A movimentação espontânea foi avaliada nos mesmos animais utilizados para o teste de hiperalgisia mecânica na sexta hora após o tratamento com LPS (50 μ g/kg, ip). O aparato de campo aberto consistiu em uma arena de madeira quadrada lavável e subdividida em quadrantes. Cada rato foi individualmente colocado no centro do aparato e a movimentação espontânea foi avaliada por um período de 5 min, medida pelo número de cruzamentos dos quadrantes (BERTON et al., 1997). O aparato será limpo com etanol 5% em água antes da introdução de um novo animal para evitar possíveis efeitos de pistas de odor deixadas pelo animal anterior.

3.8 TESTE DA PREFERÊNCIA PELA SACAROSE

Este experimento avaliou o efeito dos antagonistas dos receptores ETA e ETB na preferência por sacarose usando o *two-bottle choice paradigm* (SOUZA et al., 2018). Os animais foram transferidos para gaiolas individuais e apresentados a duas garrafas previamente pesadas, uma com solução de sacarose (5%, p / v) e outra com água para ambientação dos ratos a ambas as garrafas. Os animais não foram privados de alimento durante o teste. A posição das garrafas na gaiola variava diariamente para evitar preferência.

No dia do experimento, entre 9 e 11 h, os ratos receberam BQ123 ou BQ788 (3 pmol, i.c.v.) seguido por LPS (50 μ g/kg, i.p.) 30 min depois. O consumo foi

Comentado [AZ18]: TER QUE CORRIGIR TEMPO VERBAL DE FUTURO PARA O PASSADO EM UMA TESE DE DOUTORAMENTO..... ACHARIA UM ABSURDO EM UM ALUNO DE MESTRADO. VC REALMENTE RELEU ESTE TRABALHO ANTES DE ENVIAR AO SEU ORIENTADOR?

Comentado [AZ19]: Coloque aqui o trabalho do Bruno Martinhak

Souza LC, Martynhak BJ, Bassani TB, et al. Agomelatine's effect on circadian locomotor rhythm alteration and depressive-like behavior in 6-OHDA lesioned rats. *Physiol Behav.* 2018;188:298-310. doi:10.1016/j.physbeh.2018.02.033

registrado por 12 h durante o ciclo escuro dos animais pesando-se as garrafas, e a soma do consumo de água e sacarose foi definida como a ingestão total. O consumo de sacarose (%) foi determinado pela equação:

% preferência = (consumo de sacarose x 100) / consumo total.

Este teste foi realizado apenas com animais que foram tratados com LPS porque mostramos anteriormente que a hiperalgesia induzida por LPS dura até 24 horas após a administração (DE OLIVEIRA et al., 2017).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de hiperalgesia e febre foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias, com tempo e tratamento como fatores. Para os outros testes, foi usada ANOVA de uma via. Todos os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram determinadas em ambos os casos usando o teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O programa *GraphPad Prism*, versão 7 (San Diego, CA, E.U.A.) foi usado em todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 ET-1 INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM RATOS

A injeção i.c.v. de veículo não alterou os limiares nociceptivos basais dos animais. A injeção i.c.v. de ET-1 induziu hiperalgisia mecânica e térmica nos ratos (Fig. 4). Na dose mais baixa (0,1 pmol), a ET-1 induziu apenas hiperalgisia térmica (Fig. 4B). A administração de 0,3 e 1 pmol de ET-1 induziu hiperalgisia mecânica e térmica significativa, que começou 1 h após a injeção e durou pelo menos 3 h (Fig. 4 A e B, respectivamente). A ANOVA de medidas repetidas de duas vias mostrou interação significativa de tempo vs tratamento para hiperalgisia mecânica ($F_{18,222} = 3,876$, $p < 0,001$) e hiperalgisia térmica ($F_{15,85} = 3,272$, $p = 0,003$). Ambas as doses de 0,3 e 1 pmol de ET-1 induziram hiperalgisia mecânica e térmica; assim, a dose mais baixa foi escolhida para os experimentos subsequentes.

Esta dose escolhida (0,3 pmol) na Fig.4 foi comparada à resposta observada nos experimentos subsequentes. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeitos significativos para o tempo ($F_{3,17, 72,8} = 32,36$, $p < 0,001$), mas não para o experimento ($F_{2,23} = 0,96$, $p = 0,3964$). Portanto, não houve interação significativa ($F_{10, 115} = 1,37$, $p < 0,2018$). Assim, não houve diferenças significativas nas respostas observadas para a injeção i.c.v. de ET-1 entre os diferentes experimentos.

Comentado [AZ20]: Porque vc não acrescenta os gráficos controles de BQ123 e BQ788 na hiperalgisia mecânica e térmica como a primeira figura dos resultados (Fig 4). Só não se esqueça de acrescentar isso no protocolo experimental na metodologia também, logo depois da descrição das duas hiperalgisias.

Comentado [AZ21]: Sugiro que corrija todos os gráficos de térmica e ao invés de limiar de retirada da pata, para latência de retirada da pata.

Na legenda dos gráficos trocar 0.1 e 0.3 por 0,1 e 0,3

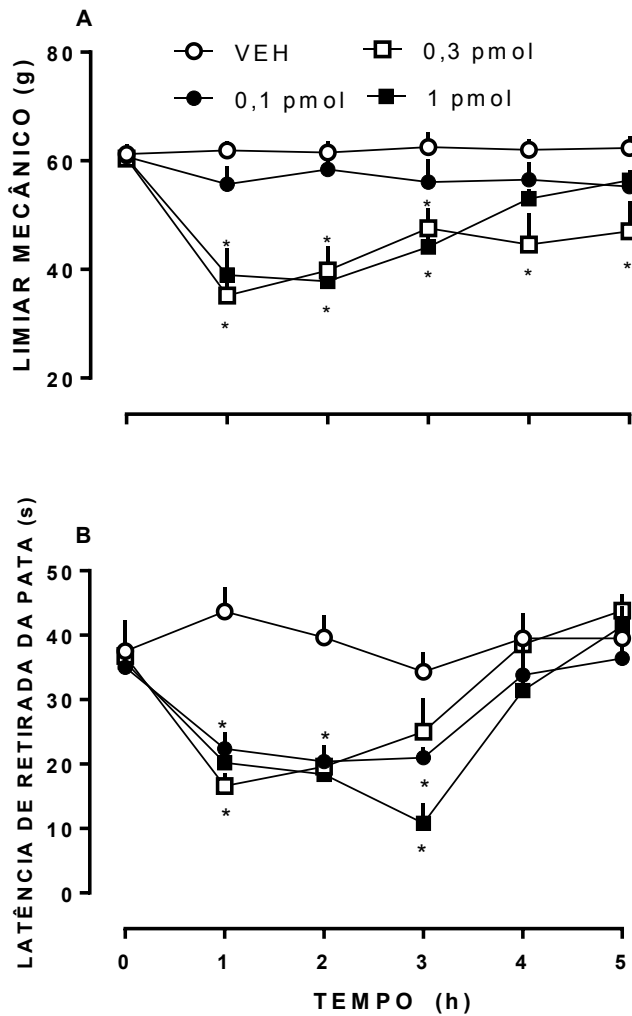


FIG 4 ET-1 INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM RATOS. A ET-1 (0,1, 0,3 e 1 pmol) ou o veículo (VEH) foi injetado i.c.v. em ratos. O limiar mecânico (A) e a latência de retirada da pata (B) foram avaliados nos momentos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm EPM do limiar mecânico (g) ou da latência de retirada da pata (s). $n=6-12$ * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao grupo VEH.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1.

A administração i.c.v. de BQ123 reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 (interação tempo vs tratamento, $F_{10,90} = 7,208$, $p < 0,0001$; Fig. 5A) e hiperalgesia térmica (interação tempo vs tratamento, $F_{10,85} = 5,472$, $p < 0,0001$; Fig. 5B). Por outro lado, o tratamento com BQ788 aumentou significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 (interação tempo vs tratamento, $F_{10,120} = 8,16$, $p < 0,0001$; Fig. 5C) e hiperalgesia térmica (interação tempo vs tratamento, $F_{10,135} = 6,669$, $p < 0,0001$; Fig. 5D).

Comentado [AZ22]: Em todos os gráficos está errada a legenda ET/VEH. Mude para VEH/ET

Não sei o que vc fez nas legendas dos gráficos. Mas nas legendas a linha passa dentro do símbolo. Isso não acontece no gráfico.

No trabalho não está assim porque eu corriji.

O que eu faço é colocar a cor do símbolo em branco e não em "clear

Se puder aumentar e posicionar os * melhora.

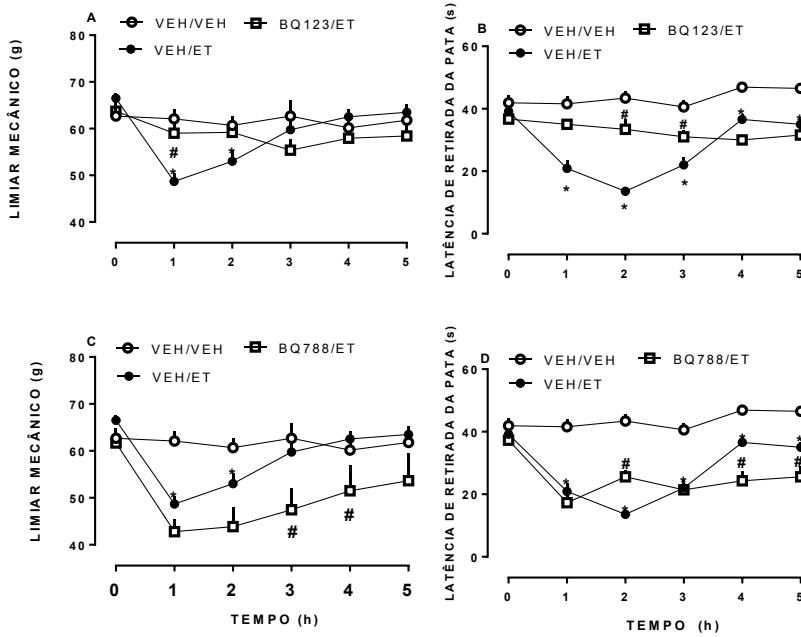


FIG 5 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1. Os ratos foram tratados com BQ123 (3 pmol/2 µl, icv) ou BQ788 (3 pmol/2 µl, i.c.v.) ou veículo (VEH; 2 µl de solução salina estéril, i.c.v.) e após 30 min receberam ET-1 (0,3 pmol / 2 µl, i.c.v.) ou veículo (VEH, 2 µl de solução salina estéril, i.c.v.). O limiar mecânico (A, C) e latência de retirada da pata (B, D) foram avaliados nos momentos indicados. Os resultados são expressos como a média ± EPM do limiar mecânico (g) ou da latência de retirada da pata (s). n = 6-10. * p <0,05, diferença significativa com o grupo VEH/VEH; # p <0,05, diferença significativa com o grupo VEH/ET-1.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NO LIMIAR MECÂNICO E NO TEMPO DE LATÊNCIA TÉRMICO BASAL.

A administração i.c.v. de BQ123 OU DE BQ788 não alterou o limiar mecânico (A) ou o tempo de latência na placa aquecida (B) quando comparados com animais tratados somente com salina estéril (FIG 6).

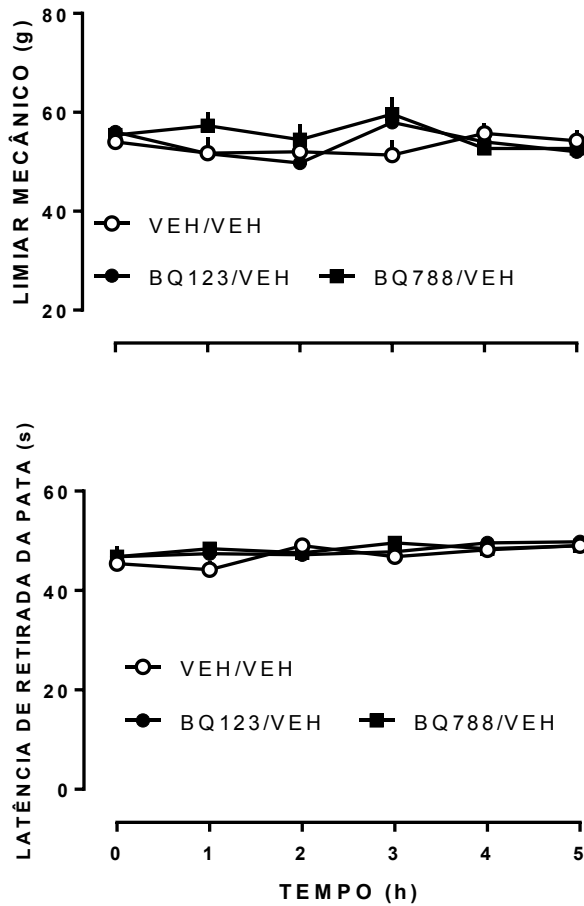


FIG 6 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 OU COM BQ788 NO LIMIAR MECÂNICO E NO TEMPO DE LATÊNCIA TÉRMICO EM RATOS. Os ratos foram tratados com BQ123 (3 pmol/2 μ l, icv) ou BQ788 (3 pmol/2 μ l, i.c.v.) ou veículo (VEH; 2 μ l de solução salina estéril, i.c.v.). O limiar mecânico (A) e latência de retirada da pata (B) foram avaliados nos momentos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm EPM do limiar mecânico (g) ou da latência de retirada da pata (s). n=4-6

4.4 EFEITO DA INDOMETACINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1.

O pré-tratamento com o inibidor da COX indometacina não alterou nem a hiperalgesia mecânica nem a térmica induzida por ET-1 (Fig. 7 A e B, respectivamente). A ANOVA de duas vias mostrou interações tempo vs tratamento significativas para hiperalgesia mecânica ($F_{10,70} = 11,93$, $p < 0,0001$) e hiperalgesia térmica ($F_{10,75} = 6,51$, $p < 0,0001$).

Comentado [AZ23]: Latência ao invés de limiar. Em todos os gráficos de térmico.

O mesmo problema acontece com os símbolos aqui. A linha cruza o símbolo na legenda mas não no gráfico. Na minha opinião a linha dos símbolos está muito grossa o que dificulta a clareza dos gráficos.

No gráfico A o quadrado está errado e deveria ser indo/ET
No gráfico B o quadrado também está errado e deveria ser indo/ET.

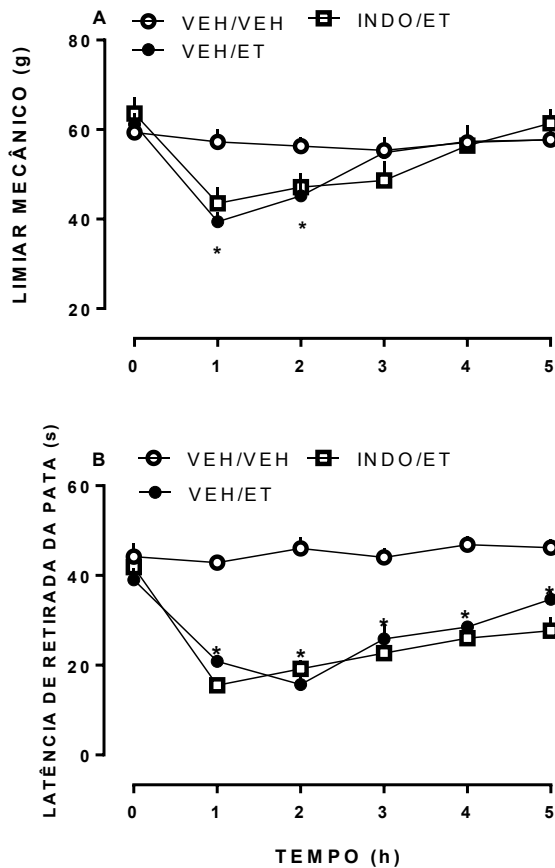


FIG 7 EFEITO DA INDOMETACINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA ET-1 Os ratos foram tratados com indometacina (INDO; 2 mg/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.) e após 30 min receberam ET-1 (0,3 pmol/2 μ l, i.c.v.) ou veículo (VEH; solução salina estéril, i.c.v.). O limiar mecânico (A) e a latência de retirada da pata (B) foram avaliados nos tempos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm EPM do limiar mecânico (em gramas) ou da latência de retirada da pata (em segundos). n = 6. *p < 0,05, diferença significativa em relação ao grupo VEH/VEH.

4.5 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELO LPS.

A injeção i.p. de LPS induziu hiperalgesia mecânica (Fig. 8A e 8C) e hiperalgesia térmica (Fig. 8B e 8D) durante pelo menos 6 h após administração. A administração i.c.v. do antagonista do receptor ET_A BQ123 aboliu a hiperalgesia mecânica induzida por LPS (interação tratamento vs tempo, $F_{12,186} = 6.304$, $p < 0.0001$; Fig. 8 A) e reduziu a hiperalgesia térmica (interação tratamento vs tempo, $F_{8,136} = 8.092$, $p < 0.0001$; Fig. 8B) somente na 3ª hora após a administração de LPS. Do mesmo modo, o tratamento com o antagonista do receptor de ET_B BQ788 aboliu a hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS (interação tratamento vs tempo, $F_{18,198} = 3,238$, $p < 0,0001$; Fig. 8C) e reduziu a hiperalgesia térmica (interação tratamento vs tempo, $F_{8,136} = 8,631$, $p < 0,0001$; Fig. 8D) somente na 3ª hora após a administração do LPS.

Comentado [AZ24]: Nos gráficos B e D, é BQ123/LPS e BQ788/LPS. Aumente um pouco o tamanho dos *. Vc não falou que media a hiperalgesia mecânica até a 5 h porque depois fazia a movimentação espontânea?
Mudar para latência da retirada da pata.
Os símbolos nas legendas do gráfico A não tem a linha passando pelo meio do símbolo enquanto que nos outros gráficos isso acontece.

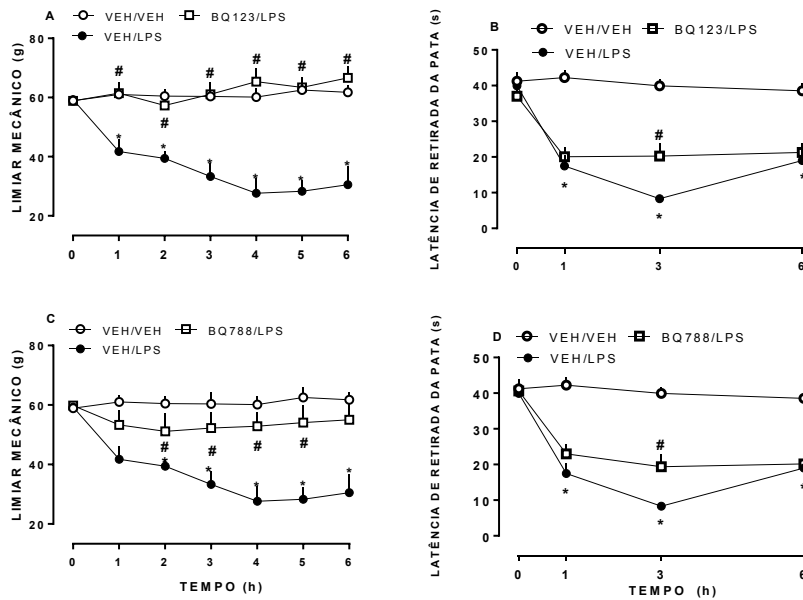


FIG 8 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELO LPS. Os ratos foram tratados com BQ123 (3 pmol / 2 μ l, i.c.v.), BQ788 (3 pmol / 2 μ l, i.c.v.) ou veículo (VEH; icv) e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.). O limiar mecânico (A, C) e a latência de retirada da pata (B, D) foram avaliados nos tempos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm EPM do limiar mecânico (g) ou da latência de retirada da pata (s). n = 5-8. * p < 0,05, diferença significativa em relação ao grupo VEH/VEH; # p < 0,05, diferença significativa com o grupo VEH/LPS.

4.6 EFEITO DA INJEÇÃO INTRAHIPOTALÂMICA DO BQ123 E DO BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LPS.

A administração de LPS induziu hiperalgisia mecânica nos ratos. A administração intrahipotalâmica de BQ123 aboliu a hiperalgisia mecânica induzida por LPS (interação tratamento vs tempo, $F_{10,90} = 7,725$, $p < 0,0001$; Fig. 9 A) em todos os pontos de tempo avaliados. Em contraste, LPS induziu uma hiperalgisia significativa, mas o tratamento com BQ788 não afetou a hiperalgisia mecânica induzida por LPS (interação tratamento vs tempo, $F_{10,85} = 5,667$, $p = 0,0001$; Fig. 9 B).

Comentado [AZ25]: nos quadrados é BQ123 /LPS e BQ788/LPS. A linha cruza o símbolos das legendas mas nao o símbolo do gráfico. e é Latencia ao invés de limiar térmico.

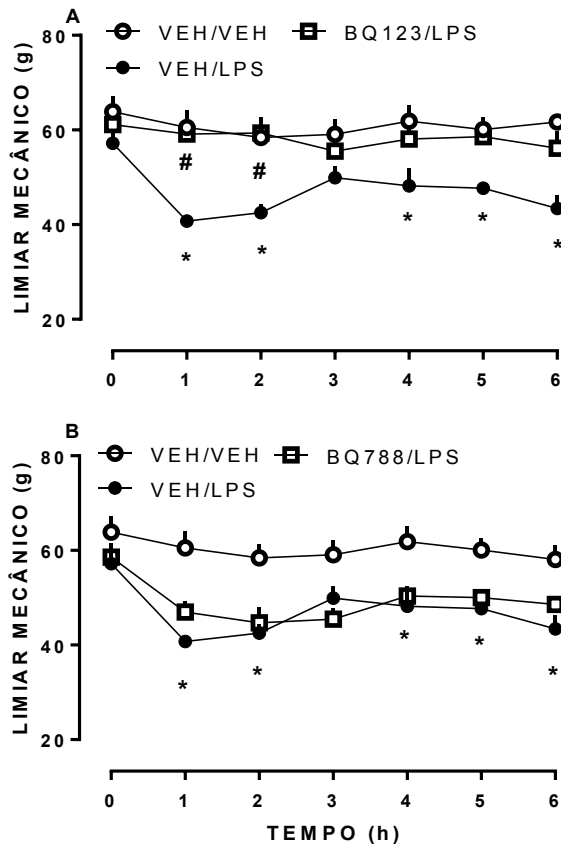


FIG 9 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE BQ123 OU BQ788 NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS em ratos. Os ratos foram tratados com BQ123 (0,3 pmol / 0,5 µl) (A), BQ788 (0,3 pmol / 0,5 µl) (B) ou veículo (VEH) diretamente no hipotálamo e após 30 min receberam LPS (50 µg/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.). Os resultados são expressos como a média ± EPM do limiar mecânico (g) ou da latência de retirada da pata (s). n = 6-10. * p <0,05, diferença significativa com o grupo VEH/VEH. # p <0,05, diferença significativa com o grupo VEH/LPS.

Comentado [AZ26]: nao era 0,5 ul?

Comentado [AZ27]: 0,5 ul?

4.7 EFEITO DO BQ123 E DO BQ788 NO TESTE DE PRERÊNCIA PELA SACAROSE E MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

A administração de LPS reduziu a preferência dos animais por sacarose, e o tratamento com BQ788 aboliu essa resposta ($F_{3,48} = 7,944$, $p = 0,0002$; Fig. 10A). O LPS também diminuiu os movimentos espontâneos no campo aberto, e esta resposta foi revertida por BQ123 e BQ788 ($F_{3,35} = 3,452$, $p = 0,0268$; Fig. 10B).

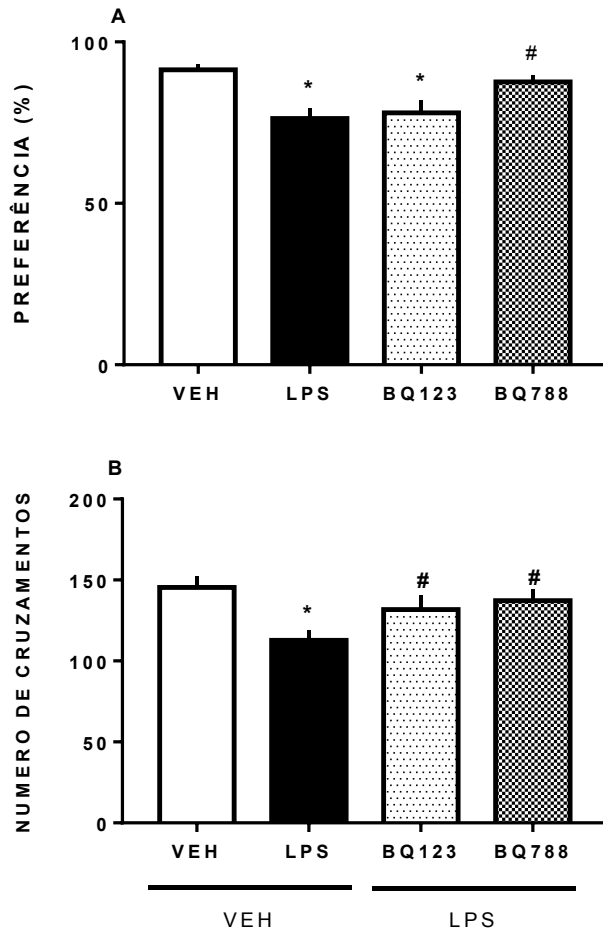


FIG 10 EFEITOS DO BQ123 E BQ788 NA PREFERÊNCIA DE SACAROSE E ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA. Os ratos foram tratados com BQ123 (3 pmol/2 μ l), BQ788 (3 pmol/2 μ l) ou veículo (VEH) por via i.c.v e após 30 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.). Os resultados são expressos como a média \pm EPM do limiar mecânico (em gramas) ou da latência de retirada da pata (em segundos). n = 8-18. * p <0,05, diferença significativa em relação ao grupo VEH/VEH; # p <0,05, diferença significativa em relação ao grupo VEH/LPS.

4.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR BAIXA DOSE LPS.

A injeção de veículo não provocou alterações significativas na temperatura corporal dos animais. A administração de LPS na dose de 10 µg/kg induziu uma resposta febril que iniciou-se imediatamente após a injeção e manteve-se significativamente maior que o veículo até por volta de 3-4^a hora (FIG 11). O pré-tratamento com o BQ123 não modificou significativamente a resposta ($F_{64,288} = 1,47$, $p = 0,018$, FIG 11A). De maneira similar, o pós-tratamento com o BQ123 também não modificou a resposta febril induzida por esta dose de LPS ($F_{64,1088} = 3,41$, $p < 0,001$, FIG 11B).

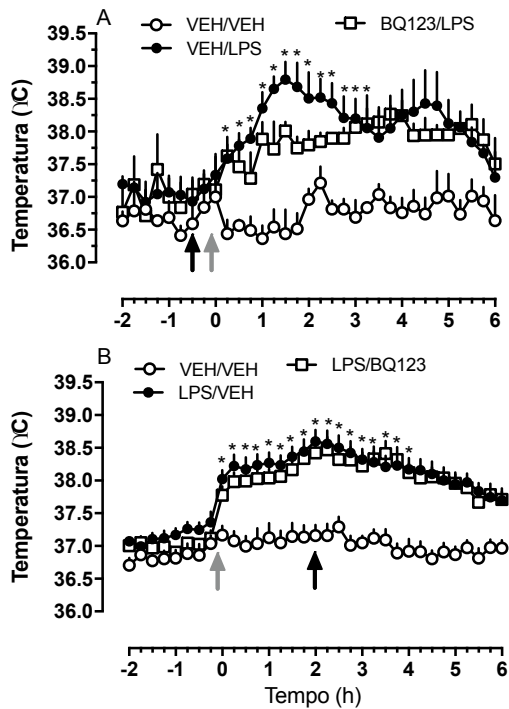


FIG 11 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR BAIXA DOSE DE LPS. Os animais foram tratados com BQ123 (3 pmol/2 μ l, i.c.v.) 30 min antes (A) ou 2 h após (B) a administração de LPS (10 μ g/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.). As setas cinzas indicam o momento da injeção de LPS e as setas pretas o tratamento com BQ123. Os resultados são expressos como a média \pm EPM da temperatura corporal (em $^{\circ}$ C) n = 5 em A e 11-14 em B. * p < 0,05, diferença significativa com o grupo VEH.

Comentado [AZ28]: Esta parte da tese só vou corrigir quando tiver os resultados.

4.9 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR ALTA DOSE LPS.

A injeção de veículo não provocou alterações significativas na temperatura corporal dos animais. A administração de LPS na dose de 200 µg/kg induziu uma resposta febril que iniciou-se por volta de 2 h após a injeção e manteve-se significativamente maior que o veículo até por volta de 5-6ª hora (FIG 12). O pré-tratamento com o BQ123 não modificou significativamente a resposta ($F_{64,512} = 3,04$, $p < 0,001$, FIG 12A). Diferentemente, o pós-tratamento com o BQ123 reduziu significativamente a resposta febril induzida por esta dose de LPS ($F_{64,864} = 4,46$, $p < 0,001$, FIG 12B).

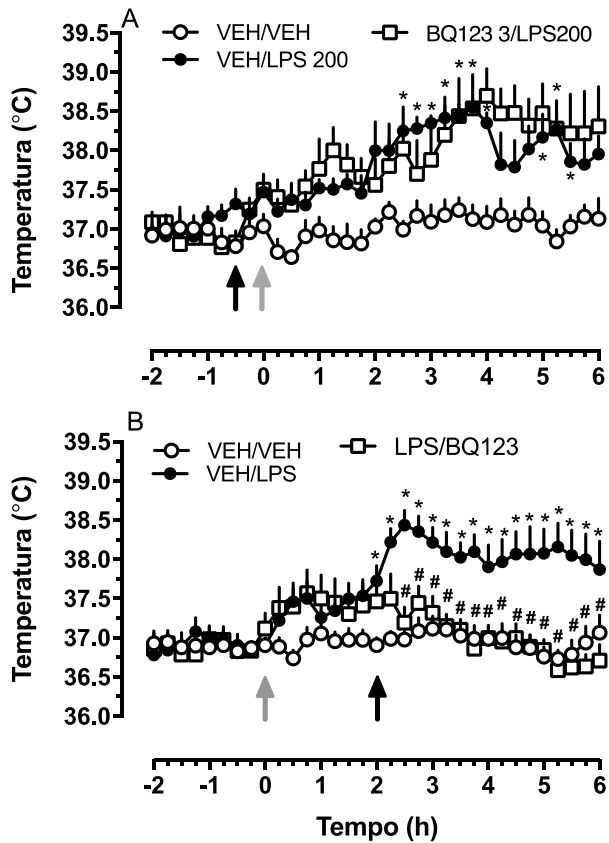


FIG 12 EFEITO DO TRATAMENTO COM BQ123 NA FEBRE INDUZIDA POR ALTA DOSE DE LPS. Os animais foram tratados com BQ123 (3 pmol/2 µl, i.c.v.) 30 min antes (A) ou 2 h após (B) a administração de LPS (200 µg/kg, i.p.) ou veículo (VEH, i.p.). As setas cinzas indicam o momento da injeção de LPS e as setas pretas o tratamento com BQ123. Os resultados são expressos como a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) n = 5-8 em A e 9-11 em B. * p <0,05, diferença significativa com o grupo VEH. ; # p <0,05, diferença significativa com o grupo LPS.

Comentado [AZ29]: Esta parte da tese só vou corrigir quando tiver os resultados.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de ET-1 no sistema nervoso central induziu hiperalgisia mecânica e térmica em ratos. Também observamos que os receptores ET_A parecem desempenhar um papel pró-nociceptivo e que o bloqueio do receptor ET_B intensifica a hiperalgisia. Da mesma forma, a liberação de ET-1 após a administração periférica de LPS contribuiu tanto para a hiperalgisia mecânica e térmica induzida por este estímulo. A ativação dos receptores ET_A no hipotálamo é importante para a hiperalgisia mecânica, enquanto o papel dos receptores ET_B parece envolver outras estruturas cerebrais. Além disso, a anedonia, a hipolocomoção e a febre induzidas por LPS, características da síndrome da doença, também envolvem a participação da ET-1.

No presente estudo demonstramos que a administração central de doses mais baixas de ET-1 promoveu hiperalgisia. As doses que foram testadas aqui estão na mesma faixa de doses que foram usadas em estudos anteriores para induzir febre (FABRICIO et al., 1998; FRAGA et al., 2016), e essas doses são menores do que as doses que foram usadas em outros trabalhos para identificar um efeito antinociceptivo provocado pela administração central de ET-1.

Hung et al. empregaram a superexpressão de ET-1 em astrócitos de camundongos para demonstrar o efeito antinociceptivo de ET-1, sugerindo que concentrações mais elevadas desse peptídeo seriam responsáveis por seu efeito antinociceptivo (HUNG et al., 2012). Notavelmente, no entanto, altas doses de ET-1 produzem isquemia nos tecidos, e a administração destas altas doses tem sido inclusive utilizada como modelo para acidente vascular cerebral isquêmico (SASAKI et al., 1997; ZIV et al., 1992). A hipoperfusão cerebral crônica causada pela ET-1 em ratos é caracterizada pela oclusão permanente das carótidas, o que parece induzir uma disfunção mitocondrial que gera radicais livres, degeneração axonal, astrogliose e piora da inflamação (FARKAS et al., 2004). Todavia, se a morte neuronal pode contribuir para o efeito antinociceptivo também necessita de mais esclarecimentos.

Também evidenciamos que o pré-tratamento com BQ123 aboliu a hiperalgisia mecânica e térmica induzida por ET-1, enquanto o BQ788 aumentou essa resposta. Portanto, semelhantemente às ações na periferia, a resposta hiperalgésica induzida por baixas doses de ET-1 no sistema nervoso central ocorre principalmente por meio

de suas ações nos receptores ET_A , enquanto seus efeitos antinociceptivos estão relacionados às ações nos receptores ET_B .

Em conjunto, todos estes dados sugerem que a administração de ET-1 no sistema nervoso central, de maneira similar ao que ocorre periféricamente, pode ativar tanto vias nociceptivas quanto antinociceptivas. Considerando nossos dados relativos à injeção i.c.v., onde tanto a ET-1 quanto os antagonistas poderiam atingir diversas estruturas no sistema nervoso central, de maneira geral a ativação de receptores ET_A estaria predominantemente relacionada a uma ação nociceptiva, enquanto a ativação de receptores ET_B a uma atividade antinociceptiva. No entanto, é possível que quando maiores quantidades deste peptídeo sejam formadas no sistema nervoso central (HUANG et al., 2012) ações diferentes sejam observadas, possivelmente pelo fato de que uma quantidade maior deste peptídeo atinja diferentes alvos, concomitantemente com uma maior expressão de receptores ET_B pelos astrócitos.

Estudos anteriores demonstraram que as ações da ET-1 no sistema nervoso central se devem a mecanismos que aumentam o influxo de Ca^{2+} intracelular (BOURSON et al., 1989; NIKOLOV et al., 1992). Em cultura neuronal de ratos, entretanto, a ET-1 via ET_A diminui a frequência de abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L (HELD; POCOCK; PEARSON, 1998) e notavelmente os efeitos da ET-1 sobre estes canais são opostos aos observados na periferia, apesar de não se saber a influência deste efeito na variação da resposta de hiperalgesia.

Deste modo, torna-se de extrema importância que a participação da ET-1 formada no SNC na hiperalgesia seja avaliada não somente através da injeção ou superexpressão deste peptídeo, mas também através de modelos experimentais que simulem situações fisiopatológicas. Assim, seria possível determinar o envolvimento deste peptídeo em cada condição.

A questão levantada acima será avaliada e discutida mais adiante neste estudo. Antes disso, propusemo-nos a avaliar um outro aspecto da resposta hiperalgésica induzida por ET-1, que é a participação de PG nesta resposta. Um estudo anterior de Abe et al. mostrou que injeções de inibidores da COX diretamente na área pré-óptica do hipotálamo (APO/HÁ) aboliram a hiperalgesia térmica induzida pelo LPS, sugerindo o envolvimento de PG produzidas diretamente no hipotálamo nesta resposta (ABE et al., 2001). Estudos mais recentes confirmaram o envolvimento da COX-2 hipotalâmica, e portanto de prostaglandinas, na resposta hiperalgésica induzida pela administração periférica de LPS em camundongos (BJÖRK WILHELMS et al., 2016).

Também demonstrou-se que a injeção i.c.v de ET-1 aumenta os níveis de PG no líquido céfalo-raquidiano e que o tratamento com indometacina reduz estes níveis (FABRÍCIO et al., 2005). No entanto, a resposta febril induzida pela ET-1 não foi afetada por este anti-inflamatório não esteroideal (FABRÍCIO et al., 1998, 2005) sugerindo que, embora a ET-1 possa induzir a síntese destes eicosanóides no SNC, a resposta febril induzida por este peptídeo ocorre de forma independente desta síntese. De forma semelhante, a hiperalgesia periférica induzida pela ET-1 não foi revertida pelo tratamento com indometacina (DA CUNHA et al., 2004) sugerindo que assim como para a resposta febril, a hiperalgesia induzida pela injeção deste peptídeo ocorre independentemente da síntese de eicosanóides. Portanto, avaliamos se a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela ET-1 poderia ser bloqueada pela indometacina, a qual é um inibidor da COX. Os resultados mostraram que nem a hiperalgesia mecânica nem a térmica foram modificadas pelo tratamento, sugerindo que, assim como a resposta febril e a hiperalgesia periférica, a hiperalgesia induzida pela administração central de ET-1 não depende da síntese de PG. Interessantemente, Filipovich-Rimon et al. demonstraram que tanto a ET-1, quanto a ET-2 e ET-3 reduziram a produção de PGE₂ induzida por LPS em células da glia através de uma ação em ambos os receptores, sugerindo que este peptídeo poderia atuar em um mecanismo de *feedback* para controlar a produção excessiva destes eicosanóides no SNC (FILIPOVICH-RIMON; FLEISHER-BERKOVICH, 2010).

Como mencionado anteriormente, efeitos centrais da ET-1 parecem depender da quantidade de ET-1 formada. Portanto, as investigações do envolvimento desse peptídeo na síndrome de doença induzida por LPS, que mimetiza uma infecção bacteriana, poderia representar uma condição patológica adequada para esta investigação. Estudos anteriores relataram que doses pirogênicas de LPS produziram hiperalgesia mecânica e térmica por várias horas em animais experimentais e humanos (DE OLIVEIRA et al., 2017; PITYCHOUTIS et al., 2009).

Utilizando este modelo, o presente estudo corroborou estes dados e demonstrou adicionalmente que tanto o antagonista de receptores endotelinérgicos ET_A BQ123 quanto ET_B BQ788 bloquearam a hiperalgesia mecânica induzida por LPS, enquanto o limiar térmico de retirada da pata foi reduzido somente na terceira hora e, portanto, menos afetado. Estes dados sugerem que particularmente a hiperalgesia mecânica induzida por LPS, assim como a resposta febril, depende da

liberação de ET-1 no sistema nervoso central e que ambos os receptores estão envolvidos nesta resposta.

Estes dados vão de encontro a estudos anteriores sobre a participação periférica da ET-1 na hiperalgesia que demonstraram que os receptores ET_B parecem estar envolvidos na hiperalgesia mecânica apenas quando previamente sensibilizados pela resposta inflamatória (DE-MELO et al., 1998). Portanto, a ET-1 endógena formada do SNC após a administração de LPS, exerce ações pró-nociceptivas em vez de um efeito antinociceptivo. O menor efeito da administração central de ambos os antagonistas na hiperalgesia térmica, comparativamente à mecânica induzida pela administração periférica de LPS, requer mais estudos. Uma das possibilidades a ser estudada seria o envolvimento de diferentes neurocircuitos envolvidos no processamento dos estímulos térmicos e mecânicos. No entanto, os estudos caracterizando estes neurocircuitos ainda são bastante escassos.

O mecanismo de dessensibilização do receptor de ET, internalização e tráfego intracelular também são mal compreendidos. Sabe-se que após a ativação pela ET-1 do receptor ET_A, o complexo formado segue a via celular de reciclagem no material pericentriolar, e após a internalização volta para a membrana da célula, enquanto que o complexo formado pelo ET_B é direcionado para lisossomos e degradado.

As distintas vias intracelulares podem explicar a resposta persistente do sinal através do receptor ET_A e a resposta transitória através do receptor ET_B na hiperalgesia. Tem sido sugerido que o direcionamento para o lisossomo do complexo formado com o receptor ET_B poderia também servir como um mecanismo para a depuração da ET-1, o que alteraria sua resposta em função da diminuição da sua concentração (BREMNES et al., 2000). Este mecanismo talvez seja, entretanto, compensado pela maior abundância do receptor ET_B, que ocorre na maioria dos tecidos. No córtex, por exemplo, quase todos os receptores encontrados são ET_B.

No hipotálamo a presença dos receptores em diversos núcleos sugere sua participação na modulação neuroendócrina e comportamental (NAIDOO; NAIDOO; NAIDOO, 2004). Neste sentido, a ET-1 regula a liberação de neuropeptídeos da pituitária e do próprio hipotálamo como a prolactina, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, vasopressina e ocitocina (KHIMJI; ROCKEY, 2010; LEITE-AVALCA et al., 2016; NAIDOO; NAIDOO; NAIDOO, 2004).

Comentado [AZ30]: Referencia?????????

Comentado [AZ31]: citar o meu trabalho de eletrofisiologia.

Estudos anteriores também demonstraram que a ET-1 induziu febre quando injetada diretamente no hipotálamo (FABRICIO et al., 1998). Assim, o presente estudo investigou a ação da ET-1 no hipotálamo para induzir hiperalgisia mecânica após a injeção de LPS. A administração intra-hipotalâmica de BQ123 aboliu a hiperalgisia mecânica induzida pelo LPS, ao passo que o BQ788 não alterou a resposta. Esses resultados sugerem que a hiperalgisia mecânica produzida pela ET-1, sintetizada no sistema nervoso central após a injeção de LPS, é pelo menos em parte devido à ativação dos receptores ET_A no hipotálamo.

Além do hipotálamo, outros núcleos cerebrais provavelmente estão envolvidos na hiperalgisia mecânica induzida por LPS. Heinricher et al. relataram que uma injeção de baixas doses de PGE₂ na área pré-óptica medial do hipotálamo ativou neurônios facilitadores (células ON) e suprimiu neurônios inibidores (células OFF) no VRM, uma região que está envolvida na modulação da dor, para produzir hiperalgisia (HEINRICHER et al., 2004). Portanto, a ET-1 poderia agir de forma semelhante, mas essa possibilidade requer mais investigação.

Concomitantemente à febre e a hiperalgisia manifestadas durante a síndrome da doença, outros comportamentos como o comportamento do tipo depressivo, hipolocomoção, anedonia e anorexia são observados (DANTZER, 2004). A ingestão embotada de sacarose no teste de preferência de sacarose foi proposta como um modelo de anedonia (PITYCHOUTIS et al., 2009), e a administração de LPS em camundongos reduziu a preferência por sacarose e a atividade locomotora (SONCINI et al., 2012). Como esperado, o presente estudo mostrou que o LPS reduziu significativamente a preferência pela sacarose e a atividade locomotora. Esses dados foram obtidos no final do período claro (atividade locomotora) e durante o período escuro (preferência pela sacarose) que se seguiu aos experimentos de hiperalgisia, o que pode explicar porque as reduções observadas não foram tão substanciais como em estudos anteriores (PITYCHOUTIS et al., 2009). O tratamento com BQ123 e BQ788 restaurou a atividade locomotora, mas apenas o BQ788 restaurou a preferência pela sacarose. Estes dados sugerem, portanto, que a ET-1 também está envolvida na indução destes comportamentos associados a infecção e que enquanto ambos os receptores endotelinérgicos estão envolvidos na hipolocomoção, apenas o receptor ET_B está envolvido na anedonia.

Já foi evidenciado que a perda da atividade motora está associada à doenças neurológicas, possivelmente como resultado da neuroinflamação (GLASS et al., 2010). Diversos estudos reportaram que a neuroinflamação é suprimida com a inibição do TLR-4, o que conseqüentemente minimiza o *déficit* motor em animais (FENG et al., 2017) mas o papel da ET-1 na hipolocomoção causada pela neuroinflamação não havia sido demonstrado.

Portanto, os dados reportados até o momento sugerem que a ET-1 tem um papel importante em diversos sinais e sintomas que caracterizam a síndrome de doença observada após a administração de LPS: na resposta febril (FABRICIO et al., 1998, 2005) e na anedonia através de receptores ET_B mas também na hiperalgesia térmica, na mecânica e na hipolocomoção através de ambos os receptores.

Envolvimento de receptores ET_A na resposta febril

Como mencionado anteriormente, com relação a resposta febril, o BQ788 aboliu o aumento da temperatura corporal induzido por LPS sugerindo a participação da endotelinas na resposta febril induzida por LPS através de receptores ET_B (FABRICIO et al., 1998). Adicionalmente, 3 h após a injeção de LPS, houve um aumento na concentração de ET-1 no líquido cefaloraquidiano simultaneamente à diminuição do seu precursor, a *big-endotelina* (FABRICIO et al., 2005). No entanto, o estudo inicial de Fabrício et al. (1998) sugeriu ainda que o receptor ET_A não participava da febre induzida por LPS, já que a administração de BQ123 15 minutos antes da administração do LPS, não reduziu a resposta febril.

No entanto, em estudos subsequentes em nosso laboratório observamos ratos submetidos à punção e ligadura do ceco (CLP) como modelo de septicemia, apresentaram febre (LEITE-AVALCA et al., 2016). Subseqüentemente imagens de uma termocâmera mostraram vasoconstrição periférica na cauda destes mesmos animais (LEITE-AVALCA et al. 2019). A vasoconstrição periférica é uma das estratégias do organismo para reter o calor e aumentar a temperatura corporal durante a resposta febril, assim juntamente com outras mudanças comportamentais e de produção de calor (MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2012).

O tratamento dos animais com BQ123 administrado no ventrículo lateral inibiu a vasoconstrição periférica, sugerindo que o receptor ET_A poderia estar envolvido na resposta febril (LEITE-AVALCA, 2018). Os modelos de febre utilizados nos estudos

Comentado [AZ32]: Aqui acredito que seja o trabalho da Fabrício 2005.

acima (FABRÍCIO et al, 1998 e LEITE-AVALCA et al., 2019) são bastante diferentes. Primeiramente, no estudo de Fabrício e colaboradores, a resposta febril é induzida pela injeção periférica de baixa dose de LPS por via endovenosa, sendo que a febre observada por Leite-Avalca e colaboradores, é derivada da presença de microorganismos viáveis do intestino, e portanto, polimicrobial. Além disso, com relação ao tempo de administração dos antagonistas, no primeiro estudo o BQ123 foi administrado 15 minutos antes da injeção do LPS, enquanto no segundo estudo este antagonista foi administrado em uma dose superior e 4 h após a indução da sepse.

No presente estudo, como avaliamos a participação da ET-1 em diferentes comportamentos relacionados a síndrome de doença (hiperalgesia, anedonia e hipolocomoção) enfocando ambos os receptores, decidimos investigar mais a fundo esta aparente discrepância para a participação da ET-1 na febre pela ativação de receptores ET_A, utilizando a indução de febre por LPS ao invés de um modelo polimicrobial complexo como a sepse.

A administração de baixas doses de LPS promoveu um aumento da temperatura corporal imediatamente após a administração. Esta rápida indução de febre após baixas doses já é conhecida. Esta primeira fase na curva temporal da resposta febril está relacionada principalmente ao reconhecimento do LPS pelos TLR-4 nas células hematopoiéticas (STEINER et al., 2006), além do aumento de enzimas que sintetizam PGE₂ no pulmão e no fígado (IVANOV et al., 2002). Em estudos que utilizaram doses ainda menores de LPS por via endovenosa, de 1 µg/Kg, a resposta febril se inicia em até dez minutos e é correlacionada com o início de outras respostas termo-efetoras. A febre observada a partir da segunda até a sexta hora envolve possivelmente células não hematopoiéticas, como os astrócitos e a micróglia (STEINER et al., 2006).

Os resultados obtidos demonstraram que independentemente do momento em que o tratamento dos animais com BQ123 é feito, este não é capaz de reduzir a resposta febril induzida por esta baixa dose de LPS. Embora tenha sido usada uma dose diferente daquela usada por Fabrício e colaboradores (1998), nossos resultados corroboram estes resultados encontrados anteriormente e confirmam a não participação de receptores ET_A na febre, nestas condições experimentais.

No entanto, avaliamos ainda o efeito do BQ123 sobre a febre induzida por uma dose mais elevada de LPS (200 µg/kg, i.p.). O modelo de injeção de altas doses de LPS é considerado um modelo de endotoxemia, e não de sepse, e os estudos

empregam doses variadas do polissacarídeo para induzir esta condição que variam de 100 µg/kg a 10 mg/kg (LOPES PIRES et al., 2019; STEVEN et al., 2017; SUN et al., 2015; WANG et al., 2018; ZILA et al., 2015).

Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento com BQ123 não modificou significativamente a resposta febril induzida por esta alta dose de LPS. No entanto, observamos que a resposta febril dos animais tratados com BQ123, embora não fosse significativamente diferente do grupo controle, apresentou vários pontos que também não foram diferentes do grupo que recebeu somente veículo, apresentando grande variabilidade.

Por outro lado, a administração do antagonista de receptores ET_A 2 h após a administração de LPS, reduziu significativamente e claramente a resposta febril induzida por este estímulo. Este resultado sugere que a ET-1 poderia participar da resposta febril induzida por altas doses de LPS através da ativação de receptores ET_A particularmente em uma fase mais tardia, uma vez que o pós-tratamento com este antagonista foi mais efetivo que o pré-tratamento.

Não encontramos na literatura estudos que avaliassem a cinética da expressão de receptores ET_A no hipotálamo ou em outras regiões cerebrais após a administração de LPS. Henrikson e colaboradores demonstraram que a expressão tanto de receptores ET_A quanto de receptores ET_B no cérebro aumentam após isquemia cerebral (HENRIKSSON et al., 2007). Ainda, artérias basilares cerebrais de ratas incubadas com fluido cefalorraquidiano de pacientes que apresentaram hemorragia subaracnóide apresentaram um aumento na expressão dos receptores endotelinérgicos 24 h após a exposição (CHENG et al., 2018).

O aumento na expressão de receptores endotelinérgicos induzido por LPS na periferia, particularmente com doses endotoxêmicas, já foi demonstrado. A injeção de 15 mg/kg de LPS em ratos induziu, 3 h após a administração, um aumento na expressão pulmonar de receptores ET_A e uma redução na expressão de receptores ET_B (JESMIN et al., 2011). Em artérias mesentéricas de rato, a administração de 5 mg/kg de LPS também induziu um aumento na expressão de ambos os receptores e este aumento foi dependente da ativação de NF-κB (ZHANG et al., 2019). Adicionalmente, a administração de 15 mg/kg de LPS em ratos aumentou a expressão tanto de receptores ET_A quanto de receptores ET_B em pequenas artérias renais (YAMAGUCHI et al., 2006). Interessantemente, neste estudo, enquanto o aumento na

expressão de receptores ET_B ocorreu 1 a 3 h após a administração de LPS, a expressão de receptores ET_A ocorreu em uma fase mais tardia.

Deste modo, é plausível que, de maneira similar ao que ocorre periféricamente, altas doses de LPS sejam capazes de promover um aumento na expressão de receptores ET_A no SNC e que nestas condições este receptor participe da resposta febril induzida por LPS.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo demonstram de maneira geral que a ET-1 tem um papel importante em diferentes fenômenos observados na síndrome de doença, entre eles a hiperalgesia, a anedonia, a hipolocomoção e a febre. Os dados apresentados nos permitem concluir que:

A administração i.c.v. de baixas doses de ET-1 induz hiperalgesia mecânica e térmica em ratos.

Tanto a hiperalgesia mecânica quanto a hiperalgesia térmica induzida pela administração i.c.v. de ET-1 dependem da ativação de receptores ET_A , ao passo que o bloqueio de receptores ET_B aumentou esta resposta.

A hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção central de ET-1 não depende da síntese de prostaglandinas.

A administração periférica de LPS induziu um comportamento de doença caracterizado por hiperalgesia, anedonia e hipolocomoção.

A ET-1 participa da hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS através da ativação tanto de receptores ET_A quanto de receptores ET_B .

A hiperalgesia mecânica induzida por LPS depende da ativação de receptores ET_A , mas não de receptores ET_B , presentes no hipotálamo.

A anedonia (redução do consumo de sacarose) induzida por LPS depende exclusivamente da ativação de receptores ET_B enquanto a hipolocomoção depende da ativação de ambos os receptores.

Os receptores ET_A estão envolvidos na resposta febril, outra característica da síndrome de doença, induzida por altas doses de LPS mas não na febre induzida por baixas doses deste polissacarídeo.

7 REFERÊNCIAS

AANONSEN, Linda M.; LEI, Sizheng; WILCOX, George L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 309–321, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)90008-2). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304395990900082>.

ABE, Michie; OKA, Takakazu; HORI, Tetsuro; TAKAHASHI, Shosuke. Prostanoids in the preoptic hypothalamus mediate systemic lipopolysaccharide-induced hyperalgesia in rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 916, n. 1, p. 41–49, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02861-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02861-X). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689930102861X>.

AHN, G. Y.; BUTT, K. I.; JINDO, T.; YAGUCHI, H.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alpha. **The Journal of dermatology**, England, v. 25, n. 2, p. 78–84, 1998. DOI: 10.1111/j.1346-8138.1998.tb02354.x.

ALEXANDER, Stephen P. H. et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 176 Suppl, n. Suppl 1, p. S21–S141, 2019. DOI: 10.1111/bph.14748.

ALEY, Kochuvelikam O.; LEVINE, Jon D. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 2181 LP – 2186, 1999. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-06-02181.1999. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/19/6/2181.abstract>.

BARTON, Gregory M.; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptor signaling pathways. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 300, n. 5625, p. 1524–1525, 2003. DOI: 10.1126/science.1085536.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, Diana M.; SCHERRER, Grégory; JULIUS, David. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

BASTOS-PEREIRA, A. L.; LEITE, M. C. G.; FRAGA, D.; ZAMPRONIO, A. R. Central mediators involved in the febrile response induced by polyinosinic–polycytidylic acid: Lack of involvement of endothelins and substance P. **Journal of Neuroimmunology**,

[S. I.], v. 278, p. 100–107, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.12.011>.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572814009953>.

BELLAVANCE, Marc-Andre; RIVEST, Serge. **The HPA – Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain** *Frontiers in Immunology*, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00136>.

BERNHEIM, H. A.; KLUGER, M. J. Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. *Science*, [S. I.], v. 193, n. 4249, p. 237 LP – 239, 1976. DOI: 10.1126/science.935867. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/193/4249/237.abstract>.

BERTON, Olivier; RAMOS, André; CHAOULOFF, Francis; MORMÉDE, Pierre. **Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: A multivariate analysis of six inbred rat strains.** *Behavior Genetics* Germany Springer, , 1997. DOI: 10.1023/A:1025641509809.

BJÖRK WILHELMS, Daniel; MIRRASEKHIAN, Elahe; ZAJDEL, Joanna; KUMAR SINGH, Anand; ENGBLOM, David. Cyclooxygenase Isoform Exchange Blocks Brain-Mediated Inflammatory Symptoms. *PloS one*, [S. I.], v. 11, n. 11, p. e0166153–e0166153, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0166153. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27861574>.

BLOCH, Kenneth D.; HONG, Charles C.; EDDY, Roger L.; SHOWS, Thomas B.; QUERTERMOUS, Thomas. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: Vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics*, [S. I.], v. 10, n. 1, p. 236–242, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90505-9](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90505-9). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0888754391905059>.

BLUTHE', Rose-Marie; DANTZER, Robert; KELLEY, Keith W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Research*, [S. I.], v. 573, n. 2, p. 318–320, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90779-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90779-9). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899392907799>.

BOIVIN, Stéphane; TESSIER, Sophie; AUBIN, Jacinthe; LAMPRON, Philippe; DETHEUX, Michel; FOURNIER, Alain. Identification of a Binding Domain of the

Endothelin-B Receptor Using a Selective IRL-1620-Derived Photoprobe. **Biochemistry**, [S. l.], v. 43, n. 36, p. 11516–11525, 2004. DOI: 10.1021/bi049246x. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi049246x>.

BOURSON, Anne; MOSER, Paul C.; GOWER, Alma J.; MIR, Anis K. Central and peripheral effects of the dihydropyridine calcium channel activator BAY K 8644 in the rat. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 160, n. 3, p. 339–347, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90089-7). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299989900897>.

BREMNES, T.; PAASCHE, J. D.; MEHLUM, A.; SANDBERG, C.; BREMNES, B.; ATTRAMADAL, H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 275, n. 23, p. 17596–17604, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M000142200.

BRITO, Haissa et al. Immune-mediated febrile response in female rats: Role of central hypothalamic mediators. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61210-z.

BRITO, Haissa Oliveira; BARBOSA, Felipe L.; REIS, Renata Cristiane Dos; FRAGA, Daniel; BORGES, Beatriz S.; FRANCO, Celia R. C.; ZAMPRONIO, Aleksander Roberto. Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- α , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. **Journal of Neuroimmunology**, [S. l.], v. 293, p. 1–7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.016>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572816300169>.

CAHILL, C. M.; DRAY, A.; CODERRE, T. J. Priming enhances endotoxin-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats. **Brain research**, Netherlands, v. 808, n. 1, p. 13–22, 1998. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00786-0.

CAPURON, Lucile; MILLER, Andrew H. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. **Biological psychiatry**, United States, v. 56, n. 11, p. 819–824, 2004. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.02.009.

CARDUCCI, Michael A.; JIMENO, Antonio. Targeting Bone Metastasis in Prostate Cancer with Endothelin Receptor Antagonists. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 20, p. 6296s LP-6300s, 2006. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0929. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/20/6296s.abstract>.

CHAN, Ying Kai; GACK, Michaela U. RIG-I-like receptor regulation in virus infection

and immunity. **Current opinion in virology**, [S. I.], v. 12, p. 7–14, 2015. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25644461>.

CHENG, Ya-Wen et al. Role of endothelin-1 and its receptors in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. **Molecular medicine reports**, Greece, v. 18, n. 6, p. 5229–5236, 2018. DOI: 10.3892/mmr.2018.9513.

CLARKE, Deborah L.; DAVIS, Nicola H. E.; MAJITHIYA, Jayesh B.; PIPER, Sian C.; LEWIS, Arthur; SLEEMAN, Matthew A.; CORKILL, Dominic J.; MAY, Richard D. Development of a mouse model mimicking key aspects of a viral asthma exacerbation. **Clinical Science**, [S. I.], v. 126, n. 8, p. 567–580, 2013. DOI: 10.1042/CS20130149. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20130149>.

CLERK, Angela; SUGDEN, Peter H. Regulation of Phospholipases C and D in Rat Ventricular Myocytes: Stimulation by Endothelin-1, Bradykinin and Phenylephrine. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S. I.], v. 29, n. 6, p. 1593–1604, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0395>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282897903953>.

COELHO, L. C. M.; CRUZ, J. V.; MABA, I. K.; ZAMPRONIO, Aleksander Roberto. Fever Induced by Zymosan A and Polyinosinic-Polycytidylic Acid in Female Rats: Influence of Sex Hormones and the Participation of Endothelin-1. **Inflammation**, [S. I.], 2020. DOI: 10.1007/s10753-020-01335-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01335-5>.

COLE, Steve W.; HAWKLEY, Louise C.; AREVALO, Jesusa M.; SUNG, Caroline Y.; ROSE, Robert M.; CACIOPPO, John T. Social regulation of gene expression in human leukocytes. **Genome biology**, [S. I.], v. 8, n. 9, p. R189, 2007. DOI: 10.1186/gb-2007-8-9-r189.

COOK, A. J.; WOOLF, C. J.; WALL, P. D. Prolonged C-fibre mediated facilitation of the flexion reflex in the rat is not due to changes in afferent terminal or motoneurone excitability. **Neuroscience letters**, Ireland, v. 70, n. 1, p. 91–96, 1986. DOI: 10.1016/0304-3940(86)90443-x.

D'AMICO, M.; BERRINO, L.; MAIONE, S.; FILIPPELLI, A.; DE NOVELLIS, V.; ROSSI, F. Endothelin-1 in periaqueductal gray area of mice induces analgesia via glutamatergic receptors. **Pain**, United States, v. 65, n. 2–3, p. 205–209, 1996. DOI:

10.1016/0304-3959(95)00178-6.

D'MELLO, Charlotte; RIAZI, Kiarash; LE, Tai; STEVENS, Katarzyna M.; WANG, Arthur; MCKAY, Derek M.; PITTMAN, Quentin J.; SWAIN, Mark G. P-Selectin-Mediated Monocyte-Cerebral Endothelium Adhesive Interactions Link Peripheral Organ Inflammation To Sickness Behaviors. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 37, p. 14878 LP – 14888, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1329-13.2013. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/33/37/14878.abstract>.

DA CUNHA, Joice M.; RAE, Giles A.; FERREIRA, Sérgio H.; CUNHA, Fernando de Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 501, n. 1–3, p. 87–94, 2004. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.08.004.

DAHLÖF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, T.; JERN, S.; HANSSON, L. Regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reaction. **Journal of hypertension**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 811–817, 1990. DOI: 10.1097/00004872-199009000-00004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004872-199009000-00004>.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v. 933, p. 222–234, 2001. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05827.x.

DANTZER, Robert. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 500, n. 1–3, p. 399–411, 2004. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.040.

DAVIE, NEIL; HALEEN, STEPHEN J.; UPTON, PAUL D.; POLAK, JULIA M.; YACOUB, MAGDI H.; MORRELL, NICHOLAS W.; WHARTON, JOHN. ETA and ETB Receptors Modulate the Proliferation of Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 165, n. 3, p. 398–405, 2002. DOI: 10.1164/ajrccm.165.3.2104059. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.3.2104059>.

DE-MELO, J. D.; TONUSSI, C. R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RAE, G. A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, United States, v. 77, n. 3, p. 261–269, 1998. DOI: 10.1016/s0304-3959(98)00098-0.

DE OLIVEIRA, Bruna M. T.; TELLES, Tatiane M. B. B.; LOMBA, Luiz A.; CORREIA, Diego; ZAMPRONIO, Aleksander R. Effects of binge-like ethanol exposure during adolescence on the hyperalgesia observed during sickness syndrome in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 160, p. 63–69, 2017. DOI: 10.1016/J.PBB.2017.08.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305717301673>. Acesso em: 9 mar. 2020.

DELLAGIOIA, Nicole; DEVINE, Lesley; PITTMAN, Brian; HANNESTAD, Jonas. Bupropion pre-treatment of endotoxin-induced depressive symptoms. **Brain, behavior, and immunity**, Netherlands, v. 31, p. 197–204, 2013. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.10.008.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of infectious diseases**, United States, v. 10, n. 1, p. 168–189, 1988. DOI: 10.1093/clinids/10.1.168.

DOSTROVSKY, Jonathan O.; GUILBAUD, Gisele. Nociceptive responses in medial thalamus of the normal and arthritic rat. **Pain**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 93–104, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91056-O](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91056-O). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030439599091056O>.

DUNCAN, Marnie; GALIC, Michael A.; WANG, Arthur; CHAMBERS, Adam P.; MCCAFFERTY, Donna-Marie; MCKAY, Derek M.; SHARKEY, Keith A.; PITTMAN, Quentin J. Cannabinoid 1 receptors are critical for the innate immune response to TLR4 stimulation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 305, n. 3, p. R224–R231, 2013. DOI: 10.1152/ajpregu.00104.2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00104.2013>.

EISENBERGER, Naomi I.; INAGAKI, Tristen K.; RAMESON, Lian T.; MASHAL, Nehjla M.; IRWIN, Michael R. An fMRI study of cytokine-induced depressed mood and social pain: the role of sex differences. **NeuroImage**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 881–890, 2009. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2009.04.040.

EISENBERGER, Naomi I.; MOIENI, Mona. Inflammation affects social experience: implications for mental health. **World Psychiatry**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 109–110, 2020. DOI: 10.1002/wps.20724. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wps.20724>.

ERCAN, Z. S.; KILINÇ, M.; YAZAR, O.; KORKUSUZ, P.; TÜRKER, R. K. Endothelin-1-induced oedema in rat and guinea-pig isolated perfused lungs. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, Belgium, v. 323, p. 74–84, 1993.

FABRICIO, A. S.; SILVA, C. A.; RAE, G. A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. **British journal of pharmacology**, England, v. 125, n. 3, p. 542–548, 1998. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702075.

FABRICIO, Aline S. C.; RAE, Giles A.; D'ORLÉANS-JUSTE, Pedro; SOUZA, Glória E. P. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain research**, Netherlands, v. 1066, n. 1–2, p. 92–100, 2005. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.10.037.

FARKAS, Eszter; DONKA, Gergely; DE VOS, Rob A. I.; MIHÁLY, András; BARI, Ferenc; LUITEN, Paul G. M. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. **Acta neuropathologica**, Germany, v. 108, n. 1, p. 57–64, 2004. DOI: 10.1007/s00401-004-0864-9.

FARRUGIA, Mark; BARON, Byron. The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. **International journal of inflammation**, [S. l.], v. 2017, p. 8391230, 2017. DOI: 10.1155/2017/8391230. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28553556>.

FENG, Yan; GAO, Junling; CUI, Ying; LI, Minghang; LI, Ran; CUI, Changmeng; CUI, Jianzhong. Neuroprotective Effects of Resatorvid Against Traumatic Brain Injury in Rat: Involvement of Neuronal Autophagy and TLR4 Signaling Pathway. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 155–168, 2017. DOI: 10.1007/s10571-016-0356-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0356-1>.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 1227–1231, 1993. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13946.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8298813>.

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **Journal of cardiovascular pharmacology**, United States, v. 13 Suppl 5, p. S220-2, 1989. DOI: 10.1097/00005344-198900135-00065.

FILIPOVICH-RIMON, Talia; FLEISHER-BERKOVICH, Sigal. Glial response to

lipopolysaccharide: Possible role of endothelins. **Peptides**, [S. l.], v. 31, n. 12, p. 2269–2275, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.09.007>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019697811000392X>.

FRAGA, Daniel; MACHADO, Renes R.; FERNANDES, Luíz C.; SOUZA, Glória E. P.; ZAMPRONIO, Aleksander R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, United States, v. 294, n. 2, p. R411-20, 2008. DOI: 10.1152/ajpregu.00465.2007.

FRAGA, Daniel; ZANONI, Cristiane I. S. S.; ZAMPRONIO, Aleksander R.; PARADA, Carlos A.; RAE, Giles A.; SOUZA, Glória E. P. P. Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 51, p. 204–211, 2016. a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.014>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159115004705>. Acesso em: 10 mar. 2020.

FRAGA, Daniel; ZANONI, Cristiane I. S.; ZAMPRONIO, Aleksander R.; PARADA, Carlos A.; RAE, Giles A.; SOUZA, Glória E. P. Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 51, p. 204–211, 2016. b. DOI: 10.1016/J.BBI.2015.08.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159115004705>. Acesso em: 10 mar. 2020.

FREEDMAN, N. J.; AMENT, A. S.; OPPERMANN, M.; STOFFEL, R. H.; EXUM, S. T.; LEFKOWITZ, R. J. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 272, n. 28, p. 17734–17743, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.28.17734.

FRIEDLAENDER, M. M.; JAIN, D.; AHMED, Z.; HART, D.; BARNETT, R. L.; NORD, E. P. Endothelin activation of phospholipase D: dual modulation by protein kinase C and Ca²⁺. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 264, n. 5, p. F845–F853, 1993. DOI: 10.1152/ajprenal.1993.264.5.F845. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.264.5.F845>.

GHONEIM, Magdy Ahmed; YAMAMOTO, Tadashi; HIROSE, Shigehisa; NAGASAWA, Toru; HAGIWARA, Hiromi. Endothelium Localization of ETB Receptor Revealed by Immunohistochemistry. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [S. l.], v. 22, 1993. Disponível em:

https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/1993/22008/Endothelium_Localization_of_ETB_Receptor_Revealed.30.aspx.

GLASS, Christopher K.; SAIJO, Kaoru; WINNER, Beate; MARCHETTO, Maria Carolina; GAGE, Fred H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.016.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & behavior**, United States, v. 47, n. 5, p. 963–991, 1990. DOI: 10.1016/0031-9384(90)90025-y.

HANNESTAD, Jonas; DELLAGIOIA, Nicole; ORTIZ, Nyрма; PITTMAN, Brian; BHAGWAGAR, Zubin. Citalopram reduces endotoxin-induced fatigue. **Brain, behavior, and immunity**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 256–259, 2011. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.10.013.

HANS, Guy; DESEURE, Kristof; ROBERT, Dominique; DE HERT, Stefan. Neurosensory changes in a human model of endothelin-1 induced pain: A behavioral study. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 418, n. 2, p. 117–121, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.03.008>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030439400700290X>.

HANS, Guy; SCHMIDT, Brian L.; STRICHARTZ, Gary. Nociceptive sensitization by endothelin-1. **Brain research reviews**, Netherlands, v. 60, n. 1, p. 36–42, 2009. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.008.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United States, v. 12, n. 2, p. 123–137, 1988. DOI: 10.1016/s0149-7634(88)80004-6.

HARTMANN, G. Nucleic Acid Immunity. **Advances in immunology**, [S. l.], v. 133, p. 121–169, 2017. DOI: 10.1016/bs.ai.2016.11.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28215278>.

HASDAY, Jeffrey D.; THOMPSON, Christopher; SINGH, Ishwar S. Fever, immunity, and molecular adaptations. **Comprehensive Physiology**, United States, v. 4, n. 1, p. 109–148, 2014. DOI: 10.1002/cphy.c130019.

HASUE, Fumio; KUWAKI, Tomoyuki; YAMADA, Hiroaki; FUKUDA, Yasuichiro; SHIMOYAMA, Megumi. Inhibitory actions of endothelin-1 on pain processing. **Journal of cardiovascular pharmacology**, United States, v. 44 Suppl 1, p. S318-20, 2004. DOI: 10.1097/01.fjc.0000166271.40044.0c.

HEINRICHER, M. M.; NEUBERT, M. J.; MARTENSON, M. E.; GONCALVES, L. Prostaglandin E2 in the medial preoptic area produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience**, United States, v. 128, n. 2, p. 389–398, 2004. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.050.

HELD, Brigitte; POCOCK, Jennifer M.; PEARSON, H. A. Endothelin-1 inhibits voltage-sensitive Ca²⁺ channels in cultured rat cerebellar granule neurones via the ET-A receptor. **Pflügers Archiv**, [S. l.], v. 436, n. 5, p. 766–775, 1998. DOI: 10.1007/s004240050700. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004240050700>.

HENNESSY, Michael B.; DEAK, Terrence; SCHIML, Patricia A. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure? **Brain, behavior, and immunity**, [S. l.], v. 37, p. 15–20, 2014. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.10.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184399>.

HENRIKSSON, Marie; STENMAN, Emelie; VIKMAN, Petter; EDVINSSON, Lars. MEK1/2 inhibition attenuates vascular ETA and ETB receptor alterations after cerebral ischaemia. **Experimental brain research**, Germany, v. 178, n. 4, p. 470–476, 2007. DOI: 10.1007/s00221-006-0753-7.

HORI, T.; OKA, T.; HOSOI, M.; ABE, M.; OKA, K. Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v. 917, p. 106–120, 2000. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05375.x.

HORNG, Tiffany; BARTON, Gregory M.; FLAVELL, Richard A.; MEDZHITOV, Ruslan. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. **Nature**, England, v. 420, n. 6913, p. 329–333, 2002. DOI: 10.1038/nature01180.

HOSTENBACH, Stéphanie; D'HAESELEER, Miguel; KOOIJMAN, Ron; DE KEYSER, Jacques. The pathophysiological role of astrocytic endothelin-1. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 144, 2016. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.04.009.

HOUDE, M.; DESBIENS, L.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Endothelin-1: Biosynthesis,

Signaling and Vasoreactivity. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, United States, v. 77, p. 143–175, 2016. DOI: 10.1016/bs.apha.2016.05.002.

HSIEH, Cheng-Ta; LEE, Yih-Jing; DAI, Xiaoli; OJEDA, Norma Beatriz; LEE, Hyun Joon; TIEN, Lu-Tai; FAN, Lir-Wan. Systemic Lipopolysaccharide-Induced Pain Sensitivity and Spinal Inflammation Were Reduced by Minocycline in Neonatal Rats. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 2947, 2018. DOI: 10.3390/ijms19102947. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30262747>.

HUANG, C. F.; DU, J. X.; DENG, W.; CHENG, X. C.; ZHANG, S. Y.; ZHAO, S. J.; TAO, M. J.; CHEN, G. Z.; HAO, X. Q. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. **Neuroscience**, [S. l.], v. 286, p. 364–370, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.002>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452214010343>.

HUNG, Victor K. L.; CHEN, Samantha M. Y.; TAI, Lydia W.; CHEN, Ann Y. S.; CHUNG, Sookja K.; CHEUNG, C. W. Over-expression of endothelin-1 in astrocytes, but not endothelial cells, ameliorates inflammatory pain response after formalin injection. **Life sciences**, Netherlands, v. 91, n. 13–14, p. 618–622, 2012. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.06.038.

HUNT, S. P.; ROSSI, J. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, England, v. 308, n. 1136, p. 283–289, 1985. DOI: 10.1098/rstb.1985.0028.

HUNTER, Alison; TURNER, Anthony. Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, [S. l.], v. 231, p. 718–722, 2006.

HURTADO DEL POZO, Carmen et al. A Receptor of the Immunoglobulin Superfamily Regulates Adaptive Thermogenesis. **Cell Reports**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 773–791.e7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.061>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124719308344>.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 86, n. 8, p. 2863–

2867, 1989. DOI: 10.1073/pnas.86.8.2863.

IVANOV, Andrei I.; PERO, Ralph S.; SCHECK, Adrienne C.; ROMANOVSKY, Andrej A. Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, United States, v. 283, n. 5, p. R1104-17, 2002. DOI: 10.1152/ajpregu.00347.2002.

JESMIN, Subrina; YAMAGUCHI, Naoto; ZAEDI, Sohel; SULTANA, Sayeeda; IWASHIMA, Yoshio; SAWAMURA, Atsushi; GANDO, Satoshi. Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on acute lung injury in an endotoxemic rat model. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, [S. l.], v. 32, p. 9–17, 2011. DOI: 10.2220/biomedres.32.9.

JIANG, M. H.; HÖÖG, A.; MA, K. C.; NIE, X. J.; OLSSON, Y.; ZHANG, W. W. Endothelin-1-like immunoreactivity is expressed in human reactive astrocytes. **Neuroreport**, England, v. 4, n. 7, p. 935–937, 1993. DOI: 10.1097/00001756-199307000-00024.

KALLAKURI, S.; KREIPKE, C. W.; SCHAFER, P. C.; SCHAFER, S. M.; RAFOLS, J. A. Brain cellular localization of endothelin receptors A and B in a rodent model of diffuse traumatic brain injury. **Neuroscience**, [S. l.], v. 168, n. 3, p. 820–830, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.018>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210000199>.

KATO, Hiroki et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, England, v. 441, n. 7089, p. 101–105, 2006. DOI: 10.1038/nature04734.

KAWABATA, Atsufumi. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v. 34, n. 8, p. 1170–1173, 2011. DOI: 10.1248/bpb.34.1170.

KAWASAKI, Takumi; KAWAI, Taro. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 5, p. 461, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25309543>.

KHIMJI, Al-Karim; ROCKEY, Don C. Endothelin--biology and disease. **Cellular signalling**, England, v. 22, n. 11, p. 1615–1625, 2010. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.05.002.

KHODOROVA, Alla; FAREED, Moin U.; GOKIN, Alexander; STRICHARTZ, Gary R.; DAVAR, Gudarz. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, United States, v. 22, n. 17, p. 7788–7796, 2002.

KHODOROVA, Alla; MONTMAYEUR, Jean-Pierre; STRICHARTZ, Gary. Endothelin receptors and pain. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, United States, v. 10, n. 1, p. 4–28, 2009. DOI: 10.1016/j.jpain.2008.09.009.

KIM, Young Keun; SHIN, Jeon Soo; NAHM, Moon H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei medical journal**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 5–14, 2016. DOI: 10.3349/ymj.2016.57.1.5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26632377>.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological reviews**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 93–127, 1991. DOI: 10.1152/physrev.1991.71.1.93.

KLUGER, M. J.; KOZAK, W.; LEON, L. R.; SOSZYNSKI, D.; CONN, C. A. Cytokines and fever. **Neuroimmunomodulation**, Switzerland, v. 2, n. 4, p. 216–223, 1995. DOI: 10.1159/000097199.

KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 188, n. 4184, p. 166–168, 1975.

KOBRZYCKA, Anna; NAPORA, Paweł; PEARSON, Brandon L.; PIERZCHAŁA-KOZIEC, Krystyna; SZEWCZYK, Rafał; WIECZOREK, Marek. Peripheral and central compensatory mechanisms for impaired vagus nerve function during peripheral immune activation. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 150, 2019. DOI: 10.1186/s12974-019-1544-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1544-y>.

KONSMAN, Jan Pieter; PARNET, Patricia; DANTZER, Robert. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in neurosciences**, England, v. 25, n. 3, p. 154–159, 2002. DOI: 10.1016/s0166-2236(00)02088-9.

KOPETZ, E. Scott; NELSON, Joel B.; CARDUCCI, Michael A. Endothelin-1 as a Target for Therapeutic Intervention in Prostate Cancer. **Investigational New Drugs**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 173–182, 2002. DOI: 10.1023/A:1015630513908. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1015630513908>.

KOYAMA, Yutaka; MICHINAGA, Shotaro. Regulations of Astrocytic Functions by Endothelins: Roles in the Pathophysiological Responses of Damaged Brains. **Journal of Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 118, n. 4, p. 401–407, 2012. DOI: 10.1254/jphs.11R13CP.

KUBIN, M.; CHOW, J. M.; TRINCHIERI, G. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, United States, v. 83, n. 7, p. 1847–1855, 1994.

KUNER, Rohini. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010. DOI: 10.1038/nm.2231. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2231>.

LALICH, Mihailo; MCNEEL, Douglas G.; WILDING, George; LIU, Glenn. Endothelin receptor antagonists in cancer therapy. **Cancer investigation**, England, v. 25, n. 8, p. 785–794, 2007. DOI: 10.1080/07357900701522588.

LATREMOLIERE, Alban; WOOLF, Clifford J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009. DOI: 10.1016/j.jpain.2009.06.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19712899>.

LAZARUS, Michael; YOSHIDA, Kyoko; COPPARI, Roberto; BASS, Caroline E.; MOCHIZUKI, Takatoshi; LOWELL, Bradford B.; SAPER, Clifford B. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nature neuroscience**, United States, v. 10, n. 9, p. 1131–1133, 2007. DOI: 10.1038/nn1949.

LEITE-AVALCA, M. C. G.; LOMBA, L. A.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; BRITO, H. O.; FRAGA, D.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of Central Endothelin et A and Cannabinoid CB 1 Receptors and Arginine Vasopressin Release in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats. **Shock**, [S. l.], v. 46, n. 3, 2016. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000598.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, United States, v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80172-5.

LIEBERWIRTH, Claudia; WANG, Zuoxin. Social bonding: regulation by neuropeptides. **Frontiers in neuroscience**, [S. l.], v. 8, p. 171, 2014. DOI: 10.3389/fnins.2014.00171. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25009457>.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, United States, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008. DOI: 10.1016/j.pain.2008.04.025.

LOO, Yueh-Ming; GALE JR, Michael. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 680–692, 2011. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21616437>.

LOPES PIRES, Maria E.; ANTUNES NAIME, Ana C.; OLIVEIRA, Jessica G. F.; ANHE, Gabriel F.; GARRAUD, Oliver; COGNASSE, Fabrice; ANTUNES, Edson; MARCONDES, Sisi. Signalling pathways involved in p47phox-dependent reactive oxygen species in platelets of endotoxemic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 124, n. 4, p. 394–403, 2019. DOI: 10.1111/bcpt.13148. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13148>.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22019906>.

LORAM, Lisa C.; TAYLOR, Frederick R.; STRAND, Keith A.; FRANK, Matthew G.; SHOLAR, Paige; HARRISON, Jacqueline A.; MAIER, Steven F.; WATKINS, Linda R. Prior exposure to glucocorticoids potentiates lipopolysaccharide induced mechanical allodynia and spinal neuroinflammation. **Brain, behavior, and immunity**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1408–1415, 2011. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.04.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21536123>.

LU, Yong-Chen; YEH, Wen-Chen; OHASHI, Pamela S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466608000070>.

LUHESHI, Giamal; BLUTHÉ, Rose-Marie; RUSHFORTH, D.; MULCAHY, Nicholas; KONSMAN, Jan Pieter; GOLDBACH, Michael; DANTZER, Robert. Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats.

Autonomic neuroscience : basic & clinical, [S. l.], v. 85, p. 127–132, 2000. DOI: 10.1016/S1566-0702(00)00231-9.

LÜSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation**, United States, v. 102, n. 19, p. 2434–2440, 2000. DOI: 10.1161/01.cir.102.19.2434.

MACARTHUR, H.; WARNER, T. D.; WOOD, E. G.; CORDER, R.; VANE, J. R. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 200, n. 1, p. 395–400, 1994. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1462.

MACKOWIAK, Philip A. Concepts of Fever. **Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 158, n. 17, p. 1870–1881, 1998. DOI: 10.1001/archinte.158.17.1870. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archinte.158.17.1870>.

MAIER, Steven F.; WIERTELAK, Eric P.; MARTIN, David; WATKINS, Linda R. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. **Brain Research**, [S. l.], v. 623, n. 2, p. 321–324, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91446-Y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91446-Y). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939391446Y>.

MAIHÖFNER, Christian; JESBERGER, Florian; SEIFERT, Frank; KALTENHÄUSER, Martin. Cortical processing of mechanical hyperalgesia: A MEG study. **European Journal of Pain**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 64–70, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.02.007>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090380109000305>.

MAJER, Olivia; LIU, Bo; BARTON, Gregory M. Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation. **Current opinion in immunology**, [S. l.], v. 44, p. 26–33, 2017. DOI: 10.1016/j.coi.2016.10.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27907816>.

MALEK, A.; IZUMO, S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. **The American journal of physiology**, United States, v. 263, n. 2 Pt 1, p. C389-96, 1992. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.263.2.C389.

MASAKI, Tomoh. Endothelins: Homeostatic and Compensatory Actions in the

Circulatory and Endocrine Systems. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 256–268, 1993. DOI: 10.1210/edrv-14-3-256. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/edrv-14-3-256>.

MATSUJURA, A.; YAMOCHI, W.; HIRATA, K.; KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, United States, v. 32, n. 1, p. 89–95, 1998. DOI: 10.1161/01.hyp.32.1.89.

MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001. DOI: 10.1038/35100529. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35100529>.

MILLER, N. E. **Some Psychophysiological Studies of Motivation and of the Behavioural Effects of Illness**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=83sVywEACAAJ>.

MIÑANO, F. J.; FERNÁNDEZ-ALONSO, A.; MYERS, R. D.; SANCIBRIÁN, M. Hypothalamic interaction between macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in rats: a new level for fever control? **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 491 (Pt 1, n. Pt 1, p. 209–217, 1996. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9011612>.

MOIENI, Mona; EISENBERGER, Naomi I. Effects of inflammation on social processes and implications for health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1428, n. 1, p. 5–13, 2018. DOI: 10.1111/nyas.13864.

MORRISON, Shaun F.; MADDEN, Christopher J.; TUPONE, Domenico. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. **Frontiers in endocrinology**, [S. l.], v. 3, n. 5, 2012. DOI: 10.3389/fendo.2012.00005.

MOTTA, Emerson M.; CHICHORRO, Juliana G.; D'ORLÉANS-JUSTE, Pedro; RAE, Giles A. Roles of endothelin ETA and ETB receptors in nociception and chemical, thermal and mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in the rat hindpaw. **Peptides**, United States, v. 30, n. 5, p. 918–925, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2009.01.011.

MUZIO, Marta; NI, Jian; FENG, Ping; DIXIT, Vishva M. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. **Science**, [S. l.], v. 278, n.

5343, p. 1612 LP – 1615, 1997. DOI: 10.1126/science.278.5343.1612. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/278/5343/1612.abstract>.

NAIDOO, V.; NAIDOO, S.; RAIDOO, D. M. Immunolocalisation of endothelin-1 in human brain. **Journal of chemical neuroanatomy**, Netherlands, v. 27, n. 3, p. 193–200, 2004. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2004.03.007.

NAKAMURA, Kazuhiro. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 5, p. R1207–R1228, 2011. DOI: 10.1152/ajpregu.00109.2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>.

NAKAMURA, Kazuhiro; MATSUMURA, Kiyoshi; KANEKO, Takeshi; KOBAYASHI, Shigeo; KATOH, Hironori; NEGISHI, Manabu. The Rostral Raphe Pallidus Nucleus Mediates Pyrogenic Transmission from the Preoptic Area. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 11, p. 4600 LP – 4610, 2002. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-11-04600.2002. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/22/11/4600.abstract>.

NELSON, Joel; BAGNATO, Anna; BATTISTINI, Bruno; NISEN, Perry. The endothelin axis: emerging role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 110–116, 2003. DOI: 10.1038/nrc990. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc990>.

NETEA, Mihai G.; VAN DER GRAAF, Chantal A. A.; VONK, Alieke G.; VERSCHUEREN INEKE; VAN DER MEER, Jos W. M.; KULLBERG, Bart Jan. The Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the Host Defense against Disseminated Candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 185, n. 10, p. 1483–1489, 2002. DOI: 10.1086/340511. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/340511>.

NEUGEBAUER, Volker; LI, Weidong. Differential sensitization of amygdala neurons to afferent inputs in a model of arthritic pain. **Journal of neurophysiology**, United States, v. 89, n. 2, p. 716–727, 2003. DOI: 10.1152/jn.00799.2002.

NIKOLOV, R.; MASLAROVA, J.; SEMKOVA, I.; MOYANOVA, S. Intracerebroventricular endothelin-1 (ET-1) produces Ca(2+)-mediated antinociception in mice. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, Spain, v. 14, n. 3, p. 229–233, 1992.

OSHIUMI, Hiroyuki; SASAI, Miwa; SHIDA, Kyoko; FUJITA, Takashi; MATSUMOTO,

Misako; SEYA, Tsukasa. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 278, n. 50, p. 49751–49762, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M305820200.

OSLER, William. **The principles and practice of medicine**. [s.l.] : D. Appleton and Company, 1912.

OWENS, David F.; KRIEGSTEIN, Arnold R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature reviews. Neuroscience**, England, v. 3, n. 9, p. 715–727, 2002. DOI: 10.1038/nrn919.

PARK, Beom Seok; LEE, Jie-Oh. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 12, p. e66–e66, 2013. DOI: 10.1038/emm.2013.97. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>.

PAXINOS, George; WATSON, Charles R. R.; EMSON, Piers C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 129–149, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(80\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(80)90021-7). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165027080900217>.

PECCHI, Emilie; DALLAPORTA, Michel; JEAN, André; THIRION, Sylvie; TROADEC, Jean-Denis. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiology & behavior**, United States, v. 97, n. 3–4, p. 279–292, 2009. DOI: 10.1016/j.physbeh.2009.02.040.

PEIFLEY, Kimberly A.; WINKLES, Jeffrey A. Angiotensin II and Endothelin-1 Increase Fibroblast Growth Factor-2 mRNA Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 242, n. 1, p. 202–208, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7940>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X97979407>.

PIERRE, Moreau; V., D'Uscio Livius; SIDNEY, Shaw; HIROYUKI, Takase; MATTHIAS, Barton; F., Lüscher Thomas. Angiotensin II Increases Tissue Endothelin and Induces Vascular Hypertrophy . **Circulation**, [S. l.], v. 96, n. 5, p. 1593–1597, 1997. DOI: 10.1161/01.CIR.96.5.1593. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1593>.

PIOVEZAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E.; RAE, G. A. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **British journal of pharmacology**, England, v. 129, n. 5, p. 961–968, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703154.

PITYCHOUTIS, P. M.; NAKAMURA, K.; TSONIS, P. A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**, United States, v. 159, n. 4, p. 1216–1232, 2009. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.072.

POMONIS, James D.; ROGERS, Scott D.; PETERS, Christopher M.; GHILARDI, Joseph R.; MANTYH, Patrick W. Expression and Localization of Endothelin Receptors: Implications for the Involvement of Peripheral Glia in Nociception. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 999 LP – 1006, 2001. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-03-00999.2001. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/21/3/999.abstract>.

POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, England, v. 126, n. 3, p. 649–656, 1999. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702347.

POULAT, P.; COUTURE, R. Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 344, n. 2–3, p. 251–259, 1998. DOI: 10.1016/s0014-2999(97)01569-0.

RAFFA, R. B.; SCHUPSKY, J. J.; JACOBY, H. I. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, United States, v. 276, n. 2, p. 647–651, 1996.

RAFFA, Robert B.; JACOBY, Henry I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sciences**, [S. l.], v. 48, n. 17, p. PL85–PL90, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90130-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90130-4). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0024320591901304>.

REIS, R. C.; BRITO, H. O.; FRAGA, D.; CABRINI, D. A.; ZAMPRONIO, A. R. Central substance P NK₁ receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and

CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain research**, Netherlands, v. 1384, p. 161–169, 2011. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.001.

REN, Ke; HYLDEN, Janice L. K.; WILLIAMS, Gene M.; RUDA, M. A.; DUBNER, Ronald. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. **PAIN**, [S. l.], v. 50, n. 3, 1992. Disponível em: https://journals.lww.com/pain/Fulltext/1992/09000/The_effects_of_a_non_competitive_NMDA_receptor.13.aspx.

RIZVI, T. A.; MURPHY, A. Z.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M. M.; SHIPLEY, M. T. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 333–344, 1996. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-01-00333.1996.

ROSSOL, Manuela; HEINE, Holger; MEUSCH, Undine; QUANDT, Dagmar; KLEIN, Carina; SWEET, Matthew; HAUSCHILDT, Sunna. LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. **Critical reviews in immunology**, [S. l.], v. 31, p. 379–446, 2011. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20.

ROTH, Joachim; BLATTEIS, Clark M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Comprehensive Physiology**, United States, v. 4, n. 4, p. 1563–1604, 2014. DOI: 10.1002/cphy.c130033.

ROTHWELL, N. J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat. **The American journal of physiology**, United States, v. 256, n. 1 Pt 1, p. E111-5, 1989. DOI: 10.1152/ajpendo.1989.256.1.E111.

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological reviews**, United States, v. 46, n. 3, p. 325–415, 1994.

RUBIN, S. A.; LEVIN, E. R. Clinical review 53: The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, United States, v. 78, n. 1, p. 6–10, 1994. DOI: 10.1210/jcem.78.1.8288715.

SAIDA, K.; MITSUI, Y.; ISHIDA, N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological

activity. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 264, n. 25, p. 14613–14616, 1989.

SAKURAI-YAMASHITA, Yasuko; YAMASHITA, Kimihiro; YOSHIDA, Akira; OBANA, Motoo; TAKADA, Kohei; SHIBAGUCHI, Hirotomo; SHIGEMATSU, Kazuto; NIWA, Masami; TANIYAMA, Kohtaro. Rat peritoneal macrophages express endothelin ETB but not endothelin ETA receptors. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 338, n. 2, p. 199–203, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)81949-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)81949-8). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299997819498>.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Molecular characterization of endothelin receptors. **Trends in pharmacological sciences**, England, v. 13, n. 3, p. 103–108, 1992. DOI: 10.1016/0165-6147(92)90038-8.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, England, v. 348, n. 6303, p. 732–735, 1990. DOI: 10.1038/348732a0.

SASAKI, Y.; TAKIMOTO, M.; ODA, K.; FRUH, T.; TAKAI, M.; OKADA, T.; HORI, S. Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. **Journal of neurochemistry**, England, v. 68, n. 5, p. 2194–2200, 1997. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.68052194.x.

SCAMMELL, T. E.; ELMQUIST, J. K.; GRIFFIN, J. D.; SAPER, C. B. Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 19, p. 6246–6254, 1996. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-19-06246.1996.

SCAPIGLIATI, G.; BUONOCORE, F.; MAZZINI, M. Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective. **Current pharmaceutical design**, United Arab Emirates, v. 12, n. 24, p. 3071–3081, 2006. DOI: 10.2174/138161206777947489.

SCHILTZ, Jennifer C.; SAWCHENKO, Paul E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 13, p. 5606–5618, 2002. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05606.2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12097512>.

SHETTY, S. S.; OKADA, T.; WEBB, R. L.; DELGRANDE, D.; LAPPE, R. W. Functionally Distinct Endothelin B Receptors in Vascular Endothelium and Smooth Muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 191, n. 2, p. 459–464, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1240>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X83712404>.

SINGHMAR, Pooja et al. Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 113, n. 11, p. 3036–3041, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1516036113.

SLAVICH, George M.; WAY, Baldwin M.; EISENBERGER, Naomi I.; TAYLOR, Shelley E. Neural sensitivity to social rejection is associated with inflammatory responses to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 107, n. 33, p. 14817–14822, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009164107. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20679216>.

SMITH, Terika P.; HAYMOND, Tami; SMITH, Sherika N.; SWEITZER, Sarah M. Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. **Journal of pain research**, [S. l.], v. 7, p. 531–545, 2014. DOI: 10.2147/JPR.S65923. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210474>.

SOARES, Denis Melo; FIGUEIREDO, Maria José; MARTINS, Juliano Manvailer; MACHADO, Renes Resende; KANASHIRO, Alexandre; MALVAR, David do Carmo; PESSINI, Andréa Carla; ROTH, Joachim; SOUZA, Glória Emília Petto. CCL3/MIP-1 alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. **Brain research**, Netherlands, v. 1269, p. 54–60, 2009. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.03.003.

SOARES, Denis Melo; MACHADO, Renes R.; YAMASHIRO, Lívia H.; MELO, Miriam C. C.; SOUZA, Glória E. P. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. **Brain research**, Netherlands, v. 1233, p. 79–88, 2008. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.07.069.

SONCINI, Roseli; DE SOUZA, Denise F.; NEVES, Andrea P.; BRAGA, Daniela S.; ANDRADE, Carina A. F.; GIUSTI-PAIVA, Alexandre. Dipyron attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience letters**, Ireland, v.

516, n. 1, p. 114–118, 2012. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.070.

SONG, Kun; WANG, Hong; KAMM, Gretel B.; POHLE, Jörg; REIS, Fernanda de Castro; HEPPENSTALL, Paul; WENDE, Hagen; SIEMENS, Jan. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. **Science**, [S. l.], v. 353, n. 6306, p. 1393 LP – 1398, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf7537. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/353/6306/1393.abstract>.

SOUZA, Leonardo C.; MARTYNHAK, Bruno J.; BASSANI, Taysa B.; TURNES, Joelle de M.; MACHADO, Meira M.; MOURA, Eric; ANDREATINI, Roberto; VITAL, Maria A. B. F. Agomelatine's effect on circadian locomotor rhythm alteration and depressive-like behavior in 6-OHDA lesioned rats. **Physiology & behavior**, United States, v. 188, p. 298–310, 2018. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.02.033.

SPECIALE, L.; RODA, K.; SARESELLA, M.; TARAMELLI, D.; FERRANTE, P. Different endothelins stimulate cytokine production by peritoneal macrophages and microglial cell line. **Immunology**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 109–114, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00391.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9536126>.

STEINER, Alexandre A.; CHAKRAVARTY, Sumana; RUDAYA, Alla Y.; HERKENHAM, Miles; ROMANOVSKY, Andrej A. Bacterial lipopolysaccharide fever is initiated via Toll-like receptor 4 on hematopoietic cells. **Blood**, [S. l.], v. 107, n. 10, p. 4000–4002, 2006. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4743. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16403908>.

STEVEN, Sebastian; DIB, Mobin; ROOHANI, Siyer; KASHANI, Fatemeh; MÜNDEL, Thomas; DAIBER, Andreas. Time Response of Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in LPS-Induced Endotoxaemia-A Comparative Study of Mice and Rats. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 18, n. 10, 2017. DOI: 10.3390/ijms18102176.

SUN, Jie; ZHANG, Susu; ZHANG, Xiang; ZHANG, Xiaobao; DONG, Hongquan; QIAN, Yanning. IL-17A is implicated in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in aged rats via microglial activation. **Journal of neuroinflammation**, [S. l.], v. 12, p. 165, 2015. DOI: 10.1186/s12974-015-0394-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373740>.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**,

United States, v. 44, n. 1, p. 131–135, 1991. DOI: 10.1016/0306-4522(91)90255-m.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadimitsu. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. a016295–a016295, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190079>.

TODA, Yoko; TSUKADA, Junichi; MISAGO, Masahiro; KOMINATO, Yoshihiko; AURON, Philip E.; TANAKA, Yoshiya. Autocrine Induction of the Human Pro-IL-1 β Gene Promoter by IL-1 β in Monocytes. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 1984 LP – 1991, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.168.4.1984. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/168/4/1984.abstract>.

TRENT, M. Stephen; STEAD, Christopher M.; TRAN, An X.; HANKINS, Jessica V. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. **Journal of endotoxin research**, United States, v. 12, n. 4, p. 205–223, 2006. DOI: 10.1179/096805106X118825.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual review of immunology**, United States, v. 13, p. 251–276, 1995. DOI: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001343.

TSUJIMOTO, Hironori; ONO, Satoshi; EFRON, Philip A.; SCUMPIA, Philip O.; MOLDAWER, Lyle L.; MOCHIZUKI, Hidetaka. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, United States, v. 29, n. 3, p. 315–321, 2008. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318157ee55.

UENO, A. et al. Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. **Biochemical pharmacology**, England, v. 62, n. 2, p. 157–160, 2001. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00654-2.

USCHAKOV, A.; GONG, H.; MCGINTY, D.; SZYMUSIAK, R. Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. **Neuroscience**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 104–120, 2007. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17928156>.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, England, v. 395, n. 6699, p. 281–284, 1998. DOI:

10.1038/26233.

VANDERWALL, Arden G.; MILLIGAN, Erin D. **Cytokines in Pain: Harnessing Endogenous Anti-Inflammatory Signaling for Improved Pain Management** *Frontiers in Immunology*, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.03009>.

VELLOSO, Fernando J.; TROMBETTA-LIMA, Marina; ANSCHAU, Valesca; SOGAYAR, Mari C.; CORREA, Ricardo G. NOD-like receptors: major players (and targets) in the interface between innate immunity and cancer. **Bioscience reports**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. BSR20181709, 2019. DOI: 10.1042/BSR20181709. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30837326>.

VIDYA, Mallenahally Kusha; KUMAR, V. Girish; SEJIAN, Veerasamy; BAGATH, Madijagan; KRISHNAN, Govindan; BHATTA, Raghavendra. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. **International reviews of immunology**, England, v. 37, n. 1, p. 20–36, 2018. DOI: 10.1080/08830185.2017.1380200.

WALKER, Katharine; DRAY, Andy; PERKINS, Martin. Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. **Pain**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 211–219, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00195-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00195-6). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304395995001956>.

WANG, Li-Ming et al. Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- β and p-tau formation in the rat brain. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 86–99, 2018.

WANIDWORANUN, C.; STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 151, n. 12, p. 6853–6861, 1993. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/151/12/6853.abstract>.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain research**, Netherlands, v. 692, n. 1–2, p. 244–250, 1995. DOI: 10.1016/0006-8993(95)00715-3.

WEBER, Michael D.; GODBOUT, Jonathan P.; SHERIDAN, John F. Repeated Social

Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 46–61, 2017. DOI: 10.1038/npp.2016.102. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319971>.

WEI, Feng et al. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. **Neuron**, United States, v. 36, n. 4, p. 713–726, 2002. DOI: 10.1016/s0896-6273(02)01019-x.

WESSON, D. E.; SIMONI, J.; GREEN, D. F. Reduced extracellular pH increases endothelin-1 secretion by human renal microvascular endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 101, n. 3, p. 578–583, 1998. DOI: 10.1172/JCI854. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI854>.

WOOLF, C. J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, England, v. 306, n. 5944, p. 686–688, 1983. DOI: 10.1038/306686a0.

YAMAGUCHI, Naoto; JESMIN, Subrina; ZAEDI, Sohel; SHIMOJO, Nobutake; MAEDA, Seiji; GANDO, Satoshi; KOYAMA, Akio; MIYAUCHI, Takashi. Time-dependent expression of renal vaso-regulatory molecules in LPS-induced endotoxemia in rat. **Peptides**, United States, v. 27, n. 9, p. 2258–2270, 2006. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.03.025.

YAMAMOTO, Masahiro et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **Science**, [S. l.], v. 301, n. 5633, p. 640 LP – 643, 2003. DOI: 10.1126/science.1087262. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/301/5633/640.abstract>.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, England, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988. DOI: 10.1038/332411a0.

YANG, Yang Claire; MCCLINTOCK, Martha K.; KOZLOSKI, Michael; LI, Ting. Social isolation and adult mortality: the role of chronic inflammation and sex differences. **Journal of health and social behavior**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 183–203, 2013. DOI: 10.1177/0022146513485244. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23653312>.

YOON, S. Y.; PATEL, D.; DOUGHERTY, P. M. Minocycline blocks lipopolysaccharide

induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. **Neuroscience**, [S. l.], v. 221, p. 214–224, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.024.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; SILVA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **The American journal of physiology**, United States, v. 266, n. 5 Pt 2, p. R1670-4, 1994. DOI: 10.1152/ajpregu.1994.266.5.R1670.

ZANDI, E.; ROTHWARF, D. M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. **Cell**, United States, v. 91, n. 2, p. 243–252, 1997. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80406-7.

ZHANG, Wei; ZHANG, Shan-Shan; HUANG, Hong-Lang; SONG, Bing-Jie; LIU, Xiao; QI, Zhi. Enhanced Endothelin A and B Receptor Expression and Receptor-Mediated Vasoconstriction in Rat Mesenteric arteries after Lipopolysaccharide Challenge. **Mediators of inflammation**, [S. l.], v. 2019, p. 6248197, 2019. DOI: 10.1155/2019/6248197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827377>.

ZILA, I.; MOKRA, D.; KOPINCOVA, J.; KOLOMAZNIK, M.; JAVORKA, M.; CALKOVSKA, A. Heart rate variability and inflammatory response in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. **Physiological research**, Czech Republic, v. 64, n. Suppl 5, p. S669-76, 2015. DOI: 10.33549/physiolres.933226.

ZIV, I.; FLEMINGER, G.; DJALDETTI, R.; ACHIRON, A.; MELAMED, E.; SOKOLOVSKY, M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. **Stroke**, United States, v. 23, n. 7, p. 1014–1016, 1992. DOI: 10.1161/01.str.23.7.1014.