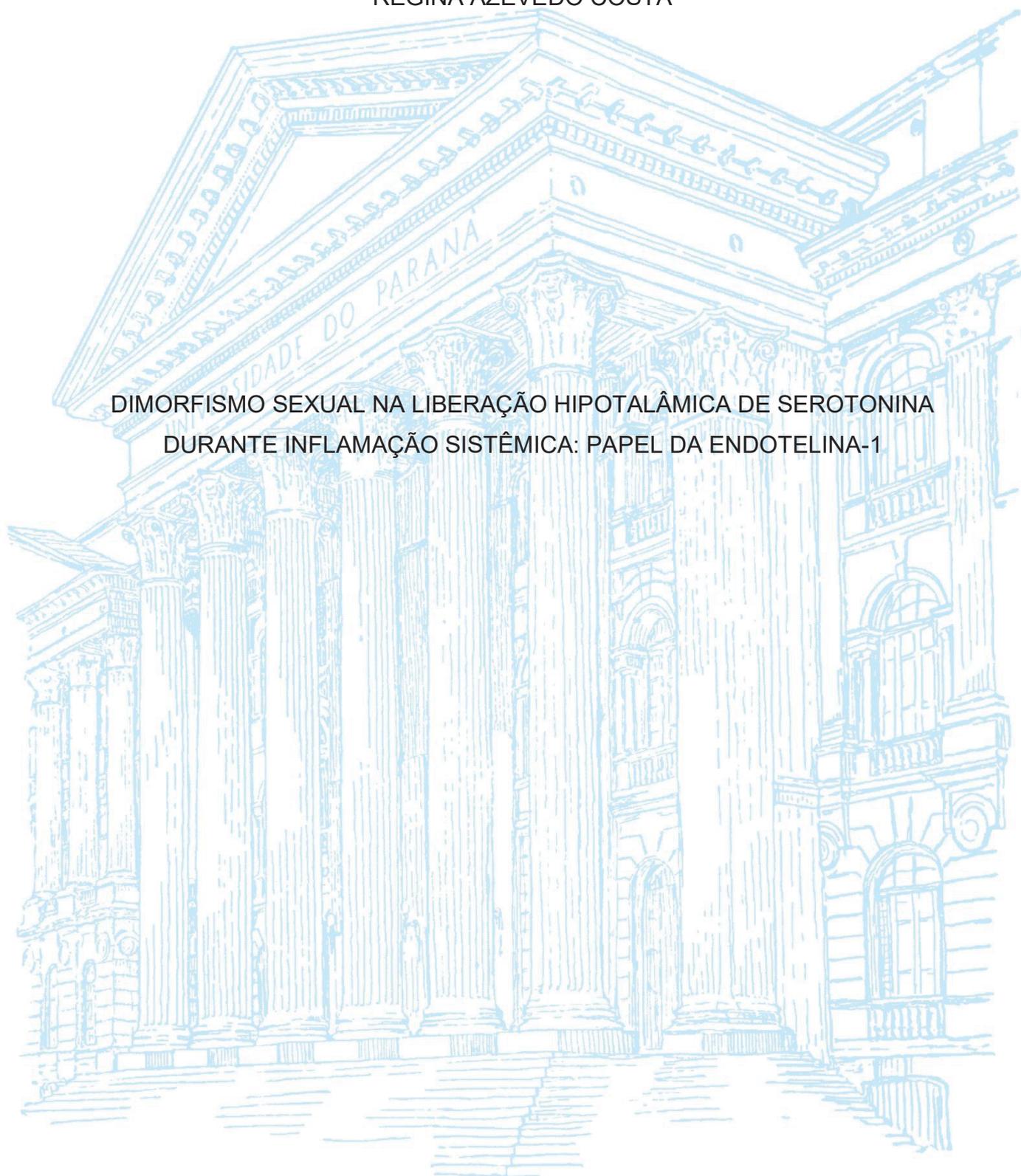


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINA AZEVEDO COSTA

DIMORFISMO SEXUAL NA LIBERAÇÃO HIPOTALÂMICA DE SEROTONINA  
DURANTE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA: PAPEL DA ENDOTELINA-1



CURITIBA

2024

REGINA AZEVEDO COSTA

DIMORFISMO SEXUAL NA LIBERAÇÃO HIPOTALÂMICA DE SEROTONINA  
DURANTE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA: PAPEL DA ENDOTELINA-1

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de mestre em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio.

CURITIBA

2024

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

Costa, Regina Azevedo

Dimorfismo sexual na liberação hipotalâmica de serotonina durante inflamação sistêmica : papel da endotelina-1 / Regina Azevedo Costa. – Curitiba, 2024.  
1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio.

1. Febre. 2. Hipotalamo. 3. Lipopolissacarídeos. I. Zampronio, Aleksander Roberto, 1967-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



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 FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de REGINA AZEVEDO COSTA intitulada: **Dimorfismo sexual na liberação hipotalâmica de serotonina durante inflamação sistêmica: papel da endotelina-1**, sob orientação do Prof. Dr. ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após terem inquirido a autora e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 29 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica

23/05/2024 09:55:27.0

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

22/05/2024 15:44:58.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/05/2024 11:37:26.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (04) 1336-11693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 367670

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 367670

*Aos meus pais, exemplo de amor e superação.*

## AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu trabalho, um projeto no qual depositamos nossa crença conjunta, e ao Autor da minha fé, que tornou possível sua realização.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Zamprônio, por seus valiosos ensinamentos, paciência e dedicação. Sua persistência e confiança foram fundamentais para mim, assim como as lições de que sempre podemos nos superar. Guardarei suas qualidades como professor e pesquisador como um exemplo a seguir.

Agradeço também ao Departamento de Farmacologia da UFPR, aos professores e colegas que foram parte essencial do meu crescimento acadêmico durante este período.

Minha sincera gratidão à professora Cristina Stern e à Gisele Guaita pelo suporte técnico na dosagem dos neurotransmissores, que foi crucial para o sucesso do meu trabalho.

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

Aos meus colegas de laboratório, Jefferson, Gustavo e Thaís, agradeço por toda ajuda e pela amizade que tornaram este período mais leve e alegre.

À minha família, Rubens, Selma, Suellen e Junior, o suporte de vocês foi o pilar da minha jornada. Sem ele, eu não teria alcançado este feito.

Por fim, mas não menos importante, ao meu namorado Dyego, pelo amor incondicional, apoio e compreensão que me fortaleceram durante este período.

*"É apenas uma rosa, porém, foi a ela que eu reguei. Foi a ela que pus sob a redoma. Foi a ela que abriguei. Foi a ela que eu escutei queixar-se ou gabar-se, ou mesmo calar-se algumas vezes. É a minha rosa...*

*...Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez tua rosa tão importante."*

***Antoine Saint Exupéry, em O Pequeno Príncipe.***

## RESUMO

Doenças inflamatórias sistêmicas se manifestam com sintomas como febre, hiperalgesia, perda de apetite e sonolência, coletivamente conhecidos como síndrome de doença. O hipotálamo é uma área importante no sistema nervoso central para o controle e integração destas repostas através de mediadores centrais como prostaglandinas e a endotelina-1(ET-1). O hipotálamo recebe projeções serotoninérgicas do núcleo da rafe, e essas projeções apresentam dimorfismo sexual. Tem sido demonstrado que durante a inflamação sistêmica em ratos machos ocorre uma redução nos níveis hipotalâmicos de serotonina (5-HT) que se acredita estar associada com uma redução no reflexo anti-inflamatório. No entanto, não está claro se esta resposta também ocorre em fêmeas e qual o mediador responsável por este fenômeno em ambos os sexos. O presente estudo avaliou o envolvimento da ET-1 na resposta febril, na hipolocomoção (um parâmetro do comportamento de doença) e nas alterações na liberação de 5-HT no hipotálamo durante uma inflamação sistêmica não apenas em ratos machos, mas também em fêmeas. Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar, com 90 dias de idade, que receberam registradores remotos de temperatura na cavidade peritoneal. Após 7 dias, os animais foram transferidos para uma sala a 28°C e receberam lipopolissacarídeo (LPS) - *Escherichia Coli* (50 e 100 µg/kg, i.p.), BQ788 (6pmol intracerebroventricular – i.c.v.), ET-1 (i.c.v.) e veículo, conforme delineamento experimental, e a temperatura corporal foi avaliada por 5 h. Ao final deste período os animais foram submetidos ao campo aberto para avaliar a locomoção e em seguida os hipotálamos foram coletados para dosagem de 5-HT e 5HIAA por HPLC. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Paraná (Processo nº 1444/2022). A injeção intraperitoneal de LPS, 50 ou 100 µg/kg induziu resposta febril e hipolocomoção em ratos machos e fêmeas. A dose mais elevada de LPS reduziu os níveis hipotalâmicos de 5-HT e do seu metabolito ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) em ratos machos, e aumentou os níveis deste neurotransmissor e do seu metabolito em fêmeas. Os níveis de dopamina foram reduzidos em machos e fêmeas, demonstrando que este dimorfismo está associado a 5-HT. A injeção i.c.v. do antagonista do receptor ET<sub>B</sub> BQ788 reduziu significativamente a resposta febril e a hipolocomoção induzida por LPS em ambos, ratos machos e fêmeas. O tratamento com BQ788 também reverteu a redução induzida por LPS nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em ratos machos, bem como o aumento nos níveis de 5-HT e 5-HIAA em ratas. A administração i.c.v. de ET-1 induziu uma resposta febril significativa e hipolocomoção em ambos os sexos. No entanto, em ratos machos e fêmeas, a administração de ET-1 também reduziu os níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA. Estes resultados indicam que existe um dimorfismo sexual importante durante a inflamação sistêmica em relação à liberação de 5-HT no hipotálamo. Além disso, a ET-1 surge como um importante mediador envolvido tanto na redução da 5-HT hipotalâmica nos machos quanto no aumento da 5-HT nas fêmeas.

**Palavras-chave:** reposta febril, hipolocomoção, hipotálamo, lipopolissacarídeo.

## ABSTRACT

Systemic inflammatory diseases manifest with symptoms such as fever, hyperalgesia, loss of appetite, and drowsiness, collectively known as sickness syndrome. The hypothalamus is an important area in the central nervous system for the control and integration of these responses through central mediators such as prostaglandins and endothelin-1 (ET-1). The hypothalamus receives serotonergic projections from the raphe nucleus, and these projections show sexual dimorphism. It has been demonstrated that during systemic inflammation in male rats there is a reduction in hypothalamic serotonin (5-HT) levels, which is believed to be associated with a reduction in the anti-inflammatory reflex. However, it is unclear whether this response also occurs in females and which mediator is responsible for this phenomenon in both sexes. The present study evaluated the involvement of ET-1 in the febrile response, hypolocomotion (a parameter of sickness behavior) and changes in 5-HT release in the hypothalamus during systemic inflammation not only in male rats, but also in females. To carry out the experiments, 90-day-old Wistar rats were used, which received remote temperature recorders in the peritoneal cavity. After 7 days, the animals were transferred to a room at 28°C and received lipopolysaccharide (LPS) - *Escherichia Coli* (50 and 100 µg/kg, i.p.), BQ788 (6pmol intracerebroventricular – i.c.v.), ET-1 (i.c.v.) and vehicle, according to the experimental design, and body temperature was assessed for 5 h. At the end of this period, the animals were placed in the open field to evaluate locomotion and then the hypothalamus was collected for measurement of 5-HT and 5HIAA by HPLC. This project was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Paraná (Process nº 1444/2022). Intraperitoneal injection of LPS, 50 or 100 µg/kg induced febrile response and hypolocomotion in male and female rats. The highest dose of LPS reduced hypothalamic levels of 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in male rats, and increased the levels of this neurotransmitter and its metabolite in females. Dopamine levels were reduced in males and females, demonstrating that this dimorphism is associated with 5-HT. The i.c.v. of the ETB receptor antagonist BQ788 significantly reduced the febrile response and hypolocomotion induced by LPS in both male and female rats. BQ788 treatment also reversed the LPS-induced reduction in hypothalamic 5-HT and 5-HIAA levels in male rats, as well as the increase in 5-HT and 5-HIAA levels in female rats. The i.c.v. of ET-1 induced a significant febrile response and hypolocomotion in both sexes. However, in male and female rats, ET-1 administration also reduced hypothalamic 5-HT and 5-HIAA levels. These results indicate that there is an important sexual dimorphism during systemic inflammation in relation to the release of 5-HT in the hypothalamus. Furthermore, ET-1 appears as an important mediator involved in both the reduction of hypothalamic 5-HT in males and the increase of 5-HT in females.

**Key Words:** febrile response, hypolocomotion, hypothalamus, lipopolysaccharide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1: Resposta febril induzida por diferentes doses de LPS em ratos machos e fêmeas. ....	35
Figura 2: Efeito da administração de LPS na locomoção no campo aberto em ratos machos e fêmeas. ....	36
Figura 3: Efeito da administração do LPS nos níveis hipotalâmicos de 5-HT, 5-HIAA e dopamina em ratos machos e fêmeas. ....	37
Figura 4: Efeito do bloqueio do receptor ET <sub>B</sub> pelo BQ788 na resposta febril induzida pela administração de LPS em ratos machos e fêmeas. ....	39
Figura 5: Efeito do bloqueio do receptor ET <sub>B</sub> pelo BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos machos e fêmeas. ....	40
Figura 6: Efeito do bloqueio do receptor ET <sub>B</sub> pelo BQ788 nas alterações dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas. ....	41
Figura 7: Resposta febril induzida pela injeção i.c.v. de ET-1 em ratos machos e fêmeas. ....	43
Figura 8: Efeito da administração de ET-1 na locomoção no campo aberto em ratos machos e fêmeas. ....	44
Figura 9: Efeito da administração de ET-1 nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em ratos machos e fêmeas. ....	45
Figura 10: Representação esquemática desenvolvida a partir dos resultados propostos e encontrados neste trabalho. ....	53

## LISTA DE SIGLAS

**AMPC** – Monofosfato cíclico de adenosina

**ANOVA** – Análise de variância

**AVP** - Arginina-vasopressina

**AVPO** - Região pré-óptica anteroventral do hipotálamo

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

**CLP** - Ligadura e punção cecal, do inglês “*cecal ligation and puncture*”

**DA** – Dopamina

**E. coli** - *Escherichia coli*

**Ednraa-/-** - Receptor aa da endotelina em zebra-fish

**EPM** - Erro padrão da média

**ET** - Endotelina

**GPCR** - Receptor acoplado à proteína G

**HPA** - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)

**i.c.v.** – Intracerebroventricular

**IL** – Interleucina

**i.p.** – Intraperitoneal

**LCR** - Líquido cefalorraquidiano

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E<sub>2</sub>

**RRP** - Receptores de reconhecimento de padrão

**5-HIAA** - Ácido 5-hidroxiindol acético

**5-HT** – 5-hidroxitriptamina ou Serotonina

**5-HT1A** – Subtipo de receptor de Serotonina

**5-HT2A** - Subtipo de receptor de Serotonina

**SIRS** - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, *systemic inflammatory response syndrome*)

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**Tc** – Temperatura corporal

**TAM**- Tecido adiposo marrom

**TLR4** - Receptores do tipo *Toll* 4 (do inglês, *Toll-like receptor 4*)

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês, *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

**TRPs** – Receptores de potencial transitório (do inglês, *transient receptor potential*).

**V** - Veículo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 A resposta febril e a hipolocomoção durante a resposta inflamatória sistêmica..	15
1.2 Hipolocomoção .....	19
1.3 O Sistema Endotelinérgico.....	20
1.4 A importância do sistema serotoninérgico no hipotálamo .....	22
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	25
<b>3. OBJETIVO</b> .....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Drogas.....	27
4.3 Implante da cânula para administração intracerebroventricular .....	28
4.4 Implante de Registradores Remotos .....	29
4.5 Modelo de Endotoxemia (Inflamação Sistêmica) .....	29
4.6 Registro de temperatura e administração das drogas.....	29
4.7 Teste do Campo Aberto .....	30
4.8 Coleta do Hipotálamo.....	30
4.9 Protocolos Experimentais .....	31
4.10 Avaliação dos níveis de neurotransmissores por HPLC .....	32
4.11 Análise Estatística .....	33

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Resposta febril, hipolocomoção e níveis de neurotransmissores no hipotálamo de ratos machos e fêmeas após injeção de LPS. ....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Efeito do BQ788 na resposta febril, hipolocomoção e na modulação dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3 Efeito da ET-1 na resposta febril, hipolocomoção e modulação dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em ratos machos e fêmeas.....</b>	<b>42</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1A resposta febril e a hipolocomoção durante a resposta inflamatória sistêmica

A inflamação sistêmica é uma resposta do organismo a um agente agressor que pode ter origem infecciosa ou não (trauma cirúrgico, por exemplo). Durante este processo, observa-se uma série de sinais e sintomas conhecidos como síndrome de doença (*sickness syndrome*) e os comportamentos associados (*sickness behaviour*). Dentre estes sinais e sintomas encontramos febre, hiperalgesia sistêmica, perda de apetite e sonolência. Estas alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas têm a finalidade de combater a infecção e poupar energia para a recuperação do organismo. Esta resposta pode evoluir para sepse no caso de uma infecção, que é uma condição acompanhada por sintomas como hipotermia ou febre, alterações na frequência respiratória e cardíaca e eventualmente para um choque séptico, quando ocorre a falência de múltiplos órgãos (BONE; BALK; CERRA; DELLINGER et al., 1992).

O modelo de escolha para indução de inflamação sistêmica experimental a fim de replicar os achados clínicos é a injeção de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas. Neste caso, em muitos estudos este modelo é denominado endotoxemia. A endotoxemia caracteriza-se por uma inflamação sistêmica onde se tem a predominância de febre e hiperalgesia acompanhadas de comportamentos de doença, mas é uma condição muito mais branda do que a sepse (MOHAMMAD; THIEMERMANN, 2020).

Durante a endotoxemia, há uma estimulação da defesa do hospedeiro por meio da ativação de receptores do tipo Toll 4 (TLR4). Os TLR4 são receptores transmembranas que pertencem a família dos receptores de reconhecimento de padrão (RRP), são receptores do sistema imunológico inato e possuem a capacidade de identificar a presença de uma infecção microbiana. Sendo expressos em células imunes de vigilância, como macrófagos e células

dendríticas, os TLR4 iniciam e amplificam o processo pro-inflamatório, por meio da ativação de vias de sinalização, ativação de fatores de transcrição e na liberação de citocinas na circulação, incluindo fator de necrose tumoral - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina(IL)-1 $\beta$  e IL-6 (BASTOS-PEREIRA; FRAGA; OTT; SIMM et al., 2014; MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO et al., 2017).

Neste modelo, observa-se febre que pode ser definida como um aumento da temperatura corporal resultante de uma alteração na regulação da temperatura pelo hipotálamo (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). Essa regulação é exercida por mecanismos do Sistema Nervoso Central (SNC), que levam a uma série de respostas termorreguladoras para manutenção da homeostase, dentre as quais podemos citar, tremor muscular, termogênese no tecido adiposo marrom, vasoconstrição e vasodilatação, sudorese e respiração ofegante (KLUGER; VAUGHN, 1978). No entanto, a resposta febril possui diferenças relacionadas ao sexo, e particularmente aos hormônios sexuais. Por exemplo, Brito e colaboradores demonstraram que após a administração de LPS, ratas fêmeas com ciclo estral normal apresentam uma resposta febril menor quando comparada com os ratos machos e que após a ovariectomia essa resposta febril atinge níveis similares aos machos (BRITO; BARBOSA; REIS; FRAGA *et al.*, 2016). Esta resposta febril diminuída em ratas ovariectomizadas retorna ao nível similar às ratas com ciclo estral normal após a reposição de estrógeno, demonstrando uma provável interferência dos hormônios sexuais femininos na resposta febril induzida por LPS (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016).

A resposta febril é, em geral, benéfica ao organismo pois facilita a eliminação de microrganismos. Isto ocorre devido ao aumento da atividade imunológica e alteração do ambiente térmico do corpo, tornando-o menos adequado para o patógeno. No entanto, temperaturas corporais muito elevadas podem ser prejudiciais, pois comprometem as reações enzimáticas necessárias (MIYAMOTO; OGAWA; MARUTA; NIKAIDO *et al.*, 1995). O sistema termorregulador também pode desenvolver outros papéis, como a aumento da temperatura em situações de estresse, por ativação simpática e aumento da

temperatura para regular o consumo de energia, estando este último associado a obesidade (LANDSBERG; YOUNG; LEONARD; LINSENMEIER *et al.*, 2009).

Este sistema consiste em três componentes: parte sensorial aferente, parte de integração e comando eferente. Termorreceptores como os receptores de potencial transitório (TRP) presentes na pele, nas vísceras e na cavidade abdominal, irão encaminhar informações sobre o ambiente e sobre a temperatura interna do organismo ao centro termorregulador no cérebro, a região pré-óptica anteroventral do hipotálamo (AVPO), por meio de vias neuronais aferentes. A AVPO é considerada a porção integradora, uma vez que seus neurônios terão sua atividade modulada pelo sistema aferente e estão conectados a vias neuronais descendentes que ativarão respostas de perda de calor (vasodilatação, respiração ofegante, sudorese), de conservação de calor (vasoconstrição, inibição da sudorese) ou de produção de calor (tremor muscular, ativação do tecido adiposo marrom – TAM) conforme necessário (MORRISON; NAKAMURA, 2019).

Dentre os termorreceptores cutâneos, o TRPM8 é um canal responsável pelas respostas defensivas ao frio, ativando-se em temperaturas menores do que 27°C, produzindo respostas de produção de calor (MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Já as respostas relacionadas a temperaturas quentes são mais discutíveis. Estudos demonstram a ativação de canais do tipo TRPM2 e TRPV1, sendo o primeiro expresso em neurônios somatossensoriais primários e ativados por temperaturas quentes (TOGASHI; HARA; TOMINAGA; HIGASHI *et al.*, 2006) enquanto o TRPV1 possui uma relação com a rede de termorregulação central, uma vez que este receptor está intimamente ligado a regulação da temperatura corporal central relativamente constante (CATERINA; SCHUMACHER; TOMINAGA; ROSEN *et al.*, 1997). A manutenção desta temperatura a 37°C constata, permite a homeostase e controle de uma temperatura ideal a manutenção de funções celulares ideais garantindo a própria manutenção da vida. Isto requer um ajuste orquestrado das vias termorreguladoras por mecanismos reflexivos como *feedback* e *feedforward*. Estes mecanismos afetam o circuito integrativo da AVPO para manutenção deste ponto de equilíbrio (37°C), sendo considerado a faixa de temperatura

termoneutra, uma estreita faixa de temperatura ambiente, onde o organismo utilizará apenas mecanismos de vasoconstrição cutânea para manutenção do ponto de equilíbrio (MORRISON; NAKAMURA, 2019).

A AVPO também apresenta neurônios termosensíveis ao calor, o aumento da temperatura na AVPO leva a um aumento dos disparos nessa região com consequente inibição das respostas de produção de calor. Durante o resfriamento, ocorre o oposto, com redução destes disparos dos neurônios sensíveis ao calor, levando a produção de calor para a manutenção do ponto de equilíbrio, atuando assim como um termostato, por meio da ativação de uma via de *feedback* negativo. Porém, ainda são necessários mais estudos para entender melhor como funciona este circuito e qual o papel destes neurônios e receptores envolvidos neste processo (MORRISON; NAKAMURA, 2019).

Durante um processo infeccioso, os sinais imunológicos que chegam ao SNC irão desencadear a produção de mediadores pirogênicos que serão detectados pela AVPO. Após obter essas informações, o centro termorregulador irá fornecer comandos para efetores periféricos através de vias neurais e neuroendócrinas eferentes alterando o ponto de equilíbrio (SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988). Após a sinalização pirogênica do sistema imunológico, ocorrerá a síntese e liberação de mediadores importantes para a resposta febril, como a prostaglandinas E<sub>2</sub>, (PGE<sub>2</sub>), fator liberador de corticotrofina, opioides endógenos, substância P, endotelina-1 (ET-1) e endocanabinóides endógenos (FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998; FRAGA; ZANONI; ZAMPRONIO; PARADA *et al.*, 2016; REIS; BRITO; FRAGA; CABRINI *et al.*, 2011; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). As prostaglandinas são, sem dúvida alguma, os mediadores mais estudados e importantes da resposta febril, que por sua vez irão atuar em receptores EP<sub>3</sub> na AVPO, receptor acoplado a proteína G (GPCR) inibitória. Estes receptores estão presentes em neurônios inibitórios GABAérgicos e sua ativação promove uma redução na atividade da adenilato ciclase e consequente redução nos níveis de fosfato cíclico de adenosina (AMPc). A inibição destas vias inibitórias leva a um aumento da conservação e produção de calor, gerando a resposta febril, por mecanismos

como vasoconstrição, ativação da termogênese pelo TAM e tremores musculares (MURAKAMI; WATANABE, 1989; NAKAMURA, 2011).

Além de neurônios GABAérgicos, neurônios glutamatérgicos também parecem ser importantes para a termogênese. Após a inibição destes neurônios GABAérgicos, o núcleo da rafe ficará sobre a influência de projeções excitatórias do hipotálamo dorsomedial, que será responsável pela ativação de neurônios pré-motores para levar a impulsos de termogênese no TAM, tremores e taquicardia através da ativação da sinalização bulbo espinhal (MADDEN; MORRISON, 2003; NAKAMURA; MORRISON, 2007).

## 1.2 Hipolocomoção

Durante a inflamação sistêmica, alterações comportamentais também são observadas (*sickness behaviour*). Dentre essas alterações é possível observar fraqueza, mal-estar, apatia e letargia (HART, 1988). Essas alterações ocorrem mediante a liberação de citocinas inflamatórias (DANTZER, 2001). Estudos anteriores demonstram que a administração central e sistêmica de citocinas induzem o quadro completo de alterações comportamentais encontrados no comportamento de doença, e dessas alterações, a redução da exploração social, ingestão de alimentos e movimentação espontânea como a hipolocomoção, tem sido formas para avaliar este comportamento em roedores (BLUTHÉ; DANTZER; KELLEY, 1992; BLUTHÉ; PAWLOWSKI; SUAREZ; PARNET et al., 1994).

Essas respostas comportamentais induzidas pelo LPS podem apresentar diferenças sexuais, uma vez que as fêmeas apresentam uma maior sensibilidade neuroendócrina ao LPS, o que provavelmente leva a uma maior ativação serotoninérgica e traz como vantagem uma melhor adaptação ao estresse em vários aspectos do comportamento (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). Além disso, experimentos realizados *in vitro*, demonstram que macrófagos de camundongos machos tratados com LPS

apresentam maiores níveis de citocinas inflamatórias liberadas em comparação com as fêmeas e elas desenvolvem tolerância ao LPS mais rapidamente (MARRIOTT; BOST; HUET-HUDSON, 2006).

A hipolocomoção observada na síndrome de doença se refere a depressão da atividade motora, com ativação de diversas áreas hipotalâmicas e pré-ópticas e de algumas estruturas telencefálicas como núcleo accumbens e núcleo central da amígdala, e está relacionada a sensação de doença que o animal irá experimentar. Este comportamento irá ocorrer logo após a administração do LPS e dura aproximadamente 6 horas. Este quadro difere de comportamentos tipo depressivo que se manifestam após a síndrome de doença. Este último irá aparecer após 24 horas da administração do LPS, onde o animal já se recuperou da hipolocomoção. Neste processo, ocorrerá a ativação de áreas da amígdala e diversas áreas do hipocampo e essa ativação se correlaciona com testes comportamentais que avaliaram o comportamento tipo-depressivo (FRENOIS; MOREAU; O'CONNOR; LAWSON *et al.*, 2007).

### 1.3 O Sistema Endotelinérgico

Além das prostaglandinas, outros mediadores centrais são importantes para a febre e hipolocomoção observados durante a endotoxemia, entre eles a ET-1 (KASZAKI; WOLFÁRD; BOROS; BARANYI *et al.*, 1997; KOWALCZYK; KLENIEWSKA; KOLODZIEJCZYK; SKIBSKA *et al.*, 2015; LEITE-AVALCA; LOMBA; BASTOS-PEREIRA; BRITO *et al.*, 2016; LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021). A importância deste mediador pode ainda ser evidenciada pois níveis elevados de ET-1 também são observados em pacientes humanos com sepse e esta condição está correlacionada com um pior prognóstico, como aumento da disfunção orgânica e mortalidade (BRAUNER; ROHDE; CLAUSELL, 2000). Além disso, estudos demonstram que a infusão sistêmica de ET-1 promove a disfunção de órgãos vitais como: fígado, pulmão, coração e rim (KOWALCZYK; KLENIEWSKA; KOLODZIEJCZYK; SKIBSKA *et*

al., 2015; LUNDBERG; BERGENZAUN; RYDÉN; ROSENQVIST et al., 2016; SCHUETZ; CHRIST-CRAIN; MORGENTHALER; STRUCK et al., 2007).

A ET-1 é uma das isoformas de uma família de peptídeos, onde temos ainda ET-2 e ET-3. As endotelinas atuam como potentes vasoconstritores, mas outras funções foram atribuídas a estes peptídeos posteriormente (KEDZIERSKI; YANAGISAWA, 2001; YANAGISAWA; KURIHARA; KIMURA; TOMOBE *et al.*, 1988). A ET-1 é sintetizada como Big-ET-1 (BLAIS; FUGÈRE; DENAULT; KLARSKOV *et al.*, 2002) e convertida posteriormente no peptídeo ativo por enzimas conversoras de endotelina (D'ORLÉANS-JUSTE; PLANTE; HONORÉ; CARRIER *et al.*, 2003). Células endoteliais vasculares cerebrais, neurônios e astrócitos podem sintetizar esse peptídeo (HAMMOND; GADEA; DUPREE; KERNINON *et al.*, 2014; KEDZIERSKI; YANAGISAWA, 2001). Existem dois receptores de endotelina, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, que são GPCR, encontrados em diversas áreas cerebrais sob condições fisiológicas e patológicas. Estes receptores possuem diferentes afinidades por essa família de peptídeos: a ET-1 e ET-2 possui maior afinidade pelo receptor ET<sub>A</sub>, enquanto que a ET-3 possui uma afinidade 100 vezes menor por este receptor; já o receptor ET<sub>B</sub> possui afinidade similar para os 3 ligantes (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC et al., 2020; D'ORLÉANS-JUSTE; PLANTE; HONORÉ; CARRIER et al., 2003; FABRICIO; RAE; ZAMPRONIO; D'ORLÉANS-JUSTE et al., 2006; HOSTENBACH; D'HAESELEER; KOOIJMAN; DE KEYSER, 2016).

Estudos anteriores evidenciaram que a ET-1 participa da resposta febril induzida por LPS principalmente através da ativação de receptores de ET<sub>B</sub> no sistema nervoso central, uma vez que o antagonista do receptor de ET<sub>B</sub> BQ788 reverteu esta resposta (FABRICIO; RAE; ZAMPRONIO; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2006; FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998). Estudos recentes evidenciaram que, em condições específicas, os receptores centrais ET<sub>A</sub> também podem ser importantes para a febre induzida por LPS, uma vez que a injeção i.c.v. de BQ123 após altas doses, mas não baixas doses, de LPS foi capaz de reduzir a resposta febril (LOMBA; LEITE-AVALCA; ZAMPRONIO, 2021). Ambos os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no sistema nervoso central também estão envolvidos na hiperalgesia e hipolocomoção induzida pela administração de LPS

em ratos, uma vez que ambos os antagonistas BQ123 e BQ788 reduziram estas respostas (LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021). Além disso, estudos anteriores também demonstraram que a ação central da ET-1 é importante na sepse, uma vez que a injeção i.c.v. do antagonista de receptores ET<sub>A</sub> BQ123 melhorou a taxa de sobrevivência e aumentou os níveis de arginina-vasopressina (AVP) na sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP) e demonstrou melhoras nas funções dos órgãos vitais (LEITE-AVALCA; LOMBA; BASTOS-PEREIRA; BRITO *et al.*, 2016; MATIAS; RADULSKI; RODRIGUES DA SILVA; RAYMUNDI *et al.*, 2023). Todos estes resultados sugerem que os efeitos centrais da ET-1, particularmente no hipotálamo, são importantes para os eventos observados durante a inflamação sistêmica. Além disso, estudos anteriores demonstraram a expressão de ET em várias estruturas neuronais e não neuronais do SNC, sendo a ET-1 e ET-3 encontradas em regiões como: núcleos circumventriculares, como o órgão subfornical, o terceiro ventrículo anteroventral e área postrema; núcleo supraóptico e paraventricular do hipotálamo; em várias estruturas diencefálicas importantes na modulação neuroendócrina; e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (KUWAKI; CAO; KUMADA, 1994; MORTENSEN, 1999). Neste último a ET-1 e ET-3 possuem concentrações similares (KUWAKI; CAO; KUMADA, 1994; MORTENSEN, 1999). Porém estudos são necessários para descrever um possível papel da ET-3 no processo inflamatório, considerando sua presença em regiões importantes para a resposta febril, por exemplo. Já a ET-2 está mais expressa nos ovários e células epiteliais intestinais (KAWANABE; NAULI, 2011; KEDZIERSKI; YANAGISAWA, 2001), não estando disponível na literatura estudos que apresentam uma provável relação na sua expressão com áreas importantes para o processo inflamatório.

#### **1.4 A importância do sistema serotoninérgico no hipotálamo**

Como mencionado anteriormente, a AVPO possui neurônios termorreguladores que são inibidos pela PGE<sub>2</sub> (NAKAMURA, 2011). Essa região do hipotálamo recebe projeções diretas do núcleo da rafe, importante fonte de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) no sistema nervoso central (NAKAMURA,

2011; OKA; OKA; KOBAYASHI; SUGIMOTO *et al.*, 2003). Mota *et al.* demonstraram que a administração de LPS reduziu os níveis endógenos de 5-HT no hipotálamo de ratos machos. Adicionalmente, o tratamento de animais com 5-HT administrada na AVPO reduziu a resposta febril e os níveis de PGE<sub>2</sub> associados a esta resposta após a administração de LPS, enquanto nos animais controle que receberam veículo, a 5-HT não provocou alterações na temperatura corporal, demonstrando que é possível que a modulação do sistema serotoninérgico ocorra após a presença de um desafio imunológico (MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). A administração i.c.v. de 5-HT também reduziu os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL6 e os níveis esplênicos de TNF- $\alpha$  induzidos por LPS (MOTA; BORGES; AMORIM; CAROLINO *et al.*, 2019). Esses dados sugerem que a liberação de 5-HT está reduzida no hipotálamo durante a inflamação sistêmica induzida por LPS em ratos machos. Esta redução na liberação de 5-HT no hipotálamo parece favorecer uma maior síntese de prostaglandinas, o que resulta em uma resposta febril, aumentando a resposta imune inata através da inibição da via anti-inflamatória sistêmica ou reflexo inflamatório. Esta via neural é responsável por monitorar e ajustar a resposta inflamatória reflexivamente, uma vez que desafios imunológicos irão ativar vias sensoriais que irão transmitir informação ao hipotálamo, ao mesmo tempo como um reflexo, ocorrerá a ativação de vias anti-inflamatórias, que terão uma ação oposta, reduzindo a liberação de citocinas na circulação e controlando este processo (BOROVIKOVA; IVANOVA; ZHANG; YANG *et al.*, 2000; MOTA; BORGES; AMORIM; CAROLINO *et al.*, 2019; TRACEY, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que os receptores de 5-HT, 5-HT1A e 5-HT2A desempenham um papel importante na termorregulação (PETROIANU, 2022), e que em ratas ovariectomizadas, as vias neuronais relacionadas a estes receptores sofrem alterações, o que sugere que as ondas de calor características no período da menopausa possam ter relação com estes receptores. Porém, ainda não está claro como ocorrem estas alterações na expressão de 5-HT e seus receptores após a ovariectomia (WANG; CUI; JIN; WANG *et al.*, 2016). O receptor 5-HT1A é considerado um receptor pré-sináptico e é o único subtipo expresso em neurônios serotoninérgicos (BARNES; SHARP, 1999). Além disso,

juntamente com o 5-HT<sub>2A</sub>, estes receptores também estão expressos em células pós-sinápticas e medeiam a hiperpolarização e despolarização dos neurônios, podendo modular funções opostas no cérebro, conforme ativação (JU; FERNANDEZ-ARROYO; WU; JACKY *et al.*, 2020). Wang e colaboradores, demonstraram que camundongos fêmeas ovariectomizadas apresentam um aumento na expressão destes receptores de 5-HT. Apesar disso, a 5-HT disponível para ligação diminui, tornando estes receptores disfuncionais, gerando uma alteração entre o equilíbrio da produção e dissipação de calor, podendo ser este um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da temperatura corporal nestes animais (WANG; SUN; WANG; WANG *et al.*, 2024). Apesar disso, os receptores de estrogênio estão amplamente distribuídos no cérebro e podem afetar neurônios ligados diretamente a diferentes respostas, incluindo respostas neuroinflamatórias, onde a 5-HT parece estar relacionada com estes processos (HUANG; OCHANDARENA; PHILSON; HYUN *et al.*, 2019).

No entanto, não está claro qual mediador inflamatório promove esta modulação nos níveis hipotalâmicos de 5-HT, e como ocorre a redução deste neurotransmissor após a administração de LPS. Carreño-Gutiérrez *et al.*, utilizando peixe-zebra que apresentava uma mutação no receptor da endotelina (*ednraa*<sup>-/-</sup>), observaram que estes animais apresentavam comportamento alterado e níveis aumentados de 5-HT no sistema nervoso central, sugerindo uma possível interação entre os dois sistemas (CARREÑO GUTIÉRREZ; COLANESI; COOPER; REICHMANN *et al.*, 2019). Portanto, é possível que níveis elevados de ET-1 no sistema nervoso central sejam responsáveis pela redução dos níveis hipotalâmicos de 5-HT.

## **2. Hipótese**

Como a ET-1 é um mediador central da resposta febril, hiperalgisia e hipolocomoção induzida pelo LPS e atua no hipotálamo em paralelo com as prostaglandinas para induzir febre e existem evidências de uma interação entre o a ET-1 e os níveis de serotonina no SNC, levantamos a possibilidade de que a ET-1 seria uma possível candidata a ser o mediador central responsável pela redução dos níveis de 5-HT nesta área durante a resposta febril.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a possível interação entre os sistemas endotelinérgico e serotoninérgico no hipotálamo durante a endotoxemia em ratos machos e fêmeas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis hipotalâmicos de 5-HT e de seu metabolito 5-HIAA no hipotálamo de ratos machos e fêmeas após a administração de diferentes doses de LPS.
- Avaliar se o bloqueio de receptores endotelinérgico  $ET_B$  pelo BQ788, modulam os níveis de 5-HT e de seu metabolito induzida pela administração de LPS concomitantemente com a redução na resposta febril e da hipolocomoção em ambos os sexos.
- Avaliar se a administração i.c.v. de ET-1, em doses que induzem febre e hipolocomoção, modulam os níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipotálamo de ratos machos e fêmeas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os animais foram alojados quatro por caixa, em sala com temperatura e umidade controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7 h e livre acesso a comida e água filtrada.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Instituição (CEUA-BIO/UFPR, protocolo nº 1444) e foram realizados de acordo com as Diretrizes Internacionais para Cuidado Animal e com as Diretrizes Brasileiras para Experimentação Animal definidas pelo Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.2 Drogas

Lipopolissacarídeo de *E. coli* 0111:B4, Endotelina-1, e o antagonista seletivo do receptor  $\text{ET}_B$  - BQ788 [2,6-Dimetilpiperidinacarbonil- $\gamma$ -Metil-Leu-Nin-(Metoxicarbonil)-d-Trp-d-Nle, N-[N- [(2,6-Dimetil-1-piperidinil)carbonil]-4-metil-leucil]-1-(metoxicarbonil)-d-triptofil]-d-norleucina sal sódico] foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Cetamina, Xilazina e Isoflurano foram adquiridos da Syntec do Brasil Ltda (Santana do Parnaíba, SP, Brasil). A terramicina e o cetoprofeno foram de qualidade comercial.

### **4.3 Implante da cânula para administração intracerebroventricular**

Para administração intracerebroventricular (i.c.v.) das drogas, os animais foram submetidos ao implante de uma cânula guia no ventrículo lateral uma semana antes do experimento. Para tanto, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, intraperitoneal - i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após tricotomia e assepsia da pele, os animais foram imobilizados em aparelho estereotáxico. Aproximadamente 0,2 ml de solução de lidocaína a 2% com vasoconstritor foi administrado por via subcutânea no topo da cabeça, seguido de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele para expor o crânio. Esse procedimento facilita a retirada do periósteo, ajudando a inibir o estímulo doloroso e diminuindo o sangramento. Após a localização do bregma (tomado como ponto de referência), os parâmetros estereotáxicos utilizados para perfuração do crânio e implante da cânula no ventrículo lateral direito foram: -0,8 mm anteroposterior e 1,5 mm lateral, com inclinação de -3,3 mm do barra incisal (PAXINOS; WATSON, 1998). Uma cânula estéril de aço inoxidável (16 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro) foi implantada no tecido cerebral com uma coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana (PAXINOS; WATSON, 1998). Após a cirurgia, os animais foram tratados com oxitetraciclina (Terramicina, 400 mg/kg, i.m.) como profilaxia cirúrgica e cetoprofeno (15 mg/kg, por via oral, durante 2 dias) para analgesia. Ao final de todos os experimentos, foram injetados 2 µl de azul de Evans (1 % em solução salina), os cérebros foram removidos e a presença do corante no ventrículo lateral foi verificada macroscopicamente. Os animais que apresentaram deslocamento da cânula, bloqueio da cânula durante a injeção ou ganho anormal de peso corporal após a cirurgia foram excluídos do estudo.

#### **4.4 Implante de Registradores Remotos**

Durante a cirurgia estereotáxica descrita acima e sob a mesma anestesia, os animais receberam transmissores remotos para medição da temperatura corporal (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016). Resumidamente, após laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha média, transmissores remotos de temperatura previamente programados e higienizados (Subcue Dataloggers, Calgary, Canadá) foram implantados na cavidade peritoneal e a cavidade suturada.

#### **4.5 Modelo de Endotoxemia (Inflamação Sistêmica)**

A endotoxemia com consequente indução de inflamação sistêmica foi induzida por injeção i.p. de lipopolissacarídeo (LPS) em doses de 50 e 100 µg/kg conforme descrito anteriormente (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2016; LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021; MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Essas doses de LPS foram escolhidas por causarem resposta febril, hipolocomoção e redução dos níveis de 5-HT no hipotálamo.

#### **4.6 Registro de temperatura e administração das drogas**

Uma semana após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram aclimatados a 28°C ± 1°C (ou seja, zona termoneutra para ratos) (GORDON, 1990). A temperatura corporal (T<sub>c</sub>) foi monitorada continuamente em intervalos de 15 minutos durante pelo menos 2 h antes de qualquer injeção para determinar a temperatura basal. As injeções i.p. foram feitas em um volume de 2 ml/kg e as injeções i.c.v. em um volume de 2 µl. As injeções i.c.v. foram realizadas sob condições assépticas, utilizando uma agulha de micro injeção (30G) conectada a uma seringa de Hamilton (25µL) por um tubo de polipropileno. A agulha projetou-se 2 mm além da ponta da cânula e o volume foi injetado suavemente

durante 1 min. A Tc dos animais foi então monitorada continuamente em intervalos de 15 minutos durante 5 horas após a injeção do estímulo pirogênico.

#### **4.7 Teste do Campo Aberto**

A movimentação espontânea do animal foi avaliada pelo teste de campo aberto 5 h após a administração do pirogênio. Resumidamente, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato do campo aberto (30 x 60 x 60 cm), com divisão por linhas em 9 quadrantes, e sua movimentação no aparato foi filmada por 3 min para posterior análise (ASANO, 1986; SMIRNOV; SITNIKOVA, 2019). A luminosidade no ambiente foi reduzida para 10-20 Lux 30 min antes da colocação do animal no aparato para favorecer a sua movimentação. O aparato foi limpo com etanol 70% após cada animal ter sido testado para evitar efeitos de odor residual. O número de cruzamentos foi avaliado posteriormente nos filmes e a distância percorrida, velocidade e o mapa de calor foram obtidos utilizando o *software* Ethovision® (Noldus, Wageningen, Holanda).

#### **4.8 Coleta do Hipotálamo**

Imediatamente após a avaliação no campo aberto, os animais foram anestesiados com isoflurano, eutanasiados por decapitação e os cérebros foram rapidamente removidos do crânio e colocados sobre uma superfície fria de vidro. O hipotálamo foi dissecado (PAXINOS; WATSON, 1998), imediatamente congelado em gelo seco, pesado e armazenado a -80°C para posterior análise de neurotransmissores por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### 4.9 Protocolos Experimentais

*A fim de facilitar a compreensão os protocolos descritos abaixo, serão apresentados como uma linha do tempo acima da figura relacionada a resposta febril sendo o mesmo para os resultados subsequentes (hipolocomoção e níveis de neurotransmissores)*

*Efeito do LPS na resposta febril, hipolocomoção e nos níveis de neurotransmissores no hipotálamo de ratos machos e fêmeas.*

No primeiro conjunto de experimentos, ratos machos e fêmeas receberam diferentes doses de LPS (50 e 100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de veículo (solução salina) e a temperatura corporal foi monitorada por 5 horas. Após esse período, os animais foram testados no campo aberto. Os animais foram então eutanasiados com isoflurano e o hipotálamo anterior coletado, rapidamente congelado em gelo seco e armazenado a -80°C para posterior análise dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e dopamina por HPLC.

*Efeito do BQ788 na resposta febril, hipolocomoção e na modulação dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas*

Animais de ambos os sexos foram tratados com BQ788 (3 e 6 pmol, i.c.v. em machos e 6 pmol, i.c.v. em fêmeas) ou o mesmo volume de veículo (solução salina) e após 15 min receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de veículo (solução salina) e a temperatura corporal foi monitorada por 5 horas. Após esse período, os animais foram testados no campo aberto. Os animais foram então eutanasiados com isoflurano, o hipotálamo anterior coletado, rapidamente congelado em gelo seco e armazenado a -80°C para posterior análise dos níveis de 5-HT e 5-HIAA por HPLC.

*Efeito da ET-1 na resposta febril, hipolocomoção e na modulação dos níveis hipotalâmicos 5-HT e 5-HIAA em ratos machos e fêmeas*

Animais de ambos os sexos foram tratados com ET-1 (1 pmol, i.c.v.) ou o mesmo volume de veículo (solução salina) e a temperatura corporal foi monitorada por 5 h. Após esse período, os animais foram testados no campo aberto. Os animais foram então eutanasiados com isoflurano, o hipotálamo anterior coletado, rapidamente congelado em gelo seco e armazenado a -80°C para posterior análise dos níveis de 5-HT e 5-HIAA por HPLC.

#### **4.10 Avaliação dos níveis de neurotransmissores por HPLC**

Para avaliação dos níveis de neurotransmissores, a amostra de tecido hipotalâmico já pesada, foi homogeneizada com um disruptor celular ultrassônico em ácido perclórico 0,1 M contendo metabissulfito de sódio 0,02% e um padrão interno (50 ng/ml 3,4-dihidroxibenzilamine, Sigma-Aldrich). As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Vinte microlitros de sobrenadante foram injetados no HPLC. A fase móvel consistiu em 20 g de ácido cítrico monohidratado (Merck), 200 mg de sal sódico de ácido octano-1-sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma) e 900 ml de água deionizada grau HPLC e filtrada através de um Filtro de 0,45 µm. Metanol (Merck) foi então adicionado para uma composição final de 10% de metanol (v/v). A concentração de 5-HT, 5-HIAA e dopamina foi avaliada por HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica.

O sistema consistiu em uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RPC-18 (150 × 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 4 µm) equipada com uma pré-coluna de 4 × 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP), um detector eletroquímico (detector eletroquímico ESA Coulochem III) equipado com uma célula de guarda (ESA 5020) com eletrodo ajustado em 350 mV e uma célula analítica de eletrodo duplo (ESA 5011A), e uma bomba LC-20AT (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) equipada com injetor manual Rheodyne 7725 com loop de 20 µL.

A coluna foi mantida dentro de um forno com temperatura controlada (25°C, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). A célula possuía duas câmaras em série: cada câmara incluiu um eletrodo colorimétrico de grafite poroso, um contra eletrodo duplo e um eletrodo duplo de referência. Os potenciais oxidantes foram ajustados em 100 mV para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo eletrodo. Os neurotransmissores foram detectados no segundo eletrodo. As áreas de pico dos padrões foram utilizadas para quantificar os picos da amostra. Os dados foram expressos em ng/g de tecido com base em estudos anteriores (MOREIRA; BARBIERO; ARIZA; DOMBROWSKI *et al.*, 2012).

#### 4.11 Análise Estatística

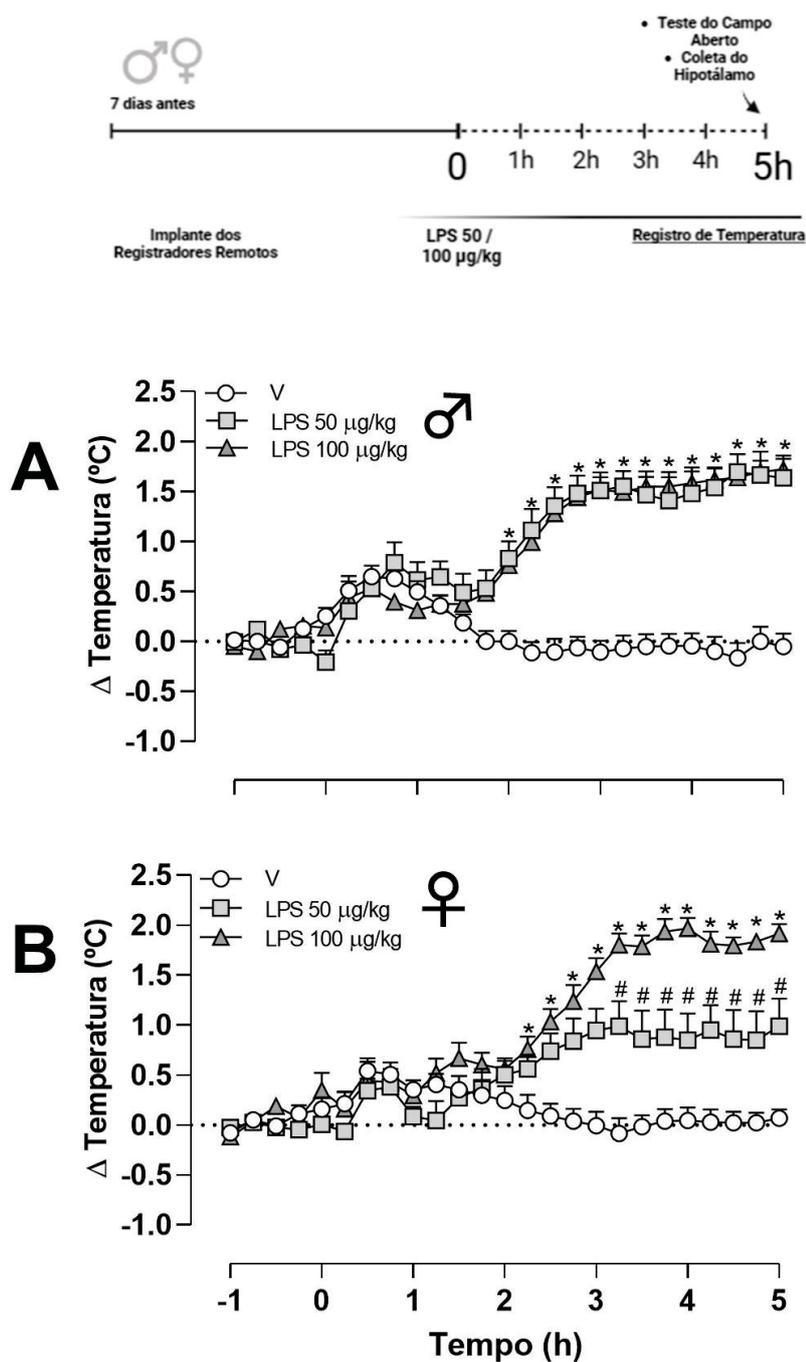
A temperatura basal de cada animal foi calculada como a média de 3 a 4 medições consecutivas antes de qualquer injeção. As variações ( $\Delta$ ) na Tc foram calculadas como a diferença entre a Tc em momentos específicos e a temperatura basal. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A resposta febril foi analisada por análise de variância de medidas repetidas de dois fatores (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os dados de campo aberto (número de cruzamentos, distância percorrida e velocidade) e dos níveis de neurotransmissores foram analisados por ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Bonferroni ou teste t de Student conforme apropriado. Os dados foram analisados utilizando o software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

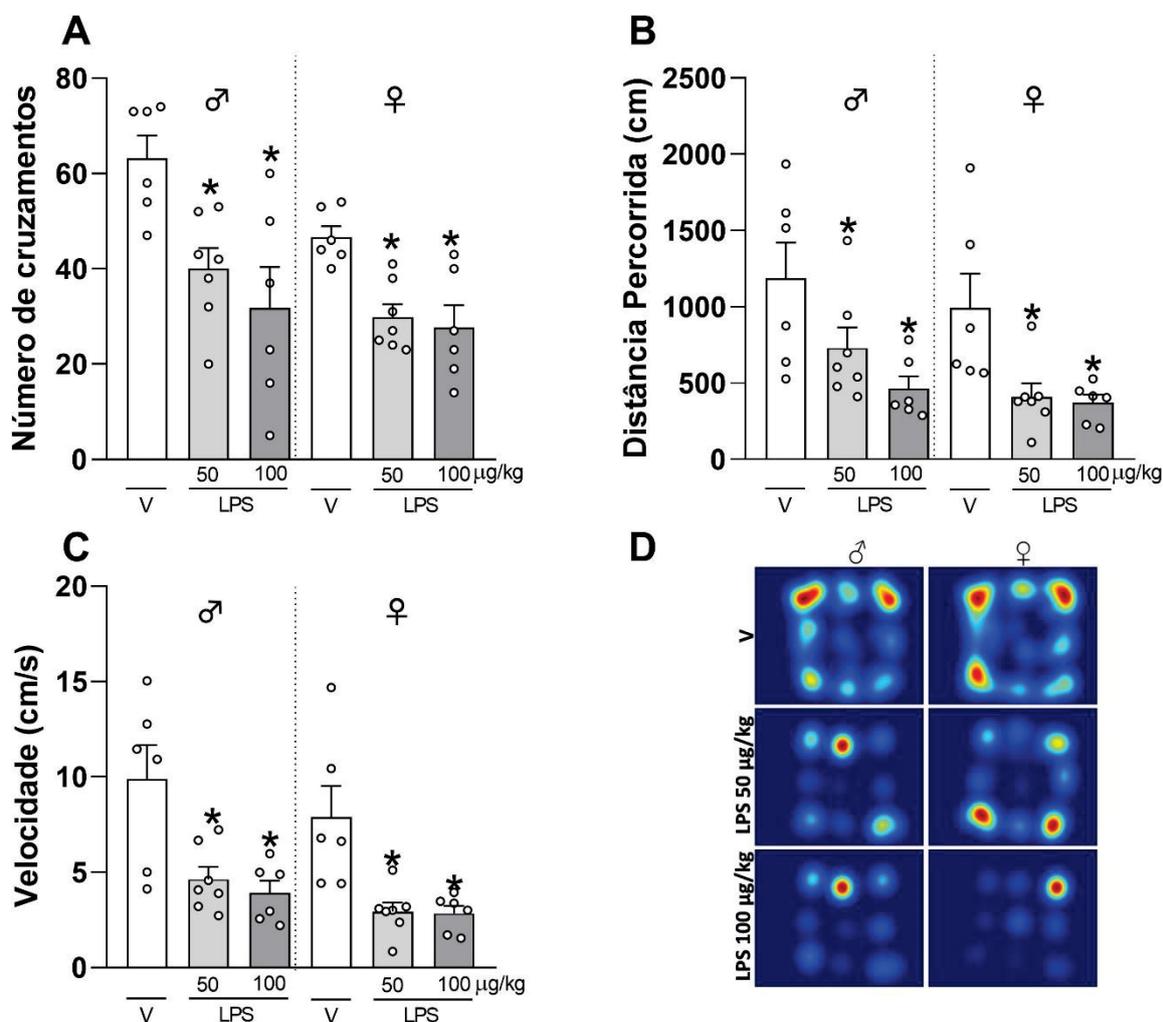
### 5.1 Resposta febril, hipolocomoção e níveis de neurotransmissores no hipotálamo de ratos machos e fêmeas após injeção de LPS.

A administração do veículo não alterou significativamente a temperatura corporal dos animais (machos e fêmeas). O LPS, em doses de 50 e 100 µg/kg, induziu uma resposta febril significativa em ratos machos e fêmeas. No entanto, enquanto nos machos não foram observadas diferenças na intensidade da resposta induzida por estas duas doses diferentes (Fig. 1A), nas fêmeas a resposta febril foi dependente da dose, e a dose de 50 µg/kg foi significativamente inferior à 100 µg/kg (Fig. 1B). A resposta febril induzida por 100 µg/kg foi semelhante em ratos machos e fêmeas. Concomitantemente, animais de ambos os sexos apresentaram hipolocomoção característica do comportamento de doença após administração de LPS nas duas doses em comparação aos animais que receberam veículo, com redução no número de cruzamentos (Fig. 2A), distância percorrida (Fig. 2B), e velocidade (Fig. 2C). Não foram observadas diferenças significativas entre as duas doses de LPS nestes parâmetros. O mapa de calor exemplifica essa redução nos diferentes tratamentos (Fig. 2D).

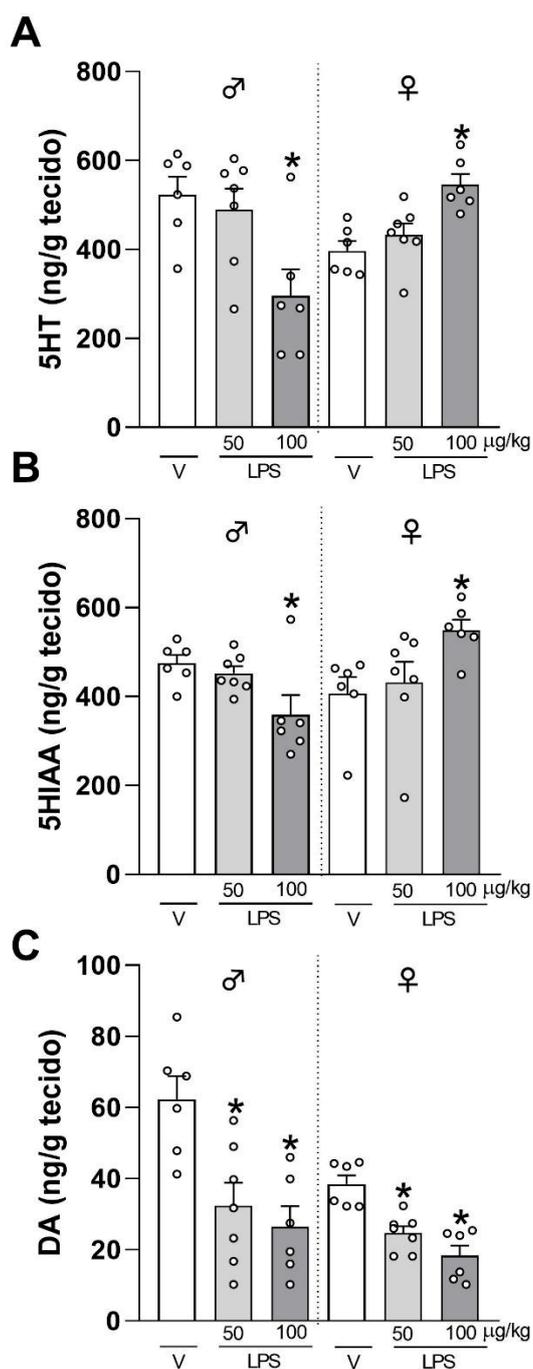
A Figura 3 mostra os níveis dos neurotransmissores avaliados no hipotálamo. A administração de LPS em doses mais baixas não alterou significativamente os níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipotálamo de ratos machos ou fêmeas (Fig. 3A e 3B). No entanto, uma dose mais elevada de LPS, 100 µg/kg, reduziu os níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipotálamo de ratos machos enquanto aumentou os níveis deste neurotransmissor e do seu metabolito em fêmeas (Fig. 3A e 3B). A Figura 3C mostra que essa diferença sexual se restringe a 5-HT e 5-HIAA hipotalâmicos, uma vez que o LPS, em ambas as doses e em ambos os sexos, reduziu significativamente os níveis de dopamina.



**Figura 1: Resposta febril induzida por diferentes doses de LPS em ratos machos e fêmeas.** Os animais foram injetados com LPS (50 µg/kg ou 100 µg/kg i.p.) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e a temperatura corporal foi registrada por 5 h. Os dados mostram a média ± EPM da variação na temperatura corporal (°C, machos: n = 6-7 / fêmeas: n = 6-7). \* indica diferença estatística em relação ao grupo veículo,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. # indica diferença estatística em relação ao grupo LPS 100 µg/kg,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 2: Efeito da administração de LPS na locomoção no campo aberto em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam injeção de LPS (50 µg/kg ou 100 µg/kg i.p) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e após 5 h a movimentação espontânea no campo aberto foi registrada durante 3 min. Os dados demonstram a média ± EPM do número de cruzamentos (A), distância (em cm, B) e velocidade (em cm/s, C) em machos (n = 6-7) e fêmeas (n = 6-7). O painel D demonstra um mapa de calor representativo do movimento dos animais no campo aberto. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo veículo,  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.



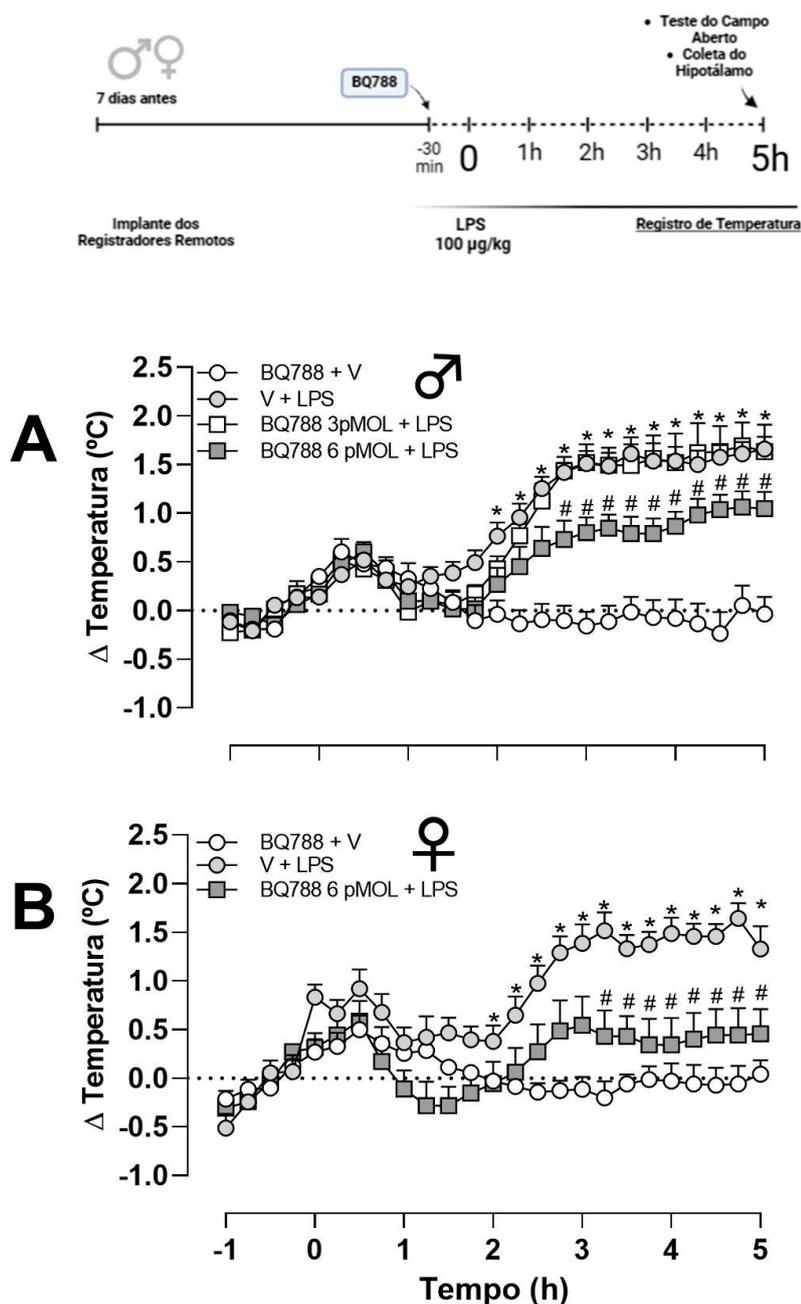
**Figura 3: Efeito da administração do LPS nos níveis hipotalâmicos de 5-HT, 5-HIAA e dopamina em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam LPS (50 ou 100 µg/kg, i.p.) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e após 5 h o hipotálamo foi coletado. Os níveis de 5-HT (A), 5-HIAA (B) e dopamina (DA, C) foram analisados por HPLC. Os dados mostram a média ± EPM dos níveis de neurotransmissores hipotalâmicos (ng/g de tecido, machos: n = 6-7 / fêmeas: 6-7). \*Indica diferença estatística em relação ao grupo que recebeu veículo (solução salina),  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

## **5.2 Efeito do BQ788 na resposta febril, hipolocomoção e na modulação dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas**

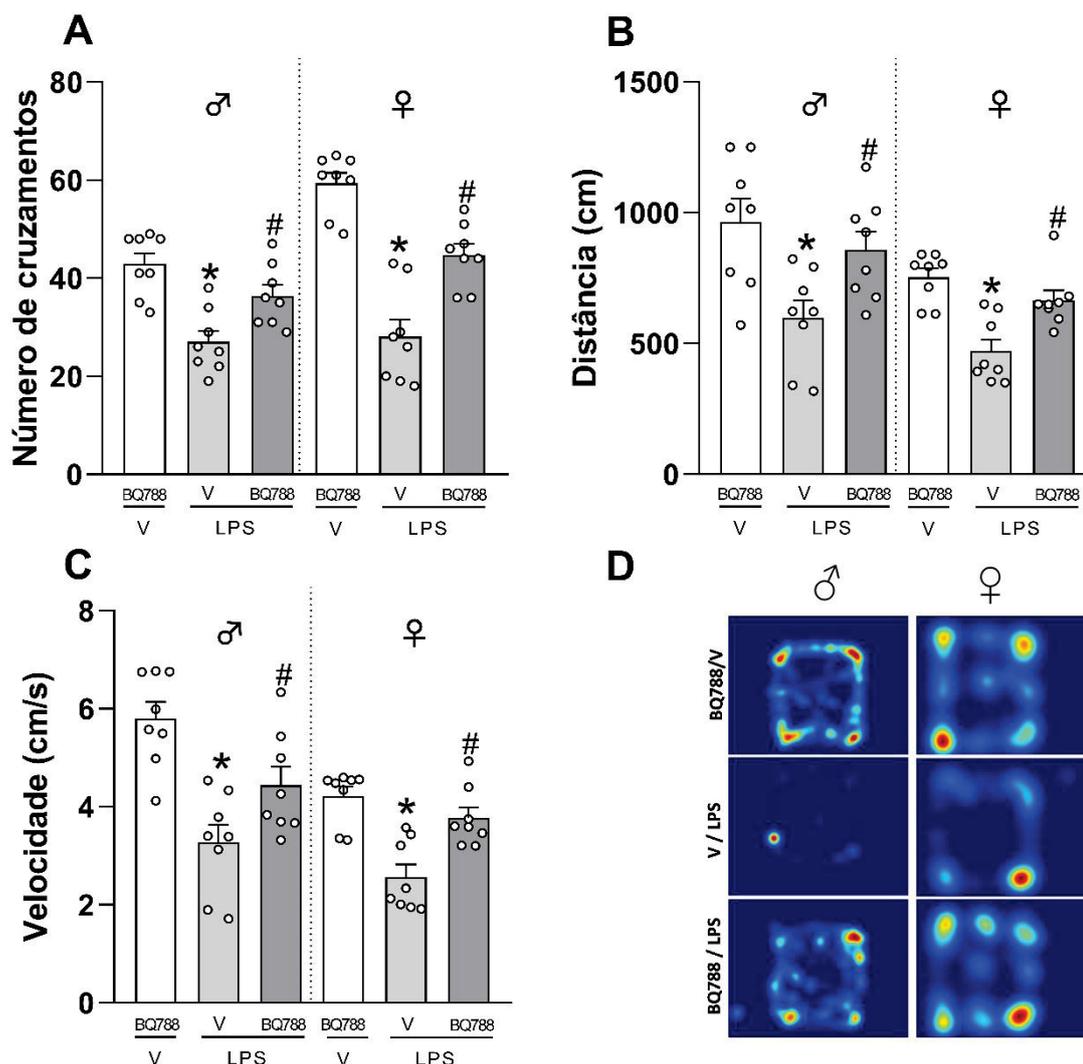
O próximo passo foi avaliar se o bloqueio dos receptores endotelinérgicos ET<sub>B</sub> pelo BQ788 em ratos machos e fêmeas afetaria a hipolocomoção e os níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidos pela administração de altas doses de LPS. Observamos que a dose de 3 pmol de BQ788 não alterou a resposta febril induzida por LPS (100 µg/kg, ip), enquanto uma dose mais elevada do antagonista (6 pmol) reduziu significativamente esta resposta em ratos machos (Fig. 4A). Esta dose de BQ788 também foi eficaz na redução da resposta febril induzida por LPS em fêmeas (Fig. 4B).

O tratamento dos animais com o antagonista do receptor ET<sub>B</sub> BQ788 atenuou a redução observada em todos os parâmetros avaliados no teste de campo aberto após injeção de LPS em machos e fêmeas, aumentando o número de cruzamentos (Fig. 5A), a distância percorrida (Fig. 5B) e a velocidade (Fig. 5C). A Figura 5D demonstra o mapa de calor representativo onde os animais permaneceram em uma área restrita durante o período de 3 minutos após a administração do LPS e voltaram a se movimentar pelo aparato após o tratamento com BQ788.

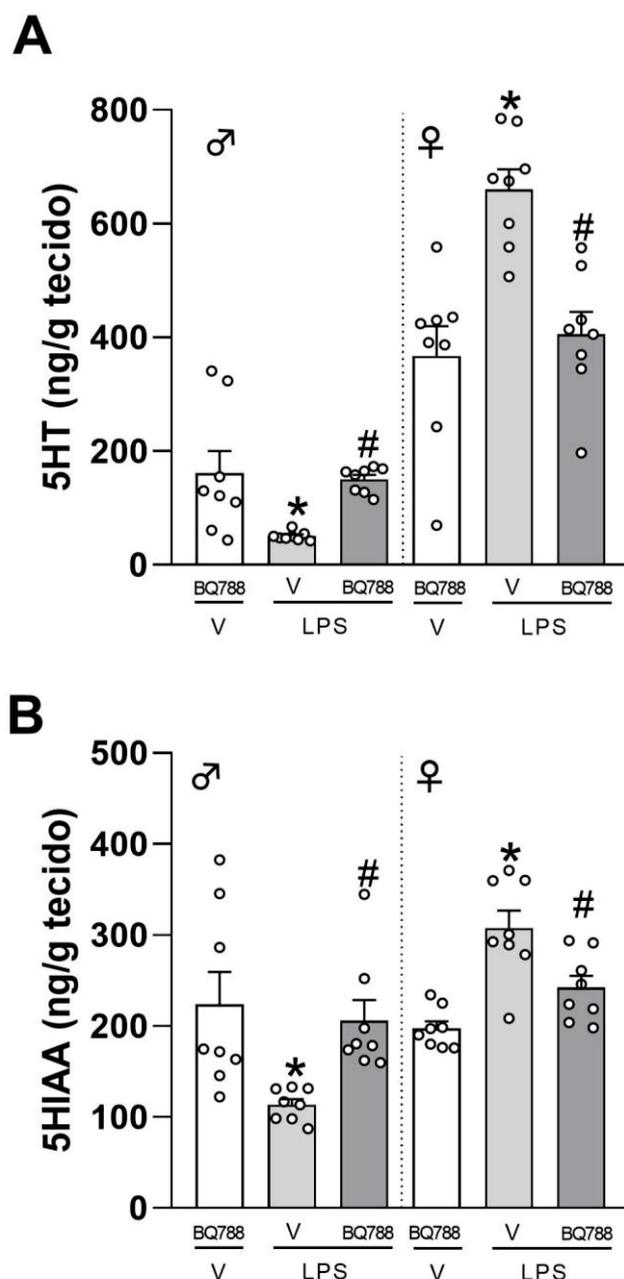
O tratamento com BQ788 reverteu as alterações nos níveis hipotalâmicos de 5-HT (Fig. 6A) e 5-HIAA (Fig. 6B) em ratos machos e fêmeas. Especificamente, o tratamento com BQ788 reverteu a redução induzida por LPS nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5HIAA em machos, bem como o aumento nos níveis de 5-HT e 5HIAA em fêmeas.



**Figura 4: Efeito do bloqueio do receptor  $ET_B$  pelo BQ788 na resposta febril induzida pela administração de LPS em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam uma injeção icv de BQ788 (3 ou 6 pMOL) ou veículo (V, solução salina) 30 min antes da injeção de LPS (100 µg/kg, ip) e a temperatura corporal foi registrada por 5 h. Os dados demonstram a média  $\pm$  EPM da variação da temperatura corporal (°C) em ratos machos (n = 8) e fêmeas (n = 8). \*indica diferença estatística em relação ao grupo BQ788 + V,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. # indica diferença estatística em relação ao grupo V + LPS,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 5: Efeito do bloqueio do receptor  $ET_B$  pelo BQ788 na hipolocomoção induzida por LPS em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam uma injeção i.c.v. do BQ788 (6 pMOL) ou veículo (solução salina) 30 min antes da injeção do LPS (100  $\mu$ g/kg, i.p.) e após 5 h, a movimentação espontânea foi avaliada no campo aberto por 3 min. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do número de cruzamentos (A), distância percorrida (em cm, B) e velocidade (em cm/s, C) em ratos machos (n = 8) e fêmeas (n = 8). A figura D mostra o mapa de calor representativo do movimento dos animais no campo aberto. \* Indica diferença estatística em relação ao grupo BQ788 + V,  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. # indica diferença estatística em relação ao grupo V + LPS,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

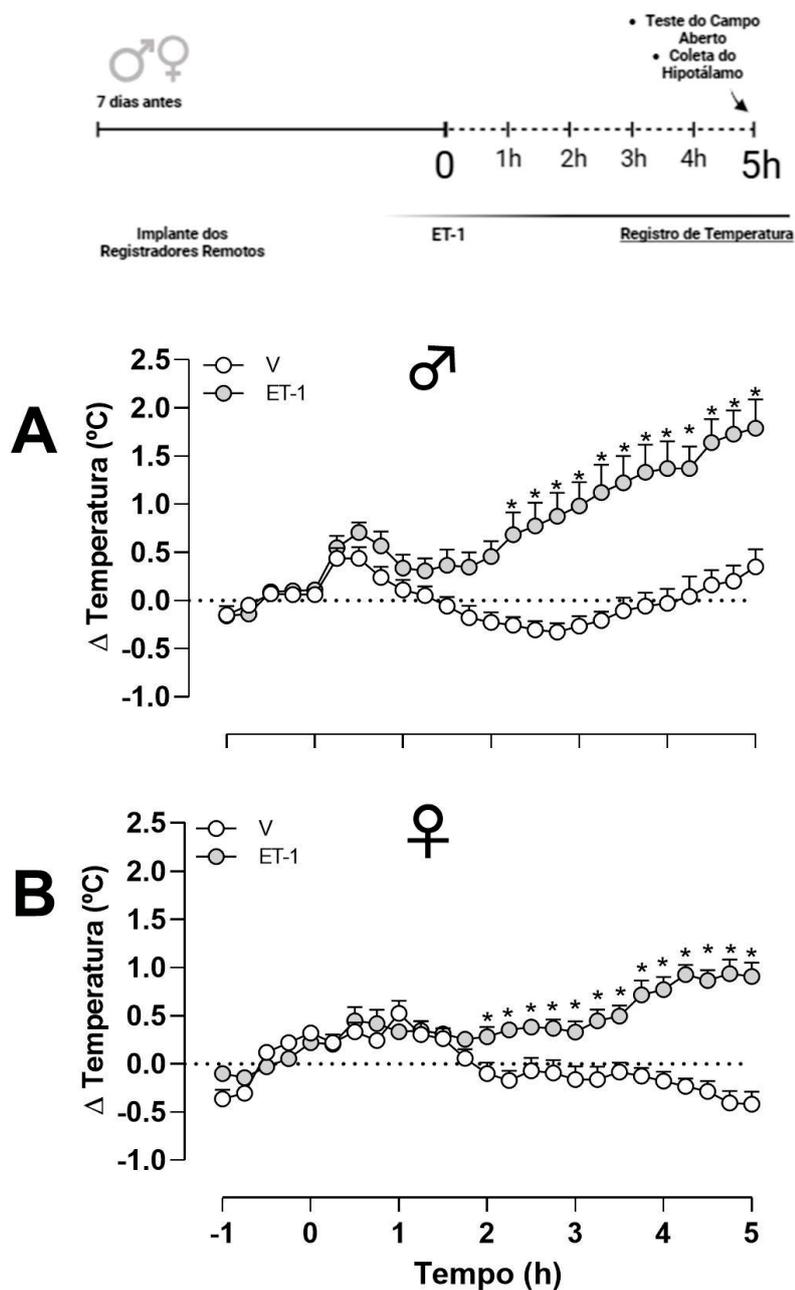


**Figura 6: Efeito do bloqueio do receptor  $ET_B$  pelo BQ788 nas alterações dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA induzidas por LPS em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam uma injeção i.c.v. de BQ788 (6 pMOL) ou veículo (V, solução salina) 30 min antes da injeção de LPS (100  $\mu$ g/kg, i.p.) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e após 5 h, o hipotálamo foi coletado para avaliação de 5-HT e 5-HIAA por HPLC. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) em ng/g de tecido em ratos machos ( $n = 8$ ) e fêmeas (8). \*Indica diferença estatística em relação ao grupo BQ788 + V,  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. # indica diferença estatística em relação ao grupo V + LPS,  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

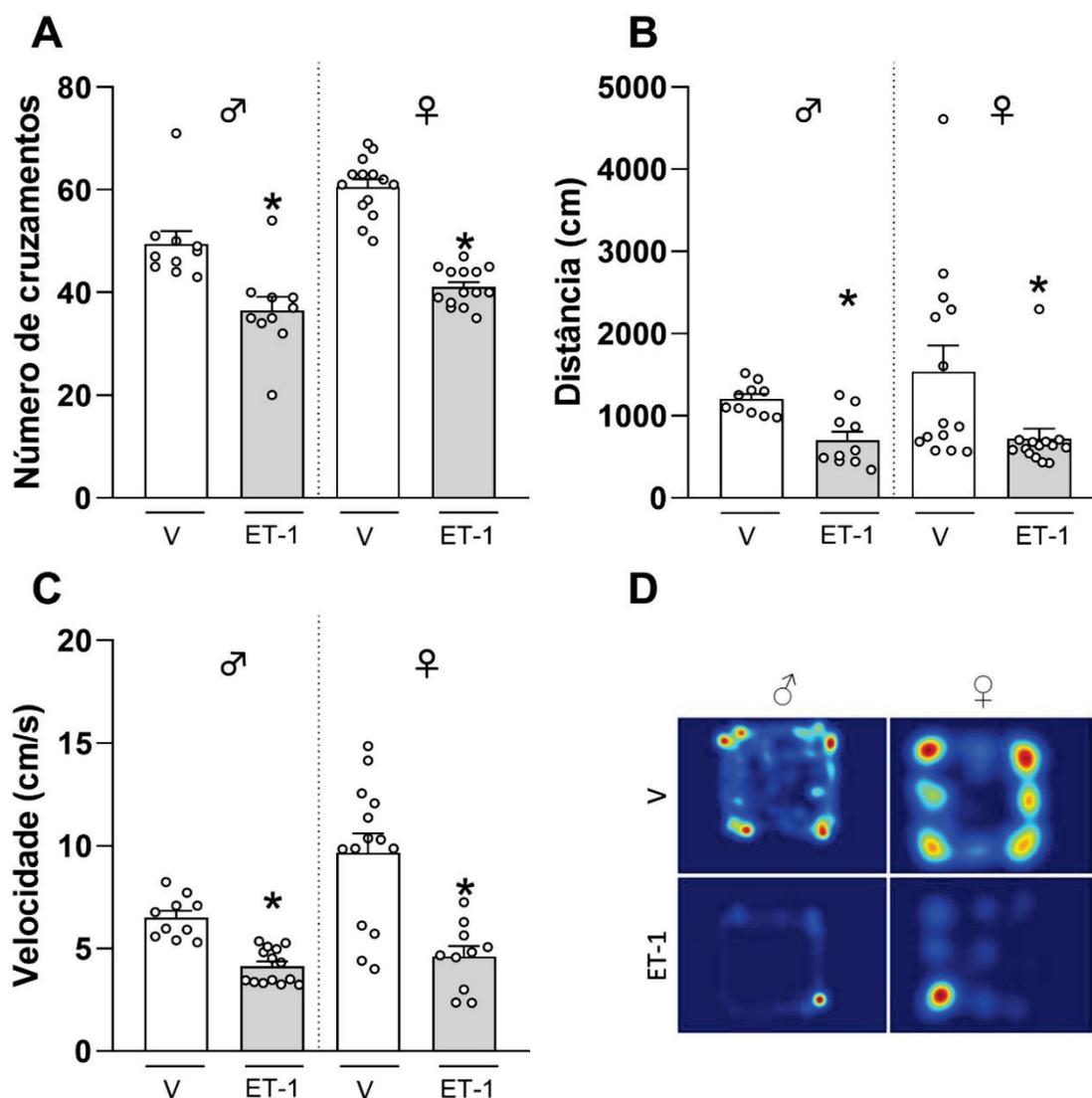
### **5.3 Efeito da ET-1 na resposta febril, hipolocomoção e modulação dos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em ratos machos e fêmeas**

Posteriormente, avaliamos se a injeção i.c.v. de ET-1, em doses que induzem febre, promoveria as mesmas alterações na movimentação espontânea e nos níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipotálamo de ratos machos e fêmeas. A administração de ET-1 induziu uma resposta febril significativa tanto em machos (Fig. 7A) quanto em fêmeas (Fig. 7B). Da mesma forma ao que ocorreu com doses mais baixas de LPS, a resposta febril induzida pela ET-1 nas fêmeas foi inferior à observada nos ratos machos. Em relação aos testes comportamentais, também observamos redução significativa no número de cruzamentos (Fig. 8A), distância percorrida (Fig. 8B) e velocidade (Fig. 8C). A Fig. 8D exemplifica a mudança no comportamento dos animais no campo aberto após a administração de ET-1.

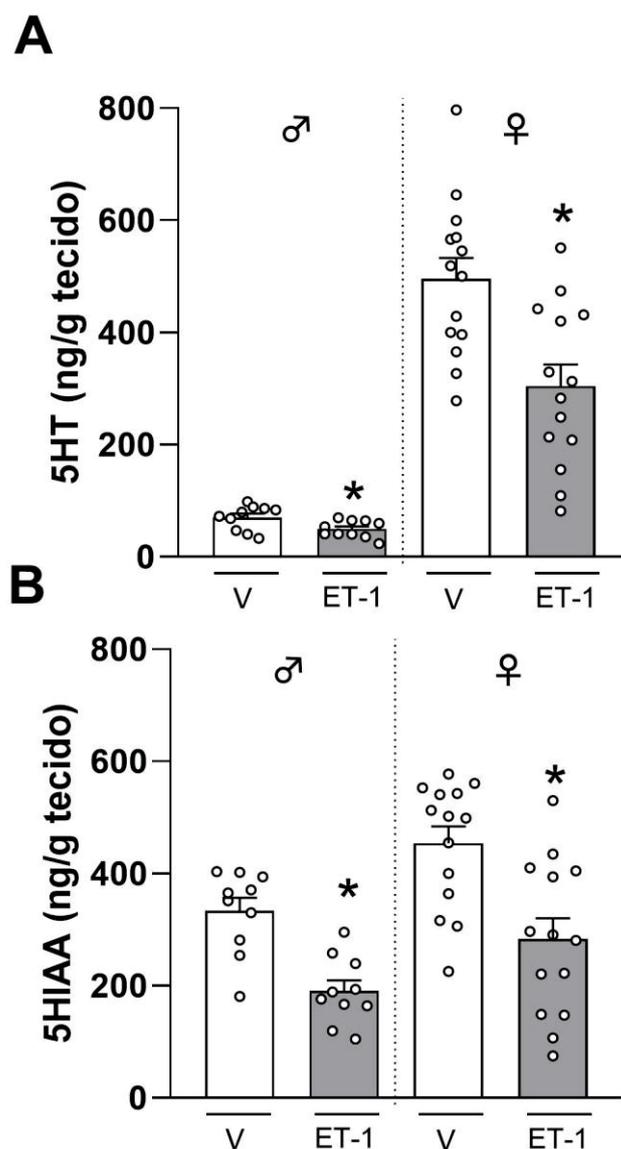
Nos ratos machos, a administração de doses pirogênicas de ET-1 reduziu os níveis hipotalâmicos de 5-HT (Fig. 9A) e 5-HIAA (Fig. 9B). No entanto, em ratas, surpreendentemente, a administração i.c.v. de ET-1 também reduziu os níveis hipotalâmicos de 5-HT (Fig. 9A) e 5-HIAA (Fig. 9B).



**Figura 7: Resposta febril induzida pela injeção i.c.v. de ET-1 em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam ET-1 (1 pmol, i.c.v.) ou o mesmo volume do veículo (V, solução salina) e a temperatura corporal foi registrada por 5 h. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM da variação da temperatura corporal ( $^{\circ}\text{C}$ ) em machos ( $n=10$ ) e fêmeas ( $n=14$ ). \* indica diferença estatística em relação ao grupo V,  $p<0,05$ , ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 8: Efeito da administração de ET-1 na locomoção no campo aberto em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam ET-1 (1 pmol, i.c.v.) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e após 5 h foi registrada a movimentação espontânea no campo aberto durante 3 min. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do número de cruzamentos (A), distância percorrida (em cm, B) e velocidade (em cm/s, C) em ratos machos ( $n = 10$ ) e fêmeas ( $n = 14$ ). O painel D mostra um mapa de calor representativo do movimento dos animais em campo aberto. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo V  $p < 0,05$ . Teste t de Student.



**Figura 9: Efeito da administração de ET-1 nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA em ratos machos e fêmeas.** Os animais receberam ET-1 (1 pmol, i.c.v.) ou o mesmo volume de veículo (V, solução salina) e após 5 h o hipotálamo foi coletado. Os níveis de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) foram avaliados por HPLC. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM dos níveis de neurotransmissores hipotalâmicos (ng/g de tecido) medidos por HPLC em machos (n=10) e fêmeas (n=14). \* Indica diferença estatística entre grupos,  $p < 0,05$ , teste t de Student.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a administração sistêmica de LPS induz febre em ratos machos e fêmeas, mas a intensidade desta resposta é específica do sexo. Concomitantemente à resposta febril, foi observado um comportamento de doença clássica, a hipolocomoção. O ponto mais importante demonstrado neste estudo foi uma diferença sexual relevante entre machos e fêmeas no que diz respeito aos níveis hipotalâmicos de 5-HT durante uma resposta inflamatória sistêmica. Enquanto em ratos machos foi observada uma redução nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA sugerindo uma redução na liberação deste neurotransmissor, em ratas fêmeas ocorreu um aumento nestes níveis, ou seja, um aumento na liberação de 5-HT. De maneira interessante, tanto a redução de 5-HT em machos quanto o aumento de 5-HT em fêmeas foram revertidos pelo antagonista do receptor  $ET_B$  - BQ788. A injeção intracerebral de ET-1 em ratos machos também induziu febre, hipolocomoção e redução dos níveis de 5-HT e 5-HIAA. Surpreendentemente, a injeção de ET-1 em ratas fêmeas induziu uma redução dos níveis de 5-HT e 5-HIAA em vez de um aumento nos níveis deste neurotransmissor.

A dose mais baixa de LPS (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) induziu uma resposta febril menor em fêmeas do que em machos. Esses dados são semelhantes aos observados em um estudo anterior de nosso laboratório utilizando esta dose de LPS para indução de febre (BRITO; BARBOSA; REIS; FRAGA *et al.*, 2016). No entanto, com uma dose mais elevada de LPS, a resposta febril aumentou em fêmeas, enquanto nos machos nenhuma alteração foi observada. Estes dados sugerem que enquanto em machos a dose de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS já induz uma resposta máxima, em fêmeas esta resposta é menor nesta dose. Estudos anteriores de Mota e colaboradores (2017) demonstraram que a redução nos níveis de 5-HT em ratos machos ocorreu com o uso de uma dose mais elevada de LPS para produzir uma inflamação sistêmica (MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Assim, em virtude deste estudo e de termos observados alterações significativas de 5-HT tanto em machos como em

fêmeas no presente estudo os experimentos subsequentes foram conduzidos usando apenas a dose mais alta.

Demonstramos também que essa resposta febril foi acompanhada de uma redução na movimentação espontânea dos animais, reduzindo sua velocidade de locomoção, distância percorrida e número de cruzamentos no campo aberto. Este resultado é importante no presente contexto, pois, juntamente com a resposta febril, mostra que os animais apresentaram um comportamento característico da síndrome da doença. De forma similar, Pitychoutis et al. (2009) também observaram uma redução da exploração social no campo aberto em ratos machos e fêmeas 2 horas após a injeção de uma mesma dose de LPS. Esta redução, no entanto, não foi observada 6 horas após a injeção, trazendo divergências em relação ao tempo da expressão deste comportamento com o presente estudo. No entanto isso pode refletir uma diferença entre o LPS utilizado (outra cepa de *E.coli*) ou no tempo de avaliação, uma vez que o movimento espontâneo foi avaliado por 15 minutos. (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que esta redução na atividade espontânea no teste de campo aberto pode ser evidenciada 6 horas após a administração utilizando uma dose mais elevada de LPS em camundongos o que dá suporte a hipótese de que o tempo para a expressão do comportamento depende da potência do LPS utilizado (SENS; SCHNEIDER; MAUCH; SCHAFFSTEIN *et al.*, 2017). Estes autores também demonstraram que a hipolocomoção pareceu ser mais robusta em machos do que em fêmeas. No presente estudo não foi possível identificar diferenças relacionadas ao sexo neste parâmetro. Segundo Pitychoutis e colaboradores as fêmeas também parecem lidar melhor com a situação de estresse durante o nado forçado, mas este parâmetro não foi avaliado no presente estudo. Loh et al., (2023) também observaram uma redução dose dependente na atividade espontânea no campo aberto após a injeção de LPS. Doses superiores a 10 µg/kg i.p. em ratos machos também induziram esta resposta (LOH; STICKLING; SCHRANK; HANSHAW et al., 2023).

Os níveis hipotalâmicos de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA foram reduzidos após a administração de LPS em ratos machos. Esses dados também estão de acordo com a literatura e sugerem que a indução de resposta inflamatória sistêmica reduz a liberação de 5-HT no hipotálamo (MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Porém, diferentemente do ocorrido nos machos, a administração de LPS em fêmeas aumentou os níveis de 5-HT (Fig. 6) e de seu metabólito 5-HIAA no hipotálamo sugerindo que há um aumento na liberação deste neurotransmissor em fêmeas durante a inflamação sistêmica induzida por LPS. Curiosamente, esta diferença sexual em relação à liberação de 5-HT no hipotálamo é bastante específico, pois observamos que a liberação de dopamina foi reduzida em ambos os sexos após a administração de LPS.

Em 1984, Simerly *et al.* demonstraram que o núcleo pré-óptico medial do hipotálamo de ratos é, do ponto de vista morfológico sexualmente dimórfico. Esta área parece ser maior nos machos e conter uma menor densidade de fibras coradas com 5-HT (SIMERLY; SWANSON; GORSKI, 1984a). Posteriormente, esses autores mostraram que as projeções serotoninérgicas para o núcleo pré-óptico medial originam-se de neurônios dos núcleos dorsal e mediano da rafe e da região adjacente ao lemnisco medial. (SIMERLY; SWANSON; GORSKI, 1984b). Posteriormente, Carlsson & Carlsson (1988) também demonstraram que as proporções 5-HIAA e 5-HT eram significativamente maiores em fêmeas na área hipotálamo/pré-óptica. (CARLSSON; CARLSSON, 1988). Esses autores, semelhante ao que encontramos no presente estudo, não observaram diferenças nos níveis de dopamina.

Estas diferenças morfológicas no sistema serotoninérgico que atinge o hipotálamo são importantes, mas podem não refletir necessariamente diferenças nos resultados finais quando da ativação deste sistema. Por exemplo, Goel *et al.* demonstraram que, apesar das diferenças morfológicas já citadas no sistema serotoninérgico, machos e fêmeas apresentavam perfis regionais semelhantes de habituação celular da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) à exposição repetida ao estresse, sugerindo substratos comuns do sistema nervoso central de adaptação neuroendócrina. No entanto, esta semelhança

entre machos e fêmeas quanto a ativação do eixo HPA pode também sofrer influência de outras diferenças sexuais subjacentes no controle serotoninérgico que normalmente estimula o eixo HPA, como a percepção do estresse por machos e fêmeas (GOEL; PHILIPPE; CHANG; KOBLANSKI *et al.*, 2022). Diferentemente deste estudo, onde foi avaliada a ativação do eixo HPA ao estresse repetido, mostramos no presente estudo que durante uma resposta inflamatória sistêmica esse sistema é regulado diferencialmente. Enquanto nos machos há uma redução nos níveis de 5-HT e 5-HIAA, nas fêmeas estes níveis estão aumentados. Pitychooutis *et al.* (2009) não observaram diferenças significativas nos níveis de 5-HT ou 5-HIAA no hipotálamo de machos, mas observaram um aumento significativo de 5-HT em fêmeas 2 horas após a injeção de LPS (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). Além disso, ao avaliarem a relação 5-HIAA/5-HT, observaram redução nos machos e aumento nas fêmeas. Este resultado está em consonância com os nossos resultados e as pequenas discrepâncias podem depender, como mencionado anteriormente, da cepa da bactéria ou do momento da avaliação. Em geral, todos estes estudos confirmam que, após a administração de LPS, a resposta serotoninérgica no hipotálamo pode ser diferenciada pelo sexo frente ao estímulo que a causa. Enquanto em algumas situações não se observa esta diferença, em outras, como na inflamação sistêmica ela é evidente. É importante ressaltar que existem estudos que demonstram que as fêmeas apresentam aumento na liberação de 5-HT em outras áreas cerebrais além do hipotálamo, principalmente no sistema límbico, incluindo córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009). E a ação deste neurotransmissor em outras áreas cerebrais certamente é importante para o comportamento de doença.

Em ratos machos, Mota *et al.* (2017) demonstraram que o aumento da síntese de prostaglandinas no AVPO está relacionado à redução da liberação de 5-HT. Nestes estudos, os autores mostraram que a injeção i.c.v. de 5-HT reduziu os níveis de PGE<sub>2</sub> na AVPO e os níveis periféricos de IL-6 concomitantemente com a redução da resposta febril induzida pelo LPS (MOTA; RODRIGUES-SANTOS; FERNÁNDEZ; CAROLINO *et al.*, 2017). Os autores também observaram que a injeção de 5-HT no AVPO reduziu o aumento da

corticosterona plasmática induzido por LPS, ressaltando a importância deste neurotransmissor em ativar o eixo HPA. Portanto, os autores especularam que o nível de 5-HT no hipotálamo é um mecanismo chave para modular diversos circuitos cerebrais envolvidos na ativação do eixo HPA (PAVLOV; WANG; CZURA; FRIEDMAN *et al.*, 2003) bem como as vias anti-inflamatórias colinérgicas vagais reduzindo os níveis periféricos de IL-6 (PAVLOV; TRACEY, 2005; TRACEY, 2002). Esta última suposição baseia-se em dados relatados por vários estudos que demonstraram que o nervo vago desempenha um papel fundamental na limitação da resposta inflamatória (uma via denominada via anti-inflamatória colinérgica ou braço eferente do reflexo inflamatório) (TRACEY, 2002). Posteriormente, os autores mostraram que a injeção i.c.v. de 5-HT também reduziu os níveis de citocinas no plasma e os níveis esplênicos de TNF- $\alpha$  (MOTA; BORGES; AMORIM; CAROLINO *et al.*, 2019). Portanto, os autores sugerem que a 5-HT hipotalâmica ativa esse importante mecanismo anti-inflamatório. Assim, a sua redução durante a inflamação sistêmica em ratos machos facilitaria (ou aumentaria) a ocorrência da resposta febril por exemplo. Se em fêmeas houver, portanto, um aumento da liberação de 5-HT no hipotálamo em vez de redução, pode-se sugerir que esse reflexo anti-inflamatório esteja mais ativo e, desta forma contribuindo para a menor intensidade da febre observada nas fêmeas. É interessante ressaltar a importância que esta informação poderia ter para a terapêutica de doenças inflamatórias sistêmicas. A ativação da via anti-inflamatória colinérgica tem sido sugerida como terapêutica adicional para amenizar diversas condições como endotoxemia, sepse, lesão de isquemia-reperfusão entre outras (KELLY; BREATHNACH; TRACEY; DONNELLY, 2022) e se os resultados do presente estudo indicam que poderia ser diferente proceder esta ativação em machos e fêmeas ou em homens e mulheres.

Como foi demonstrado que a ET-1 participa como mediador central da resposta febril induzida pelo LPS (FABRICIO; SILVA; RAE; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1998) em uma via independente e/ou paralela a indução da síntese de prostaglandinas (FABRICIO; VEIGA; CRISTOFOLETTI; NAVARRA *et al.*, 2005; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). No entanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não foram esclarecidos. Estudos mais recentes do nosso

grupo confirmaram que, de maneira similar ao que ocorre em machos a ET-1 também participa de resposta febril induzida pelo LPS nas fêmeas (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020; COELHO; CRUZ; MABA; ZAMPRONIO, 2021). Corroborando estes e outros estudos anteriores mostramos no presente estudo que a injeção i.c.v. de do antagonista de receptores ET<sub>B</sub> BQ788 reduziu a resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas (COELHO; CRUZ; MABA; ZAMPRONIO, 2021; FABRICIO; RAE; ZAMPRONIO; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2006). No presente estudo, a dose de BQ788 necessária para observar esse efeito foi superior à utilizada anteriormente, uma vez que a dose de LPS também foi superior. A administração de BQ788 também reduziu todos os parâmetros avaliados no movimento espontâneo, confirmando que este antagonista foi capaz de reduzir as respostas associadas à síndrome da doença (LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021). Confirmando nossa hipótese, a administração de BQ788 em machos reverteu a redução nos níveis hipotalâmicos de 5-HT e 5-HIAA, enquanto nas fêmeas o antagonista reverteu o aumento de 5-HT e 5-HIAA. Esses dados em conjunto sugerem que a ET-1 está envolvida tanto na redução dos níveis de 5-HT nos ratos machos quanto no aumento de 5-HT nas fêmeas, modulando os níveis de 5-HT hipotalâmico.

No entanto, o presente estudo apresenta algumas limitações, uma vez que não sabemos exatamente em que região cerebral o antagonista do receptor ET<sub>B</sub> está atuando uma vez que este antagonista foi injetado por via i.c.v. Como mencionado anteriormente, a fonte de 5-HT hipotalâmica são os núcleos da rafe (SIMERLY; SWANSON; GORSKI, 1984b) mas esses receptores também são encontrados em outras células além dos neurônios, como os astrócitos (MORGA; FABER; HEUSCHLING, 2000) e a micróglia (FLEISHER-BERKOVICH; FILIPOVICH-RIMON; BEN-SHMUEL; HÜLSMANN *et al.*, 2010). Portanto, novos estudos devem abordar esta questão para determinar onde o antagonista do receptor ET<sub>B</sub> está agindo, se é no hipotálamo ou nos núcleos da rafe.

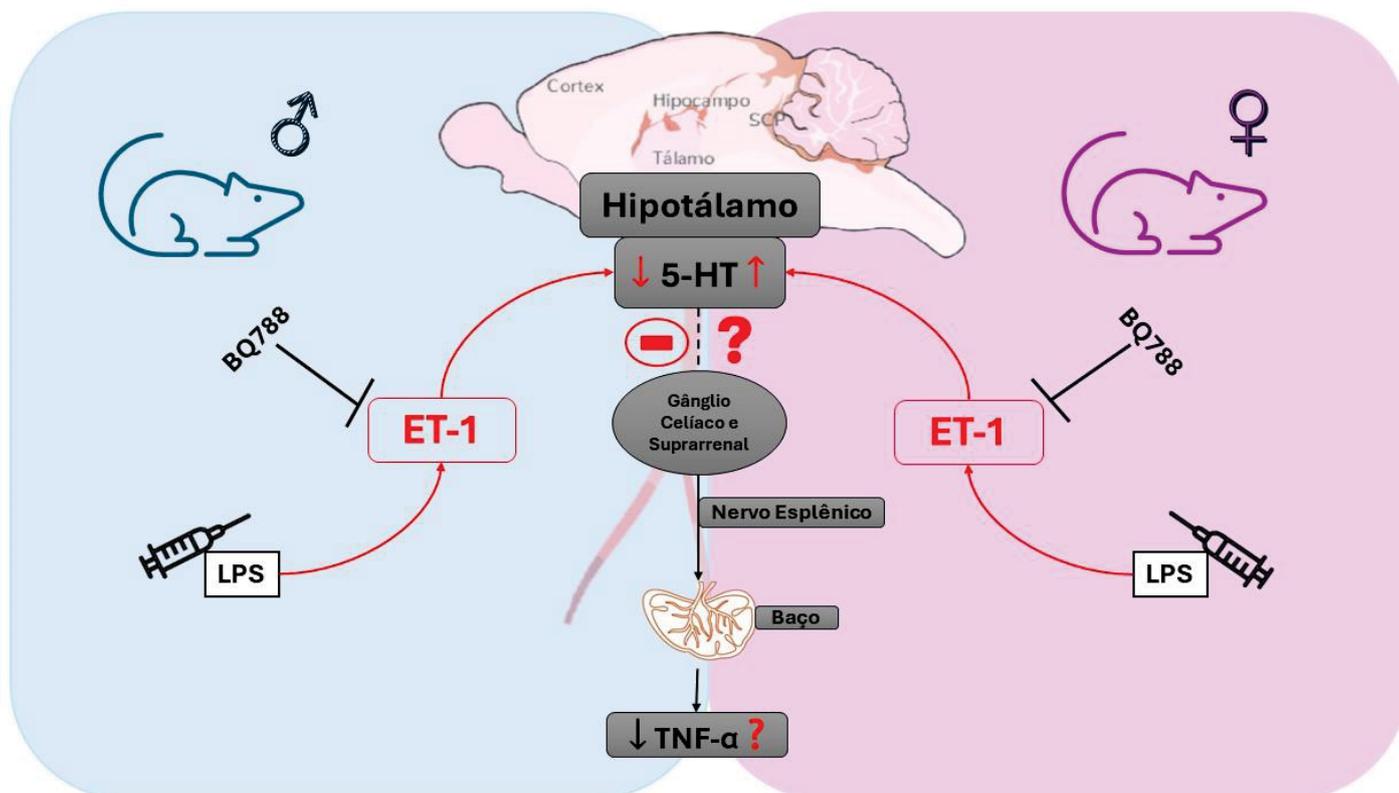
Posteriormente, injetamos ET-1 em machos e fêmeas para avaliar se poderíamos reproduzir as mesmas alterações observadas após a injeção de

LPS. A injeção i.c.v. de ET-1 induziu febre em ratos machos e fêmeas, que foi acompanhada de redução nos movimentos espontâneos confirmando os resultados obtidos com o BQ788 neste estudo e reafirmando a participação central deste peptídeo nessas respostas. Estes dados também corroboram estudos anteriores (BRITO; RADULSKI; WILHELMS; STOJAKOVIC *et al.*, 2020; LOMBA; CRUZ; COELHO; LEITE-AVALCA *et al.*, 2021). No entanto, enquanto a injeção de ET-1 reduziu os níveis de 5-HT e 5-HIAA nos machos (como ocorreu com a administração do LPS), nas fêmeas também foi observada uma redução dos níveis de 5-HT e 5-HIAA, e não um aumento (Fig. 6). Mais estudos serão necessários para esclarecer esta dicotomia entre os efeitos do BQ788 na resposta induzida por LPS e ET-1 em fêmeas em relação à liberação de 5-HT no hipotálamo.

Um ponto importante que deve ser levado em conta é que a injeção *in bolus* de ET-1 no sistema nervoso central tanto em machos como em fêmeas não simula exatamente o que ocorre com o aumento quantitativo gradual e constante deste peptídeo após a injeção de LPS. É possível que a resposta para esta questão possa ser melhor entendida através da injeção de diferentes doses de ET-1 no sistema nervoso central. Adicionalmente, sabemos bem menos sobre a regulação serotoninérgica no sistema nervoso central em fêmeas do que sabemos em machos visto que, em estudos mais antigos, somente machos foram utilizados. E de fato este pode ser um ponto crucial pois tanto o presente estudo como e estudos anteriores sugerem que a transmissão serotoninérgica no sistema nervoso central em fêmeas é mais complexa do que em macho (PITYCHOUTIS; NAKAMURA; TSONIS; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2009).

Tomados em conjunto, estes resultados apresentados no presente estudo sugerem que a ET-1 aumenta no sistema nervoso central após uma inflamação sistêmica e é o mediador inflamatório responsável pela redução dos níveis hipotalâmicos de 5-HT em ratos machos (Fig. 10). Nas fêmeas, esse peptídeo também é importante para o aumento dos níveis hipotalâmicos de 5-HT, mas os mecanismos pelos quais isso ocorre necessitam de mais estudos (Fig. 10). Os dados apresentados também confirmam e corroboram estudos anteriores que a

ação da ET-1 no sistema nervoso central, via receptores ETB também é importante para o desenvolvimento da resposta febril e para a hipolocomoção.



**Figura 10: Representação esquemática desenvolvida a partir dos resultados propostos e encontrados neste trabalho.** O aumento de 5-HT no hipotálamo ativaria a via descendente inibitória no nervo esplênico que reduziria a liberação de TNF- $\alpha$  (via anti-inflamatória). Em vermelho podemos observar a ação diferencial da ET-1 em machos e fêmeas. Em machos, a ET-1 seria responsável pela redução dos níveis de 5-HT, reduzindo assim a ativação da via anti-inflamatória. Em fêmeas, a ET-1 aumenta os níveis de 5-HT no hipotálamo. Os pontos de interrogação e as vias em setas pontilhadas representam mecanismos que ainda necessitam de mais esclarecimentos.

## 7. CONCLUSÃO

Durante a inflamação sistêmica, ratos machos e fêmeas apresentam um importante dimorfismo sexual quanto à liberação de 5-HT no hipotálamo, embora as respostas relacionadas à síndrome da doença (febre e hipolocomoção) sejam semelhantes. Além disso, a ET-1 é um importante mediador envolvido tanto na redução da 5-HT hipotalâmica nos machos quanto no aumento da 5-HT nas fêmeas.

## REFERÊNCIAS

ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Jikken Dobutsu**, 35, n. 4, p. 505-508, Oct 1986.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, 38, n. 8, p. 1083-1152, Aug 1999.

BASTOS-PEREIRA, A. L.; FRAGA, D.; OTT, D.; SIMM, B. *et al.* Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. **J Appl Physiol** (1985), 116, n. 9, p. 1220-1229, May 2014.

BLAIS, V.; FUGÈRE, M.; DENAULT, J. B.; KLARSKOV, K. *et al.* Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. **FEBS Lett**, 524, n. 1-3, p. 43-48, Jul 31 2002.

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

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

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101, n. 6, p. 1644-1655, Jun 1992.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H. *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, 405, n. 6785, p. 458-462, May 25 2000.

BRAUNER, J. S.; ROHDE, L. E.; CLAUSELL, N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. **Intensive Care Med**, 26, n. 3, p. 305-313, Mar 2000.

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

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

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

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

CARREÑO GUTIÉRREZ, H.; COLANESI, S.; COOPER, B.; REICHMANN, F. *et al.* Endothelin neurotransmitter signalling controls zebrafish social behaviour. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 3040, Feb 28 2019.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389, n. 6653, p. 816-824, Oct 23 1997.

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

D'ORLÉANS-JUSTE, P.; PLANTE, M.; HONORÉ, J. C.; CARRIER, E. *et al.* Synthesis and degradation of endothelin-1. **Can J Physiol Pharmacol**, 81, n. 6, p. 503-510, Jun 2003.

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

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

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

FABRICIO, A. S.; VEIGA, F. H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P. *et al.* The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-

induced fever in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 288, n. 3, p. R671-677, Mar 2005.

FLEISHER-BERKOVICH, S.; FILIPOVICH-RIMON, T.; BEN-SHMUEL, S.; HÜLSMANN, C. *et al.* Distinct modulation of microglial amyloid  $\beta$  phagocytosis and migration by neuropeptides (i). **J Neuroinflammation**, 7, p. 61, Oct 11 2010.

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

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

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

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, 47, n. 5, p. 963-991, May 1990.

HAMMOND, T. R.; GADEA, A.; DUPREE, J.; KERNINON, C. *et al.* Astrocyte-derived endothelin-1 inhibits remyelination through notch activation. **Neuron**, 81, n. 3, p. 588-602, Feb 5 2014.

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

HOSTENBACH, S.; D'HAESELEER, M.; KOOIJMAN, R.; DE KEYSER, J. The pathophysiological role of astrocytic endothelin-1. **Prog Neurobiol**, 144, p. 88-102, Sep 2016.

HUANG, K. W.; OCHANDARENA, N. E.; PHILSON, A. C.; HYUN, M. *et al.* Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. **Elife**, 8, Aug 14 2019.

JU, A.; FERNANDEZ-ARROYO, B.; WU, Y.; JACKY, D. *et al.* Expression of serotonin 1A and 2A receptors in molecular- and projection-defined neurons of the mouse insular cortex. **Mol Brain**, 13, n. 1, p. 99, Jun 29 2020.

KASZAKI, J.; WOLFÁRD, A.; BOROS, M.; BARANYI, L. *et al.* Effects of antiendothelin treatment on the early hemodynamic changes in hyperdynamic endotoxemia. **Acta Chir Hung**, 36, n. 1-4, p. 152-153, 1997.

KAWANABE, Y.; NAULI, S. M. Endothelin. **Cell Mol Life Sci**, 68, n. 2, p. 195-203, Jan 2011.

KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41, p. 851-876, 2001.

KELLY, M. J.; BREATHNACH, C.; TRACEY, K. J.; DONNELLY, S. C. Manipulation of the inflammatory reflex as a therapeutic strategy. **Cell Rep Med**, 3, n. 7, p. 100696, Jul 19 2022.

KLUGER, M. J.; VAUGHN, L. K. Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. **J Physiol**, 282, p. 243-251, Sep 1978.

KOWALCZYK, A.; KLENIEWSKA, P.; KOLODZIEJCZYK, M.; SKIBSKA, B. *et al.* The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 63, n. 1, p. 41-52, Feb 2015.

KUWAKI, T.; CAO, W. H.; KUMADA, M. Endothelin in the brain and its effect on central control of the circulation and other functions. **Jpn J Physiol**, 44, n. 1, p. 1-18, 1994.

LANDSBERG, L.; YOUNG, J. B.; LEONARD, W. R.; LINSENMEIER, R. A. *et al.* Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. **Metabolism**, 58, n. 6, p. 871-876, Jun 2009.

LEITE-AVALCA, M. C.; LOMBA, L. A.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; BRITO, H. O. *et al.* Involvement of Central Endothelin ETA and Cannabinoid CB1 Receptors and Arginine Vasopressin Release in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats. **Shock**, 46, n. 3, p. 290-296, Sep 2016.

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

LOMBA, L. A.; CRUZ, J. V.; COELHO, L. C. M.; LEITE-AVALCA, M. C. G. *et al.* Role of central endothelin-1 in hyperalgesia, anhedonia, and hypolocomotion

induced by endotoxin in male rats. **Experimental Brain Research**, 239, n. 1, p. 267-277, Jan 2021.

LOMBA, L. A.; LEITE-AVALCA, M. C. G.; ZAMPRONIO, A. R. ET(A) receptors are involved in the febrile response induced by high dose of bacterial endotoxin. **J Therm Biol**, 95, p. 102804, Jan 2021.

LUNDBERG, O. H.; BERGENZAUN, L.; RYDÉN, J.; ROSENQVIST, M. *et al.* Adrenomedullin and endothelin-1 are associated with myocardial injury and death in septic shock patients. **Crit Care**, 20, n. 1, p. 178, Jun 9 2016.

MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. Excitatory amino acid receptor activation in the raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis. **Neuroscience**, 122, n. 1, p. 5-15, 2003.

MARRIOTT, I.; BOST, K. L.; HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. **J Reprod Immunol**, 71, n. 1, p. 12-27, Aug 2006.

MATIAS, M. E.; RADULSKI, D. R.; RODRIGUES DA SILVA, T.; RAYMUNDI, A. M. *et al.* Involvement of cannabinoid receptors and neuroinflammation in early sepsis: Implications for posttraumatic stress disorder. **Int Immunopharmacol**, 123, p. 110745, Aug 2 2023.

MCKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416, n. 6876, p. 52-58, Mar 7 2002.

MIYAMOTO, H.; OGAWA, M.; MARUTA, K.; NIKAIDO, Y. *et al.* Temperature effects on Legionella pneumophila killing by and multiplication in phagocytes of guinea pigs. **Microbiol Immunol**, 39, n. 9, p. 647-654, 1995.

MOHAMMAD, S.; THIEMERMANN, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. **Front Immunol**, 11, p. 594150, 2020.

MOREIRA, C. G.; BARBIERO, J. K.; ARIZA, D.; DOMBROWSKI, P. A. *et al.* Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: a new approach for an old neurotoxin. **Neurotox Res**, 21, n. 3, p. 291-301, Apr 2012.

MORGA, E.; FABER, C.; HEUSCHLING, P. Stimulation of endothelin B receptor modulates the inflammatory activation of rat astrocytes. **J Neurochem**, 74, n. 2, p. 603-612, Feb 2000.

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

MORTENSEN, L. H. Endothelin and the central and peripheral nervous systems: a decade of endothelin research. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 26, n. 12, p. 980-984, Dec 1999.

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

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

MURAKAMI, N.; WATANABE, T. Activation of ACTH release is mediated by the same molecule as the final mediator, PGE<sub>2</sub>, of febrile response in rats. **Brain Res**, 478, n. 1, p. 171-174, Jan 23 1989.

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

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 292, n. 1, p. R127-136, Jan 2007.

OKA, T.; OKA, K.; KOBAYASHI, T.; SUGIMOTO, Y. *et al.* Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. **J Physiol**, 551, n. Pt 3, p. 945-954, Sep 15 2003.

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

PAVLOV, V. A.; WANG, H.; CZURA, C. J.; FRIEDMAN, S. G. *et al.* The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**, 9, n. 5-8, p. 125-134, May-Aug 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, USA: Academic Press 1998.

PETROIANU, G. A. Hyperthermia and Serotonin: The Quest for a "Better Cyproheptadine". **Int J Mol Sci**, 23, n. 6, Mar 20 2022.

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

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

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, 240, n. 4857, p. 1328-1331, Jun 3 1988.

SCHUETZ, P.; CHRIST-CRAIN, M.; MORGENTHALER, N. G.; STRUCK, J. *et al.* Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. **Endothelium**, 14, n. 6, p. 345-351, Nov-Dec 2007.

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

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

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

SMIRNOV, K.; SITNIKOVA, E. Developmental milestones and behavior of infant rats: The role of sensory input from whiskers. **Behav Brain Res**, 374, p. 112143, Nov 18 2019.

TOGASHI, K.; HARA, Y.; TOMINAGA, T.; HIGASHI, T. *et al.* TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. **Embo j**, 25, n. 9, p. 1804-1815, May 3 2006.

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

WANG, H.; SUN, Y.; WANG, W.; WANG, X. *et al.* Mapping the 5-HTergic neural pathways in perimenopausal mice and elucidating the role of oestrogen receptors in 5-HT neurotransmission. **Heliyon**, 10, n. 6, p. e27976, Mar 30 2024.

WANG, W.; CUI, G.; JIN, B.; WANG, K. *et al.* Estradiol Valerate and Remifemin ameliorate ovariectomy-induced decrease in a serotonin dorsal raphe-preoptic hypothalamus pathway in rats. **Ann Anat**, 208, p. 31-39, Nov 2016.

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

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