

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA HEME OXIGENASE-
MONÓXIDO DE CARBONO-GMPc,
NO LOCUS COERULEUS,
NA RESPOSTA TERMORREGULATÓRIA
À ENDOTOXINA E AO ESTRESSE.**

MARIA IDA BONINI RAVANELLI

**Ribeirão Preto
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA IDA BONINI RAVANELLI

**PARTICIPAÇÃO DA VIA HEME OXIGENASE-
MONÓXIDO DE CARBONO-GMPc,
NO LOCUS COERULEUS,
NA RESPOSTA TERMORREGULATÓRIA
À ENDOTOXINA E AO ESTRESSE.**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Fisiologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção
do grau de Doutor em Ciências, sob
orientação do Prof. Dr. Luiz Guilherme de
Siqueira Branco.**

**Ribeirão Preto
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ravanelli, Maria Ida Bonini

Participação da via heme oxigenase-monóxido de carbono-GMPc, no *locus coeruleus*, na resposta termorregulatória à endotoxina e ao estresse.

Ribeirão Preto, 2007.

74 p., 1 il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP-
Área: fisiologia.

Orientador: Luiz Guilherme de Siqueira Branco

1. Temperatura corporal 2. Inflamação sistêmica. 3. Lipopolissacarídeo. 4. Estresse. 5. Febre. 6. Hipotermia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo apoio e respaldo durante toda minha vida, permitindo meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Prof. Luiz Guilherme de Siqueira Branco pelo voto de confiança e por ter-me acolhido em seu laboratório, onde pude aprender no dia-a-dia que a construção de uma carreira requer premissas relativamente simples, mas valorosas, como planejamento, otimismo, e principalmente, a aposta em nossa capacidade plena de concretizar cada um desses planos.

Aos preciosos amigos do laboratório, e também colaboradores: Luciane, Renata, Kênia, Mirela, Valéria, Giovani, Alexandre, Stella, Carol, Tatiane, Diego, pela amizade e por ajudarem transformar momentos difíceis em etapas superadas. Ao Mauro, Gustavo e especialmente à Lidiane pelo inestimável auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Maria Camila, amiga verdadeiramente generosa, que incentivou e participou diretamente de etapas importantes deste trabalho com seu auxílio, apoio e ensinamentos irretribuíveis.

À Fabiola pela amizade verdadeira e pelos momentos de descontração no convívio diário, pelo incentivo e confiança.

Ao meu namorado Nelson pelo incentivo, credibilidade, compreensão e confiança, que proporcionaram tranquilidade e segurança, fundamentais para concretização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto-USP.

Aos professores Dr. Cândido Coimbra, Dr. Mauro Martins Teixeira, Dr. José Antunes Rodrigues e Dr. Guilherme Lucas, pela disponibilidade para compor a banca examinadora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.RESUMO	1
2.ABSTRACT	2
3.INTRODUÇÃO	3
3.1.Temperatura corporal	3
3.2.Regulação da temperatura corporal	4
3.3.Febre ou hipotermia: como o organismo responde aos estímulos?	9
3.4.O <i>locus coeruleus</i>	15
3.5.A via heme oxigenase-monóxido de carbono-GMPc.....	17
4.OBJETIVOS	22
5.MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1.Animais	23
5.2.Drogas utilizadas	23
5.3.Procedimentos cirúrgicos	24
5.4.Microinjeções e histologia.....	25
5.5.Medidas de temperatura corporal	26
5.6.Estresse de contenção	27
5.7.Protocolos experimentais	28
5.7.1.Participação da via HO-CO-GMPc na febre induzida por endotoxina (LPS) em ratos ...	28
5.7.2.Participação da via HO-CO-GMPc na redução da temperatura corporal induzida por estresse de contenção agudo em ratos	31
5.8.Análise estatística dos dados	33
6.RESULTADOS	35
6.1.Microinjeção intra-LC.....	35
6.2.Participação da via HO-CO-GMPc na febre induzida por endotoxina (LPS) em ratos	36
6.2.1.Experimento 1	37
6.2.2.Experimento 2	38
6.2.3.Experimento 3	39
6.2.4.Experimento 4	40
6.2.5.Experimento 5	41
6.3.Participação da via HO-CO-GMPc na redução da temperatura corporal induzida por estresse de contenção agudo em ratos	43
6.3.1.Experimento 1	43
6.3.2.Experimento 2	44

6.3.3.Experimento 3	45
6.3.4.Experimento 4	46
7.DISSCUSSÃO.....	48
7.1.Participação da via HO-CO-GMPc na febre induzida por endotoxina (LPS) em ratos	48
7.2.Participação da via HO-CO-GMPc na redução da temperatura corporal induzida por estresse de contenção agudo em ratos	52
8.CONCLUSÕES.....	58
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO 1	
ANEXO 2	

Resumo

1. RESUMO

O monóxido de carbono (CO) é um mensageiro gasoso na sinalização central capaz de difundir-se das células onde é produzido e regular a temperatura corporal por meio da ativação da GCs, uma hemeproteína citosólica que catalisa a produção de GMPc. A heme oxigenase (HO, enzima que catalisa o metabolismo de heme em CO, biliverdina e ferro em quantidades equiulares) é a enzima responsável pela produção endógena de CO e é induzida por uma variedade de estímulos como estresse oxidativo e nitrosativo, lipopolissacarídeo/endotoxina (LPS) e glicocorticóides. No entanto, o sítio de ação no qual o CO exerce seus efeitos termorregulatórios no sistema nervoso central ainda não foi identificado. O locus coeruleus (LC) é um grupo bem delineado de células adjacente ao assoalho do quarto ventrículo na região pontina do tronco encefálico e é o principal núcleo noradrenérgico do SNC. O LC contém grande quantidade de GCs e HO. Recentemente, foi demonstrado que os neurônios noradrenérgicos do LC são muito importantes para o desenvolvimento da febre induzida por LPS, bem como para as respostas fisiológicas ao estresse. Em vista disso, o possível envolvimento da via HO-CO-GMPc no LC no controle termorregulatório após o estímulo com LPS e estresse de contenção foi investigada. A indução da via da heme oxigenase utilizando heme-lisinato (7,6 nmol, intra-LC) atenuou a resposta febril ao LPS e aumentou a resposta hipotérmica ao estresse, e esses efeitos foram prevenidos pela administração de ODQ (inibidor da enzima GCs, administrado intracerebroventricularmente, 1.3 nmol). Além disso, ZnDPBG (inibidor da HO; 5 nmol, intra-LC) aumentou a resposta febril ao LPS e atenuou a hipotermia induzida pela contenção. Em conjunto, os dados indicam que o CO endógeno no LC, produzido pela HO e atuando via GMPc apresenta efeito antipirético durante a febre induzida por LPS e um efeito criogênico na hipotermia induzida pelo estresse de contenção em ratos.

Abstract

2. ABSTRACT

Carbon monoxide (CO) has been identified as a diffusible signaling messenger in the brain, capable of altering body temperature by stimulating soluble guanylate cyclase (sGC). Endogenously, CO is produced by heme oxygenase (HO, the enzyme that catalyses the metabolism of heme to CO, along with biliverdin and free iron) which is induced by various stimuli, including oxidative and nitrosative stress, bacterial lipopolysaccharide (LPS) and glucocorticoids. However, its brain site of thermoregulatory action remains unclear. Locus coeruleus (LC) is a well-delineated cluster of noradrenaline-containing neurones located adjacent to the fourth ventricle in the pontine brainstem, rich not only in sGC but also in heme oxygenase-2 (HO-2). Recently, LC was reported to play a major role in the development of LPS induced fever and have been shown playing a role in the physiological responses to stress. Therefore, the possible thermoregulatory role of the HO-CO-cGMP pathway in the LPS-induced fever and restraint stress by LC neurones was investigated. Induction of the HO pathway using heme-lysinate (7.6 nmol, intra-LC) attenuated the febrile response to LPS and augmented the hypothermic response to restraint, and these effects could be prevented by pretreatment with ODQ (an sGC inhibitor; given intracerebroventricularly, 1.3 nmol). Moreover, ZnDPBG (an HO inhibitor; 5 nmol, intra-LC) augmented the febrile response and blunted the restraint hypothermia. Taken together, these data suggest that CO in the LC produced by the HO pathway and acting via cGMP plays an antipyretic or a cryogenic role during LPS-fever and restraint hypothermia in rats, respectively.

Introdução

3. INTRODUÇÃO

3.1. TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal interna (T_c) é um dos mais importantes sinais vitais, tal como são as frequências cardíaca e respiratória. Assim sendo, a T_c é frequentemente monitorada em pacientes hospitalizados, e é um importante indicativo do estado de saúde do paciente. Essa ênfase dada a T_c é fundamentada pela sua forte influência sobre as funções fisiológicas e pelo fato de alterações na T_c serem importantes sintomas de estados patológicos (Blatteis, 1998; Milton, 1998).

A T_c está entre as constantes mais bem defendidas nas espécies homeotérmicas. Isso é resultado da evolução de mecanismos que regulam a troca de calor com o ambiente e de mecanismos capazes de regular a produção basal de calor pelo corpo e a produção adicional de calor em resposta a ambientes frios, situação na qual apenas a produção metabólica basal de calor e os mecanismos de conservação de calor não são suficientes para manter a T_c .

Ao considerarmos os efeitos da temperatura em diversas reações bioquímicas e fisiológicas, torna-se evidente a importância da regulação e manutenção da T_c em níveis relativamente constantes. A T_c tem forte influência nas reações enzimáticas (Dejours, 1981), na contratilidade muscular (Wasserstrom & Vites, 1999), na interação hormônio-receptor (Hinkle *et al*, 1980), na atividade neuronal (Aihara *et al*, 2001) e nas funções imunológicas (Wenisch *et al*, 1996).

Ao lançarmos os olhos à humanidade compreenderemos a idéia de A. S. Milton (1998) de que a sociedade moderna, tal qual conhecemos hoje, não existiria se o homem, um mamífero tropical, não tivesse aprendido manter sua T_c em situações climáticas adversas com o uso de vestimentas, construção de casas e abrigos.

3.2. REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

Na década de 30, John Hunter sugeriu que os animais fossem divididos em dois grupos distintos de acordo com sua capacidade de termorregulação: animais com T_c constante a animais com T_c variável. Em 1947, Bergmann introduziu os termos homeotermia (do grego, *homos*, semelhante) e poiquilotermia (do grego, *poikilos*, inconstante) para definir essas duas classes de animais (*cf* Milton, 1998). No entanto, esses termos de classificação deixaram de ser utilizados à medida que os estudos em termorregulação foram sendo aprimorados por não refletirem, com exatidão, toda a complexidade de recursos que os animais utilizam para controlar sua T_c .

Mais recentemente, foi proposto (Blatteis, 1998) que os animais poderiam ser melhor classificados como endotérmicos e ectotérmicos, de acordo com a origem da principal fonte de calor que utilizam para regular a temperatura corporal. Os animais endotérmicos (aves e mamíferos) são capazes de manter a temperatura corporal dentro de uma faixa satisfatória às suas necessidades pela produção interna de calor. Esses animais possuem de um modo geral, taxa metabólica elevada e termorregulam de forma autonômica e comportamental, mantendo sua T_c dentro de uma faixa estreita a despeito das modificações na temperatura ambiente. Os animais ectotérmicos (répteis, anfíbios e peixes) por sua vez, possuem taxa metabólica muito baixa e termorregulam primariamente de modo comportamental dependendo de fontes externas ou ambientais de calor. Assim, sua T_c é regulada dentro de uma faixa mais ampla, dependendo diretamente de sua temperatura de preferência.

Como mencionado, os animais endotérmicos regulam sua T_c por meio de mecanismos autonômicos e comportamentais. O mecanismo termorregulatório comportamental envolve a troca de calor com o ambiente selecionado e está relacionado à seleção e busca por ambiente quente ou frio, ou da adoção de posturas corporais

(encolhida ou estirada), sendo diretamente dependentes das sensações de frio ou calor (Cabanac, 1998). O mecanismo termorregulatório comportamental é o mais eficiente e pode ser sustentado por mais tempo do que as respostas autonômicas complementares. Também é o mais econômico do ponto de vista energético, uma vez que envolve a troca passiva de calor com o ambiente selecionado. Já os mecanismos autonômicos são aqueles que possibilitam o organismo manter sua T_c com uma relativa independência das condições ambientais, sendo modulados de forma involuntária. Dentre eles, têm-se os mecanismos de ganho de calor e os mecanismos de perda de calor. Os mecanismos de ganho de calor incluem a produção metabólica de calor por tremor (tremor de músculos estriados), a produção metabólica de calor por não-tremor (produção metabólica basal e pelo tecido adiposo marrom, quando este está presente) e também os mecanismos de conservação de calor, que envolvem principalmente vasoconstrição periférica e piloereção. Os mecanismos de perda de calor envolvem a vasodilatação periférica, ofegação e sudorese. Todos esses mecanismos são controlados primariamente pelo sistema nervoso autonômico e são recrutados de acordo com o estímulo ambiental (observe a Figura 1). O balanço entre o ganho e a perda de calor determina a T_c do animal (Szelényi & Székely, 1979; Werner, 1998), que deve ser regulada dentro de uma estreita faixa de temperatura conhecida como *set point* termorregulatório (Briese, 1998; Kluger, 1991), ou mais recentemente denominada ponto de balanço (*cf.* Romanovsky, 2007).

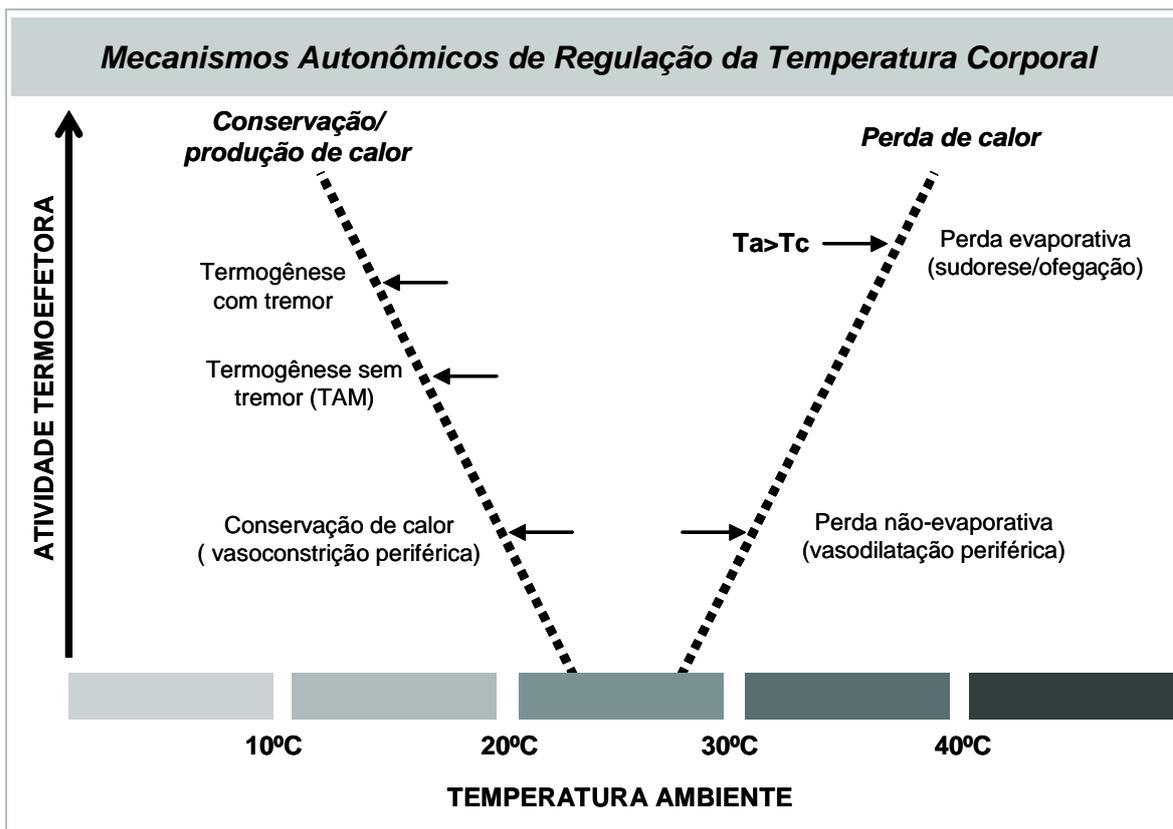


Figura 1. Recrutamento dos mecanismos autonômicos de regulação homeostática da temperatura corporal (T_c) de acordo com a temperatura ambiente (T_a) em animais endotérmicos. A exposição ao frio ativa mecanismos de conservação/produção de calor e inibe mecanismos de perda de calor. O contrário ocorre quando o animal é exposto ao calor.

A redução da temperatura ambiente, e a conseqüente tendência de redução da T_c , leva à ativação dos mecanismos de produção/conservação de calor e à inibição dos mecanismos de perda de calor para o ambiente. Ao passo, que quando ocorre uma elevação na temperatura ambiente os mecanismos de perda de calor são ativados e os de produção de calor são inibidos. A capacidade de um organismo de manter a T_c relativamente constante, apesar de variações na temperatura ambiente, depende da habilidade do sistema nervoso em sentir e integrar as informações térmicas interna e ambiental, gerando uma resposta termorregulatória apropriada (Boulant, 1998a; Boulant, 1998b). As vias somatossensoriais fazem a comunicação da periferia ao sistema nervoso central (SNC), sendo a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) a

principal região do SNC responsável por receber e integrar as informações térmicas, coordenando o controle da T_c .

A temperatura ambiente é detectada por sensores localizados na pele, que são fibras aferentes do tipo C, ou seja, terminações nervosas livres de pequeno diâmetro, amielinizadas, denominadas termorreceptores periféricos. Os termorreceptores periféricos são de dois tipos; os sensíveis ao frio aumentam sua frequência de disparos com a redução da temperatura, e os sensíveis ao calor aumentam suas frequências de disparos quando a temperatura se eleva. Grande parte dos termorreceptores sensíveis ao frio e ao calor apresenta-se ativa em temperaturas ao redor de 33°C , temperatura da pele em situações de termoneutralidade na maioria dos mamíferos. Assim, acredita-se que ambos são capazes de levar informações térmicas da periferia para o SNC na maioria das condições fisiológicas.

A informação gerada pelos termorreceptores periféricos adentra o SNC pelo corno dorsal da medula espinhal e alcança os níveis superiores de integração térmica pelos tratos espino-talâmico e espino-hipotalâmico. Parte dessas informações alcança o tálamo ventrobasal, de onde a informação discriminativa da temperatura cutânea parte para o córtex somatossensorial. Entretanto, essa informação discriminativa não tem validade para a regulação da T_c , para qual são necessárias informações sobre a temperatura média de grandes áreas da pele. Neste último caso, as informações convergem na formação reticular do tronco encefálico, de onde se projetam para outras áreas, incluindo a POA (Boulant, 1998b), por duas vias neuroniais principais: o feixe prosencefálico medial e o estriado periventricular.

Além dos termorreceptores periféricos também existem os centrais, responsáveis por detectar a temperatura corporal interna. Os termorreceptores centrais são populações de neurônios localizados em diversos níveis do SNC, incluindo a medula espinhal, a

formação reticular e a POA (Boulant, 2000). Estudos demonstram que a maioria dos termorreceptores centrais são sensíveis ao calor, ao contrário do que ocorre na periferia do corpo (*cf.* Romanovsky, 2007). Os termorreceptores da medula espinhal também se projetam para POA, levando informações sobre a T_c interna do animal (Boulant & Hardy, 1974). Na POA, a informação térmica é integrada e processada gerando sinais efetores para diferentes regiões do SNC, que por fim, ativam as respostas termorregulatórias apropriadas.

3.3. FEBRE OU HIPOTERMIA: COMO O ORGANISMO RESPONDE AOS ESTÍMULOS?

O estado febril é certamente o sintoma indicativo de enfermidade mais antigo. A febre é uma das várias respostas de defesa do hospedeiro à invasão do organismo por microorganismos patogênicos como bactérias e vírus, bem como a outros insultos deletérios, químicos ou físicos. Apesar de desagradável e debilitante, a resposta febril é benéfica ao organismo (Kluger, 1991). A febre ocorre como resultado de uma interação física e complexa entre fatores solúveis e células, que se inicia na periferia pela presença de patógenos ou seus produtos e então, é transmitida aos níveis superiores do SNC. Este, por sua vez, é o responsável pela modulação da resposta febril. Este processo envolve, tanto na periferia como no encéfalo, mediadores que promovem concomitantemente sinalização pró- e anti-pirética em diferentes pontos desta via. Dessa forma, a febre é um processo estritamente regulado, apresentando mecanismos capazes de prevenir uma resposta febril exagerada e deletéria durante desafios infecciosos sistêmicos.

De modo geral, as respostas endócrinas, metabólicas e imunológicas do organismo a um agente invasor podem ser temporalmente divididas em respostas de fase aguda e tardia. A primeira seria responsável pela restrição ao dano, e a segunda pelo reparo tecidual e pelo desenvolvimento de defesa específica. A febre é considerada uma das principais respostas de fase aguda, que é iniciada pela ativação do sistema imune (Zeisberger, 1999).

O lipopolissacarídeo (LPS) é a forma purificada de um composto extraído da parede celular de bactérias Gram-negativas (endotoxina) e é amplamente utilizado em laboratório como modelo experimental para estudar as respostas inflamatórias.

Quando um agente inflamatório, como por exemplo, o LPS, rompe as barreiras de um organismo ocorre a indução liberação e síntese de diversos mediadores endógenos. Entre os principais, estão as citocinas: interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), de origem peptídica (Kluger, 1991) e outros derivados do metabolismo de lipídios como as prostaglandinas (PGs) (Milton, 1989). As citocinas sinalizam o SNC de que uma resposta inflamatória está em curso. No entanto, ainda é controverso de que maneira esses mediadores produzidos periféricamente sinalizam o SNC, particularmente a POA, uma vez que são peptídios relativamente grandes, incapazes de atravessar livremente a barreira hematoencefálica (BHE). Quatro principais hipóteses foram propostas até o momento: 1- existência de transporte transendotelial saturável (Banks *et al*, 1995); 2- entrada através de regiões onde a BHE é ausente ou enfraquecida, como os órgãos circumventriculares (Blatteis *et al*, 2000; Takahashi *et al*, 1997); 3- sinalização neural, principalmente via nervo vago (Blatteis & Sehic, 1997a; Romanovsky *et al*, 2000) e 4- interação com células endoteliais de microvasos encefálicos que resultariam na produção e liberação de PGE₂ (Elmqvist *et al*, 1997; Schiltz & Sawchenko, 2003; Tilders *et al*, 1994). Independentemente da via ativada, o resultado final será o mesmo; a síntese de PGE₂, o mediador final da febre. Na POA, a PGE₂ interage com receptores EP3 (Oka *et al*, 2003) reduzindo os níveis de AMPc (Steiner *et al*, 2002; Steiner & Branco, 2003), um sinal efetor é então enviado para outras áreas do SNC localizadas no hipotálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo; todas envolvidas no controle da atividade termofetora resultando no aumento da T_c. No rato, a T_c irá aumentar como consequência do aumento de termogênese no TAM e vasoconstrição periférica, especialmente nos vasos sanguíneos da cauda, órgão importante para troca de calor no rato. As vias termofetoras já caracterizadas estão representadas na Figura 2.

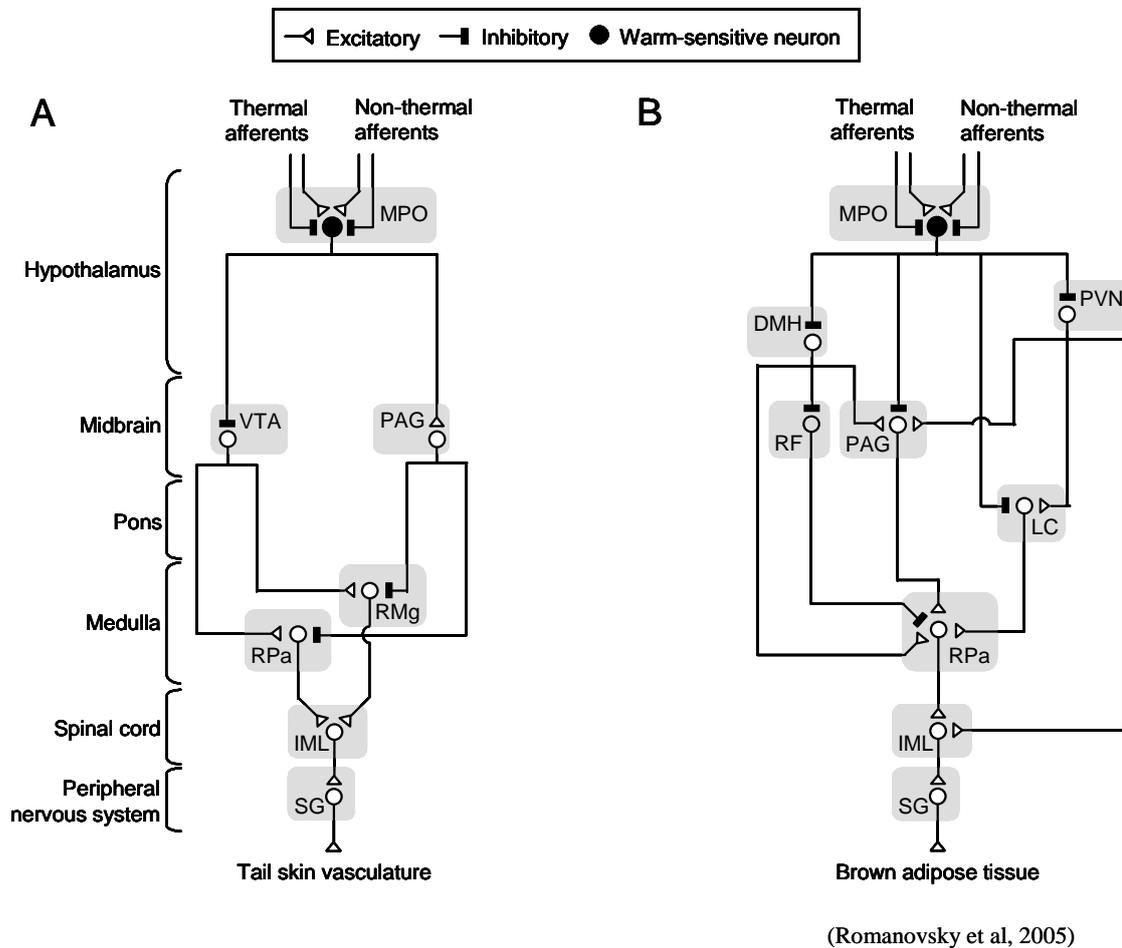


Figura 2. Circuitarias neuronais possíveis no controle do tônus vasomotor da pele da cauda (A) e termogênese no tecido adiposo marrom (B) no rato. Abreviações: DMH, hipotálamo dorsomedial; IML, coluna intermediolateral; LC, locus coeruleus; MPO, área pré-óptica medial; PAG, substância cinzenta periaquedutal; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; RF, região retrorubral; Rmg, rafe magnus; Rpa, rafe palidus; SG, gânglio simpático; VTA, área tegmental ventral.

Por outro lado, a hipotermia associada à inflamação sistêmica é comumente encontrada nos quadros de sepse ou, experimentalmente pela administração de altas doses de LPS. Hoje em dia esta hipotermia é reconhecida como uma resposta termorregulatória e considerada um sintoma de substancial valor clínico. No entanto, esta resposta foi considerada por muito tempo como mera uma falha dos mecanismos termorregulatórios. Nesse sentido, a hipotermia refletiria a inabilidade de um organismo em choque em regular a T_c (Romanovsky *et al*, 2005). Porém, sugere-se hoje que esta resposta envolva mecanismos termorregulatórios específicos que incluem a inibição da termogênese acoplada à procura por um ambiente frio (Romanovsky *et al*, 1996). Recentemente, a hipotermia induzida por LPS passou a ser foco de estudo de muitos laboratórios. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resposta hipotérmica, bem como seu significado biológico são ainda bem menos conhecidos que os da febre.

Embora a febre seja considerada um importante e bem conhecido sintoma durante a resposta inflamatória, há diversas evidências de que ela possa desenvolver-se também em resposta a uma variedade de estressores psicológicos (*cf.* Oka *et al*, 2001). A exposição do animal a condições hostis ou desagradáveis (usualmente conhecidas por condições de estresse) resultam em uma série de respostas coordenadas e organizadas que podem aumentar a probabilidade de sobrevivência. Essas respostas incluem a mobilização de reservas energéticas para o encéfalo e músculos, aumento das taxas de perfusão e utilização de glicose pelo SNC, aumento do débito cardíaco e da frequência respiratória, diminuição do apetite e da função reprodutiva, entre outras (*cf.* Carrasco & Van de Kar, 2003). As situações que geram estresse ou ansiedade como, por exemplo, o manuseio, a contenção física, exposição a campo aberto, exposição a ambiente novo podem levar também a um aumento da T_c de roedores, um fenômeno conhecido por

febre ou hipertermia induzida por estresse (Briese & Cabanac, 1991; Kluger *et al*, 1987; Olivier *et al*, 2003). Interessantemente, esta resposta tende a desaparecer após várias sessões de treinamento (Romanovsky *et al*, 1997; Steiner *et al*, 2001), reforçando sua natureza psico-emocional. Os argumentos que reforçam que o aumento de T_c em resposta a estímulos estressores trata-se de febre, e não de hipertermia, incluem o fato de que essa resposta é atenuada com o uso de salicilato de sódio ou indometacina, dois antipiréticos que não apresentam efeito na hipertermia (Briese & Cabanac, 1980; Kluger *et al*, 1987; Singer *et al*, 1986). Além disso, Briese & Cabanac (1991) relataram que o aumento da T_c induzido por estresse emocional resulta da interação entre respostas termogênicas, termoconservatórias e de dissipação de calor. Muitas evidências defendem ainda, que a febre por estresse apresenta mecanismos similares à febre induzida por LPS. Ambas são acompanhadas por aumentos nos níveis das citocinas IL-1 β e IL-6 (LeMay *et al*, 1990; Minami *et al*, 1991) e pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise- adrenal (HPA) (Turnbull *et al*, 1998; Turnbull & Rivier, 1999). Além disso, ambas são atenuadas por drogas anti-piréticas não-esteroidais (Morimoto *et al*, 1991; Singer *et al*, 1986) ou pela administração de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) (De Paula *et al*, 2000).

Embora a febre ou hipertermia induzida pelo estresse de contenção seja um fenômeno observado por vários grupos de pesquisa em ratos, (Morley *et al*, 1990; Stewart & Eikelboom, 1979) camundongos (Zethof, *et al*, 1994) e coelhos (Snow & Horita, 1982), nas últimas décadas, têm-se relatado que a contenção pode provocar também redução na temperatura corporal (ou hipotermia) em ratos (Herbert & Howes, 1993; Shimada & Stitt, 1982; Stamp & Herbert, 1999; Stamp & Herbert, 2001) e camundongos (Johnson *et al*, 2000). Semelhante à febre/hipertermia, esta resposta hipotérmica também é atenuada após sessões repetidas de estresse (Stamp & Herbert,

1999; Stamp & Herbert, 2001). Herbert & colaboradores (Herbert & Howes, 1993; Stamp & Herbert, 1999; Stamp & Herbert, 2001) demonstraram o envolvimento do hormônio liberador de corticotropina (CRF) e a alteração dos níveis de corticosterona e de opióides no desenvolvimento e na adaptação dessa resposta em ratos. Além disso, foi demonstrado que o estresse de contenção reduziu a termogênese por tremor durante a exposição ao frio (Shimada & Stitt, 1982). Porém, ainda hoje, muito pouco se sabe a respeito dos mecanismos autonômicos e endócrinos envolvidos na resposta hipotérmica ao estresse de contenção.

3.4. O LOCUS COERULEUS

Existem evidências de que a norepinefrina seja um importante neurotransmissor envolvido na gênese da febre. A administração sistêmica de agentes pirogênicos e citocinas causa ativação rápida dos terminais noradrenérgicos na POA (Dunn & Wang, 1995; Linthorst *et al*, 1995). Tanto estudos *in vitro* (Malik & Sehic, 1990) quanto *in vivo* (Sehic *et al*, 1996) demonstraram que a norepinefrina é capaz de causar a liberação de PGE₂, mediador terminal da resposta febril na POA (Blatteis & Sehic, 1997b). Além disso, a depleção de catecolaminas no SNC com o uso da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) abole a febre induzida por IL-1 em ratos (Ovadia *et al*, 1989).

O LC é o principal núcleo noradrenérgico DO SNC e está localizado adjacente ao assoalho do quarto ventrículo, na região pontina do tronco encefálico (Berridge & Waterhouse, 2003). Estima-se que aproximadamente 50% de todas as projeções noradrenérgicas do SNC originam-se no LC (Aston-Jones *et al*, 1995; Berridge & Waterhouse, 2003). Devido a sua localização estratégica, o LC pode transmitir informações para a POA ou então, controlar a atividade neuronal termofetora. O LC recebe projeções do núcleo do trato solitário (Van Bockstaele *et al*, 1999) e projeta-se para a POA (Aston-Jones *et al*, 1995). Assim, os neurônios do LC poderiam estar envolvidos na sinalização aferente da resposta febril via nervo vago. Por outro lado, o LC também recebe projeções da POA (Steininger *et al*, 2001) e projeta para regiões envolvidas no controle da atividade termogênica efetora (Grzanna & Fritschy, 1991; Jones & Yang, 1985; Morrison *et al*, 1999; Uno & Shibata, 2001). Mais recentemente, em 2004, nosso grupo demonstrou que de fato, o LC está envolvido na via termofetora da febre, não tendo participação na sinalização aferente para a POA, pelo menos durante as respostas febris induzidas por LPS e PGE₂ (Almeida *et al*, 2004), confira na Figura 2.

Além disso, o LC também é considerado um componente importante na circuitaria neuronal envolvida nas respostas ao estresse, participando da regulação das respostas neuroendócrinas aos agentes estressores (Carrasco *et al*, 2003; Lachuer *et al*, 1991; Sved *et al*, 2002). Experimentos em ratos demonstraram que o LC apresenta um significativo aumento da expressão de *c-fos* quando o animal é exposto a uma única sessão de estresse de contenção (Chen & Herbert, 1995). No entanto, os mediadores envolvidos nas respostas deste núcleo noradrenérgico tanto na febre induzida por endotoxina, quanto nas respostas termorregulatórias ao estresse de contenção ainda não foram devidamente esclarecidas.

3.5. A VIA HEME OXIGENASE-MONÓXIDO DE CARBONO- GMPc

O monóxido de carbono (CO) é popularmente conhecido por seus atributos tóxicos, incluindo seus efeitos deletérios no SNC e no sistema cardiovascular. No entanto, o CO é também produzido endogenamente em tecidos de mamíferos. A produção endógena de CO acontece por uma reação catalisada pela enzima heme oxigenase (HO).

Em 1969, Tenhunen e colaboradores descreveram pela primeira vez a heme oxigenase (HO), uma enzima microsomal que hidrolisa a porção heme das proteínas que o contêm, as heme-proteínas (Tenhunen *et al*, 1969). Assim, citocromos, heme-proteínas teciduais, hemoglobina, mioglobina e moléculas de heme recém sintetizadas (antes de sua conjugação com apoproteínas) poderiam ser fontes endógenas de heme (Maines, 1997; Tenhunen *et al*, 1969).

Até hoje foram identificadas três isoformas da enzima HO, uma induzível, HO-1, também conhecida por como proteína heatshock-32 (Hsp-32), e duas outras constitutivas, HO-2 e HO-3, que são produtos de genes distintos (Maines *et al*, 1986; McCoubrey *et al*, 1997; Shibahara *et al*, 1985).

A forma pelo qual o substrato heme torna-se disponível para hidrólise pela enzima HO ainda não foi completamente esclarecida. No entanto, presume-se que, em todos os tecidos, moléculas de heme recém sintetizadas sejam substratos para a HO. Em condições normais (homeostase), é provável que as principais fontes de heme para hidrólise, principalmente pela HO-2, sejam moléculas de heme livre recém sintetizadas nas células ou as provenientes de heme-proteínas celulares senescentes. Porém, em condições anormais ou patológicas, como situações de estresse oxidativo, usualmente ocorrem alterações no status de oxidação/redução da célula combinadas a uma forte indução da atividade da HO, principalmente da HO-1. Nesses casos, o substrato heme é

disponibilizado a partir de fontes adicionais: 1- a demanda de heme para produção de uma série de heme-proteínas (não-heat shock) poderia estar diminuída, aumentando a disponibilidade de heme para degradação pela HO; 2- danos em membranas celulares, pela ação de radicais livres ou alterações de potencial de oxidação/redução das células favoreceriam o acesso de moléculas de heme do meio extracelular para o interior da célula; 3- a suscetibilidade à desnaturação por radicais livres de heme-proteínas as tornaria prováveis fontes de heme para produção de CO (*cf.* Maines, 1997). Além disso, após hemorragias, decorrentes acidentes vasculares e traumatismos cranianos, grande quantidade de hemácias são liberadas no espaço subaracnóideo ou no parênquima encefálico. Após hemólise, a sobrecarga de heme proveniente da hemoglobina requer vários mecanismos envolvidos no transporte e metabolização do heme e do ferro para proteger o encéfalo de um potencial estresse oxidativo. Assim, transportadores extra- e intracelulares, proteínas de estoque e as isoformas de HO localizadas em vários tipos celulares do tecido nervoso são requeridas. Entre estas, foi demonstrada a hemopexina, uma proteína que liga o heme livre, e pela interação com seu receptor específico de membrana, transporta o heme para o interior da célula favorecendo sua metabolização pela HO (*cf.* Wagner et al, 2003). A hemopexina está presente no endotélio vascular e sua expressão também já foi demonstrada por imunohistoquímica no soma, axônio e dendritos de neurônios de diversas regiões encefálicas (Morris *et al*, 1993; Wagner et al, 2003).

Uma vez disponível na célula, o heme é clivado em seu anel tetrapirrólico pela HO na ponte α -meteno, produzindo quantidades equimolares de biliverdina (BV), ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) e monóxido de carbono. Em mamíferos, a BV é transformada pela enzima citosólica biliverdina-redutase (BVR) em bilirrubina (BR), que é conjugada ao ácido glicurônico e excretada (Fig.3).

Desde a descrição da atividade dessa via, muitos grupos de pesquisa focaram sua atenção na HO e seus produtos com objetivo de entender melhor suas funções biológicas e sua regulação. Todos os produtos da atividade da enzima HO parecem participar de modo importante nas funções celulares, o que certamente pode explicar a extensiva presença de isoformas da HO em diversos tecidos, incluindo o SNC, e em vários tipos celulares (Scapagnini *et al*, 2002). Em particular, em 1987, Stocker *et al* descreveram propriedades antioxidantes da BR (Stocker *et al*, 1987), e em 1993, Verma *et al*, propuseram um papel de neuromodulador endógeno para o CO (Verma *et al*, 1993). Após essas observações, a literatura tem registrado uma série de evidências demonstrando novas e importantes participações dos produtos da HO no SNC, tanto em sistemas fisiológicos como em estados patológicos.

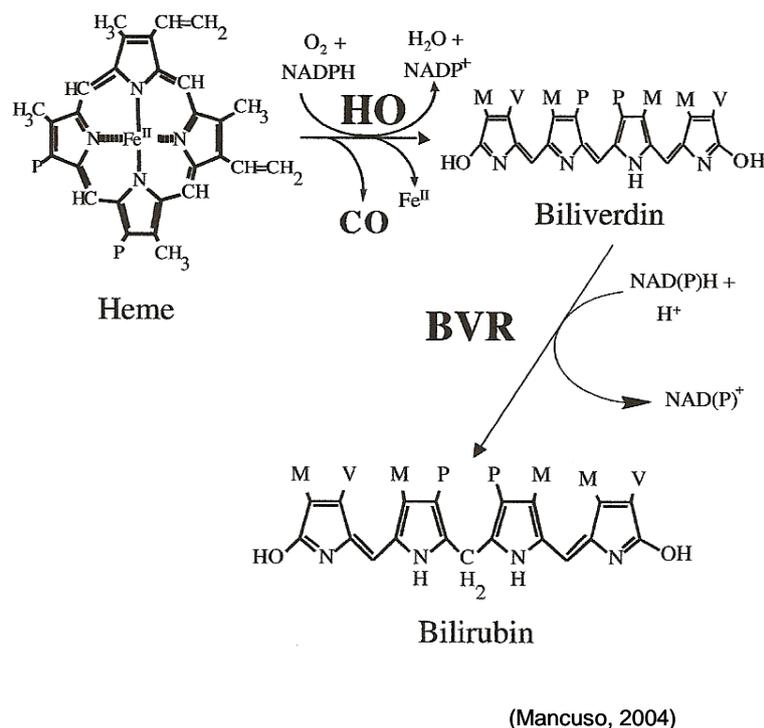


Figura 3. Via metabólica que leva a formação endógena de CO. A enzima HO transfere equivalentes redutores da NADPH-citocromo P450 reductase para a ponte α -meteno dos grupamentos heme celulares. Desta forma, HO cliva o anel tetrapirrólico do heme e libera CO e biliverdina e Fe^{2+} em quantidades equimolares.

A caracterização e a distribuição regional e celular das isoformas de HO têm auxiliado no entendimento de suas funções no SNC. Foi demonstrado que a HO-1 é expressa em pouquíssimas quantidades no encéfalo de ratos, sendo constitutivamente presente em apenas alguns poucos tipos celulares, no entanto é rápida e extensivamente induzida na presença de seu substrato heme e por agentes associados ao estresse (Paschen *et al*, 1994; Regan *et al*, 2000; Scapagnini *et al*, 2002). Por outro lado, estudos têm demonstrado que a HO-2 é fortemente expressa e distribuída de maneira constitutiva no SNC, inclusive no LC, (Maines,1997; Pineda *et al*, 1996), sendo mais fracamente induzida por agentes estressores (Raju *et al*, 1997). Ainda hoje, a função e a distribuição específica da HO-3 é muito pouco conhecida, tanto no SNC, quanto em outras regiões do organismo.

O conceito de que o CO desempenha um relevante papel na sinalização intra e intercelular tem sido cada vez mais aceito. Já é sabido que o CO exerce a maioria dos seus efeitos biológicos via ativação da enzima citosólica guanilato ciclase solúvel (GCs), que também é uma heme-proteína. Este potencial efeito do CO envolve sua interação com o grupo heme da GCs, aumentando sua atividade e estimulando a produção intracelular de GMPc, um segundo mensageiro, em uma ou duas vezes (Burstyn *et al*, 1995; Kharitonov *et al*, 1995; Mancuso, 2004).

Em 1999, Steiner *et al* descreveram pela primeira vez que o CO gerado a partir da via da HO têm um importante papel no SNC para gênese da febre induzida por endotoxina (Steiner *et al*, 1999). Nesse estudo observou-se que a indução da via da HO, utilizando-se a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de heme-lisinato (composto que promove uma superoferta de heme, substrato da enzima HO) promove um aumento da temperatura corporal de ratos, uma resposta que é atenuada pela administração do inibidor inespecífico da enzima HO, ZnDPBG. Posteriormente, foi demonstrado que o

CO é o produto da via da HO com ação pirética no SNC, atuando via GMPc (Steiner & Branco, 2001). Da mesma forma, foi demonstrado que o CO também participa da geração da febre induzida por estresse de contenção agudo (Steiner *et al*, 2003). No entanto, o sítio no SNC no qual o CO exerce suas ações piréticas ainda não foi identificado. Um potencial sítio da ação pirética do CO no SNC seria a POA, porém, a administração intra AVPO dos moduladores da via da HO não alteraram a resposta febril induzida por LPS (Steiner & Branco, 2002b). Outras ações termorregulatórias do CO foram relatadas ainda, durante a anapirexia induzida por hipóxia (Paro *et al*, 2000) e a hipotermia induzida pela insulina (Almeida & Branco, 2002), onde a ativação da via HO e o conseqüente aumento da produção de CO atuam de modo a prevenir a queda excessiva da T_c em ratos.

Objetivos

4. OBJETIVOS

Levando em consideração as evidências ressaltadas até aqui, propusemos avaliar o envolvimento da via HO-CO-GMPc, no LC, na respostas termorregulatórias durante a febre e o estresse de contenção em ratos.

A presente tese foi elaborada com base em dois estudos principais, sendo que no primeiro foi utilizado um estímulo inflamatório (LPS) e no segundo foi utilizado um estímulo de estresse emocional (contenção aguda).

O primeiro estudo, intitulado “*Participação da via HO-CO-GMPc na febre induzida por endotoxina (LPS) em ratos*” teve os seguintes objetivos específicos:

- 1- Investigar o efeito da microinjeção intra-LC de moduladores farmacológicos da via HO-CO na temperatura corporal de ratos durante a eutermia.
- 2- Verificar a participação da via da HO, no LC, durante a resposta febril induzida pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos.
- 3- Determinar qual o produto da via da HO envolvido na modulação da febre induzida por LPS em ratos e qual a via de sinalização intracelular utilizada.

O segundo estudo, intitulado “*Participação da via HO-CO-GMPc na redução da temperatura corporal induzida por estresse de contenção agudo em ratos*” teve os seguintes objetivos:

- 1- Verificar a participação da via da HO, no LC, na resposta termorregulatória induzida pelo estresse de contenção agudo.
- 2- Determinar o produto da via da HO envolvido na modulação da resposta ao estresse em ratos e qual a via de sinalização intracelular utilizada.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar adultos, machos, com peso corporal de 290-320g. Os animais utilizados em todos os experimentos foram obtidos do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e foram mantidos em uma sala com temperatura ambiente controlada (24-26°C), com ciclo claro escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 6 horas. Os ratos tiveram acesso livre à água e ração comum para ratos. Na véspera dos experimentos os animais eram transferidos para sala de experimentação com temperatura ambiente controlada em 23°C e 22°C para os estudos com LPS e estresse respectivamente, onde permaneciam por 24 horas antes do início dos experimentos.

5.2. Drogas Utilizadas

O inibidor não-seletivo da enzima HO, zinc deuteroporphyrin 2,4-bis glycol (ZnDPBG) e a hemina foram obtidos da Porphyrin Products (Logan, UT, USA). O ZnDPBG foi dissolvido em uma solução de Na₂CO₃ (50mmol/L) e estocada no escuro. A hemina foi utilizada para preparar o heme-lisinato, um indutor da via HO-CO, como descrito previamente por Tenhunen *et al* (1987). As preparações livres de heme utilizadas nos animais controles (veículo) consistiam em uma solução de L-lisina (14,2µmol/mL), etanol (5%), propileno glicol (40%) e água estéril e apirogênica (55%). O LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 0111:b4) foi obtido da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) e dissolvido em salina estéril apirogênica. O inibidor da GCs 1H-[1,2,4] oxadiazolo -[4,3,-a] quinoxaline-1-one (ODQ) foi adquirido da Tocris Cookson (St. Louis, MO, USA) e dissolvido em um veículo que consistia de uma solução de dimetil sulfóxido 1% (DMSO 1%) em salina estéril apirogênica.

5.3. Procedimentos Cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina-xylasina (100 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e proteção antibiótica (benzil penicilina 160.000 U/kg, i.m.). Os animais eram anestesiados e em seguida posicionados em um aparelho estereotáxico Kopf para o implante de uma cânula guia unilateral no LC direito do animal. A cânula guia (0,7 mm diâmetro externo e 15 mm de comprimento) era posicionada 1 mm acima do LC, de modo que o núcleo era acessado apenas no momento das microinjeções (coordenadas: ântero-posterior: -3,4 do lambda; lateral: -1,2 da linha media e dorso-ventral; -5,8 da superfície do osso, com a barra do incisivo em 0 mm e inclinação da torre vertical do estereotáxico em 15°). As coordenadas para implantação da cânula guia para injeções intra-LC foram baseadas em trabalhos de Anselmo-Franci e colaboradores (Anselmo-Franci *et al*, 1997) e trabalhos prévios do laboratório (Almeida *et al*, 2004; Ferreira *et al*, 2004).

Os animais utilizados nos experimentos com injeção de ODQ recebiam uma cânula adicional (0,7 mm de diâmetro externo e 12 mm de comprimento), posicionada no ventrículo lateral cerebral direito (coordenadas: ântero-posterior: -1,0 mm do bregma, lateral: -1,6 mm da linha média; dorso-ventral: -3,2 a -3,7 da superfície do osso, com a barra do incisivo em -3,3 mm). O deslocamento do menisco de um manômetro de água acoplado à cânula a ser implantada indicava seu posicionamento correto. As cânulas eram fixadas ao crânio do animal com o uso de resina acrílica e auxílio de dois parafusos. Um mandril era introduzido em cada cânula para prevenir a oclusão ou infecção.

Imediatamente após o término da estereotaxia, os animais eram submetidos a uma laparotomia paramedial para introdução de um dos dispositivos de medida de

temperatura corporal (as medidas de temperatura corporal nos experimentos com LPS foram realizadas utilizando o método de biotelemetria-MiniMitter, enquanto os experimentos com estresse de contenção foram realizados utilizando SubCue dataloggers). Ao término das cirurgias, os animais recebiam uma dose de analgésico (flunixinina-meglumina, 2,5 mg/kg). Os experimentos eram iniciados de 6 a 7 dias após os procedimentos cirúrgicos.

5.4 Microinjeções e Histologia

As microinjeções foram realizadas com o auxílio de uma bomba de microinjeção (modelo 310; Stoelting, Wood dale, IL, USA) utilizando uma agulha gengival (Mizzy, 200 µm de diâmetro externo e 16mm de comprimento) conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma seringa Hamilton (1µL). As microinjeções eram realizadas ao longo de 1 min e os volumes injetados eram de 100 nL e 1µL no LC e no ventrículo lateral, respectivamente. Ao final de cada experimento, os animais eram profundamente anestesiados, 100 nL de uma solução de Azul de Evans era microinjetado no LC com a finalidade de marcar o sítio de injeção para posterior localização em análise histológica. Em seguida, os animais eram perfundidos transcardiacamente com salina seguida de uma solução de formalina 10%. Os encéfalos eram imediatamente removidos da caixa craniana e pós-fixados em uma solução de formalina 10% tamponada por 4 dias. Após a fixação, os encéfalos eram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (13 µm). Os cortes eram montados em lâmina e corados pelo método de Nissl. A análise para verificação da localização do sítio de microinjeção era realizada em microscópio de luz, com base no atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1998).

5.5. Medidas da Temperatura Corporal

Biotelemetria

Nos experimentos com desafio por LPS, a temperatura corporal dos ratos foi continuamente registrada utilizando o método da biotelemetria. Os ratos acordados eram acondicionados em caixas individuais e transferidos à sala de experimentos cerca de 24h antes do início do experimento. As caixas contendo os animais eram colocadas sobre receptores Mini-Mitter (modelo ER-4000) conectados a um computador. Em todos os protocolos experimentais a T_c começou a ser registrada por um período de 1 hora antes de qualquer manipulação do animal com o objetivo de determinar a temperatura corporal inicial (T_{ci}), o registro era feito em intervalos de 5 minutos por todo o período experimental. Todos os experimentos foram realizados entre 9:00 e 16:00 horas para evitar interferências das oscilações circadianas na temperatura corporal dos animais.

Dataloggers

Nos experimentos de estresse de contenção as medidas de temperatura corporal dos ratos foram realizadas continuamente em intervalos de 5 minutos, assim como nos experimentos que utilizaram LPS. No entanto, para esses experimentos, a biotelemetria foi substituída por SubCue dataloggers (Calgary, Alberta, Canadá), um método tão eficiente quanto o primeiro, com a vantagem de ser um método mais econômico financeiramente e de não depender da disposição das caixas sobre placas receptoras, o que confere maior praticidade e possibilita a utilização de um maior número de animais por experimento. Com esse método, os dados de temperatura são armazenados em um pequeno dispositivo introduzido na cavidade abdominal do animal. Ao final dos experimentos e após a perfusão dos animais o dispositivo é retirado e os dados de temperatura são transferidos diretamente por meio de um cabo ao computador para

posterior análise com o auxílio de um software próprio. As temperaturas registradas por cada datalogger eram corrigidas utilizando as recomendações do fabricante.

5.6. Estresse de contenção

Em todos os experimentos os animais foram submetidos a uma única sessão de estresse. Os ratos eram cuidadosamente retirados de suas caixas individuais e transferidos para o interior de tubos de acrílico (160 mm de comprimento e 55 mm de diâmetro interno) perfurados ao longo de sua extensão para possibilitar a dissipação de calor corporal (Steiner et al, 2003; Terlouw et al, 1996). As dimensões do tubo possibilitavam que os animais se movimentassem da posição pronada à supina, porém, não permitiam que os animais se movimentassem rostro-caudalmente. Os animais permaneciam contidos pelo período de 30 minutos e depois eram devolvidos cuidadosamente para suas caixas de origem, onde permaneciam até o término dos experimentos.

5.7. Protocolos Experimentais

5.7.1. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMP_c NA FEBRE INDUZIDA POR ENDOTOXINA (LPS) EM RATOS.

Protocolo experimental 1

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na temperatura corporal de ratos eutérmicos.

Esse experimento foi realizado para verificar se a inibição da enzima HO alterava a temperatura basal de ratos eutérmicos, verificando assim se existe um efeito tônico da via da HO no LC na manutenção da temperatura corporal de ratos na eutermia.

Na manhã do experimento os ratos, previamente canulados no LC, tinham sua temperatura corporal basal registrada por 1 h antes de qualquer manipulação. Após a determinação da T_{ci} , os animais recebiam uma injeção intraperitoneal de salina estéril apirogênica (0,5 mL por rato). Após o período de 2h, os animais recebiam uma injeção intra-LC de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume do seu veículo Na_2CO_3 (50 mM). Essa dose foi baseada em experimentos prévios do nosso grupo (Steiner & Branco, 2002b) e experimentos piloto. A temperatura corporal foi registrada continuamente por biotelemetria durante todo o período experimental. A temperatura ambiente era controlada em $23 \pm 1^\circ C$.

Protocolo experimental 2

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na temperatura corporal de ratos eutérmicos.

Esse experimento foi realizado para verificar se a microinjeção de heme-lisinato e a consequente indução da via da HO, no LC, altera a temperatura corporal basal de ratos eutérmicos.

Após a T_{ci} ser registrada, os animais recebiam uma injeção intraperitoneal de salina estéril apirogênica (0,5 mL por rato) e duas horas depois recebiam uma microinjeção intra-LC de um indutor da via HO heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume de seu veículo (L-lisina) como controles. A temperatura corporal era registrada continuamente por todo o período experimental. A temperatura ambiente era de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolo experimental 3

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na febre induzida por LPS.

Esse experimento teve o objetivo de verificar se a inibição da enzima HO no LC alterava a resposta febril induzida por LPS em ratos.

Após a determinação da T_{ci} , os animais recebiam uma injeção intraperitoneal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal em 0,5 mL de salina estéril apirogênica). Após o período de duas horas, os animais recebiam uma microinjeção de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume do seu veículo Na_2CO_3 (50 mM). A temperatura corporal era monitorada continuamente ao longo do período experimental. A temperatura ambiente era controlada em $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolo experimental 4

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na febre induzida por LPS.

Este protocolo experimental tinha o objetivo de verificar se a indução da enzima HO no LC, por meio da administração de heme-lisinato, modificava a reação febril induzida pela injeção de LPS. Para isso, após terem sua T_{ci} registrada, os animais recebiam uma injeção de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal em 0,5 mL de salina estéril apirogênica) e duas horas depois recebiam uma microinjeção intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100nL) ou do mesmo volume de seu veículo (L-lisina). A temperatura corporal foi continuamente registrada por biotelemetria. A temperatura ambiente era controlada em $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolo experimental 5

Determinação do efeito do inibidor da GCs, ODQ, na modulação da temperatura corporal induzida pelo heme-lisinato durante a febre por LPS.

Esse protocolo experimental teve o objetivo de verificar se o GMPc era o segundo mensageiro envolvido nos efeitos produzidos pela administração intra-LC de heme-lisinato, durante a febre induzida por LPS, confirmando assim, a participação do CO.

Os ratos, previamente canulados no LC e no ventrículo lateral tiveram sua temperatura corporal basal registrada por 1 hora antes de qualquer manipulação. Após a determinação da T_{ci} , os ratos recebiam uma injeção intraperitoneal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal em 0,5 mL de salina estéril apirogênica). Após 1,5 hora da injeção de LPS, os animais recebiam um pré-tratamento central (intracerebroventricular, i.c.v.) com o inibidor da enzima GCs, ODQ (1,3 nmol em 1 μL), ou do mesmo volume de seu veículo DMSO 1%. Um novo período de 30 min era aguardado, e então os animais recebiam a microinjeção intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) ou de veículo (L-lisina). Assim como nos experimentos anteriores, a temperatura corporal foi

registrada continuamente por biotelemetria, em intervalos de 5 min durante todo o período experimental. A temperatura ambiente era controlada em $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.7.2. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMP_c NA REDUÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO EM RATOS.

Protocolo experimental 1

Determinação do efeito do estresse de contenção agudo na temperatura corporal de ratos.

Esse protocolo experimental tinha o objetivo de verificar o efeito do estresse de contenção agudo na temperatura corporal de ratos.

Na manhã do experimento os ratos, previamente implantados com SubCue dataloggers, tinham sua temperatura corporal basal registrada por 1 h antes de qualquer manipulação. Após a T_{ci} ser determinada, os animais eram divididos aleatoriamente em dois grupos. Os animais pertencentes ao primeiro grupo eram retirados cuidadosamente de suas caixas e introduzidos em tubos de contenção, como descrito anteriormente, por 30 min. Após esse período de contenção, os animais eram cuidadosamente removidos dos tubos e devolvidos às suas caixas de origem, onde permaneciam pelo restante do período experimental. Os animais do grupo controle eram apenas manipulados rápida e cuidadosamente, e em seguida devolvidos às suas caixas de origem, onde permaneciam pelo restante do período experimental. A temperatura corporal era registrada continuamente, em intervalos de 5 minutos com o uso de dataloggers. A temperatura ambiente era controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolo experimental 2

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na redução da temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção.

Esse protocolo teve o objetivo de verificar se a inibição da enzima HO no LC alterava a queda na temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção agudo em ratos.

Na manhã do experimento os ratos, previamente canulados no LC, tinham sua temperatura corporal basal registrada por 1 h antes de qualquer manipulação. Após a determinação da T_{ci} , os animais recebiam uma microinjeção de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume do seu veículo Na_2CO_3 (50 mM) e eram imediatamente transferidos para o interior dos tubos de contenção, onde permaneciam por 30 minutos. Ao término desse período, os animais eram cuidadosamente devolvidos às suas caixas de origem, onde tinham sua temperatura corporal registrada pelo restante do período experimental. A temperatura ambiente era controlada em $22 \pm 1^\circ C$.

Protocolo experimental 3

Determinação do efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na redução da temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção.

Esse experimento tinha como objetivo verificar se a indução da enzima HO no LC pela microinjeção de heme-lisinato era capaz de alterar a resposta térmica induzida pelo estresse de contenção. Para isso, após terem suas T_{ci} registradas, os animais recebiam uma microinjeção intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume de seu veículo (L-lisina) e eram imediatamente transferidos para os tubos de contenção, onde permaneciam por 30 min e depois eram devolvidos às suas

caixas individuais. A temperatura corporal era continuamente registrada e a temperatura ambiente era controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolo experimental 4

Determinação do efeito do inibidor da GCs, ODQ, na modulação da temperatura corporal induzida pelo heme-lisinato durante o estresse de contenção.

Esse protocolo experimental teve o objetivo de verificar se o GMPc era o segundo mensageiro envolvido na exacerbação da queda da temperatura corporal produzidos pela administração intra-LC de heme-lisinato durante o estresse de contenção.

Os ratos, previamente canulados no LC e no ventrículo lateral, tiveram sua temperatura corporal basal registrada por 1 hora antes de qualquer manipulação. Após a determinação da T_{ci} , os animais recebiam um pré-tratamento central (i.c.v.) com o inibidor da enzima GCs, ODQ (1,3 nmol em 1 μL), ou do mesmo volume de seu veículo DMSO 1%. Era aguardado um período de 30 min até que os animais recebessem a microinjeção intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) ou do mesmo volume de seu veículo (L-lisina). Imediatamente após a injeção intra-LC, os animais eram transferidos para o interior dos tubos de contenção, onde permaneciam por 30 minutos e depois cuidadosamente devolvidos às suas caixas de origem. A T_c era registrada continuamente pelo por todo o período experimental com o uso de dataloggers. A temperatura ambiente era controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.8. Análise Estatística dos Dados

A análise estatística foi realizada utilizando as T_c registradas no período de 120 a 290 min nos experimentos de eutermia e febre induzida por LPS. Os valores

encontrados foram comparados através de tratamento *vs* tempo utilizando two-way ANOVA para medidas repetidas, seguido de Teste de Tukey. Para os experimentos envolvendo estresse de contenção, foram analisadas as medidas de T_c registradas durante o período de 30 minutos de contenção. Os valores foram comparados através de tratamento *vs* tempo utilizando two-way ANOVA para medidas repetidas, seguido por Student Newman Keuls Method.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. *Microinjeção intra-LC*

A figura 4 mostra uma fotomicrografia representativa de uma microinjeção intra-LC. A área microinjetada está marcada com Azul de Evans e corresponde a um conjunto compacto de neurônios adjacentes ao assoalho do quarto ventrículo na região pontina do tronco encefálico, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1998). As microinjeções que atingiram regiões próximas ao LC foram consideradas peri-LC. Os dados coletados de animais cujas microinjeções atingiram o quarto ventrículo foram descartados.

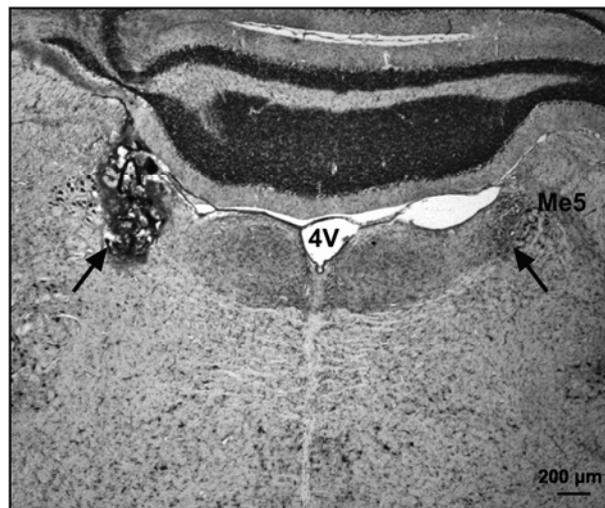


Figura 4. Fotomicrografia representativa de uma microinjeção no LC direito de rato. A figura mostra uma secção coronal no nível da ponte ilustrando a localização do LC intacto (seta da direita) e uma típica microinjeção intra-LC (seta da esquerda). As microinjeções localizadas fora da área indicada foram consideradas peri-LC. 4V: quarto ventrículo, Me5: núcleo mesencefálico trigeminal 5.

6.2. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMP_c NA FEBRE INDUZIDA POR ENDOTOXINA (LPS) EM RATOS.

Em todos os experimentos realizados não houve diferença significativa na temperatura basal corporal média dos animais (T_{ci}) entre os grupos durante o período controle. Os valores de T_{ci} medidos estão apresentados nas figuras.

A injeção intraperitoneal de salina não alterou a T_c de modo significativo, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6. As injeções de LPS (100 μ g/kg, i.p.) por sua vez, induziram uma marcada resposta febril, com a primeira fase iniciando-se em aproximadamente 90 minutos após a injeção de LPS e uma segunda fase iniciando-se aproximadamente 230 minutos após a injeção de LPS. Durante a resposta febril, o máximo aumento da temperatura observado durante o período experimental foi de 1,3 °C.

6.2.1. Experimento 1

Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na temperatura corporal de ratos eutérmicos.

Na Figura 5, podemos observar que a administração intra-LC de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL) não alterou a temperatura corporal dos animais, que permaneceu semelhante aos seus valores médios iniciais; assim, como a administração intra-LC de seu veículo, Na_2CO_3 (50 mM). Além disso, as medidas de temperatura dos animais eutérmicos que receberam ZnDPBG intra-LC não foram diferentes daquelas medidas no grupo controle tratado intra-LC com veículo, bem como em relação ao grupo controle tratado com ZnDPBG peri-LC. Esses resultados indicam que a via da HO no LC não tem participação tônica na regulação da temperatura corporal de ratos em condições basais, em temperaturas subtermoneutras.

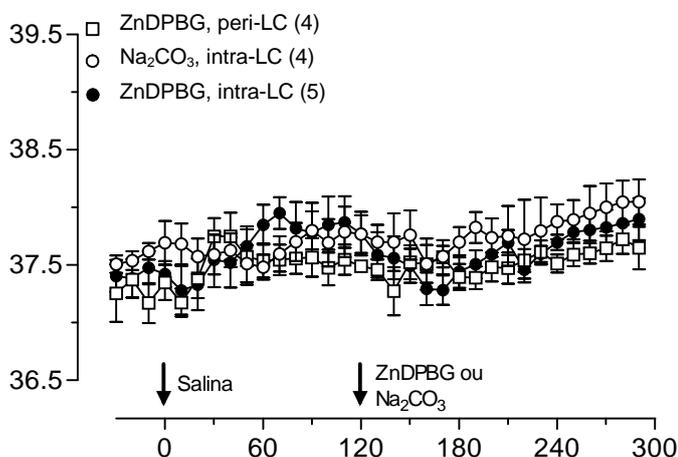


Figura 5. Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante a eutermia. Decurso temporal do efeito do tratamento com salina (i.p.) seguido pela administração intra-LC do inibidor da heme oxigenase ZnDPBG (5 nmol em 100nL) ou do seu veículo (Na_2CO_3 , 50 mM) em ratos. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.2.2. Experimento 2

Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na temperatura corporal de ratos eutérmicos.

Na Figura 6, podemos observar que a administração intra-LC do veículo do heme-lisinato, L-lisina, não alterou a temperatura corporal dos ratos em relação às temperaturas corporais médias iniciais registradas no período controle. Além disso, podemos notar que a indução da via da HO no LC pela administração de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) não causou alteração significativa da temperatura corporal dos animais, quando comparado ao grupo tratado intra-LC com veículo ou com o grupo controle tratado com heme-lisinato peri-LC.

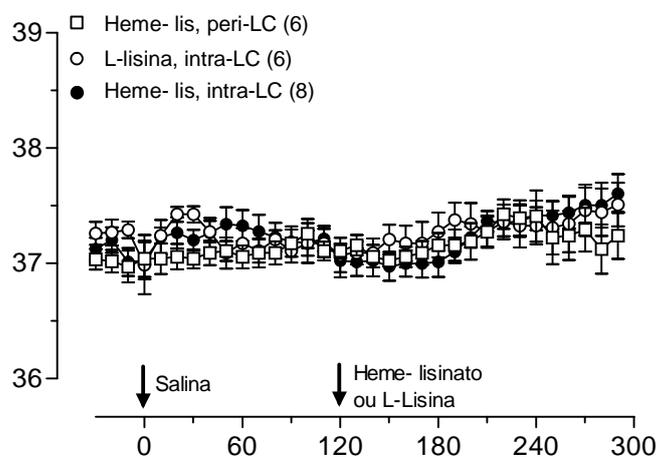


Figura 6. Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante a eutermia. Decurso temporal do efeito do tratamento com salina (i.p.) seguido pela administração intra-LC do indutor da heme oxigenase heme-lisinato (7,6 nmol em 100nL) ou do seu veículo (L-lisina) em ratos. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.2.3. Experimento 3

Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na febre induzida por LPS.

Ao observarmos a Figura 7, podemos notar que a inibição da enzima HO no LC, pela administração de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL) provocou uma importante exacerbação da resposta febril induzida pela injeção de LPS (100 µg/kg, i.p.). Além disso, o perfil da resposta febril não foi alterado. No entanto, a temperatura corporal durante a febre nos animais que receberam ZnDPBG intra- LC está aproximadamente 1°C mais elevada que nos controles que receberam veículo intra-LC ou ZnDPBG peri-LC ($F_{2,17} = 8,081, p = 0,004$).

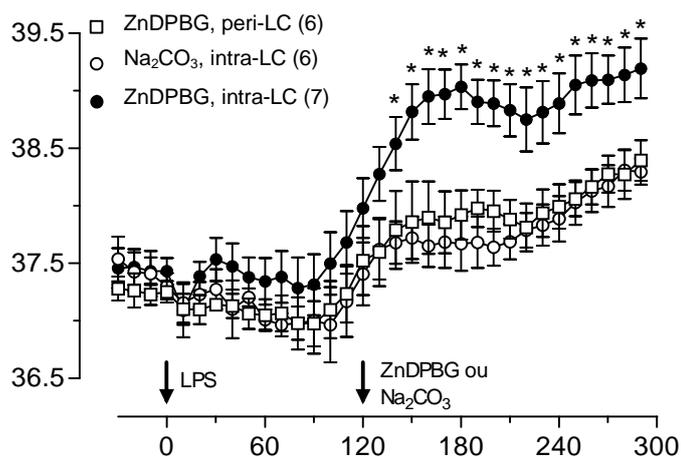


Figura 7. Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante a febre induzida por LPS. Decurso temporal do efeito do tratamento com LPS (100µg/ kg, i.p.) seguido pela administração intra-LC do inibidor da heme oxigenase ZnDPBG (5 nmol em 100nL) ou do seu veículo (Na₂CO₃, 50 mM) em ratos. * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.2.4. Experimento 4

Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na febre induzida por LPS.

A Figura 8 mostra os dados de que a administração intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) atenuou de modo importante a resposta febril induzida por LPS quando comparado com os grupos controles tratados intra-LC com veículo (L-lisina) ou peri-LC com heme-lisinato ($F_{2,17} = 6,904, p = 0,007$).

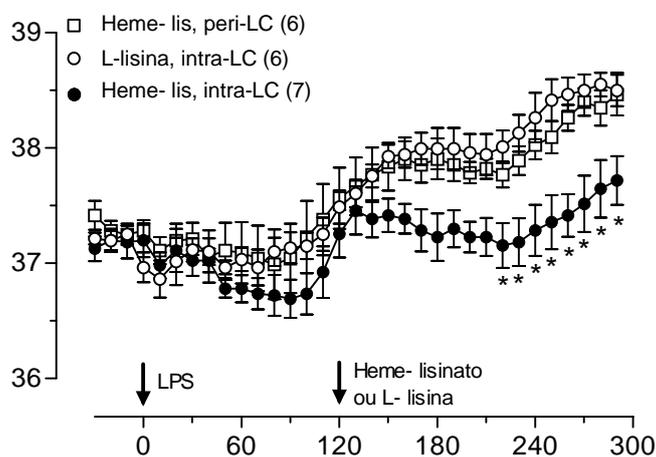


Figura 8. Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante a febre induzida por LPS. Decurso temporal do efeito do tratamento com LPS (100µg/ kg, i.p.) seguido pela administração intra-LC do indutor da heme oxigenase heme-lisinato (7,6 nmol em 100nL) ou do seu veículo (L-lisina) em ratos. * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.2.5. Experimento 5

Efeito do inibidor da GCs, ODQ, na atenuação da febre induzida por heme-lisinato.

O tratamento i.c.v. com o veículo do ODQ (DMSO 1%), combinado à administração intra-LC de veículo do heme-lisinato (L-lisina) não alterou a febre induzida por LPS, ou seja, a resposta febril com um aumento máximo de 1,3 °C na temperatura corporal. Similarmente, a administração i.c.v. do ODQ (1,3 nmol em 1 µL) não alterou o aumento de temperatura induzido pela administração de LPS, i.p. (Figura 9, painel superior). Como era esperado, os animais tratados com DMSO 1% (i.c.v.) combinado à administração intra-LC de heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) tiveram a resposta febril ao LPS atenuada. No entanto, o pré-tratamento com o inibidor da GCs, ODQ, preveniu a atenuação da resposta febril ao LPS induzida pelo heme-lisinato ($F_{1,17} = 9,455, p = 0,008$, Figura 9, painel inferior).

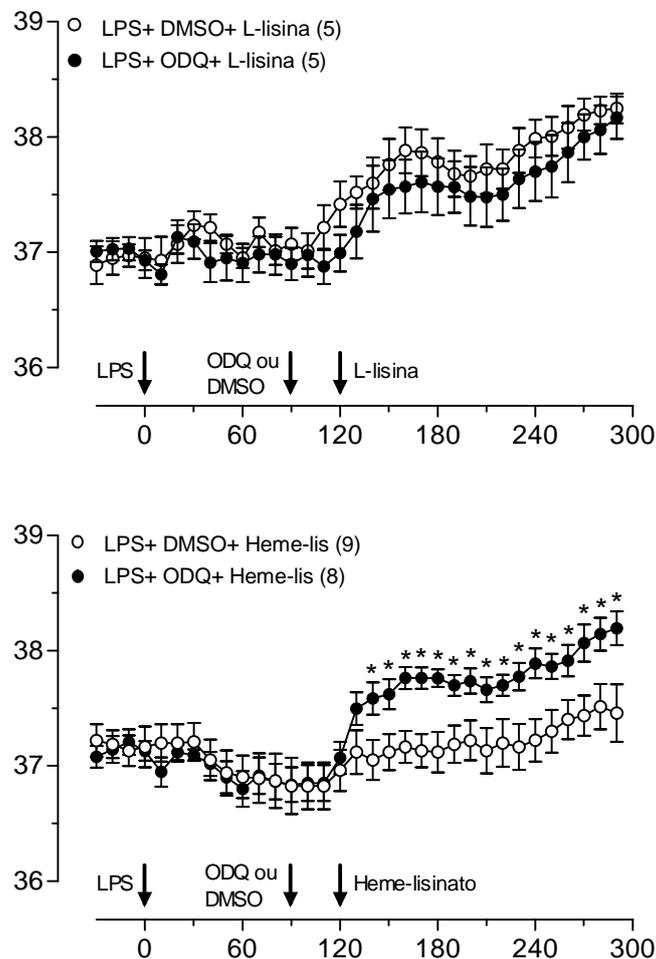


Figura 9. Efeitos do pré-tratamento com ODQ na atenuação da febre. *Painel superior:* efeitos da administração do ODQ (1,3 nmol em 1 μ L, i.c.v.), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, ou do seu veículo (DMSO 1%) combinado com a administração intra-LC do veículo do heme-lisinato (L-lisina) na temperatura corporal de ratos, previamente tratados com LPS (100 μ g/ kg, i.p.). *Painel inferior:* efeito do pré-tratamento com ODQ ou seu veículo na atenuação da febre induzida por heme-lisinato. * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.3. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMPc DURANTE A REDUÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO EM RATOS.

Em todos os experimentos realizados a temperatura corporal basal (T_{ci}) medida no período controle não foi diferente entre os grupos experimentais.

6.3.1. Experimento 1

Efeito do estresse de contenção agudo na temperatura corporal de ratos.

A Figura 10 mostra as alterações na temperatura corporal de ratos submetidos ao estresse de contenção por 30 minutos e ratos controles, com movimentação livre. Como pode ser observado na figura, durante o período de contenção, os ratos apresentaram uma rápida e consistente queda na temperatura corporal ($F_{1,6} = 6,750, p = 0,023$), que alcançou uma redução máxima de aproximadamente $0,7^{\circ}\text{C}$ após 15 minutos de contenção. Após essa queda máxima, a T_c começou a aumentar antes que os animais fossem retirados dos tubos de contenção, alcançando níveis próximos aos valores basais no período de pós-contenção subsequente.

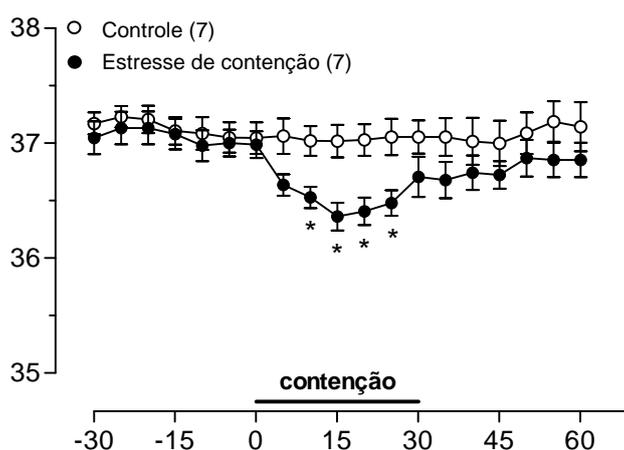


Figura 10. Temperatura corporal de animais controles ou submetidos ao estresse de contenção agudo. A figura mostra o decurso temporal das alterações na temperatura corporal de animais controles, com movimentação livre, e animais expostos à uma única sessão de estresse de contenção por 30 minutos. * $p < 0,05$ vs controles. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.3.2. Experimento 2

Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG na redução da temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a administração intra-LC de ZnDPBG (5 nmol em 100 nL), e a conseqüente inibição da enzima HO, atenuou de modo significativo a redução da temperatura induzida pelo estresse de contenção em relação aos animais controles que receberam veículo intra-LC (Na_2CO_3 , 50 mM) ou em relação ao grupo que recebeu ZnDPBG peri-LC ($F_{2,6} = 4,718$, $p = 0,025$).

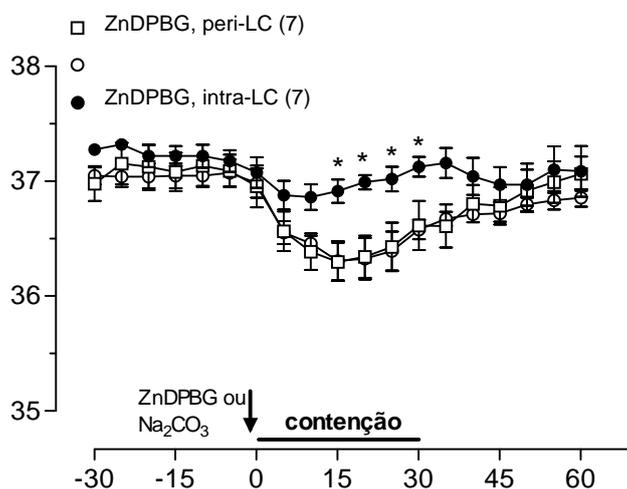


Figura 11. Efeito da microinjeção intra-LC de ZnDPBG ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante o estresse de contenção. Decurso temporal do efeito do tratamento intra-LC do inibidor da heme oxigenase ZnDPBG (5 nmol em 100nL) ou do seu veículo (Na_2CO_3 , 50 mM) em ratos controles ou submetidos ao estresse de contenção por 30 minutos. * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.3.3. Experimento 3

Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato na redução da temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção.

A Figura 12 apresenta as medidas de temperatura corporal de animais estressados que receberam tratamento com heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) intra-LC e de controles que receberam heme-lisinato peri-LC ou seu veículo (L-lisina) intra-LC. Como pode ser observado, a indução da via da HO pela administração intra-LC de heme-lisinato provocou uma redução adicional, acentuando a queda de temperatura corporal induzida pelo estresse de contenção ($F_{2,6} = 5,401$, $p = 0,012$) em relação aos animais controles. Após o tratamento com heme-lisinato a temperatura corporal teve uma redução de até 1,3°C durante a contenção, comparado a uma redução máxima de aproximadamente 0,7°C nos grupos controles.

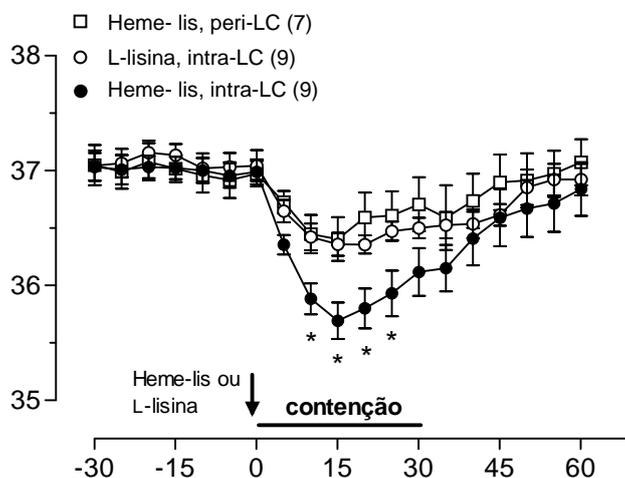


Figura 12. Efeito da microinjeção intra-LC de heme-lisinato ou do seu veículo na temperatura corporal de ratos durante o estresse de contenção. Decurso temporal do efeito do tratamento intra-LC do indutor da heme oxigenase heme-lisinato (5 nmol em 100nL) ou do seu veículo (L-lisina) em ratos controles ou submetidos ao estresse de contenção por 30 minutos. * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

6.3.4. Experimento 4

Efeito do inibidor da GCs, ODQ, na modulação da temperatura corporal induzida pelo heme-lisinato durante o estresse de contenção.

A Figura 13 mostra as medidas de temperatura de animais tratados i.c.v. com o inibidor da GCs, ODQ (1,3 nmol em 1 μ L), ou com seu veículo DMSO 1% combinados ao tratamento intra-LC com heme-lisinato (7,6 nmol em 100 nL) ou seu veículo L-lisina. Como pode ser observado, no painel superior da figura, o tratamento com DMSO 1% combinado com a administração intra-LC de L-lisina, não afetou a redução na temperatura corporal induzida pela contenção. Da mesma forma, a administração i.c.v. de ODQ, combinado ao veículo do heme-lisinato intra-LC não causou qualquer alteração na resposta hipotérmica induzida pela contenção aguda dos animais (Figura 13, painel inferior). No entanto, o pré-tratamento com ODQ preveniu a exacerbação da resposta hipotérmica ao estresse de contenção promovido pelo tratamento com heme-lisinato no LC (Figura 13, painel inferior), fazendo com que o nível de queda na T_c permanecesse semelhante aos controles tratados apenas com veículos.

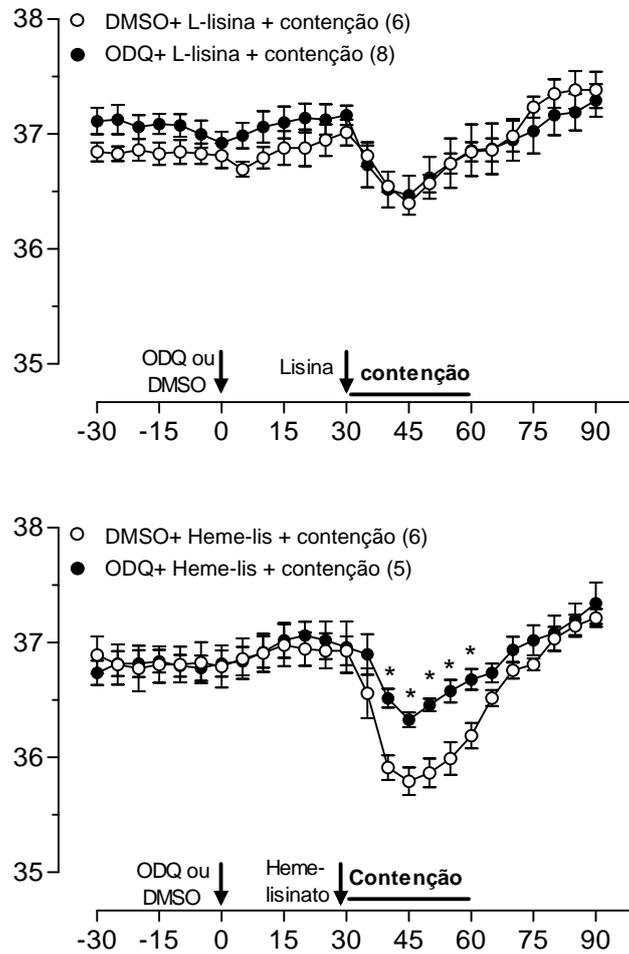


Figura 13. Efeitos do pré-tratamento com ODQ na exacerbação da resposta hipotérmica ao estresse de contenção. *Painel superior:* Efeitos da administração do ODQ (1,3 nmol em 1 μ L, i.c.v.) ou do seu veículo (DMSO 1%) combinado com a administração do veículo do heme-lisinato (L-lisina) na temperatura corporal de ratos acordados, expostos ao estresse por 30 minutos. *Painel inferior:* Efeitos da administração do ODQ ou do seu veículo combinado com a administração intra-LC de heme-lisinato (5 nmol em 100 nL). * $p < 0,05$ vs controles. As setas indicam o momento das injeções. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais por grupo.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, a discussão dos resultados obtidos neste estudo será dividida em duas partes, de acordo com o desafio termorregulatório utilizado.

7.1. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMPc DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR ENDOTOXINA (LPS) EM RATOS.

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam que a via HO-CO-GMPc, no LC, tem uma importante ação antipirética durante a febre induzida por LPS, uma vez que os resultados mostram que a administração intra-LC do doador de substrato heme, e indutor da via HO, heme-lisinato atenuou a febre induzida por LPS. Ao contrário, a microinjeção de ZnDPBG, um inibidor competitivo da enzima HO, promoveu uma exacerbação da resposta febril à dose moderada de LPS. Além disso, os dados indicam que o produto da HO que atua no LC é o CO, uma vez que este é o único produto da via que atua modulando a atividade da GCs, utilizando como segundo mensageiro o GMPc. Essa sugestão é baseada no fato de que a administração intracerebroventricular de ODQ, um inibidor da GCs, aboliu o efeito produzido pelo heme-lisinato na febre induzida por LPS. Adicionalmente, nossos dados indicam que a via HO-CO no LC não desenvolve qualquer efeito tônico no controle homeostático temperatura corporal, uma vez que a administração do inibidor da HO, ZnDPBG, não alterou a temperatura corporal basal de ratos (eutermia).

O óxido nítrico, outro neuromodulador gasoso, participa de uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a regulação da temperatura corporal e da febre, tem sido profundamente estudado nas últimas décadas (Kamerman *et al*, 2002; Roth *et al*, 1998; Schmid *et al*, 1998; Steiner & Branco, 2003). Tanto o NO (refs 5, 12, 16, 25

paper lps) quanto o CO (*cf.* Maines, 1997) atuam na maioria das vezes via ativação da GCs, uma hemoproteína citoplasmática, promovendo um aumento nos níveis intracelulares do segundo mensageiro GMPc. Apesar de CO e NO utilizarem o mesmo segundo mensageiro, estudos prévios demonstraram que as ações termorregulatórias desses neuromoduladores gasosos, no SNC, são opostas. Baseado em experimentos de injeção i.c.v. de moduladores farmacológicos da produção de NO e CO, é amplamente aceito que o NO desenvolve ações antipiréticas (Almeida *et al*, 1999; De Paula *et al*, 2000; Gourine, 1995; Raghavendra *et al*, 1999), enquanto sugere-se que o CO atua de forma oposta, ou seja aumentando a temperatura corporal durante a febre (Steiner *et al*, 1999; Steiner & Branco, 2001). Dados na literatura demonstram que a a ativação da enzima GCs pelo CO aumenta a produção de GMPc em uma ou duas vezes (Burstyn *et al*, 1995; Kharitonov *et al*, 1995), um aumento relativamente pequeno, em relação ao aumento cerca de cem vezes maior promovida pela interação do NO com a GCs (Schmidt, 1992), o que poderia explicar as diferenças encontradas entre os efeitos finais de cada um desses neuromoduladores gasosos no SNC durante a febre.

Quanto a possíveis candidatos a sítios específicos de ação do CO no SNC na termorregulação e febre, nosso grupo demonstrou que o CO produzido pela HO não exerce seu efeito pirético na POA (Steiner *et al*, 2002), e até então, este foi o único estudo descrito na literatura que se propôs a investigar possíveis locais de ação do CO durante a febre. Por outro lado, a POA parece ser um dos sítios chave no qual o NO desenvolve seus efeitos antipiréticos no SNC. Assim, os sítios de ação do NO e do CO parecem não coincidir. De acordo com essa idéia, foi sugerido que o CO poderia atuar de maneira soberana alterando os níveis de GMPc em regiões do SNC onde o NOS não seja expressa, ou exista em pequena quantidade (Maines, 1997). Foi proposto que o LC é um desses núcleos onde a NOS é pouco expressa (Xu *et al*, 1994), enquanto a

isoforma constitutiva da HO, HO-2, é abundante (Pineda *et al*, 1996). Assim, o CO seria a principal molécula capaz de interagir com GCs no LC (Maines, 1997). No entanto, essas idéias são ainda controversas, uma vez que existem relatos na literatura demonstrando ações do NO no LC via ativação da GCs (Sullivan *et al*, 2000).

Existem fortes evidências na literatura que indicam que os neurônios catecolaminérgicos do LC têm participação na gênese da febre induzida por LPS. Um recente estudo do nosso grupo (Almeida *et al*, 2004) demonstrou que a lesão bilateral do LC, eletrolítica ou química específica (6-OHDA) para neurônios catecolaminérgicos, atenuam a febre induzida pela administração intravenosa de LPS ou PGE₂, em temperatura subtermoneutra (i.e. 23°C), condição em que o aumento da Tc durante a febre ocorre por aumento na termogênese. Além disso, foi demonstrado que a lesão bilateral do LC não alterou a quantidade de PGE₂ na POA indicando que os neurônios catecolaminérgicos do LC fazem parte de uma via termoeffetora ativada por pirogênicos para aumentar a termogênese e produzir febre.

Com base nessas evidências, o presente estudo propôs-se avaliar a possível participação da via HO-CO-GMPc no LC na febre induzida por LPS. Os dados obtidos neste estudo, embora surpreendentes, são consistentes com a idéia de que, no LC, a via HO-CO-GMPc apresenta uma ação antipirética; contrariando o efeito pirético resultante das ações do CO no SNC (Steiner *et al*, 1999). De fato podemos considerar que, numa abordagem i.c.v., o efeito final observado pode resultar de uma combinação de efeitos dos agentes farmacológicos em mais de um núcleo no SNC. Considerando todos os dados existentes e a ampla expressão das isoformas de HO por todo o SNC (Ewing & Maines, 1997; Maines, 1997; Scapagnini *et al*, 2002), podemos sugerir que o CO possivelmente atua em mais de um local no SNC, talvez em muitos deles, podendo

apresentar efeitos opostos na modulação da febre induzida por LPS. Nesse cenário, o LC parece ser um desses sítios, no qual o CO apresenta uma ação anti-pirética.

Existe o consenso de que o aumento da T_c durante a febre é resultante de um balanço entre mediadores pró- e anti-inflamatórios. Assim, os mediadores endógenos da resposta febril não incluem apenas aqueles responsáveis pelo aumento da T_c (piréticos), mas também aqueles importantes para contrabalançar os efeitos pirogênicos (anti-piréticos). Atualmente, o conceito de que a febre é um fenômeno benéfico é amplamente aceito, uma vez que esta é fortemente conservada filogeneticamente, persistindo evolutivamente como parte das respostas de defesa imune primária contra agentes patológicos ou nocivos (Zeisberger, 1999). No entanto, é crítico ao hospedeiro que a T_c não se aproxime muito dos limites letais, uma vez que grandes elevações na T_c podem ser deletérias, causando injúria tecidual e até a morte (Kluger, 1991). Para que isso não ocorra, mediadores pró- e anti-piréticos participam concomitantemente da resposta febril. Assim, é razoável sugerir que no LC, a indução da via da HO e o aumento de CO resultante podem atuar como moduladores da atividade neuronal durante a febre por LPS, contrapondo-se ao aumento da T_c , e dessa forma prevenindo aumentos excessivos da temperatura, o que protegeria o tecido nervoso de lesões e conseqüências associadas.

7.2. PARTICIPAÇÃO DA VIA HO-CO-GMPc DURANTE A REDUÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO EM RATOS.

Os resultados provenientes desse estudo indicam que a via HO-CO-GMPc está envolvida na resposta hipotérmica induzida pelo estresse de contenção em ratos. Essa idéia está baseada em resultados que demonstram que a microinjeção do inibidor da HO, ZnDPBG, promoveu uma atenuação na redução da Tc durante a contenção, enquanto a indução da via pela administração intra-LC de heme-lisinato intensificou essa redução. Foi verificado ainda, que a inibição da enzima GCs com o uso de ODQ preveniu a queda adicional da Tc induzida pelo heme-lisinato, sugerindo que o produto da HO envolvido na redução da temperatura corporal é o CO, o único da via cuja sinalização intracelular se dá pela ativação da via GCs.

De fato, a maioria dos grupos que estudam termorregulação durante o estresse relata o desenvolvimento de hipertermia ou febre durante o estresse de contenção (Long *et al*, 1991; Oka *et al*, 2001; Sanches *et al*, 2002; Steiner *et al*, 2003; Stewart & Eikelboom, 1979). Por outro lado, há décadas alguns grupos têm relatado que o estresse de contenção também pode causar redução da temperatura corporal, normalmente referida como hipotermia, em ratos (Bartlett & Quimby, 1958; Herbert & Howes, 1993; Shimada & Sttit, 1983) e camundongos (Johnson *et al*, 2000). Porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos neuroniais, endócrinos e comportamentais que levam ao desenvolvimento da hipotermia induzida pelo estresse de contenção.

Alguns anos atrás nosso grupo demonstrou através de injeções i.c.v. de moduladores farmacológicos da enzima HO, que o CO endogenamente produzido no SNC apresenta efeito pirético promovendo a exacerbação da febre induzida pelo estresse de contenção (Steiner *et al*, 2003). Ao contrário das nossas expectativas durante

este estudo, utilizando o mesmo aparato usado nos experimentos anteriores, os animais responderam à contenção com uma rápida e marcada redução da temperatura corporal, não apresentando febre durante o período em que estiveram contidos. Esse achado surpreendente foi reproduzido de modo consistente ao longo de todos os experimentos realizados. Porém, em relação às novas condições experimentais utilizadas, é importante ressaltar alguns aspectos, como por exemplo, o peso corporal dos animais e a temperatura ambiente. No dia dos experimentos, os animais utilizados nesse estudo, e que responderam com redução da Tc tinham peso corporal aproximadamente 90g maior que aqueles usados em estudos prévios que desenvolveram febre. No entanto, nos dois casos a contenção permitia que os animais movessem-se da posição pronada à supina e vice-versa, mas não permitia que os animais movessem-se no sentido rostro-caudal. Além disso, a temperatura ambiente controlada na sala de experimentação foi reduzida de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizada nos experimentos prévios, para $22 \pm 1^\circ\text{C}$ neste estudo.

O aspecto específico do procedimento de contenção aplicado neste estudo capaz de promover redução na temperatura corporal dos ratos permanece desconhecido. Neste caso específico, a redução da Tc parece não estar relacionada ao aumento do peso corporal dos animais utilizados e à provável redução da movimentação permitida dentro dos tubos de contenção, embora essa hipótese já tenha sido relatada para camundongos (Johnson *et al*, 2000). Para testar a hipótese de influência do peso corporal dos animais foram realizados experimentos utilizando animais com peso semelhante àqueles utilizados anteriormente pelo grupo, e mais uma vez, a redução da Tc foi confirmada (dados não apresentados). Outro aspecto relevante, que enfraquece a hipótese de redução na movimentação dos animais, é o fato de que em nossos experimentos a Tc começa a elevar-se antes que o animal seja retirado do tubo de contenção. Testes feitos com a elevação da temperatura ambiente para $25 \pm 1^\circ\text{C}$ praticamente não alteraram a

redução da temperatura induzida pelo estresse de contenção, o que diminui a possibilidade da influência da temperatura ambiente (dados não apresentados). Esses dados corroboram com os relatos de Herbert & Howes (1993), que observaram a ocorrência de hipotermia induzida por contenção em ratos a uma temperatura ambiente de 25°C. Tendo em vista esses e outros dados disponíveis na literatura, podemos considerar a existência de um controle extremamente fino, e que aparentemente, responde de maneira específica a diferenças sutis na natureza e intensidade do estímulo ao que o animal é submetido. Contudo, não podemos descartar ainda, a possibilidade de influências do temperamento do animal no que se refere às respostas termorregulatórias induzidas por estressores *psicológicos*.

A redução moderada da temperatura corporal (*i.e.* hipotermia regulada/anapirexia) é considerada benéfica ao organismo em diferentes situações de estresse como por exemplo, na hipóxia, hipoglicemia, sepse e choque hemorrágico contribuindo com a redução dos danos causados pelo estresse oxidativo (Arrica & Bissonnette, 2007; Guven *et al*, 2002; Katz *et al*, 2004), bem como reduzindo o gasto energético (Almeida & Branco, 2000; Almeida & Branco, 2002; Almeida *et al*, 2006; Steiner & Branco, 2002a).

Desde a década de 90, nosso grupo tem se dedicado ao estudo da via HO-CO-GMPc no controle da temperatura corporal tanto para o desenvolvimento da febre, como durante a hipotermia. Assim, já foi demonstrado que a via HO está envolvida na regulação das hipotermias induzidas por hipoglicemia pela administração de 2-deoxiglicose (2-DG) (Almeida & Branco, 2000) e insulina (Almeida & Branco, 2002), e também pela hipóxia (Paro *et al*, 2002), e nesses casos o CO parece atuar protegendo o organismo contra quedas severas na Tc.

O LC é o principal núcleo catecolaminérgico do SNC e emite projeções noradrenérgicas diretas ao prosencéfalo (Carrasco & Van de Kar, 2003; Curtis & Valentino, 1994; Sawchenko & Swanson, 1982), incluindo o hipotálamo (Carrasco & Van de Kar, 2003; Habib *et al*, 2001), um centro que integra as respostas neuroendócrinas ao estresse. O LC é ativado por inúmeros estímulos promotores de estresse, que podem levar à liberação de noradrenalina em regiões encefálicas inervadas pelo LC (Gresch *et al*, 1994, Pacak *et al*, 1995; Pacak & Palkovits, 2001; Quirarte *et al*, 1998; Sved *et al*, 2002) paralelamente aos efeitos estimulatórios do LC na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Morrison, 2001; Sved *et al*, 2002; Ziegler *et al*, 1999). A estimulação do LC em situações de estresse já foi demonstrada através de alterações na atividade eletrofisiológica de seus neurônios (Abercrombie & Jacobs, 1987, Jacobs *et al*, 1991; Sved *et al*, 2002) ou pela observação de alterações na expressão de *immediate-early genes*, como por exemplo *c-fos* (Chen & Herbert, 1995; Cullinan *et al*, 1995; Pacak & Palkovits, 2001; Sved *et al*, 2002). Chen & Herbert (1995) relataram que uma única sessão de estresse de contenção induziu hipotermia combinada a um aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona e da expressão de *c-fos* no LC de ratos.

Os resultados apresentados neste estudo, apontam para uma importante participação da via HO-CO-GMPc no LC na redução da T_c durante os 10 a 15 minutos que sucedem o início do período de contenção, porém o mecanismo pelo qual o CO endógeno atua para promover essa rápida e marcante redução da T_c ainda não foi esclarecido. Pineda *et al* (1996) relataram que o CO, resultante da ativação da HO, estimula os neurônios do LC aumentando sua atividade eletrofisiológica. Uma hipótese plausível para explicar nossos resultados leva em consideração a estreita relação entre o LC e a liberação de peptídios conhecidos por reduzir a T_c, que estão envolvidos nas

respostas neuroendócrinas ao estresse, como por exemplo, a ocitocina e a vasopressina, além daqueles relacionados ao eixo HPA (i.e. hormônio liberador de corticotrofina, CRH e hormônio adrenocorticotrófico, ACTH). Muitos estudos têm demonstrado que aumentos na produção endógena de CO (via ativação da HO no hipotálamo) estão associados com a redução na liberação de ocitocina e vasopressina, ao passo que as evidências sobre o efeito do CO no eixo HPA ainda são muito controversas (Navarra et al, 2000). No entanto, um estudo muito bem conduzido utilizando estresse por eletrochoque confirmou que o CO exerce um efeito estimulatório na resposta do eixo HPA ao estresse físico-emocional, e que o hipotálamo (i.e. PVN) é o sítio crítico dessa ação do CO (Kim & Rivier, 2000).

Além disso, existem relatos de que os neurônios noradrenérgicos do LC são anatomicamente e funcionalmente relacionados ao eixo HPA (Carrasco & Van de Kar, 2003; Sved *et al*, 2002) e que a atividade desse núcleo pontino está intimamente relacionada às respostas do eixo HPA ao estresse. Assim, o LC pode modular as respostas do eixo HPA por meio de projeções diretas ao PVN (Cunningham & Sawchenko, 1988; Sved *et al*, 2002), ou alternativamente, o pode estimular neurônios CRH no PVN via projeções para amígdala ou via núcleo leito da estria terminal (BNST), visto que a quantidade de noradrenalina é aumentada nessas áreas por alguns tipos de estresse (Herman & Cullinan, 1997; Prewitt & Herman, 1998; Sved *et al*, 2002).

Ao contrário do que foi observado nos experimentos i.c.v., os dados obtidos neste estudo são evidências de que o CO, endogenamente produzido pela HO no LC, tem um papel chave na redução da Tc induzida pelo estresse de contenção, apresentando uma ação criogênica por meio da ativação da GCs e aumento nos níveis

intracelulares de GMPC. Assim, no LC, o CO parece atuar favorecendo a redução da T_c e conseqüentemente os benefícios que ela pode oferecer em situações de estresse.

Interessantemente, os resultados obtidos com a modulação da via da HO-CO-GMPC no LC durante o estresse de contenção estão em pleno acordo com os dados obtidos nos experimentos de febre induzida por LPS, no qual o CO apresenta efeito antipirético. Ou seja, tanto após o estímulo por LPS quanto durante o estresse de contenção, a ativação desta via pode atuar na termorregulação promovendo a redução da T_c em ratos.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

- 1) A via HO-CO-GMPc no LC está envolvida na resposta termorregulatória a dois tipos distintos de estímulos: o inflamatório e o estresse psico-emocional.
- 2) Nos dois casos, a indução farmacológica da via HO-CO-GMPc no LC promoveu redução da T_c de ratos. Ou seja, após o estímulo inflamatório os aumentos dos níveis endógenos de CO têm efeito antipirético, atenuando a febre induzida por LPS, enquanto durante o estresse de contenção exerce um efeito criogênico intensificando a redução da T_c induzida pelo estresse.
- 3) O presente trabalho ainda apresenta mais uma evidência de que um mesmo mediador, no caso o CO, pode ter diferentes ações no SNC de acordo com o lugar em que atua.

Analisando em conjunto todos os resultados apresentados neste trabalho, pode-se sugerir que a ativação da via HO-CO-GMPc no LC, que ocorre após a administração de LPS, participa da regulação da temperatura corporal durante o desenvolvimento da resposta febril, exercendo ação antipirética, podendo evitar que a T_c alcance níveis deletérios ao organismo, ou até mesmo letais. Durante o estresse, no entanto, a ativação desta via tem efeito criogênico, favorecendo o desenvolvimento de uma redução na T_c e dos benefícios que esta pode oferecer durante o estresse.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE ED, JACOBS BL. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J Neurosci.* 7(9):2844-2848, 1987.

AIHARA H, OKADA Y, TAMAKI N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* 893(1-2):36-45, 2001.

ALMEIDA MC, BRANCO LG. Inhibition of the central heme oxygenase-carbon monoxide pathway increases 2-deoxy-D-glucose-induced hypothermia in rats. *Neurosci Lett.* 290(1):45-48, 2000.

ALMEIDA MC, BRANCO LG. Role of the haem oxygenase-carbon monoxide pathway in insulin-induced hypothermia: evidence for carbon monoxide involvement. *Pflugers Arch.* 444(1-2):244-250. 2002.

ALMEIDA MC, STEINER AA, COIMBRA NC, BRANCO LG. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. *J Physiol.* 558:283-294, 2004.

ALMEIDA MC, STEINER AA, BRANCO LG, ROMANOVSKY AA. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J Neurosci.* 23(12):3359-3367, 2006.

ALMEIDA MC, TREVISAN FN, BARROS RC, CARNIO EC, BRANCO LG. Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway. *Neuroreport.* 10(14):3061-3065, 1999.

ANSELMO-FRANCI JA, FRANCI CR, KRULICH L, ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res.* 767(2):289-296, 1997.

ARRICA M, BISSONNETTE B. Therapeutic hypothermia. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 11(1):6-15, 2007.

ASTON-JONES G, SHIPLEY MT, CHOUVET G, ENNIS M, VAN BOCKSTAELE E, PIERIBONE V, SHIEKHATTAR R, AKAOKA H, DROLET G, ASTIER B, DROLET G, ASTIER B, CHARLÉTY P, VALENTINO RJ, WILLIAMS JT. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res.*88:47-75, 1991.

BANKS WA, KASTIN AJ, BROADWELL RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation.* 2(4):241-8, 1995.

BARTLETT RG Jr, QUIMBY FH. Heat balance in restraint (emotionally) induced hypothermia. *Am J Physiol.* 193(3):557-559, 1958.

BERRIDGE CW, WATERHOUSE BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 42(1):33-84, 2003.

BLATTEIS CM. Body temperature. In: Physiology and pathophysiology of temperature regulation (CM Blatteis, ed). World Scientific, New Jersey, USA, p.14-21, 1998.

BLATTEIS CM, SEHIC E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain? *News Physiol Sci* 12: 1-9, 1997a

BLATTEIS CM, SEHIC E. Prostaglandin E₂: a putative fever mediator. In: Fever Basic mechanisms and management (Mackowiak PA, ed). Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, USA, p.117-145 1997b.

BLATTEIS CM, SEHIC E, LI S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin Infect Dis.* 31:S168-77, 2000.

BOULANT JA. Hypothalamic neurons: Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci* 856:108-15, 1998a.

BOULANT JA. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis.*31:S157-61, 2000.

BOULANT JA. Neural Thermal reception and regulation of body temperature. In: Physiology and pathophysiology of temperature regulation (CM Blatteis, ed). World Scientific, New Jersey, USA, p.94-104, 1998b.

BOULANT JA, HARDY JD. The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J Physiol.* 240(3):639-60, 1974.

BRIESE E. Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rev.* 22(3):427-36, 1998.

BRIESE E, CABANAC M. Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever.

Physiol Behav. 49(6):1153-1157, 1991.

BRIESE E, CABANAC M. Emotional fever and salicylate. In: Contributions to thermal physiology (Szelényi Z; Székely M eds). Oxford: Pergamon Press; p161-163, 1980.

BURSTYN JN, YU AE, DIERKS EA, HAWKINS BK, DAWSON JH. Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II)sGC and Fe(II)sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme. *Biochemistry.* 34(17):5896-5903, 1995.

CABANAC M. Thermiatrics and behavior, In: Physiology and pathophysiology of temperature regulation (CM Blatteis, ed). World Scientific, New Jersey, USA, p.108-124, 1998.

CARRASCO GA, VAN DE KAR LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 463:235-72, 2003.

CHEN X, HERBERT J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience*. 64(3):675-685, 1995.

CULLINAN WE, HERMAN JP, BATTAGLIA DF, AKIL H, WATSON SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 64(2):477-505, 1995.

CUNNINGHAM ET JR, SAWCHENKO PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol*. 274(1):60-76, 1988.

CURTIS AL, VALENTINO RJ. Corticotropin-releasing factor neurotransmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain Res Bull*. 35(5-6):581-587, 1994.

DEJOURS P. Factors of energy expenditure. In: Principles of comparative respiratory physiology. Elsevier North-Holland Biomedical Press. New York, NY, USA. Pp. 1-12, 1981.

DE PAULA D, STEINER AA, BRANCO LG. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol Behav* 70(5):505-11, 2000.

DUNN AJ, WANG J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. *Neuroimmunomodulation*. 2(6):319-328, 1995.

ELMQUIST JK, BREDER CD, SHERIN JE, SCAMMELL TE, HICKEY WF, DEWITT D, SAPER CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*. 381(2):119-29, 1997.

EWING JF, MAINES MD. Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein and mRNA expression in rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1(2):165-174, 1997.

FERREIRA CM, DE PAULA PM, BRANCO LG. Role of L-glutamate in the locus coeruleus of rats in hypoxia-induced hyperventilation and anapyrexia. *Respir Physiol Neurobiol.* 139(2):157-166, 2004

GOURINE AV. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen Pharmacol.* 26(4):835-841, 1995.

GRESCH PJ, SVED AF, ZIGMOND MJ, FINLAY JM. Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem.* 63(2):575-83, 1994.

GRZANNA R, FRITSCHY JM. Efferent projections of different subpopulations of central noradrenaline neurons. *Prog Brain Res.* 88:89-101, 1991.

GUVEN H, AMANVERMEZ R, MALAZGIRT Z, KAYA E, DOGANAY Z, CELIK C, OZKAN K. Moderate hypothermia prevents brain stem oxidative stress injury after hemorrhagic shock. *J Trauma.* 53(1):66-72, 2002.

HABIB KE, GOLD PW, CHROUSOS GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30(3):695-728, 2001.

HERBERT J, HOWES SR. Interactions between corticotropin-releasing factor and endogenous opiates on the cardioaccelerator, hypothermic, and corticoid responses to restraint in the rat. *Peptides.* 14(2):145-152, 1993.

HERMAN JP, CULLINAN WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20(2):78-84, 1997.

HINKLE PM, LEWIS DG, GREER TL. Thyrotropin-releasing hormone-receptor interaction in GH3 pituitary cells. *Endocrinology.* 106:1000-5, 1980.

JACOBS BL, ABERCROMBIE ED, FORMAL CA, LEVINE ES, MORILAK DA, STAFFORD IL. Single-unit and physiological analyses of brain norepinephrine function in behaving animals. *Prog Brain Res.* 88:159-165,1991.

JOHNSON EA, SHARP DS, MILLER DB. Restraint as a stressor in mice: against the dopaminergic neurotoxicity of D-MDMA, low body weight mitigates restraint-induced hypothermia and consequent neuroprotection. *Brain Res.* 875(1-2):107-18, 2000.

JONES BE, YANG TZ. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol.* 242(1):56-92, 1985.

KAMERMAN P, MITCHELL D, LABURN H. Circadian variation in the effects of nitric oxide synthase inhibitors on body temperature, feeding and activity in rats. *Pflugers Arch.* 443(4):609-16, 2002.

KATZ LM, YOUNG AS, FRANK JE, WANG Y, PARK K. Regulated hypothermia reduces brain oxidative stress after hypoxic-ischemia. *Brain Res.* 1017(1-2):85-91, 2004.

KHARITONOV VG, SHARMA VS, PILZ RB, MAGDE D, KOESLING D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(7):2568-2571, 1995.

KIM CK, RIVIER CL. Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats. *Endocrinology.* 141(6):2244-2253, 2000.

KLUGER MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.* 71(1):93-127, 1991.

KLUGER MJ, O'REILLY B, SHOPE TR, VANDER AJ. Further evidence that stress hyperthermia is a fever. *Physiol Behav.* 39(6):763-766, 1987.

LACHUER J, GAILLET S, BARBAGLI B, BUDA M, TAPPAZ M. Differential early time course activation of the brainstem catecholaminergic groups in response to various stresses.

Neuroendocrinology. 53(6):589-596, 1991.

LEMAY LG, VANDER AJ, KLUGER MJ. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav*. 47(5):957-61, 1990.

LINTHORST AC, FLACHSKAMM C, HOLSBOER F, REUL JM. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity. *Eur J Neurosci*. 7(12):2418-2430, 1995.

LONG NC, MORIMOTO A, NAKAMORI T, YAMASHIRO O, MURAKAMI N. Intraperitoneal injections of prostaglandin E2 attenuate hyperthermia induced by restraint or interleukin-1 in rats. *J Physiol*. 444:363-373, 1991.

MAINES MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:517-54, 1997.

MAINES MD, TRAKSHEL GM, KUTTY RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*. 261(1):411-419, 1986.

MALIK KU, SEHIC E. Prostaglandins and the release of the adrenergic transmitter. *Ann N Y Acad Sci*. 604:222-236, 1990.

MANCUSO C. Heme oxygenase and its products in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 6(5):878-87, 2004.

MCCOUBREY WK JR, HUANG TJ, MAINES MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*. 247(2):725-732, 1997.

MILTON AS. Thermal physiology: briefly history and perspectives. In: Physiology and pathophysiology of temperature regulation (CM Blatteis, ed). World Scientific, New Jersey, USA, p.3-11, 1998.

MILTON AS. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann N Y Acad Sci.* 559:392-410, 1989.

MINAMI M, KURAISHI Y, YAMAGUCHI T, NAKAI S, HIRAI Y, SATOH M. Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 123(2):254-6, 1991.

MORIMOTO A, WATANABE T, MORIMOTO K, NAKAMORI T, MURAKAMI N. Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats. *J Physiol.* 443:421-429, 1991.

MORLEY RM, CONN CA, KLUGER MJ, VANDER AJ. Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 258:R1064-1069, 1990.

MORRIS CM, CANDY JM, EDWARDSON JA, BLOXHAM CA, SMITH A. Evidence for the localization of haemopexin immunoreactivity in neurones in the human brain. *Neurosci Lett.* 149(2):141-144, 1993.

MORRISON SF. Differential control of sympathetic outflow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(3):R683-R698, 2001.

MORRISON SF, SVED AF, PASSERIN AM. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 276:R290-297, 1999.

OKA T, OKA K, HORI T. Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. *Psychosom Med.* 63(3):476-486, 2001.

OKA T, OKA K, KOBAYASHI T, SUGIMOTO Y, ICHIKAWA A, USHIKUBI F, NARUMIYA S, SAPER CB. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol.* 551:945-54, 2003.

OLIVIER B, ZETHOF T, PATTIJ T, VAN BOOGAERT M, VAN OORSCHOT R, LEAHY C, OOSTING R, BOUWKNECHT A, VEENING J, VAN DER GUGTEN J, GROENINK L. Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):117-132, 2003.

OVADIA H, ABRAMSKY O, WEIDENFELD J. Evidence for the involvement of the central adrenergic system in the febrile response induced by interleukin-1 in rats. *J Neuroimmunol.* 25(2-3):109-116, 1989.

PACAK K, PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 22(4):502-548, 2001.

PACAK K, PALKOVITS M, KOPIN IJ, GOLDSTEIN DS. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol.* 16(2):89-150, 1995.

PARO FM, STEINER AA, DE PAULA PM, BRANCO LG. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway in the control of breathing under normoxia and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 130(2):151-160, 2002.

PASCHEN W, UTO A, DJURICIC B, SCHMITT J. Hemeoxygenase expression after reversible ischemia of rat brain. *Neurosci Lett.* 180(1):5-8, 1994.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. Academic Press, San Diego, 1998.

PINEDA J, KOGAN JH, AGHAJANIAN GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosci*. 16(4):1389-99, 1996.

PREWITT CM, HERMAN JP. Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual tract-tracing analysis. *J Chem Neuroanat*. 15(3):173-185, 1998.

QUIRARTE GL, GALVEZ R, ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res*. 808(2):134-140, 1998.

RAGHAVENDRA V, AGREWALA JN, KULKARNI SK. Role of centrally administered melatonin and inhibitors of COX and NOS in LPS-induced hyperthermia and adipisia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 60(4):249-253, 1999.

RAJU VS, MCCOUBREY WK JR, MAINES MD. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta*. 1351(1-2):89-104, 1997.

REGAN RF, GUO Y, KUMAR N. Heme oxygenase-1 induction protects murine cortical astrocytes from hemoglobin toxicity. *Neurosci Lett*. 282(1-2):1-4, 2000.

ROMANOVSKY AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(1):R37-46, 2007.

ROMANOVSKY AA, ALMEIDA MC, ARONOFF DM, IVANOV AI, KONSAMAN JP, STEINER AA, TUREK VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci*. 10:2193-2216, 2005.

ROMANOVSKY AA, IVANOV AI, SZEKELY M. Neural route of pyrogen signaling to the brain. *Clin Infect Dis*. 31:S162-7, 2000.

ROMANOVSKY AA, KULCHITSKY VA, SIMONS CT, SUGIMOTO N, SZEKELY M. Cold defense mechanisms in vagotomized rats. *Am J Physiol.* 273:R784-789, 1997.

ROMANOVSKY AA, SHIDO O, SAKURADA S, SUGIMOTO N, NAGASAKA T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. *Am J Physiol.* 270:R693-703, 1996.

ROTH J, STORR B, VOIGT K, ZEISBERGER E. Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats. *Life Sci.* 62(22):PL 345-50, 1998.

SANCHES DB, STEINER AA, BRANCO LG. Involvement of neuronal nitric oxide synthase in restraint stress-induced fever in rats. *Physiol Behav.* 75(1-2):261-266, 2002.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 257(3):275-325, 1982.

SCAPAGNINI G, D'AGATA V, CALABRESE V, PASCALE A, COLOMBRITA C, ALKON D, CAVALLARO S. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* 954(1):51-59, 2002.

SCAPAGNINI G, FORESTI R, CALABRESE V, GIUFFRIDA STELLA AM, GREEN CJ, MOTTERLINI R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol.* 61(3):554-561, 2002. Erratum in: *Mol Pharmacol* 2002 61(5):1264.

SCHILTZ JC, SAWCHENKO PE. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci.* 8:s1321-s1329, 2003.

SCHMID HA, RIEDEL W, SIMON E. Role of nitric oxide in temperature regulation. *Prog Brain Res.* 115:87-110, 1998.

SCHMIDT HH. NO., CO and .OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett.* 307(1):102-107, 1992.

SEHIC E, UNGAR AL, BLATTEIS CM. Interaction between norepinephrine and prostaglandin E2 in the preoptic area of guinea pigs. *Am J Physiol*. 271:R528-36, 1996.

SHIBAHARA S, MULLER R, TAGUCHI H, YOSHIDA T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(23):7865-7869, 1985.

SHIMADA SG, STITT JT. Inhibition of shivering during restraint hypothermia. *Can J Physiol Pharmacol*. 61(9):977-82, 1983.

SINGER R, HARKER CT, VANDER AJ, KLUGER MJ. Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav*. 36(6):1179-1182, 1986.

SNOW AE, HORITA A. Interaction of apomorphine and stressors in the production of hyperthermia in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*. 220(2):335-339, 1982.

STAMP JA, HERBERT J. Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. *Neuroscience*. 94(4):1313-1322, 1999.

STAMP J, HERBERT J. Corticosterone modulates autonomic responses and adaptation of central immediate-early gene expression to repeated restraint stress. *Neuroscience*. 107(3):465-79, 2001.

STEINER AA, ANTUNES-RODRIGUES J, BRANCO LG. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res*. 944(1-2):135-45, 2002.

STEINER AA, BRANCO LG. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280(2):R448-R457, 2001.

STEINER AA, BRANCO LG. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. *Annu Rev Physiol*., 64:263-88, 2002a.

STEINER AA, BRANCO LG. Role of the preoptic carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. *Brain Res.* 927(1):27-34, 2002b.

STEINER AA, BRANCO LG. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. *Front Biosci.* 8:s1398-s1408, 2003.

STEINER AA, COLOMBARI E, BRANCO LG. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. *Am J Physiol.* 277:R499-R507, 1999.

STEINER AA, LI S, LLANOS-Q J, BLATTEIS CM. Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous- and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation.*9(5):263-75, 2001.

STEINER AA, RESTE G, BRANCO LG. Role of the brain heme oxygenase-carbon monoxide pathway in stress fever in rats. *Neurosci Lett.* 341(3):193-196, 2003.

STEININGER TL, GONG H, MCGINTY D, SZYMUSIAK R. Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J Comp Neurol.* 429(4):638-53, 2001.

STEWART J, EIKELBOOM R. Stress masks the hypothermic effect of naloxone in rats. *Life Sci.* 25(13):1165-1172, 1979.

STOCKER R, YAMAMOTO Y, MCDONAGH AF, GLAZER AN, AMES BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235(4792):1043-1046, 1987.

SULLIVAN ME, HALL SR, MILNE B, JHAMANDAS K. Suppression of acute and chronic opioid withdrawal by a selective soluble guanylyl cyclase inhibitor. *Brain Res.* 859(1):45-56, 2000.

SVED AF, CANO G, PASSERIN AM, RABIN BS. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav.* 77(4-5):737-742, 2002.

SZELENYI Z, SZEKELY M. Comparison of the effector mechanisms during endotoxin fever in the adult rabbit. *Acta Physiol Acad Sci Hung.*54(1):33-41, 1979.

TAKAHASHI Y, SMITH P, FERGUSON A, PITTMAN QJ. Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol.* 273:R1690-1695, 1997.

TENHUNEN R, MARVER HS, SCHMID R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 244(23):6388-6394, 1969.

TENHUNEN R, TOKOLA O, LINDEN IB. Haem arginate: a new stable haem compound. *J Pharm Pharmacol.* 39(10):780-786, 1987.

TERLOUW EM, KENT S, CREMONA S, DANTZER R. Effect of intracerebroventricular administration of vasopressin on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav.* 60(2):417-24, 1996.

TILDERS FJ, DERIJK RH, VAN DAM AM, VINCENT VA, SCHOTANUS K, PERSOONS JH. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology.*19(2):209-32, 1994.

TURNBULL AV, KIM CK, LEE S, RIVIER CL. Influence of carbon monoxide, and its interaction with nitric oxide, on the adrenocorticotropin hormone response of the normal rat to a physico-emotional stress. *J Neuroendocrinol.* 10(10):793-802, 1998.

TURNBULL AV, RIVIER CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 79(1):1-71, 1999.

UNO T, SHIBATA M. Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(2):R536-546, 2001.

VAN BOCKSTAELE EJ, PEOPLES J, TELEGAN P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol.* 412(3):410-28, 1999.

VERMA A, HIRSCH DJ, GLATT CE, RONNETT GV, SNYDER SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science.* 259(5093):381-384, 1993. Erratum in: *Science* 1994 263(5143):15.

WAGNER KR, SHARP FR, ARDIZZONE TD, LU A, CLARK JF. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(6):629-652, 2003.

WASSERSTROM JA, VITES AM. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd^{2+} concentration and temperature. *Am J Physiol* 277(2): H488-H-498, 1999.

WENISCH C, NARZT E, SESSLER DI, PARSCHALK B, LENHARDT R, KURZ A, GRANINGER W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* 82(4):810-6, 1996.

WERNER J. Biophysics of heat exchange between body and environment. . In: *Physiology and pathophysiology of temperature regulation* (CM Blatteis, ed). World Scientific, New Jersey, USA, p.25-45, 1998.

XU ZQ, PIERIBONE VA, ZHANG X, GRILLNER S, HOKFELT T. A functional role for nitric oxide in locus coeruleus: immunohistochemical and electrophysiological studies. *Exp Brain Res.* 98(1):75-83, 1994.

ZEISBERGER E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Thermal Biol.* 24: 287-326, 1999.

ZETHOF TJ, VAN DER HEYDEN JA, TOLBOOM JT, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. *Physiol Behav.* 55(1):109-115, 1994.

ZIEGLER DR, CASS WA, HERMAN JP. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol.* 11(5):361-369, 1999.

Anexo 1

Anexo 2

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)