

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**Viviane Nogueira de Paiva**

**Influência do sistema endocanabinóide  
sobre o *sickness behavior* induzido pela  
endotoxemia em ratos**

Alfenas/MG

2013

**Viviane Nogueira de Paiva**

**Influência do sistema endocanabinóide sobre o  
*sickness behavior* induzido pela endotoxemia em  
ratos**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Alfenas, como requisito para a obtenção do título de Mestre.  
Linha de pesquisa: Neuroimunoendocrinologia.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva.

Alfenas/MG

2013

**Viviane Nogueira de Paiva**

**Influência do sistema endocanabinóide sobre o  
*sickness behavior* induzido pela endotoxemia em  
ratos**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em:

Prof. Dr.: Alexandre Giusti Paiva

Assinatura:

Instituição: UNIFAL-MG

Prof. Dr.: Alexandre Alarcon Steiner

Assinatura:

Instituição: USP-SP

Prof. Dr.: Rodrigo César Rorato

Assinatura:

Instituição: USP-RP

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida: meus pais Haroldo e Leonilda e minha irmã Vanessa. Obrigada pelo carinho, ajuda e compreensão tanto nos momentos difíceis como nos momentos bons.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal, em especial:

À minha família, pela ajuda da concretização desse sonho, pelo incentivo e pela força que sempre me deram, acreditando em tudo que faço e torcendo por mim, e por aceitar e compreender a minha ausência nessa fase tão difícil para todos nós.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pelos inúmeros ensinamentos, apoio, confiança e contribuição para o meu crescimento profissional.

À todos os professores que passaram por minha vida, pela contribuição em minha formação pessoal e acadêmica.

Aos colegas de pós-graduação, pelo incentivo e por terem compartilhado comigo tantas expectativas, angústias e conhecimentos.

Aos velhos amigos, por compreenderem os momentos de ausência e aos novos amigos, os quais não ousou citar pois são inúmeros, conquistados na caminhada científica.

À colega e amiga Vanessa Cardoso Silva, pela incansável ajuda na realização deste trabalho e ensinamentos tanto na vida profissional quanto pessoal.

Aos funcionários Marina, José, Antonieta e João pela ajuda e momentos de descontração.

À todos os que deram suas parcelas de contribuição, direta ou indireta, para a conclusão desta jornada.

Ao Biotério Central da UNIFAL-MG, por ter fornecido os animais que foram essenciais para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

E por fim, mas não menos importante, aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo oferecendo sua vida: o meu eterno respeito e agradecimento.

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”*

*Marcelo Camelo*

## RESUMO

A sepse é um processo inflamatório/infeccioso agudo que induz uma resposta do organismo denominada resposta de fase-aguda, que inclui o desenvolvimento de febre (que pode ser antecedida por hipotermia), ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), alteração da secreção neuro-hipofisária e alterações comportamentais, tais como diminuição do apetite, anedonia, diminuição do comportamento social, menor atividade motora, resumidamente chamadas de *sickness behavior*. O objetivo deste trabalho foi verificar a participação dos endocanabinóides no *sickness behavior* durante a sepse induzida por LPS avaliando temperatura corpórea, interação social, ingestão de alimento e ganho de peso e atividade de grupamentos neuronais hipotalâmicos. Os resultados demonstraram que a administração do antagonista CB<sub>1</sub> AM251 exacerba a hipotermia e diminui a febre induzida pelo LPS. A administração de um antagonista V1 de vasopressina (AVP), reconhecidamente como antipirético endógeno, faz com que não haja mais essa hipotermia exacerbada. Já a administração do AM404, inibidor da recaptção de endocanabinóides, diminui a hipotermia e exacerba a febre, mostrando que AM251 e AM404 possuem efeitos antagônicos. Quando testados quanto a ingestão de alimento e ganho de peso, conclui-se que os endocanabinóides não interferiram na resposta frente a sepse, enquanto que quando testados quanto a interação social, apenas o AM404 mostrou uma menor interação, demonstrando que há influência dos endocanabinóides no *sickness behavior* induzido pelo LPS. Quando se observa a marcação de Fos nas áreas MnPO dorsal, MnPO ventral, PVN e SON; observa-se que a marcação para Fos está aumentada em ratos tratados com LPS nessas áreas cerebrais, assim como esperado, e que o PVN possui menor expressão na sepse quando há tratamento com AM251, ou seja, a área caracterizada pela homeostase energética está alterada devido ao bloqueio dos endocanabinóides sobre o receptor CB<sub>1</sub>. A partir desses resultados pode-se afirmar que há participação dos endocanabinóides no *sickness behavior* na sepse.

Palavras-chave: Endocanabinóides. Sepse. *Sickness behavior*.

## ABSTRACT

Sepsis is an inflammatory / infectious process that induces an acute response of the body called acute-phase response, which includes the development of fever (which may be preceded by hypothermia), activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, change neuro-pituitary secretion and behavioral changes such as decreased appetite, anhedonia, decreased social behavior, lower motor activity, briefly called sickness behavior. The aim of this study was to investigate the involvement of endocannabinoids in sickness behavior during sepsis induced by LPS evaluating body temperature, social interaction, food intake and weight gain and hypothalamic neuronal activity groups. The results showed that the administration of the CB<sub>1</sub> antagonist AM251 exacerbates hypothermia and decrease fever induced by LPS. The administration of an antagonist of vasopressin V1 (AVP), known as antipyretic endogenous, causes hypothermia that was no more exacerbated. Already the administration of AM404, an inhibitor of endocannabinoids uptake, reduces fever and exacerbates hypothermia, showing that AM251 and AM404 have antagonistic effects. When tested food intake and weight gain, it is concluded that endocannabinoids not interfere with the response against sepsis, whereas when tested social interaction, only the AM404 showed less interaction, demonstrating that was influence of endocannabinoids in sickness behavior induced by LPS. When observing the marking of Fos areas MNPO dorsal ventral MNPO, SON and PVN, it is observed that the marking for Fos is increased in rats treated with LPS in these brain areas, as expected, and that has a lower expression in the PVN sepsis when treatment with AM251, ie the area characterized by energy homeostasis is altered due to blockage of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor. From these results it can be suggested that there is involvement of endocannabinoids in sickness behavior in sepsis.

Keywords: Endocannabinoids. Sepsis. Sickness behavior.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta imune inata evocada por lipopolissacarídeo endotóxico (LPS).....	20
Figura 2 - Geração da febre após infecção.....	24
Figura 3 - O sistema endocanabinóide.....	29
Figura 4 - Representação esquemática das estruturas moleculares dos canabinóides.....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito de diferentes doses de LPS administrado via i.p. na temperatura em ratos.....	43
Gráfico 2 -	Efeito de diferentes doses de LPS administrado via i.p. na variação de temperatura em ratos.....	44
Gráfico 3 -	Efeito de diferentes doses de LPS administrado via i.p. no índice térmico de 0 a 2 horas em ratos.....	45
Gráfico 4 -	Efeito das diferentes doses de LPS administrado via i.p. no índice térmico de 3 a 7 horas em ratos.....	46
Gráfico 5 -	Efeito do AM251 administrado i.c.v. na temperatura em ratos.....	47
Gráfico 6 -	Efeito do AM251 administrado i.c.v. na variação de temperatura em ratos.....	47
Gráfico 7 -	Efeito do AM251 administrado i.c.v. no índice térmico de 0 a 2 horas em ratos.....	48
Gráfico 8 -	Efeito do AM251 administrado i.c.v. no índice térmico de 3 a 7 horas em ratos.....	49
Gráfico 9 -	Efeito do antagonista AVP administrado i.c.v. na temperatura em ratos.....	50
Gráfico 10 -	Efeito do antagonista AVP administrado i.c.v. na variação de temperatura em ratos.....	50
Gráfico 11 -	Efeito do antagonista AVP administrado i.c.v. no índice térmico de 0 a 2 horas em ratos.....	51
Gráfico 12 -	Efeito do antagonista AVP administrado i.c.v. no índice térmico de 3 a 7 horas em ratos.....	51
Gráfico 13 -	Efeito do AM404 administrado i.c.v. na temperatura em ratos.....	52
Gráfico 14 -	Efeito do AM404 administrado i.c.v. na variação de temperatura em ratos.....	53
Gráfico 15 -	Efeito do AM404 administrado i.c.v. no índice térmico de 0 a 2 horas em ratos.....	54

Gráfico 16 - Efeito do AM404 administrado i.c.v. no índice térmico de 3 a 7 horas em ratos.....	54
Gráfico 17 - Efeito do tratamento com AM251 na interação social de 2 horas.....	56
Gráfico 18 - Efeito do tratamento com AM404 na interação social de 2 horas.....	57
Gráfico 19 - Efeito do tratamento com AM251 na interação social de 24 horas.....	57
Gráfico 20 - Efeito do tratamento com AM404 na interação social de 24 horas.....	58
Gráfico 21 - Efeito do tratamento com AM251 no ganho de peso.....	59
Gráfico 22 - Efeito do tratamento com AM251 na ingestão.....	60
Gráfico 23 - Efeito do tratamento com AM404 no ganho de peso.....	61
Gráfico 24 - Efeito do tratamento com AM404 na ingestão.....	62
Gráfico 25 - Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no MnPO dorsal e seu respectivo gráfico.....	64
Gráfico 26 - Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no MnPO ventral e seu respectivo gráfico.....	65
Gráfico 27 - Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no PVN e seu respectivo gráfico.....	66
Gráfico 28 - Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no SON e seu respectivo gráfico.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta^1$ -THC	- $\Delta^1$ -tetra-hidrocanabinol
$\Delta^9$ -THC	- $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol
2-AG	- 2-araquidonoilglicerol
ACTH	- Hormônio Adrenocorticotrófico
AM1241	- Agonista CB2
AM251	- Antagonista CB1
AM404	- Inibidor da recaptação de endocanabinóides
AM4113	- Antagonista CB1
AM630	- Antagonista CB2
AM6527	- Antagonista CB1
AM6545	- Antagonista CB1
AMP	- Adenosina 3',5'-monofosfato
AP	- Área postrema
AVP	- Vasopressina
BHE	- Barreira hematoencefálica
BNST	- Bed núcleo da estria terminal
CART	- Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
COX	- Ciclooxigenase
CRF	- Fator liberador de corticotrofina
CVOs	- Órgãos circunventriculares
DAGL	- Diacilglicerol lipase
EM	- Eminência mediana
ET	- Endotelina
FAAH	- Ácido graxo amida hidrolase
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	- G protein-coupled membrane receptor
GPI	- Glicosil-fosfatidilinositol
HHA	- Hipotálamo-hipófise-adrenal
i.c.v.	- Via intracerebroventricular
i.p.	- Via intraperitoneal

IL	- Interleucina
LBP	- Proteínas séricas de ligação a proteína LPS
LPS	- Lipopolissacarídeo
MGL	- Monoacilglicerol lípase
mCD14	- Receptor de membrana CD14
MDP	- Muramil-dipeptídeo
MIP	- Proteína Inflamatória de Macrófagos
NK	- Células natural killer
NPY	- Neuropeptídeo Y
OT	- Ocitocina
OVL	- Órgão vascular da lâmina terminal
PFPF	- Pre-formed pyrogenic factor
PG	- Prostaglandina
PGH2	- Prostaglandina H2
POA	- Área pré-óptica
POMC	- Pró-ópiomelanocortina
PRL	- Prolactina
PVN	- Núcleo paraventricular
sCD14	- Forma solúvel do receptor CD14
SFO	- Órgão subfornical
SNC	- Sistema Nervoso Central
SON	- Núcleo supra-óptico
SR141716	- Antagonista CB1 (rimonabant)
SSR149415	- Antagonista CB1
T4	- Tiroxina
TLR-4	- Receptor toll-like 4
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral $\alpha$
URB 597	- Inibidor da FAAH
WIN55212-2	- Agonista CB1
$\alpha$ -MSH	- Hormônio estimulante de $\alpha$ -melanócitos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Endotoxemia.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Regulação da temperatura corporal.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>Comportamento doentio.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4</b>	<b>Sistema Endocanabinóide.....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Procedimentos experimentais.....</b>	<b>35</b>
3.2.1	<i>Estereotaxia.....</i>	35
3.2.2	<i>Implante do transmissor de temperatura (probe) e determinação da temperatura corporal.....</i>	36
3.2.3	<i>Interação Social.....</i>	37
3.2.4	<i>Ingestão Alimentar e Ganho de Peso.....</i>	37
3.2.5	<i>Imunohistoquímica.....</i>	38
3.2.6	<i>Drogas.....</i>	38
3.2.7	<i>Análises estatísticas.....</i>	39
<b>3.3</b>	<b>Protocolos experimentais.....</b>	<b>39</b>
3.3.1	<i>Determinação da dose de LPS.....</i>	39
3.3.2	<i>Efeito dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos.....</i>	40
3.3.2.1	<i>Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na temperatura corpórea em ratos.....</i>	40
3.3.2.2	<i>Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptção de endocanabinóides (AM404) na temperatura corpórea em ratos.....</i>	40
3.3.2.3	<i>Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) seguida da administração de antagonista vasopressinérgico na temperatura corpórea em ratos.....</i>	40
3.3.3	<i>Efeito dos endocanabinóides na interação social.....</i>	41

3.3.3.1	Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na interação social.....	41
3.3.3.2	Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptção de endocanabinóides (AM404) na interação social.....	41
3.3.4	<i>Efeito dos endocanabinóides na ingestão alimentar e ganho de peso..</i>	41
3.3.4.1	Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na ingestão alimentar e ganho de peso.....	42
3.3.4.2	Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptção de endocanabinóides (AM404) na ingestão alimentar e ganho de peso.....	42
3.3.5	<i>Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal.....</i>	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Determinação da dose de LPS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Efeito dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos..</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Efeito dos endocanabinóides na interação social.....</b>	<b>55</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito dos endocanabinóides no ganho de peso e ingestão alimentar .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal.....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Indução de hipotermia e febre pelo LPS.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2</b>	<b>Envolvimento dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos.....</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b>Envolvimento dos endocanabinóides na interação social.....</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>Envolvimento dos endocanabinóides no ganho de peso e ingestão alimentar.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5</b>	<b>Envolvimento da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Endotoxemia

A interação entre os sistemas imune e endócrino é bidirecional e crucial para a manutenção da homeostase, sendo a interface neuro-imuno-endócrina mediada pelas citocinas que atuam como fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos, e regulam a proliferação celular, a secreção de hormônios, a atividade do eixo HHA e o comportamento (HADDAD; SAADE; SAFIEH-GARABEDIANC, 2002). A ação das citocinas também pode ser observada no estabelecimento, manutenção e controle de diversas funções fisiológicas como sono, ovulação e exercícios. Essa interação foi inicialmente proposta por Selye (1936) que observou o aumento da glândula adrenal e a involução do timo, órgão relacionado com a maturação de células do sistema imune, em resposta à diversos estímulos estressores.

O sistema endócrino tem uma importante função na manutenção da homeostase em diversas situações de estresse, incluindo a endotoxemia (BERTOK, 1998). A resposta do organismo é diferente para os diversos agentes estressores (pirógenos), implicando em uma variedade na magnitude de ativação de cada sistema (PACAK; PALKOVITS, 2001).

Os pirógenos podem ser divididos em exógenos e endógenos. Em geral, a maioria dos pirógenos exógenos é proveniente de produtos gerados por microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (ZEISBERGER, 1999). Entre os pirógenos exógenos mais estudados podemos citar o LPS (lipopolissacarídeo de membrana de bactérias Gram negativas) e o MDP (Muramildipeptídeo, componente da parede celular de bactérias Gram positivas).

Os pirógenos endógenos compreendem as proteínas termossensíveis e os mediadores lipídicos. Sua produção é geralmente estimulada pelos pirógenos exógenos e também por lesões, traumas e estresse. Entre os principais pirógenos endógenos estão as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fator liberador de corticotropina (CRF) e endotelina (ROTH; SOUZA, 2001).

Essencialmente, qualquer microorganismo pode causar sepse ou choque séptico, porém as bactérias são os agentes etiológicos mais comuns. A maioria dos

casos de sepse são devido a bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras) (THIEMERMANN, 1999).

Em 1991 uma conferência de consenso realizada pelo *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* em 1992 definiram a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) como ativação do sistema imune por um agente infeccioso com a liberação de citocinas e uma série de substâncias vasoativas. Sua resposta é caracterizada por alterações de temperatura ( $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $<36^{\circ}\text{C}$ ), frequência cardíaca elevada ( $> 90$  batimentos / minuto), taquipnéia ( $> 20$  respirações / min) e leucocitose ( $> 12000 / \text{m}^3$ ). A sepse é a SIRS com a presença de uma doença infecciosa com fonte identificável. O choque séptico é uma sepse grave com presença de hipotensão (variação do valor basal da pressão sistólica arterial entre  $<90$  mmHg ou  $> 44$  mmHg).

Experimentalmente, o LPS pode ser utilizado para mimetizar uma situação clínica de choque séptico. Os componentes da parede bacteriana são potentes ativadores do sistema imune do hospedeiro (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA et al., 2004).

O LPS desencadeia uma cascata de eventos que simulam a resposta inflamatória, estimulando principalmente células do sistema imune a liberar o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), que estimulam uma intensa resposta celular (DE PAIVA et al., 2010). Durante o desenvolvimento de um processo inflamatório ou infeccioso a produção destas citocinas apresenta-se extremamente elevada (TURNBULL; RIVIER, 1999).

Os mecanismos pelos quais as citocinas ativam o eixo HHA e a secreção de vários outros hormônios, tais como a AVP, ocitocina (OT) e prolactina (PRL) ainda não são completamente conhecidos, mas apontam para ativação de neurônios hipofisiotróficos hipotalâmicos, por diferentes vias, como o mecanismo mais provável de modulação do eixo HHA (TURNBULL; RIVIER, 1999).

As citocinas são moléculas protéicas grandes e hidrofílicas que não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE). Assim, a sinalização das citocinas no Sistema Nervoso Central (SNC) pode ocorrer via órgãos circumventriculares (CVOs), que estão livres da BHE e constituem estruturas especializadas que possuem capilares fenestrados, permitindo desta forma a passagem de algumas proteínas. Os CVOs incluem o órgão subfornicial (SFO), o órgão vasculoso da

lâmina terminal (OVLT), a eminência mediana (EM), a área postrema (AP), a glândula pineal, o órgão subcomissural, o plexo coróide do IV ventrículo e o lobo intermédio e posterior da hipófise (BERK; FINKELSTEIN, 1981; SAWCHENKO; SWANSON, 1983).

A transmissão da sinalização induzida pelas citocinas também pode ocorrer via estimulação de nervos aferentes viscerais como o nervo vago (FLESHNER et al., 1995; KAPCALA et al., 1996). Adicionalmente, diferentes trabalhos demonstraram que a retirada das terminações das aferências vagais previne a febre, reduz os efeitos comportamentais e diminui a hiperalgesia em resposta à administração intraperitoneal de citocinas (WATKINS et al., 1994; BLUTHE et al., 1996; OPP; TOTH, 1998). Entretanto, outros estudos demonstram que estas aferências não são importantes durante um processo inflamatório/infeccioso.

A divergência destes estudos provavelmente origina-se do emprego de diferentes doses, bem como do uso de diferentes vias de administração do estímulo (ENGBLOM et al., 2002). Outros mecanismos propostos relacionam-se com a liberação de citocinas cerebrais pelas células gliais ou neurônios, por mecanismo não conhecido, que então atuariam por efeito autócrino ou parácrino (LECHAN et al., 1990).

O sistema endocanabinóide modula a ativação do eixo HHA principalmente por inibir a secreção de CRF, pode-se esperar que a manipulação deste sistema possa modificar as avaliações comportamentais do animal durante o estado doentio induzido pelo LPS. O CRF também é um potente peptídeo angiogênico e possivelmente esteja envolvido com o fato do LPS provocar ansiedade em vários paradigmas comportamentais, especificamente quando o efeito do LPS é avaliado utilizando aparatos tais como o campo aberto, labirinto em cruz elevado e o teste claro-escuro (PACAK; PALKOVITS, 2001).

Postula-se que a capacidade de muitos pirógenos endógenos em causar febre é dependente da produção intracerebral do CRF, endotelina (ET) e/ou de prostaglandinas (PGs) (RUMMEL et al., 2005).

As PGs são moléculas de origem lipídica, derivadas do metabolismo do ácido araquidônico (assim como os endocanabinóides), o qual é formado a partir da clivagem de fosfolípídeos de membrana pela ação das fosfolipases, principalmente da fosfolipase A2. A conversão do ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos (PGH<sub>2</sub>) ocorre pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX). Esta enzima existe

em duas isoformas, referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tipos celulares, (HWANG et al., 1998). Já a COX-2 não é expressa em condições fisiológicas, exceto nos rins, estômago e SNC (KHAN et al., 2002). Contudo, a expressão da COX-2 pode ser induzida em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e em outros tipos celulares, por estímulos fisiológicos e inflamatórios (ELMQUIST et al., 1997).

Em resposta a um estímulo inflamatório/infeccioso foi demonstrada a síntese de PGE<sub>2</sub> na microvasculatura cerebral, bem como no parênquima cerebral (KOMAKI; ARIMURA; KOVES, 1992). A administração de PGE<sub>2</sub> no OVLT e EM induz aumento da concentração plasmática de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), enquanto, no bulbo ventrolateral induz a expressão de Fos no PVN (KATSUURA et al., 1990; MCCOY; MATTA; SHARP, 1994; ERICSSON; ARIAS; SAWCHENKO, 1997).

O uso de diferentes bloqueadores da síntese de PGE<sub>2</sub> induz redução da resposta ao LPS frente à administração de citocinas, demonstrando a importância desta via na sinalização em um processo inflamatório/infeccioso. A ativação do sistema imune é sinalizada para o SNC que desencadeia algumas respostas tais como: leucocitose, ativação do sistema complemento, ativação do eixo HHA com conseqüente aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas, diminuição da concentração plasmática de ferro e zinco e aumento da concentração de cobre, aumento da produção de proteínas de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa, ceruloplasmina e outras), anorexia e febre (TURNBULL; RIVIER, 1999; BLATTEIS, 2006).

Essa resposta do organismo é denominada resposta de fase-aguda (KUSHNER, 1988) sendo seguida por uma inibição da secreção de alguns hormônios em uma fase tardia (Figura 3), como por exemplo a AVP (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; CARNIO; MORETO et al., 2006). Os mecanismos que controlam a secreção destes hormônios ainda não estão muito bem definidos. A produção de neuromoduladores inibitórios no hipotálamo é responsável por diminuir a secreção de hormônios neuro-hipofisários durante a fase inicial e de inibir a secreção destes hormônios numa fase tardia (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; MORETO et al., 2006).

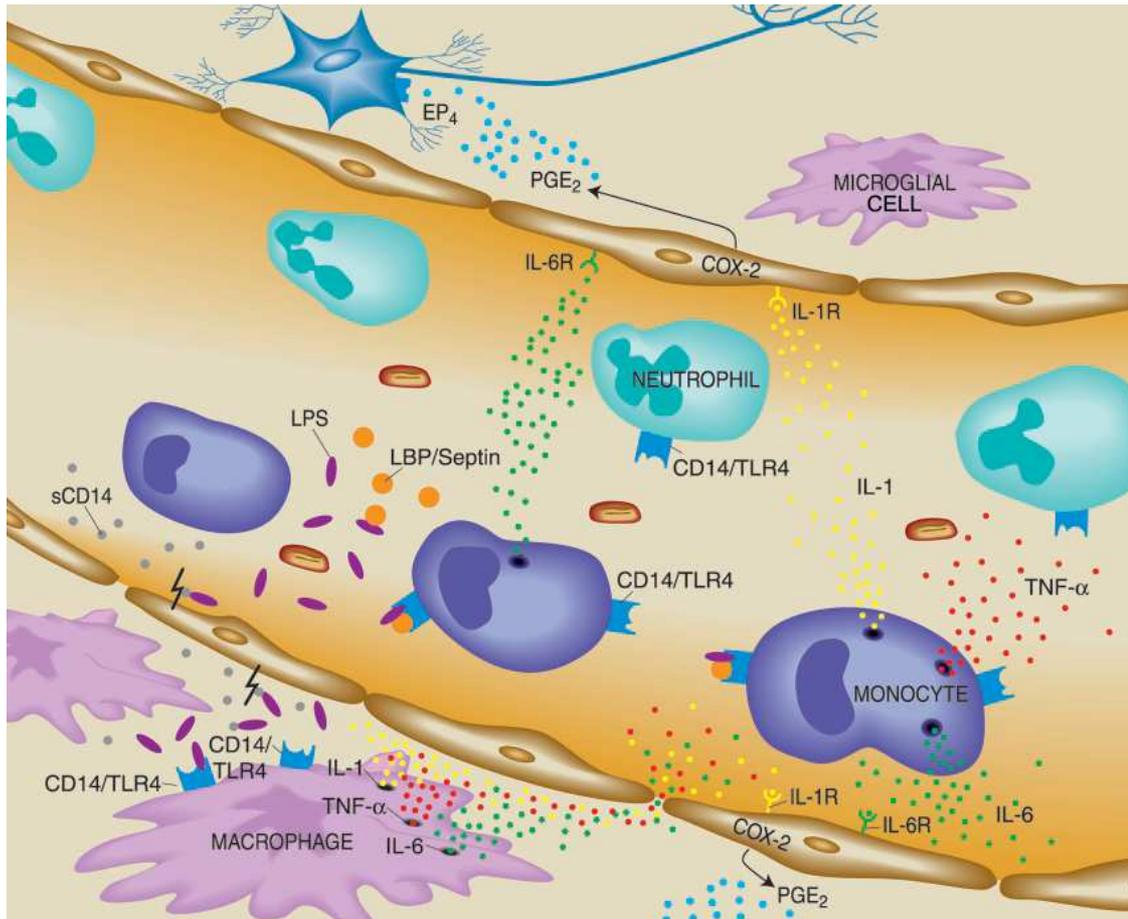


Figura 1- Resposta imune inata evocada por lipopolissacarídeo endotóxico (LPS). LPS é um componente importante das membranas de bactérias Gram negativas, que é o exemplo mais bem caracterizado de reconhecimento inato associado a uma resposta inflamatória robusta por células fagocitárias. Secreção de citocinas por monócito/neutrófilos e macrófagos teciduais circulantes por LPS requer uma série de mecanismos em cascata, sendo a primeira etapa a ligação do LPS com as proteínas séricas de ligação a proteína LPS (LBP) ou septinas. O complexo recém-formado pode então ativar diferentes populações de células por ligação ao seu receptor CD14 e receptor toll-like 4 (TLR4). Este é o atual receptor de sinalização para LPS. Duas formas de receptores CD14 podem ser encontrados. O primeiro está presente na superfície das células mielóides (mCD14) e atua como uma glicosil-fosfatidilinositol (GPI)-glicoproteína de membrana ancorada, a outra forma é solúvel no soro (sCD14) e tem as propriedades de GPI, embora possa se ligar ao LPS para ativar as células desprovidas de mCD14, tais como células endoteliais. LBP não é essencial para a sinalização de LPS, mas o complexo LPS/LBP é particularmente eficaz em ativar células de origem mielóide, isto é, neutrófilos, monócitos, macrófagos e micróglia. Uma das conseqüências mais bem conhecidas dessa ativação é a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF e IL-6. Estas citocinas podem, por sua vez, se ligar aos seus receptores cognatos expressos na superfície de células que formam a BHE, mas não são essenciais para a mediação dos efeitos de LPS no SNC. LPS é um ligante exógeno do tecido cerebral que expressa ambos os receptores de LPS.

Fonte: ZHANG, J.; RIVEST, S., 2003, modificado.

## 1.2 Regulação da temperatura corporal

A febre é uma resposta complexa que envolve vários componentes como o sistema endócrino e autonômico, metabólico e comportamental (SAPER; BREDER, 1994). É definida como elevação da temperatura corporal que ocorre em defesa à entrada de patógenos no hospedeiro (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001). Esta resposta ocorre em todos os grupos de vertebrados: mamíferos, pássaros, lagartos, cobras, tartarugas, salamandras, peixes e em alguns invertebrados. Isto indica que a febre tem um componente filogenético e está relacionada ao aumento da resposta de defesa do hospedeiro frente a uma infecção (BICEGO; BARROS; BRANCO, 2007)

A regulação da temperatura corporal está sob o controle de uma hierarquia de estruturas neurais (entre elas o hipotálamo, o sistema límbico, o tronco cerebral, a formação reticular, a medula espinhal e os gânglios simpáticos) as quais são responsáveis por integrar as informações térmicas aferentes e centrais, antes de estimular a ativação de respostas fisiológicas e comportamentais apropriadas (BOULANT, 2000). Embora a estimulação de áreas do tronco cerebral e da medula espinhal possa evocar mecanismos termorregulatórios específicos, estudos realizados *in vivo* demonstram que a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) desempenha papel crucial na regulação precisa da temperatura corporal (GRIFFIN, 2004).

Nesta área são encontrados dois tipos de neurônios. Os neurônios termossensíveis que podem ser sensíveis ao frio ou ao calor, e também os neurônios insensíveis, cuja frequência de disparo é afetada tanto por variações da temperatura sanguínea na área adjacente, como por influência de conexões diretas com termorreceptores distribuídos na pele e músculos (DINARELLO; CANNON; WOLFF, 1988). Assim, em resposta a variações de temperatura os neurônios hipotalâmicos iniciam respostas termorregulatórias apropriadas (retenção, produção ou perda de calor), com o objetivo de manter a temperatura interna constante (GORDON, 1990).

A regulação da temperatura corporal observada nos animais homeotérmicos pode ser explicada por uma teoria baseada na existência de um mecanismo similar

a um termostato, denominado de set point de regulação térmica. O set point de regulação térmica é definido como “o valor de uma variável que um organismo saudável busca estabelecer pelo processo de regulação” (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001). Esse valor é encontrado por meio da integração de informações térmicas centrais e aferentes pelos neurônios hipotalâmicos (BOULANT, 1998).

Portanto, a febre é definida como uma elevação controlada da temperatura corporal acima dos níveis normais, resultante de uma alteração do ponto de regulação hipotalâmico (DINARELLO; CANNON; WOLFF, 1988). Os mecanismos envolvidos nesse aumento do ponto de regulação consistem em alterações na frequência de disparos dos neurônios termorregulatórios do hipotálamo anterior, promovidas por substâncias que são mediadores da resposta febril - os pirógenos (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001).

A administração de pirógenos resulta na produção de PGs, as quais possuem papel importante na produção da febre. Em 1971, foi demonstrado por MILTON e WEDLANDT que a PGE2 induz febre quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v.) em gatos. Estudos efetuados por FELDBERG e SAXENA (1971) e STITT (1973) mostraram que microinjeções de PGs na POA induzem febre em ratos e coelhos, enquanto microinjeções em outras áreas encefálicas falham em induzir esta resposta. Atualmente, a PGE2 é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril, embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a PGF2 $\alpha$ , também possam induzir febre em animais experimentais (ENGBLOM et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

Apesar de vários mediadores induzirem febre via PGs, o tratamento com indometacina não modificou a resposta febril induzida em ratos por IL-8, quimiocinas (MIP-1), PFPF (pre-formed pyrogenic factor) e ET-1 em ratos, sugerindo a existência de um mecanismo adicional de mediação da resposta febril, independente da síntese e/ou liberação das PGs (FABRÍCIO et al., 2005).

O choque endotoxêmico é acompanhado por alteração da temperatura corporal, sendo que a febre é o sinal termorregulatório mais freqüente na sepse (Figura 4). Porém a hipotermia também pode ocorrer em estado crítico de choque e agrava significativamente o prognóstico do paciente (HARRIS et al., 1987). Romanovsky e colaboradores (1998) revisaram os mecanismos de hipotermia

durante o choque séptico experimental. A hipotermia associada ao choque pode ser resultado de uma redução da produção de calor em conjunto com um comportamento de busca do frio, o que sugere que a hipotermia na inflamação sistêmica grave pode constituir uma resposta adaptativa (ROMANOVSKY et al., 1997).

A febre é um processo distinto de hipertermia. Enquanto na febre há uma alteração no ponto de regulação hipotalâmico, na hipertermia o aumento de temperatura corporal observado é decorrente do comprometimento dos mecanismos de dissipação de calor (DINARELLO; CANNON; WOLFF, 1988; BLATTEIS, 2006; ROTH et al., 2006). Quando o organismo se encontra em temperaturas acima dos níveis normais ocorre aumento da fagocitose, proliferação de linfócitos T, aceleração da quimiotaxia de neutrófilos, secreção de substâncias antibacterianas e potencialização das ações do interferon, o que limita a proliferação bacteriana (KLUGER, 1991).

Estudos de estimulação térmica demonstraram que o resfriamento da POA promove o aumento da temperatura corporal, inicialmente por evocar respostas de retenção de calor, as quais incluem vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais de conservação de calor. Em seguida, ocorrem respostas de produção de calor, tais como termogênese provocada por tremores (shivering), termogênese desencadeada pelo aumento da atividade metabólica do tecido adiposo marrom (nonshivering) e termogênese química, decorrente da elevação dos níveis de hormônios metabólicos, tais como tiroxina (T4), catecolaminas e glicocorticóides. Por outro lado, o aquecimento da POA promove vasodilatação cutânea, sudorese, e várias respostas comportamentais que favorecem a perda de calor (BOULANT, 2000).

Assim como ocorre com a maioria dos processos biológicos, a febre também está sujeita a um sistema de modulação endógena. Existe uma variedade de mecanismos inibitórios específicos para a ação das citocinas, incluindo a existência de proteínas ligantes circulantes, de receptores solúveis e, no caso da IL-1, de um antagonista endógeno do seu receptor, o IL-1ra (LUHESHI; ROTHWELL, 1996). Existem ainda substâncias denominadas criógenos endógenos que, ao contrário dos pirógenos endógenos, limitam as elevações na temperatura corporal, impedindo que sejam atingidos valores de temperatura capazes de comprometer as funções vitais do organismo. Entre eles estão os glicocorticóides, a AVP, o hormônio estimulante

de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) e a IL-10 (KASTING, 1989; COELHO; SOUZA; PELÁ, 1992; MARTIN, 1998; NAVA et al., 1997; LEDEBOER et al., 2002).

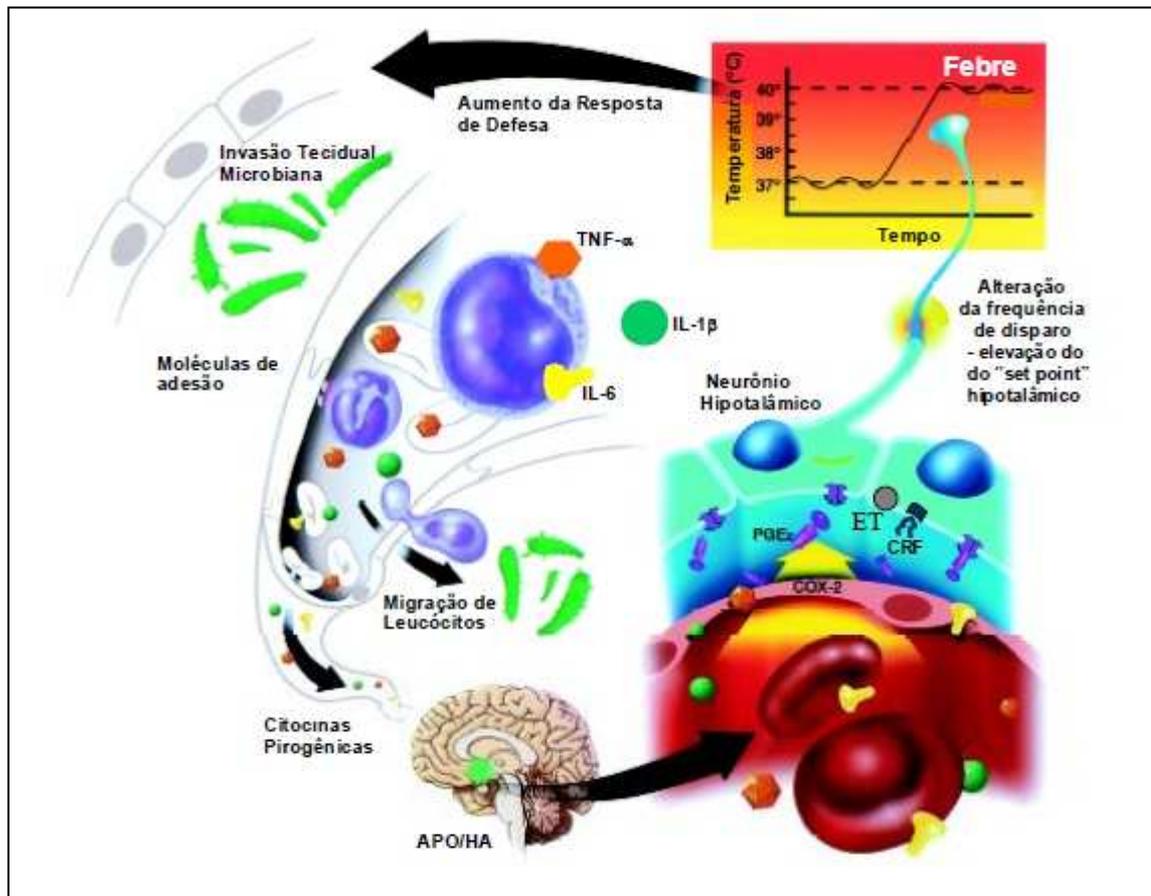


Figura 2- Geração da febre após infecção. A invasão tecidual por um agente infeccioso desencadeia a resposta inflamatória e ativa as células endoteliais locais e os leucócitos circulantes. O extravasamento de leucócitos para o tecido inflamado depende da interação regulada por várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão entre as células endoteliais. Os leucócitos ativados liberam citocinas pirogênicas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), que ao atingirem a circulação podem estimular a produção das PGs, ETs e/ou do CRF, no sistema nervoso central. Os sinais inflamatórios periféricos podem também atingir o sistema nervoso central por meio de conexões neuroniais (tais como o nervo vago). Os mediadores centrais produzidos promovem alteração da frequência de disparo dos neurônios da APO/HA, resultando na elevação do "set point" termorregulatório. O estado febril é então atingido por meio da efetuação de respostas fisiológicas e comportamentais do organismo, com o objetivo de aumentar a produção/conservação de calor. A febre pode exacerbar a resposta inflamatória sistêmica em resposta à infecção por, entre outras alterações, aumentar a função leucocitária.

Fonte: ARONOFF, D.M.; NEILSON, E.G., 2001 apud SOARES, D.M., 2008.

A administração sistêmica de LPS é comumente utilizada para avaliar uma grande variedade de alterações comportamentais induzidas pela infecção/inflamação, tais como: anorexia, sono, letargia, alteração do limiar nociceptivo e febre. Especificamente com relação as alterações termorregulatórias

que ocorrem após a administração de LPS, têm sido observado que estas dependem da dose de LPS utilizado e da temperatura ambiente. Resumidamente, baixas doses de LPS provocam apenas febre, enquanto altas doses provocam hipotermia seguida por febre (GIUSTI-PAIVA et al., 2004).

### 1.3 Comportamento doentio

A ativação do sistema imune por endotoxina resulta em várias alterações comportamentais, que são coletivamente chamadas de comportamento doentio (*sickness behavior*), as quais incluem a febre, redução da ingestão de alimento, redução da atividade locomotora e do comportamento social. Além disso, o LPS provoca efeitos semelhantes à depressão (*depressive-like*), particularmente a anedonia, evidenciada pela redução do consumo de alimentos palatáveis e preferenciais (DE PAIVA et al., 2010).

O *sickness behavior* pode ser descrito por alterações comportamentais como diminuição do apetite, anedonia, diminuição do comportamento reprodutivo, menor atividade motora, febre, ocorrência de alterações no padrão do sono, perda aparente do interesse por atividades cotidianas e positivas, como a busca por alimento, perda do contato social, e do interesse sexual (KUSHNER, 1988; KENT et al., 1992).

Hart em 1988 tentou conceituar o comportamento doentio de animais de diversas espécies. Ele agrupou alguns achados comuns a todas as espécies e processos estudados que incluíam febre, letargia ou prostração, perda de apetite e diminuição do consumo de água, diminuição de locomoção em geral, redução de autolimpeza em roedores, entre outros.

No mesmo trabalho foram listadas possíveis vantagens (aparentemente paradoxais) das alterações comportamentais para os animais acometidos de doenças tais como diminuição do gasto energético fisiológico com digestão de comida (anorexia), menor perda de calor e exposição a possíveis predadores (prostração) e geração de um ambiente menos favorável à proliferação de patógenos, favorecida pela atividade de células imunológicas (febre). Os animais doentes não estão incapacitados de realizar tarefas ou de responder a estímulos

ambientais; apenas não o fazem dada a baixa prioridade que estas tarefas têm em um determinado contexto.

A administração de um agente infeccioso via intraperitoneal (*Listeria monocytogenes*) em camundongos resulta em anorexia e pode ser contornada por alimentação forçada por gavagem. Tais animais sobrevivem, em média, metade do tempo que aqueles alimentados *ad libitum* (MURRAY; MURRAY, 1979).

Anorexia e perda de peso são observadas durante os processos inflamatórios e infecciosos em pacientes e em modelos animais experimentais de infecção. O comportamento alimentar é regulado por um sistema complexo que envolve várias regiões do cérebro, desde o córtex ao tronco cerebral, com destaque para o hipotálamo, onde ocorre a integração de sinais do estado energético e ingestão calórica (SCHWARTZ et al., 2000). A integração destes sinais desencadeia respostas neuroendócrinas como secreção de peptídeos orexígenos como neuropeptídeo Y (NPY) e orexina ou a ativação de um circuito de sinais anorexígenos, representados pela expressão do  $\alpha$ -MSH e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (ELMQUIST et al., 1997).

A sinalização periférica do balanço energético para o hipotálamo ocorre via leptina, hormônio circulante produzido pelo tecido adiposo branco. Receptores da leptina estão presentes no núcleo arqueado e sua ativação aumenta a expressão de pró-opiomelanocortina (POMC) e reduz a expressão de NPY neste núcleo (ELMQUIST et al., 1997). O LPS é capaz de induzir aumento na concentração plasmática de leptina, sendo esta ação mediada pela IL-1 (SERGEYEV; BROBEGER; HOKFELT, 2001). Foi observado, também, que a administração de LPS ou TNF impede a redução das concentrações de leptina com o jejum, enquanto, em animais alimentados a endotoxina induz aumento da secreção de leptina, que por sua vez induz aumento da expressão de POMC no núcleo arqueado (GRUNFELD et al., 1996; SERGEYEV; BROBEGER; HOKFELT, 2001). Deste modo, a leptina poderia ser o mediador da anorexia induzida pelo LPS, entretanto, os mecanismos pelos quais a leptina induz redução da ingestão de alimento, ou a participação de outros mediadores neste modelo experimental ainda são desconhecidos.

Evidências obtidas de estudos experimentais em murídeos obesos (camundongos ob/ob e db/db e ratos obesos Zucker) e normais mostraram que a ativação de receptores CB<sub>1</sub> por canabinóides endógenos ou THC estimulam o

consumo de alimentos; contrariamente, animais cujos genes dos receptores CB<sub>1</sub> haviam sido suprimidos (CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>) consomem menos comida e mostram fenótipo magro, resistente ao aumento de peso induzido por dieta; em condições normais, a ingestão de nutrientes reduz os níveis de endocanabinóides no hipotálamo e no pró-encéfalo límbico, enquanto o jejum tem efeito oposto (DI MARZO et al., 1998).

Isso sugere que o sistema endocanabinóide controla a ingestão de energia em dois níveis. Reforça tonicamente e incentiva a motivação de busca e consumo de comida, possivelmente por interagir com vias envolvidas em mecanismos de recompensa ou então o sistema é ativado "sob demanda" após um curto período de privação de comida para então modular os níveis e ou a ação de outros mediadores obesígenos e anorexígenos. A injeção de endocanabinóides em áreas encefálicas estimula o consumo de alimentos em roedores (BISOGLIO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005).

Cohn e De Sa-Rocha (2006) observaram alterações comportamentais causadas pelo LPS em camundongos dominantes e submissos acomodados em duplas estáveis. O LPS possui maior efeito em animais dominantes que, após o tratamento, apresentaram maior letargia e diminuição da busca por interação social que os animais submissos. A interação social de um animal subordinado a um outro talvez impeça a expressão do comportamento doentio, refletindo este fato na maior prioridade do animal naquele momento para desempenho de outras atividades. No entanto, os mediadores neuroquímicos envolvidos com a expressão do comportamento doentio ainda não foi muito bem elucidado.

Os efeitos do THC, um dos princípios ativos da *Cannabis sativa*, ou de agonistas dos receptores CB<sub>1</sub> e altas doses de endotoxina provocam hipotermia e os endocanabinóides atuam com neuromoduladores inibitórios relacionados à termorregulação. Com isso, a hipótese deste trabalho é a de que durante a sepse ocorre uma ativação do sistema endocanabinóide central, e este poderia participar do controle da temperatura corpórea e comportamento doentio durante a sepse.

## 1.4 Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é formado por endocanabinóides, seus receptores e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação. Constitui-se em um sistema de sinalização endógena que atua em diversas funções fisiológicas, tais como a homeostase energética, modulação da nocicepção, resposta imunológica e controle do metabolismo endócrino (MARSICANO; LUTZ, 2006). Os endocanabinóides são sintetizados a partir da quebra de fosfolipídeos de membrana, como o ácido araquidônico e agem como mensageiros retrógrados, são sintetizados nos neurônios pós-sinápticos e se ligam aos seus receptores nos neurônios pré-sinápticos e restringem a atividade neural. A anandamida e a 2 araquidonoil-glicerol (2-AG) são removidas da fenda sináptica através de transportador de endocanabinóides pela membrana (EMT) pós e pré-sináptica e hidrolisadas pela FAAH (ácido graxo amida hidrolase) e MGL (monoacilglicerol lipase), respectivamente (Figura 1). Também existem os canabinóides exógenos, que são constituintes da *Cannabis sativa*, mas não participam do sistema endocanabinóide por não se encontrarem naturalmente no organismo (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

A *Cannabis sativa*, mais conhecida como maconha ou marijuana, é a droga ilícita mais consumida no mundo desde 1960 (ADAMS; MARTIN, 1996). Seu uso teve origem na China há mais de cinco mil anos e era usada para a obtenção de fibras utilizadas na manufatura de tecidos e tratamento para tratar câimbras, dores reumáticas e dores menstruais (MECHOULAM, 1986). Em 1964 o seu princípio ativo  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol (THC) foi isolado e sua estrutura química caracterizada (GAONI; MECHOULAM, 1964). Atualmente vários análogos sintéticos da *Cannabis sativa* vêm sendo estudados e caracterizados (Figura 2). O dronabinol, um composto sintético derivado do THC, foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) há mais de 15 anos como tratamento auxiliar de fases avançadas de portadores de AIDS e câncer que possuem anorexia e caquexia (VOLICER et al., 1997).

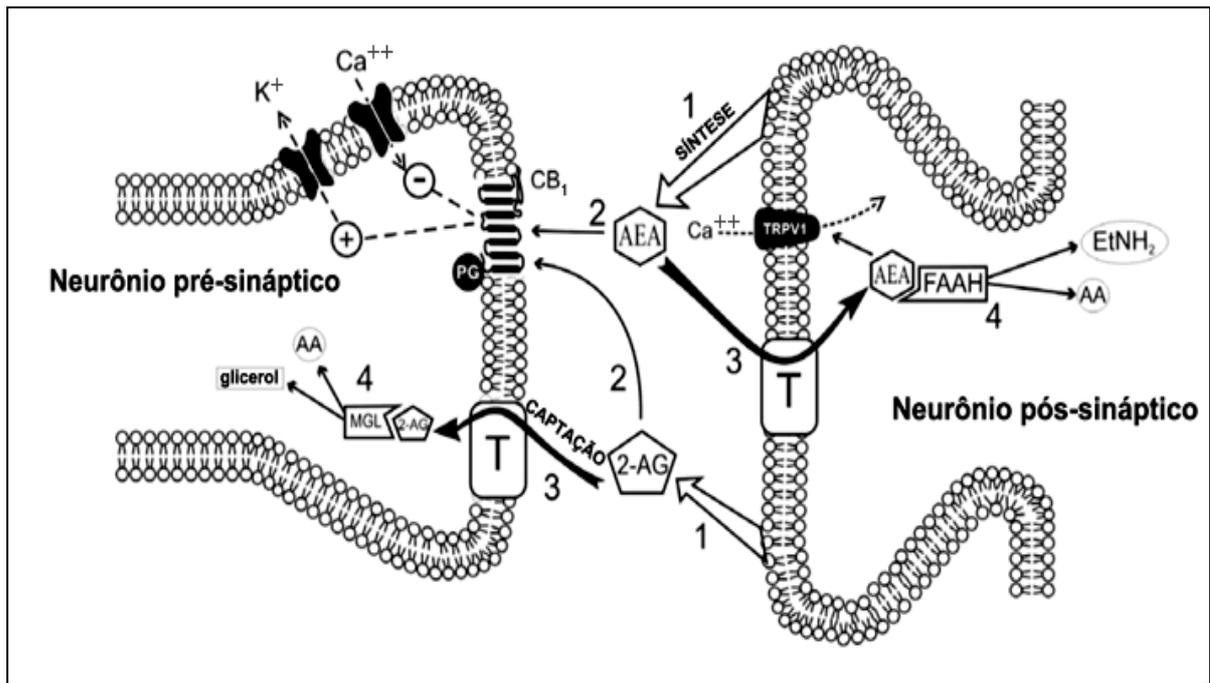


Figura 3- O sistema endocanabinóide. Os endocanabinóides são sintetizados e liberados da membrana dos neurônios pós-sinápticos segundo a demanda após o influxo de cálcio (1). Eles ativam os receptores pré-sinápticos  $CB_1$  e restringem a atividade neural (2). A anandamida e a 2-AG são removidas da fenda sináptica pela captação pós e pré-sináptica, respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida pode se acoplar e passa por hidrólise pela FAAH, ao passo a 2-AG é hidrolisada pela MGL.

Fonte: SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010, modificado.

Devane e colaboradores identificaram o primeiro receptor canabinóide em 1988 e em 1993 esse receptor foi denominado  $CB_1$ . Também em 1993 um segundo receptor foi caracterizado e designado por  $CB_2$  (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Ambos os receptores estão acoplados às proteínas Gi/o e pertencem a uma grande e diversificada família de proteínas acopladas à membrana celular. A distribuição tecidual dessas estruturas explica a maior parte dos efeitos psicotrópicos do THC atribuídos aos receptores  $CB_1$  pois encontra-se principalmente no SNC (AMERI, 1999). Os efeitos dos receptores  $CB_2$  estão mais associados à resposta imune (PORTER; FELDER, 2001).

Os receptores dos canabinóides podem ser do tipo ionotrópico ou metabotrópico. Os receptores ionotrópicos são canais abertos pela ligação de agonistas e através dos quais íons como  $Na^+$ ,  $K^+$  e/ou  $Ca^{2+}$  podem passar. Os receptores metabotrópicos são receptores formados por sete segmentos transmembrana acoplados à proteína G (GUZMAN, 2003). No caso específico dos receptores  $CB_1$ , a modulação se faz sobre canais de  $Ca^{2+}$  ativados por voltagem (os

quais inibem) e canais de  $K^+$  (os quais estimulam), fazendo com que haja uma inibição de liberação de neurotransmissores (MCALLISTER; GLASS, 2002).

Os receptores  $CB_1$  são dentre os GPCRs (G protein-coupled membrane receptor), os mais abundantes até agora identificados no SNC, embora estejam também presentes no sistema nervoso periférico (DI MARZO; BIFULCO; PETROCELLIS, 2004). Os endocanabinóides exercem importantes ações sobre o SNC, que incluem a regulação da função cognitiva e das emoções em circuitos neuronais do córtex, hipocampo e amígdala e no reforço dos efeitos de substâncias que levam à dependência química no sistema mesolímbico incluindo a algumas drogas de abuso como a cocaína, a heroína, a anfetamina e o álcool (DE VRIES; SHAHAM ; HOMBERG, 2001; FATTORE et al., 2003; ANGGADIREDDA et al., 2004; GALLATE et al., 1999).

Os receptores  $CB_2$  localizam-se em estruturas associadas à modulação do sistema imune e da hematopoiese. A presença do sistema endocanabinóide em tecidos linfóides sugere que os endocanabinóides podem exercer alguma função sobre o sistema imunológico. Os receptores canabinóides  $CB_1$  e principalmente  $CB_2$  estão presentes em células B, células natural killer (NK), monócitos, neutrófilos e leucócitos. Além disso, tanto os macrófagos como os leucócitos secretam endocanabinóides (PESTONJAMASP; BURSTEIN, 1998). A partir disso, pode-se visualizar a utilização dos canabinóides como medida terapêutica para enfermidades mediadas pelo sistema imunológico.

Os primeiros ligantes endógenos dos receptores canabinóides (endocanabinóides) foram isolados em 1992 por Devane. Nos dias atuais, a anandamida (N-araquidonoil etanolamina) e o 2-AG são, entre os canabinóides endógenos, os mais estudados. Ambos são agonistas dos receptores  $CB_1$  e  $CB_2$ . Os níveis celulares e teciduais de 2-AG são mais elevados que os da anandamida devido ao seu maior envolvimento em várias vias metabólicas.

A maior parte dos endocanabinóides identificados até o momento é derivada de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, especificamente o ácido araquidônico. Assim, a anandamida e o 2-AG são formados por vias dependentes de fosfolípidios e cujas enzimas de síntese são a N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D hidrolase (NAPE-PLD) e a DAGL, respectivamente (OKAMOTO et al., 2004).

Tanto a anandamida quanto o 2-AG têm sua ação interrompida por processo de recaptação pelos neurônios e seguida de sua degradação. Essa etapa ocorre por

simples difusão e/ou através de processo facilitado por uma proteína transportadora. Ambos os endocanabinóides são rapidamente metabolizados e hidrolizados pela FAAH e pela MAGL respectivamente, em compostos inativos (DI MARZO; MATIAS, 2005).

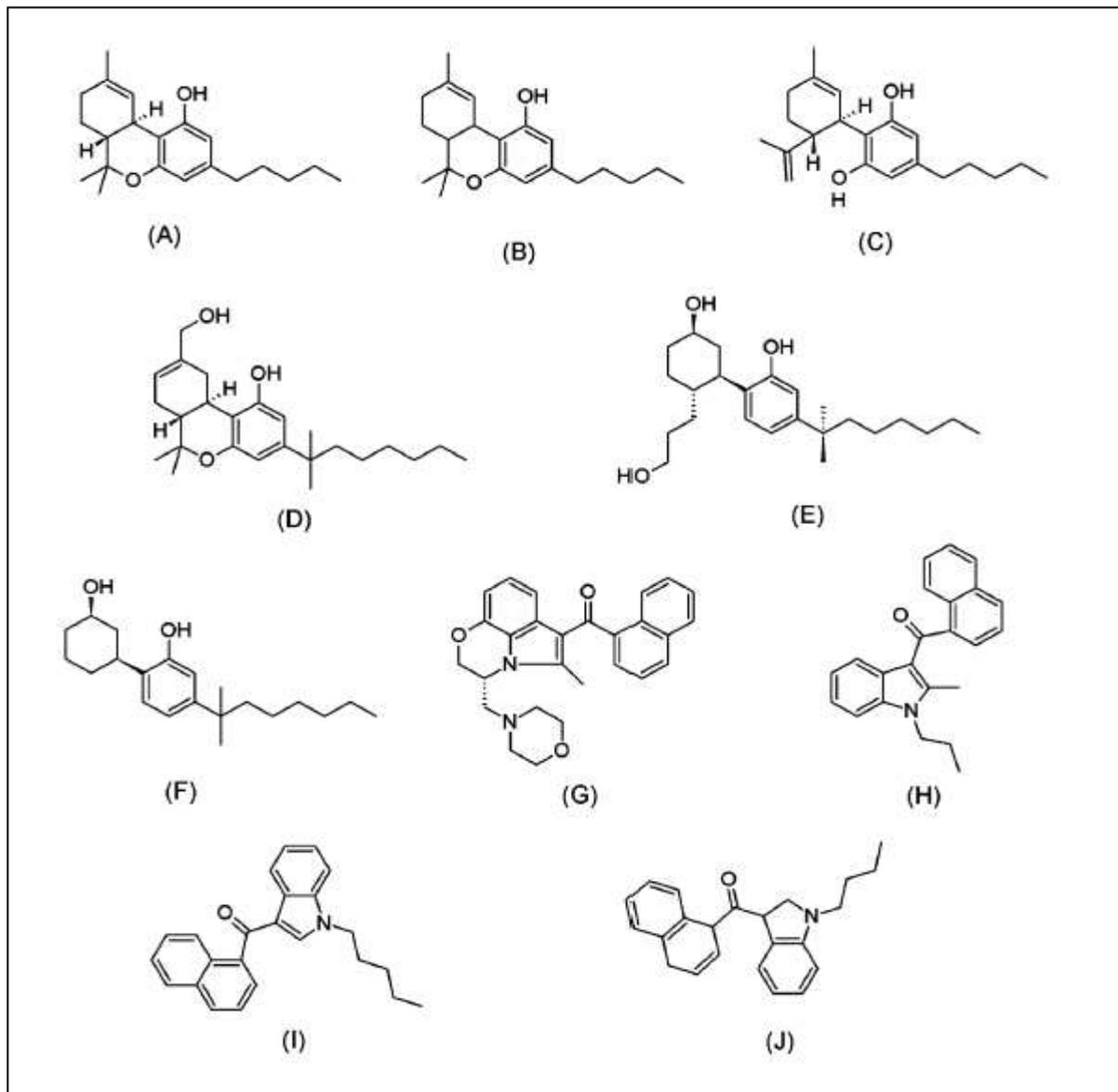


Figura 4- Representação esquemática das estruturas moleculares dos canabinóides. (A)  $\Delta_9$ -THC, (B) Canabinoil, (C) canabidiol, (D) HU-210, (E) CP-55,940, (F) CP 47,497, (G) WIN-55,212-2, (H) JWH-015, (I) JWH-018, (J) JWH-073.

Fonte: ALVES, SPANIOL, LINDEN, 2012.

O desenvolvimento de agonistas canabinóides sintéticos permitiu um grande avanço na pesquisa dos efeitos dos canabinóides. O WIN55212-2 (agonista CB<sub>1</sub>) é amplamente utilizado e tem alta afinidade pelo receptor CB<sub>1</sub>. O WIN55212-2 é bastante seletivo para o CB<sub>1</sub> e tem pouco efeito em outros sistemas de

neurotransmissores, como: efeito anti-hiperalgésico, indução de hipotermia, aumento do reflexo de retirada de cauda. Diferente desse, o composto  $\Delta^9$ -THC, que também induz hipotermia, interage com outros receptores, incluindo os serotoninérgicos. Por outro lado, pode-se utilizar inibidores da recaptação de canabinóides tanto endógenos quanto exógenos. Isso pode ser feito através da inibição da enzima FAAH ou inibição da proteína transportadora, ambos aumentam o tempo e a quantidade de canabinóides extracelular (BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005).

Outros estudos demonstraram o desenvolvimento de potentes e seletivos antagonistas do receptor CB<sub>1</sub>, tais como SR141716A e AM 251. Segundo FOX e colaboradores (2001), estes compostos podem bloquear os efeitos de hipocinesia, hipotermia, catalepsia e anti-nocicepção do  $\Delta^9$ -THC e WIN55212-2 em ratos e camundongos.

A maneira pela qual os endocanabinóides atuam no sistema nervoso central através de agonistas e antagonistas contraria os conceitos clássicos que definem um neurotransmissor. Os neurotransmissores clássicos, tais como a acetilcolina, os aminoácidos (como glutamato e GABA) ou as monoaminas (como dopamina e serotonina), preenchem os seguintes critérios: 1) os transmissores são sintetizados nos terminais pré-sinápticos a partir de precursores específicos e armazenados em vesículas sinápticas; 2) eles são liberados na fenda sináptica após um influxo de cálcio; 3) há mecanismos específicos para que finalizem suas ações, incluindo a captação e a degradação enzimática. Estes critérios tornam os endocanabinóides mensageiros atípicos, que medeiam a transferência das informações dos terminais pós aos pré-sinápticos de uma forma retrógrada, sendo que os endocanabinóides são sintetizados sob demanda e não são armazenados em vesículas (BURNSTOCK, 2009; PAGOTTO et al., 2006).

As sínteses ocorrem nos neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio e a subsequente ativação das fosfolipases (fosfolipase D no caso da anandamida e diaciglicerol lipase no caso da 2-AG), que convertem os fosfolídeos em endocanabinóides (PIOMELLI, 2003). Eles atingem imediatamente a fenda sináptica por meio da difusão livre ou assistida e se acoplam aos receptores CB<sub>1</sub> pré-sinápticos (EGERTOVA et al., 1998). Por meio de processos de sinalização intracelular, a ativação dos receptores CB<sub>1</sub> resulta em uma diminuição no influxo de cálcio nos terminais axônicos e, dessa forma, na diminuição da liberação do transmissor (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

Os receptores CB<sub>1</sub> quando ativados pelos endocanabinóides podem causar antinociceptividade (diminuição da sensibilidade aos estímulos dolorosos), controle do movimento e inibição da memória de curto prazo; inibição da secreção de prolactina (PRL) e do hormônio do crescimento; efeitos ansiolíticos, através de ações sobre o eixo HHA; modulação da resposta imune e inflamatória; aumento da frequência cardíaca, vasodilatação e broncodilatação; inibição da secreção de testosterona, anovulação e relaxamento uterino; atividade antitumoral; neuroproteção diante de situações de trauma e hipóxia; modulação da ingestão de alimentos graças aos seus efeitos sobre a liberação de peptídeos e hormônios hipotalâmicos e hipotermia (PAGOTO et al., 2006; COTA; MARSICANO; TSCHOP, 2003; DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004; WAGNER et al., 2001; WENGER et al., 2001; PANIKASHVILI et al., 2001; DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004; DI MARZO; MATIAS, 2005; RAWLS et al., 2004). Todos esses efeitos pleiotrópicos foram concisamente resumidos por Di Marzo e colaboradores (1998) em uma única frase: "O sistema endocanabinóide reduz a sensação de dor, controla o movimento, a memória, o sono, o apetite e protege".

Os canabinóides exógenos exercem efeito inibitório sobre a secreção de hormônios neuro-hipofisários, como por exemplo a vasopressina (AVP). A AVP é um importante hormônio sintetizado pelos neurônios hipotalâmicos paraventricular (PVN) e supra-ópticos (SON) e lançado em diferentes regiões do cérebro e dos terminais neurohipofisários no sangue em resposta a muitos estímulos fisiopatológicos (OOI, TAWANDROS, ESCALONA, 2004). O mecanismo que controla a secreção de AVP não foi completamente elucidado. O sistema endocanabinóide é um sistema intercelular que modula diversas ações neuroendócrinas. Endocanabinóides são liberados como mensageiros retrógrados por muitos neurônios, incluindo os neurônios magnocelulares do hipotálamo. Receptores de canabinóides estão localizados nesses neurônios, assim como nos lobos anterior e posterior da hipófise, sugerindo um papel dos endocanabinóides na produção e liberação de AVP (DE LAURENTIIS et al., 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar a influência do sistema endocanabinóide sobre o *sickness behavior* em ratos submetidos à endotoxemia.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar uma dose de LPS apropriada à indução de sepse e hipotermia seguida de febre;
- b) Avaliar a participação do sistema endocanabinóide na termorregulação durante a sepse;
- c) Avaliar a participação do sistema endocanabinóide na interação social durante a sepse;
- d) Avaliar a participação do sistema endocanabinóide nos testes de ganho de peso e ingestão durante a sepse.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos com peso entre 270 e 320g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL-MG, acondicionados em grupos de cinco em caixas plásticas cobertas com grades metálicas, mantidos em condições ambientais de luz (ciclo claro-escuro de 12 h, luz das 07:00 h as 19:00 h), temperatura controlada ( $21\pm 1$  °C) e ração comercial peletizada e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram iniciados entre 07:00 h e 08:00 h (período da manhã). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da UNIFAL-MG, aprovados pelo protocolo nº 459/2012.

### 3.2 Procedimentos experimentais

#### 3.2.1 Estereotaxia

Para possibilitar a administração de drogas no SNC os animais receberam implante de cânula guia confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas. Os ratos foram anestesiados i.p. com o anestésico geral ketamina (0,08 mL/100 g de peso corporal) e o sedativo/miorrelaxante/analgésico xilazina (0,04 mL/100 g de peso corporal). Em seguida, foram colocados no aparelho estereotáxico Digital Lab (Stoelting, modelo 51900) e foi realizada uma incisão na pele e no tecido subcutâneo ao longo da sutura sagital. O tecido subcutâneo e o perióstio foram removidos para a perfuração do osso parietal direito, onde uma cânula de 10 mm foi introduzida visando atingir o ventrículo lateral através das coordenadas indicadas no atlas de Paxino e Watson (1998): anterior: -0,3 mm; lateral: -1,5 mm e dorsal: -3,7 mm,

utilizando-se como referência o bregma. A cânula foi fixada ao osso utilizando-se acrílico dentário após a fixação de 2 parafusos “de escora”.

Após o término dos experimentos todos os animais foram sacrificados por guilhotinamento (exceto os animais destinados à imunohistoquímica). Em seguida foi administrado 1 $\mu$ L de azul de metileno na cânula (através de uma injetora de 12 mm). Os cérebros foram então removidos e armazenados em paraformaldeído 10%. Após fixação, os cérebros foram analisados a fim de conferir o posicionamento das cânulas. Somente os animais com o posicionamento correto das cânulas foram considerados para análise estatística.

### *3.2.2 Implante do transmissor de temperatura (probe) e determinação da temperatura corporal*

Anteriormente à cirurgia, os probes foram higienizados em detergente enzimático e em solução de álcool 70%. Após a canulação do ventrículo lateral no estereotáxico, com os animais ainda sedados, foi executada uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos abdominais. O probe foi então inserido na cavidade peritoneal. Os músculos e a pele foram suturados separadamente e os animais receberam antiinflamatório cetoprofeno subcutâneo (3 mg/animal) e antibiótico pentabiótico intramuscular (2 mg/animal), ambos de uso veterinário.

Após cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais nas mesmas condições anteriormente citadas. Após um período de cinco a sete dias, as caixas foram colocadas sobre o receptor telemétrico (Data Science) conectado a um computador, registrando-se a temperatura corpórea em intervalos de 10 min durante o experimento. Os dados foram coletados e graficamente exibidos no monitor, impressos digitalmente e armazenados.

A temperatura basal foi calculada pelos 30 minutos antecedentes ao início dos experimentos, ou seja, foram feitas 3 leituras de 10 em 10 min. Calculou-se a diferença da temperatura pela média da temperatura basal e obteve-se o delta da temperatura.

O gráfico de índice térmico é calculado pela integral do delta e possui uma visualização mais simples e mostra a diferença significativa que existe entre os diferentes grupos.

### *3.2.3 Interação Social*

A interação social reflete um estado psicofisiológico saudável manifestado por reações próprias da espécie. O teste em arena consiste em confrontar o animal a ser avaliado (residente) com outro desconhecido da mesma espécie de idade inferior (visitante ou intruso). Para avaliar as alterações comportamentais, os animais foram colocados no campo aberto (aparato para avaliação comportamental) por 5min. Os experimentos foram filmados utilizando-se uma câmera filmadora digital e os filmes gravados em DVD para posterior análise.

Foram considerados como caracteres de avaliação a exploração anogenital, seguir o visitante ou colocar as patas dianteiras sobre ele, somando-se o tempo total em que o residente interage com o visitante. A indiferença ao visitante ou comportamentos de submissão indicam a presença de sintomas depressivos no residente. As análises foram realizadas 02 e 24 horas após os tratamentos.

### *3.2.4 Ingestão Alimentar e Ganho de Peso*

Para obtenção de estímulo para ingestão alimentar os animais foram submetidos a 12 horas de jejum. Antes do teste o peso corporal e o peso da ração oferecida foram mensurados. O procedimento da pesagem da ração foi repetido 2, 4, 6 e 24 horas após os tratamentos verificando-se suas variações. A variação do peso corporal foi mensurado 24 horas após os tratamentos.

### 3.2.5 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1mL/100g de peso corporal) e perfundidos através de uma punção intracardíaca com salina heparinizada seguida de fixador (paraformaldeído 4%).

Os cérebros foram removidos e armazenados em fixador durante 4 horas e em seguida transferidos para uma solução de sacarose 30% a 4°C. Posteriormente, os cérebros foram seccionados em cortes de 30µm de espessura utilizando um criostato e armazenados em solução anti-freezing. Nestas fatias de tecidos foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (solução 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e as ligações inespecíficas com albumina 5%.

Para a realização de imunohistoquímica para Fos, os cortes foram incubados a temperatura ambiente de 14 a 16 horas com o anticorpo primário anti-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA, diluição 1:10.000) e em seguida incubados com segundo anticorpo biotilado (1:200). Para a coloração foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector), empregando-se diaminobenzidina (DAB) e níquel como cromógeno. O produto da reação confere uma coloração nuclear violeta escuro – preto.

Os cortes foram montados utilizando-se lâminas com Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%) secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com o meio de montagem. A visualização microscópica do tecido permite analisar o padrão espacial da imunomarcagem, realizado empregando-se um sistema de videomicroscopia. As imagens foram capturadas por meio de uma câmera de vídeo de alta resolução acoplada a um microscópio. As células imunorreativas para Fos em neurônios foram contadas manualmente com auxílio de um microscópio Nikon modelo Eclipse 80i.

### 3.2.6 Drogas

As drogas utilizadas nestes experimentos foram lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 026:B6, AM251 (antagonista CB1), AM404 (inibidor da receptação de

endocanabinoide) e antagonista do receptor V1 da vasopressina obtidos da Sigma-Aldrich. Cetoprofeno (Cristalina), Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Ketamina (Dopalen) e Xilazina (Dopaser). O veículo do AM251 e do AM404 foram DMSO 10% de DMSO 20% em salina estéril, respectivamente. As demais drogas foram diluídas em salina estéril.

### *3.2.7 Análises estatísticas*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparação de três ou mais médias aplicou-se a análise de variância One-way ou Two-way, quando apropriado, seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os dados da telemetria foram demonstrados pelo gráfico de linhas e sua estatística foi realizada através da área sob a curva calculado (integral) do delta da temperatura e denominado índice térmico. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## **3.3 Protocolos experimentais**

### *3.3.1 Determinação da dose de LPS*

Para determinação da dose de escolha de LPS na resposta sobre a temperatura corporal, foram administradas as doses de 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Os animais foram divididos em 4 grupos ( $n=7$ ) assim denominados:

C1 – grupo controle (administração de veículo – salina isotônica, 100 mL/kg)

E1 – experimental 1 (administração de LPS - 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )

E2 – experimental 2 (administração de LPS - 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )

E3 – experimental 3 (administração de LPS - 2000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )

A administração de LPS ou de veículo foi realizada por via intraperitoneal em dose única.

### 3.3.2 Efeito dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos

Injeções i.c.v. foram realizadas com seringa de Hamilton de 5  $\mu\text{L}$  e uma seringa odontológica. O volume de cada injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  (AM251) e 5  $\mu\text{L}$  (AM404 e antagonista V1 AVP) por um período de tempo acima de 1 min, e realizadas de acordo com os seguintes protocolos experimentais:

#### 3.3.2.1 Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na temperatura corpórea em ratos

Os ratos ( $n= 8$  a 12 por grupo) foram pré-tratados com AM251 (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). A temperatura corpórea foi medida por 8 horas como descrito anteriormente.

#### 3.3.2.2. Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptção de endocanabinóides (AM404) na temperatura corpórea em ratos

Os ratos ( $n= 8$  a 13 por grupo) foram pré-tratados com AM404 (10  $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). A temperatura corpórea foi medida por 8 horas como descrito anteriormente.

#### 3.3.2.3 Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) seguida da administração de antagonista vasopressinérgico na temperatura corpórea em ratos

Os ratos (n= 6 a 11 por grupo) foram pré-tratados com AM251 (5 µg/µL, i.c.v.) e 45 min após foram tratados com o antagonista vasopressinérgico (500 ng/5 µL; i.c.v.) ou veículo e após 15 min administrou-se LPS (dose 1000 µg/kg, i.p.) ou salina. A temperatura corpórea foi medida por 8 horas como descrita anteriormente.

### *3.3.3 Efeito dos endocanabinóides na interação social*

#### *3.3.3.1 Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na interação social*

Os ratos (n= 10 a 14 por grupo) foram pré-tratados com AM251 (5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000 µg/kg; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). Duas e vinte e quatro horas após, o animal residente e o intruso foram colocados no campo aberto e foi realizado o teste de interação social.

#### *3.3.3.2 Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptação de endocanabinóides (AM404) na interação social*

Os ratos foram pré-tratados com AM404 (10 µg/5µL; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000 µg/kg; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). Duas horas (n=9 a 11 por grupo) e vinte e quatro (n= 11 a 16 por grupo) horas após, o animal residente e o intruso foram colocados no campo aberto e foi realizado o teste de interação social.

#### *3.3.4 Efeito dos endocanabinóides na ingestão alimentar e ganho de peso*

#### 3.3.4.1 Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) na ingestão alimentar e ganho de peso

Os ratos (n= 8 a 13 por grupo) foram pré-tratados com AM251 (5 µg/µL; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000 µg/kg; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). A avaliação de ingestão alimentar e ganho de peso foi realizado conforme descrito anteriormente.

#### 3.3.4.2 Efeito da administração central de inibidor de proteínas de membrana de recaptção de endocanabinóides (AM404) na ingestão alimentar e ganho de peso

Os ratos (n= 7 a 9 por grupo) foram pré-tratados com AM404 (10 µg/5µL; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000 µg/kg; i.p.) ou salina (1 ml/kg; i.p.). A avaliação de ingestão alimentar e ganho de peso foi realizado conforme descrito anteriormente.

#### 3.3.5 *Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal*

Os ratos (n= 4 a 7 por grupo) foram pré-tratados com AM251 (5 µg/µL; i.c.v.) ou veículo, 1 hora antes da injeção de LPS (dose 1000 µg/kg; i.p.) ou salina (1ml/kg; i.p.). Duas 2 horas após a administração de LPS ou salina, os animais foram perfundidos com salina heparinizada seguido de paraformaldeído 4% (aproximadamente 200 mL). Em seguida os cérebros foram processados para a realização de imunohistoquímica a fim de avaliar a expressão da proteína Fos como descrito anteriormente. As áreas analisadas foram MnPO dorsal, MnPO ventral, PVN e SON.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação da dose de LPS

Como pode ser observado no Gráfico 1 a administração de diferentes doses de LPS causa uma resposta bifásica, caracterizada por uma hipotermia seguida por febre. Ao se aumentar a dose de LPS aumenta-se a resposta de hipotermia, no entanto as respostas febris foram similares. A hipotermia tem seu nadir em aproximadamente 90 minutos após administração i.p. de LPS, já a febre começa aproximadamente 3 horas após LPS e é contínua até o final das 8 horas totais de avaliação.

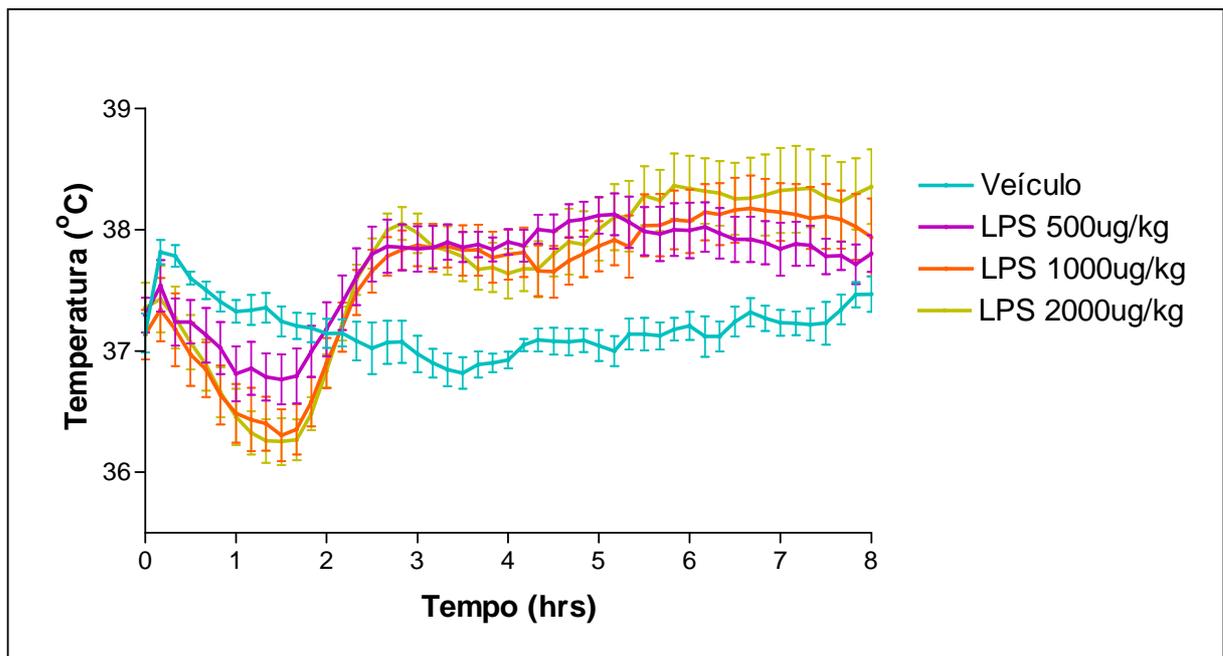


Gráfico 1- Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de LPS (500, 1000 e 2000µg/kg) ou veículo sobre a temperatura corpórea em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após o tratamento sendo que cada linha representa a temperatura (°C) dos ratos.

Fonte: Da autora.

A variação de temperatura durante as 8 horas de experimento é calculada com base na média da temperatura basal e mostrada no Gráfico 2.

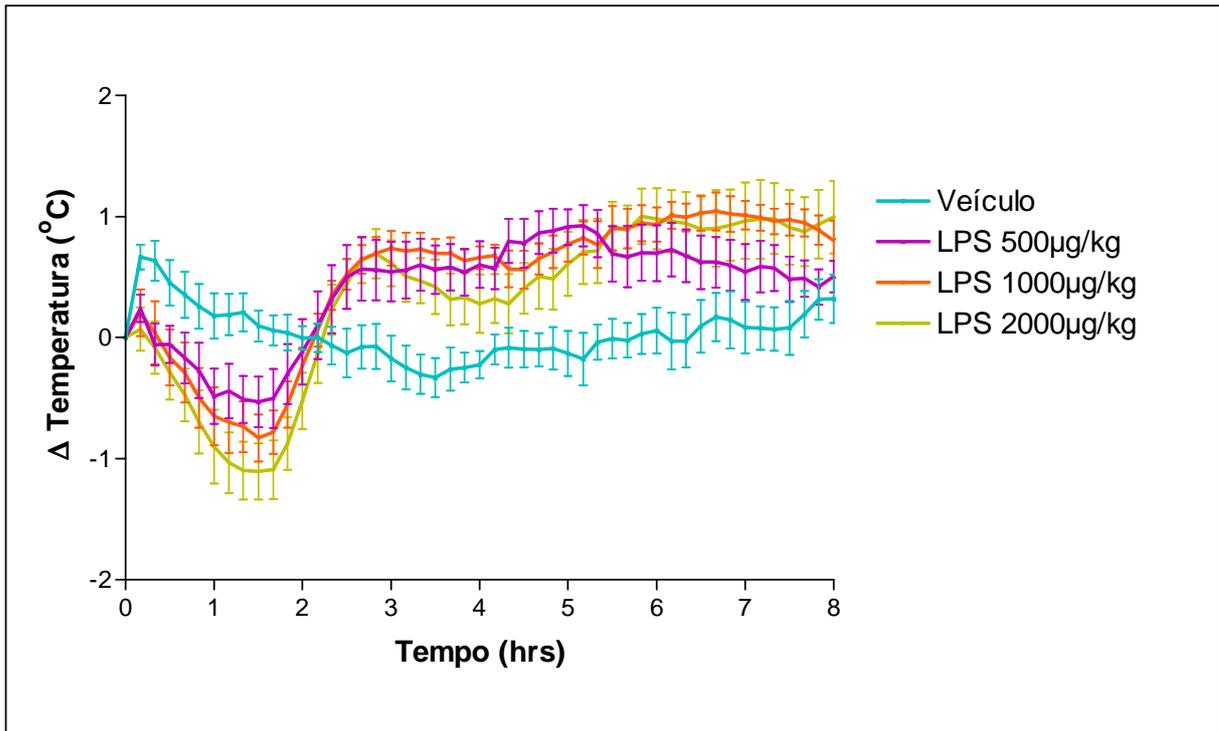


Gráfico 2- Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de LPS (500, 1000 e 2000 µg/kg) ou veículo sobre a variação da temperatura corpórea em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após o tratamento sendo que cada linha representa o delta de temperatura (°C) dos ratos.

Fonte: Da autora.

A partir do Gráfico 2 pode-se calcular o índice térmico do período de hipotermia e de febre, que correspondes respectivamente os tempo de 0 a 2 horas ( $\int_0^2$ ) e de 3 a 7 horas ( $\int_3^7$ ) que podem ser observados nos Gráficos 3 e 4, respectivamente.

Baseando-se nos gráficos e em estudos prévios, a dose escolhida (menor dose que causa evidente hipotermia) para os experimentos posteriores foi a de 1000 µg.

No gráfico 3 observamos o índice térmico do período de 0 a 2 horas após a administração de LPS nas doses de 1000 e 2000 ug/kg que provocaram uma redução do índice térmico quando comparado com o grupo controle ( $F_{3,27} = 4,474$ ;  $p < 0,05$ ), caracterizando a hipotermia provocada pelo LPS.

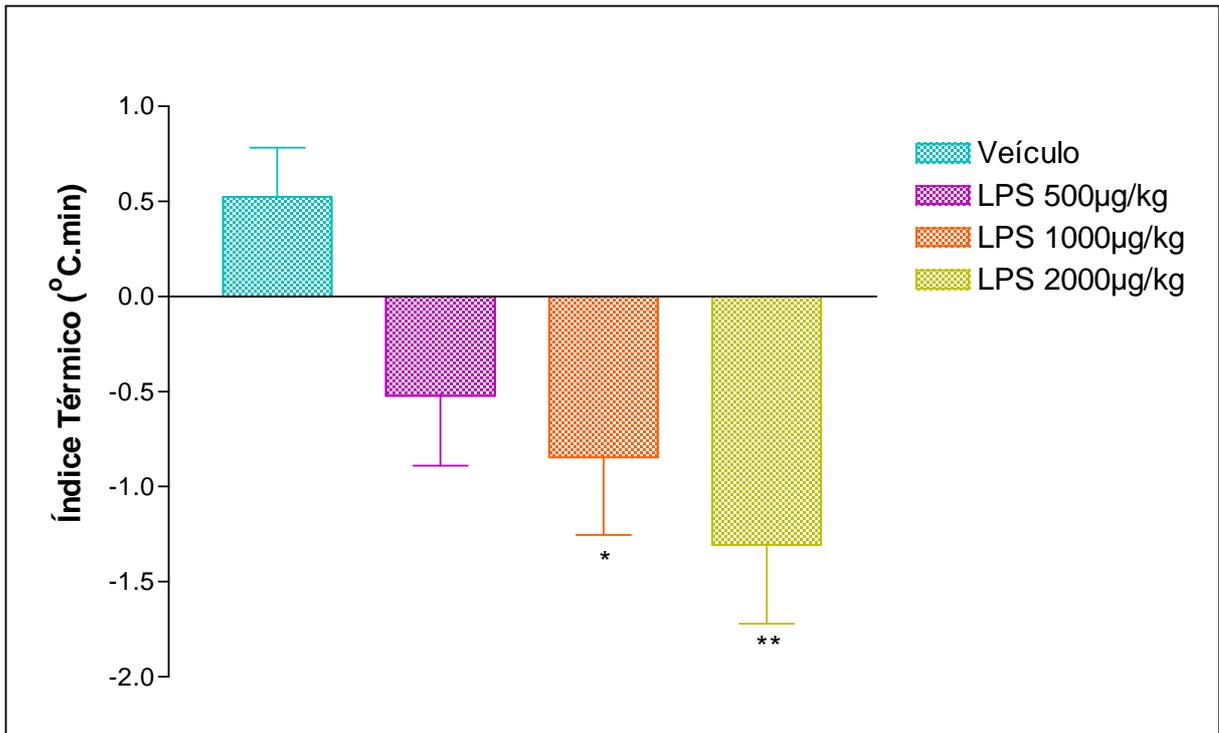


Gráfico 3- Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de LPS (500, 1000 e 2000µg/kg) ou veículo sobre a temperatura corpórea em ratos. O índice térmico (°C.min) referente a integral do gráfico 2 no período de 0 a 2 horas (hipotermia). Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 comparado com o grupo Veículo (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

O Gráfico 4 mostra o índice térmico do período de 3 a 7 horas após a administração de LPS. Os grupos tratados com LPS nas doses de 1000 e 2000 µg/kg apresentaram índice térmico maior que o controle ( $F_{3,27} = 4,054$ ;  $p < 0,0183$ ), ou seja, o LPS em altas doses causa febre nos animais.

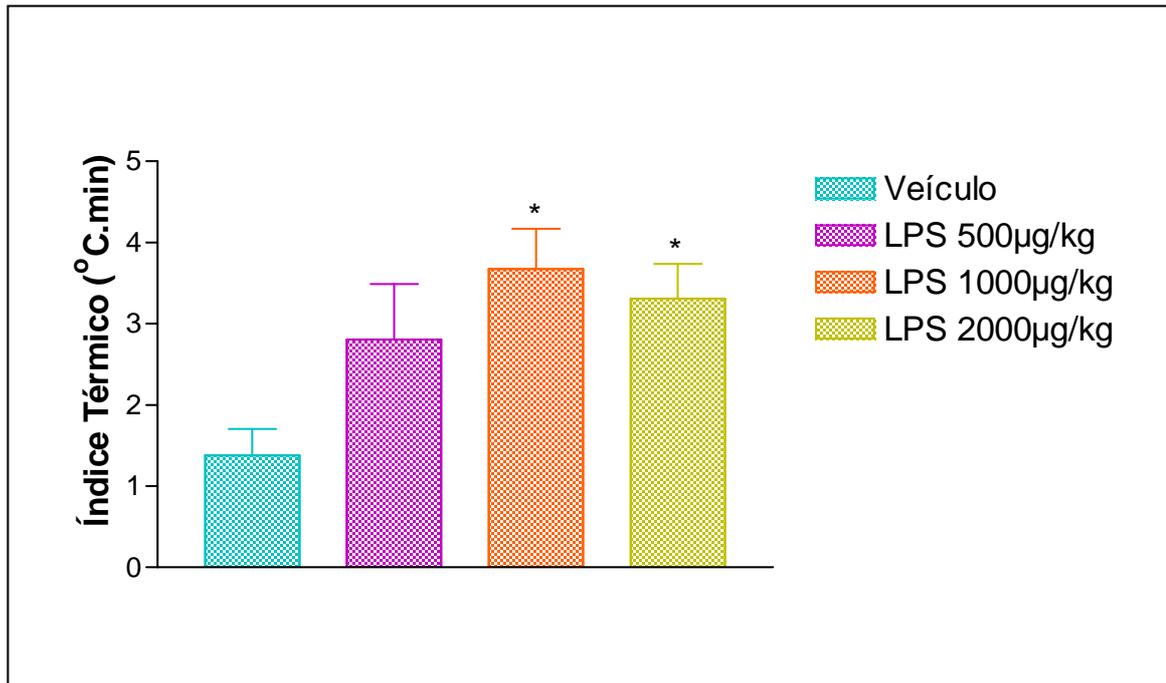


Gráfico 4- Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de LPS (500, 1000 e 2000µg/kg) ou veículo sobre a temperatura corpórea em ratos. O índice térmico (°C.min) referente a integral do gráfico 2 no período de 3 a 7 horas (febre). Valores expressos como média + SEM \* $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

#### 4.2 Efeito dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos

No Gráfico 5 observa-se o efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista  $CB_1$ ) ou veículo sobre a resposta de hipotermia e de febre provocada pelo LPS. O AM251 em conjunto com a administração de LPS causou aos animais uma hipotermia exacerbada e uma febre atenuada quando comparada aos animais controle e podem ser melhor analisados quando observamos a variação da temperatura (gráfico 6).

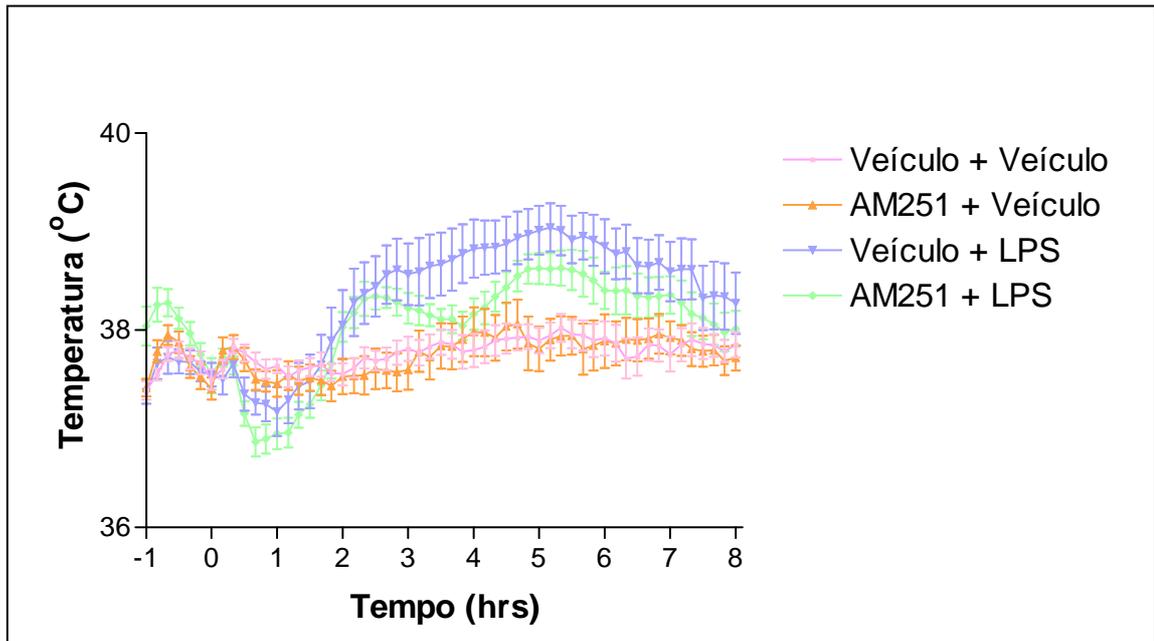


Gráfico 5- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo seguido de LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina na variação da temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após a administração de LPS sendo que cada linha representa a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos ratos. O tratamento com AM251 altera a resposta febril induzida pela seps, exacerbando a hipotermia e atenuando a posterior febre.

Fonte: Da autora.

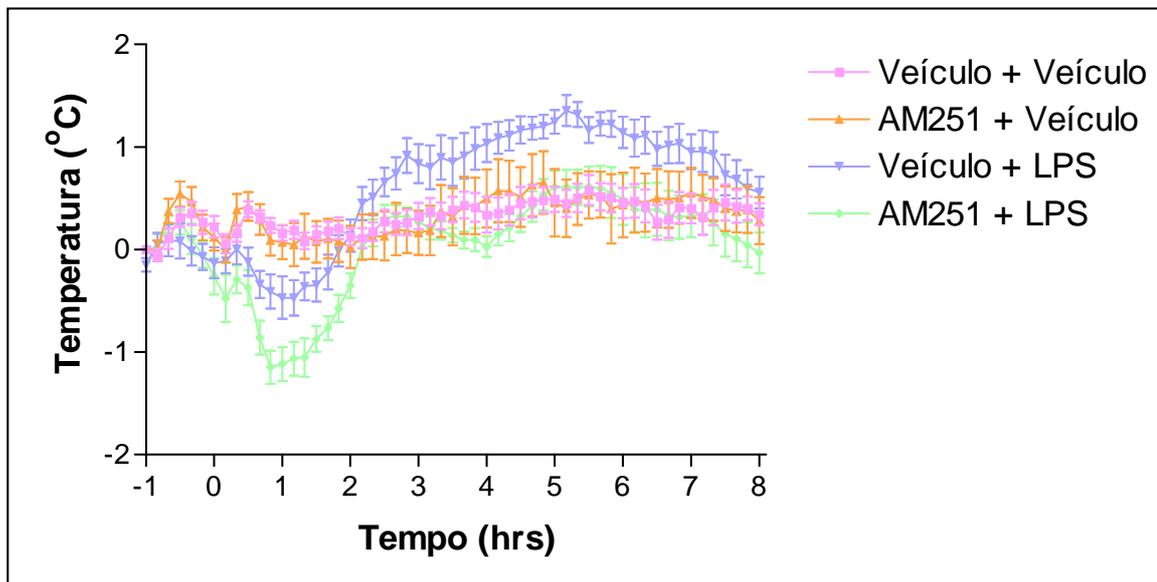


Gráfico 6- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo seguido de LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina na variação da temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após a administração de LPS sendo que cada linha representa a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos ratos. O tratamento com AM251 altera a resposta febril induzida pela seps, exacerbando a hipotermia e atenuando a posterior febre.

Fonte: Da autora.

A partir do Gráfico 6 pode-se obter o índice térmico do período de hipotermia (I.T.<sub>0-2</sub>) e de febre (I.T.<sub>3-7</sub>), conforme demonstrado nos Gráficos 7 e 8. No gráfico 7

observamos uma redução do I.T.<sub>0-2</sub> no grupo Veículo + LPS, quando comparado com o grupo Veículo + Veículo. A administração de AM251 não alterou a temperatura do animal tratado com veículo, porém acentuou a hipotermia do animal tratado com LPS ( $F_{3,39} = 13,27$ ;  $p < 0,0001$ ). No gráfico 8, no período de 3 a 7 horas após a administração de LPS (I.T.<sub>3-7</sub>) observa-se que a administração de Veículo + LPS provocou elevação da temperatura (febre), quando comparado com o grupo controle horas ( $F_{3,39} = 4,776$ ;  $p < 0,0067$ ). A administração de AM251 não alterou a temperatura do animal tratado com veículo, porém atenuou a febre do animal tratado com LPS.

O Gráfico 8 mostra que existe diferença estatística entre o grupo Veículo+Veículo e o grupo Veículo+LPS e entre o grupo Veículo + LPS e o grupo AM251+LPS de 3 a 7 horas ( $F_{3,39} = 4,776$ ;  $p < 0,0067$ ).

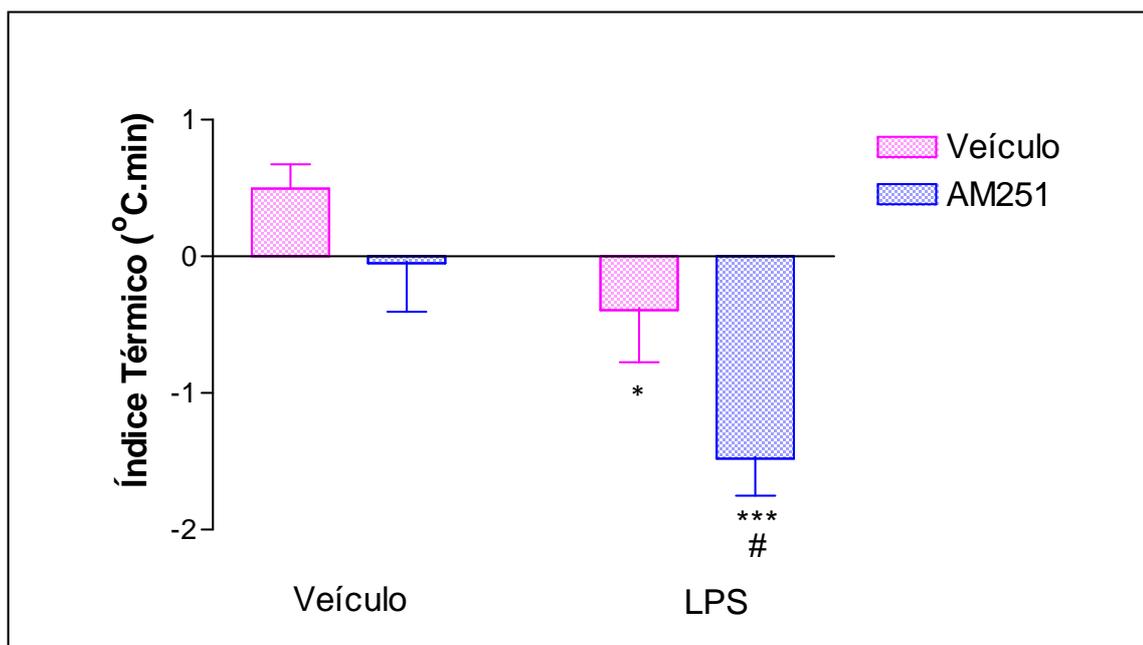


Gráfico 7- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo no índice térmico do período de 0 a 2 horas após os animais serem tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo Veículo + Veículo; # $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + LPS (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

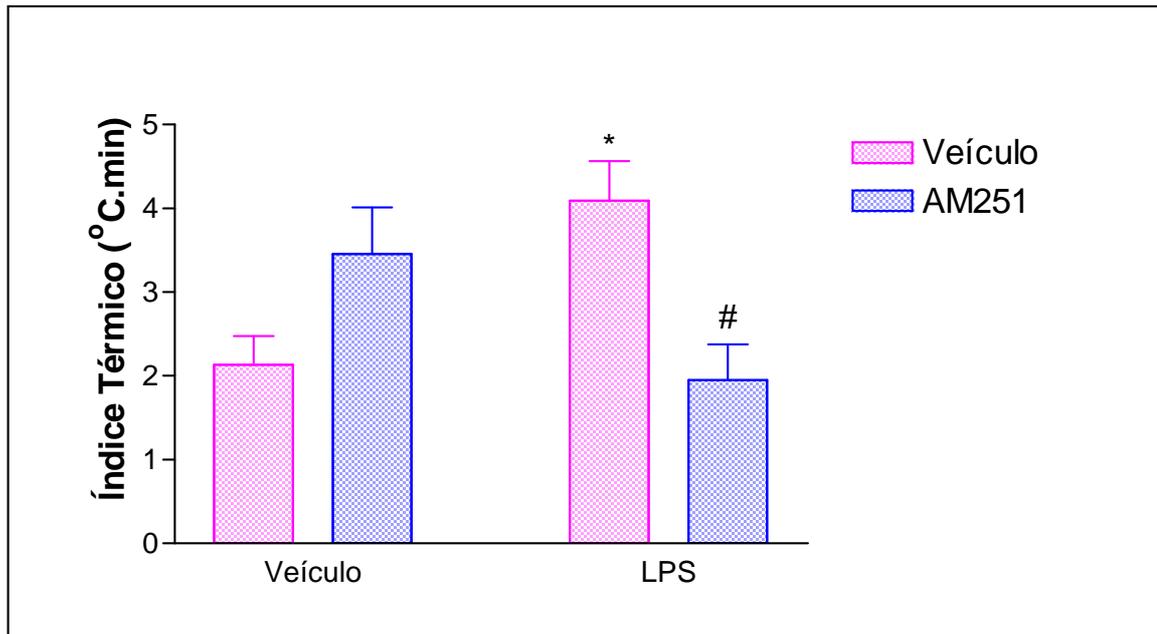


Gráfico 8- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo no índice térmico do período de 3 a 7 horas após os animais serem tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + Veículo; # $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + LPS (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

A AVP é considerada um agente antipirético endógeno e supõe-se que esteja envolvida nesta hipotermia exacerbada sendo liberada quando o sistema endocanabinóide está bloqueado. Nos Gráficos 9 e 10 conclui-se que existe a participação da vasopressina na termorregulação, pois ao se usar um antagonista do receptor V1 da vasopressina, a hipotermia que antes era exacerbada se modera, ou seja, a presença da vasopressina é importante para regular a hipotermia induzida pela sepsis.

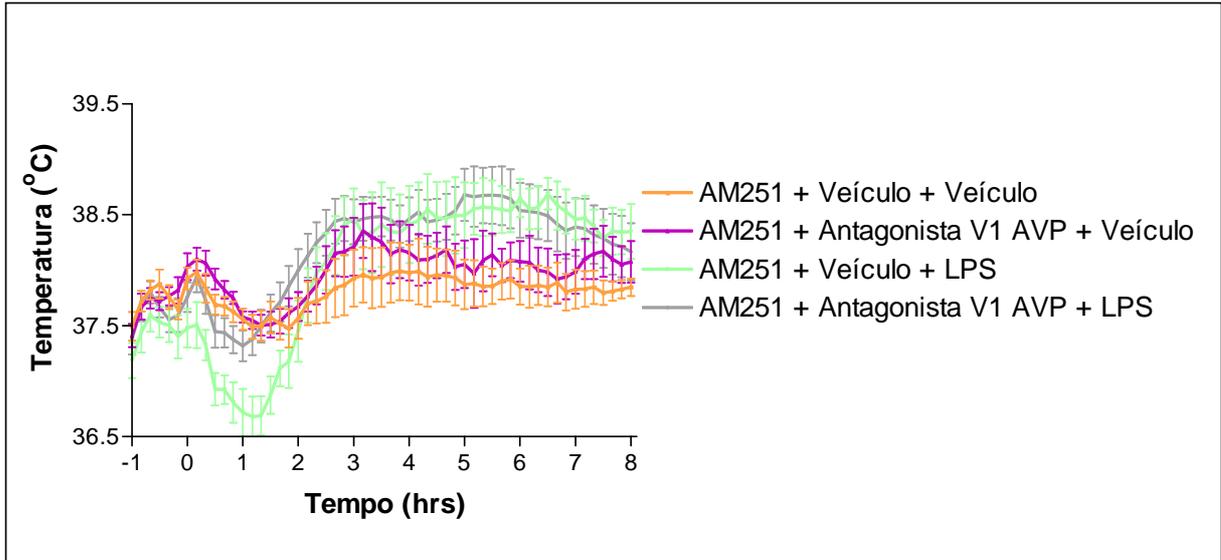


Gráfico 9- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo, seguida 45 min após de tratamento com antagonista V1 AVP (dose 500 ng/5 µL; i.c.v.) ou veículo e de LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina 15 min após na temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada por até 8 horas após a administração de LPS.

Fonte: Da autora.

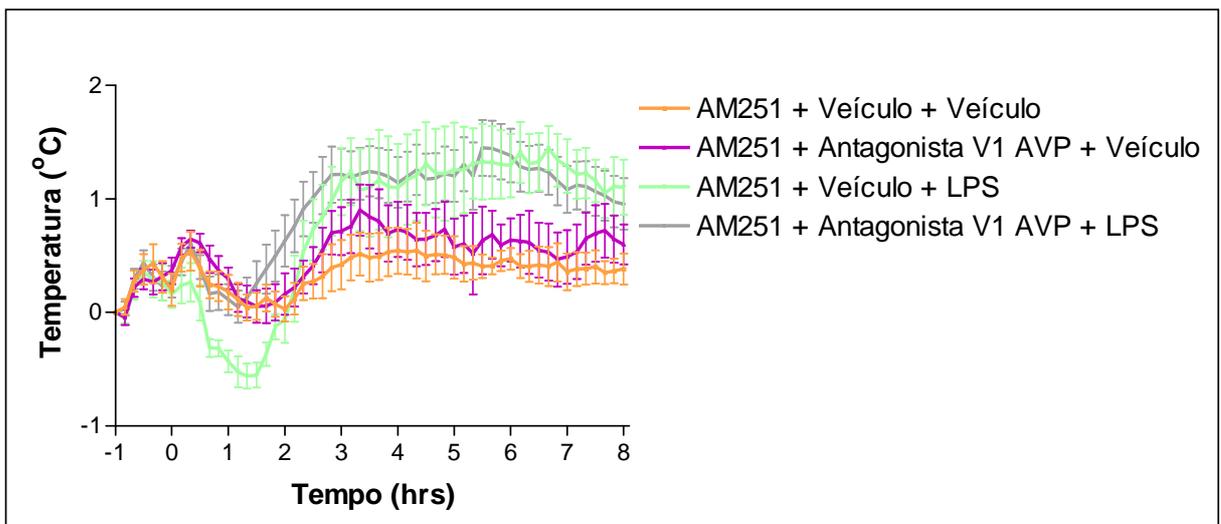


Gráfico 10- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo, seguida 45 min após de tratamento com antagonista V1 AVP (dose 500 ng/5 µL; i.c.v.) ou veículo e de LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina 15 min após na variação da temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada por até 8 após a administração de LPS.

Fonte: Da autora.

A partir do Gráfico 10 pode-se obter o índice térmico conforme demonstrado nos Gráficos 11 e 12. No Gráfico 11 observamos uma redução do I.T.<sub>0-2</sub> no grupo AM251 + Veículo + LPS, quando comparado com o grupo AM251 + Veículo + Veículo. A administração de AM251 não alterou a temperatura do animal tratado com veículo, porém acentuou a hipotermia do animal tratado com LPS e isso foi revertido pela administração do antagonista V1 AVP ( $F_{3,32} = 3,671$ ;  $p < 0,0234$ ). A

hipotermia existente foi revertida pela presença do antagonista V1 da vasopressina, isso indica sua participação na termorregulação durante a sepse. No período de 3 a 7 horas após a administração de LPS (I.T.<sub>3-7</sub>) observa-se que os tratamentos não alteraram a temperatura, porém percebe-se que existe uma tendência dos grupos tratados com LPS possuírem um maior índice térmico.

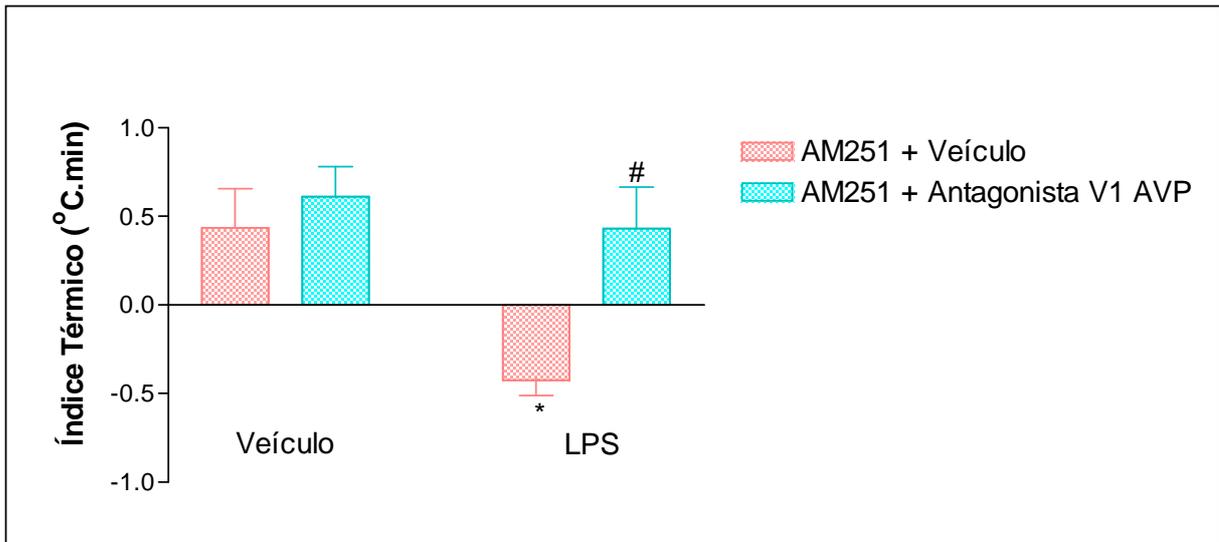


Gráfico 11- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo, seguida 45 min após de tratamento com antagonista V1 AVP (dose 500 ng/5 µL; i.c.v.) ou veículo e de LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina 15 min após no índice térmico do período de 0 a 2 horas em ratos. Valores expressos como média ± SEM \*p<0,05 comparado com o grupo AM251 + Veículo + Veículo; #p<0,05 comparado com o grupo AM251 + Veículo + LPS (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

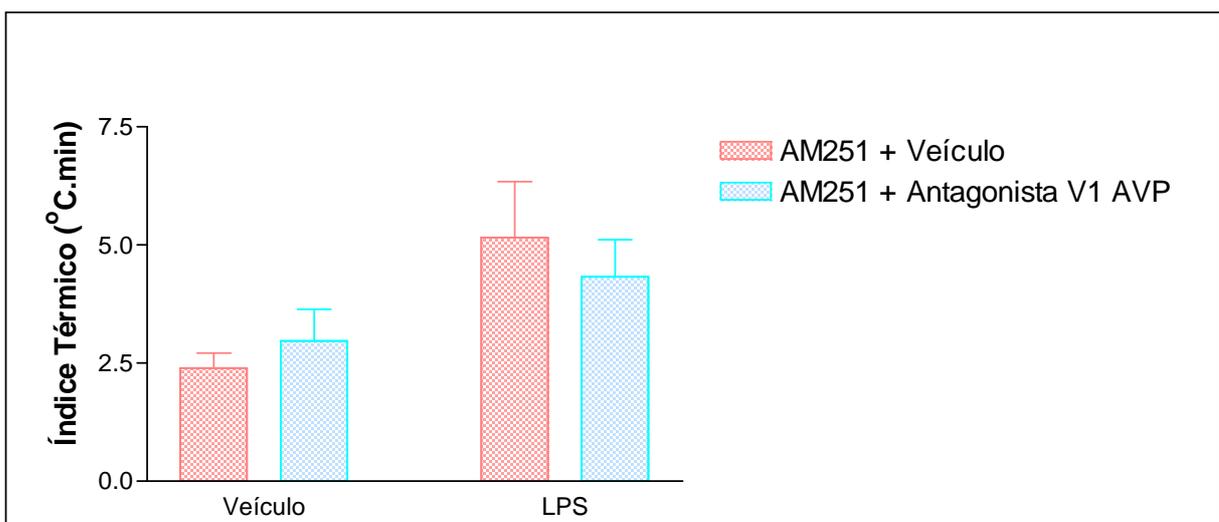


Gráfico 12- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo, seguida 45 min após de tratamento com antagonista V1 AVP (dose 500 ng/5 µL; i.c.v.) ou veículo e de LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina 15 min após no índice térmico do período de 3 a 7 horas em ratos.

Fonte: Da autora.

Já a administração do AM404, que aumenta a disponibilidade de endocanabinóides, mostra uma menor hipotermia seguida de uma febre exacerbada. Isso condiz com os experimentos anteriores, pois agora que há disponibilidade de endocanabinóides, há também a inibição de liberação de neurotransmissores. No caso específico da AVP, não haverá sua liberação, fazendo com que a hipotermia seja branda conforme pode ser visto nos Gráficos 13 e 14.

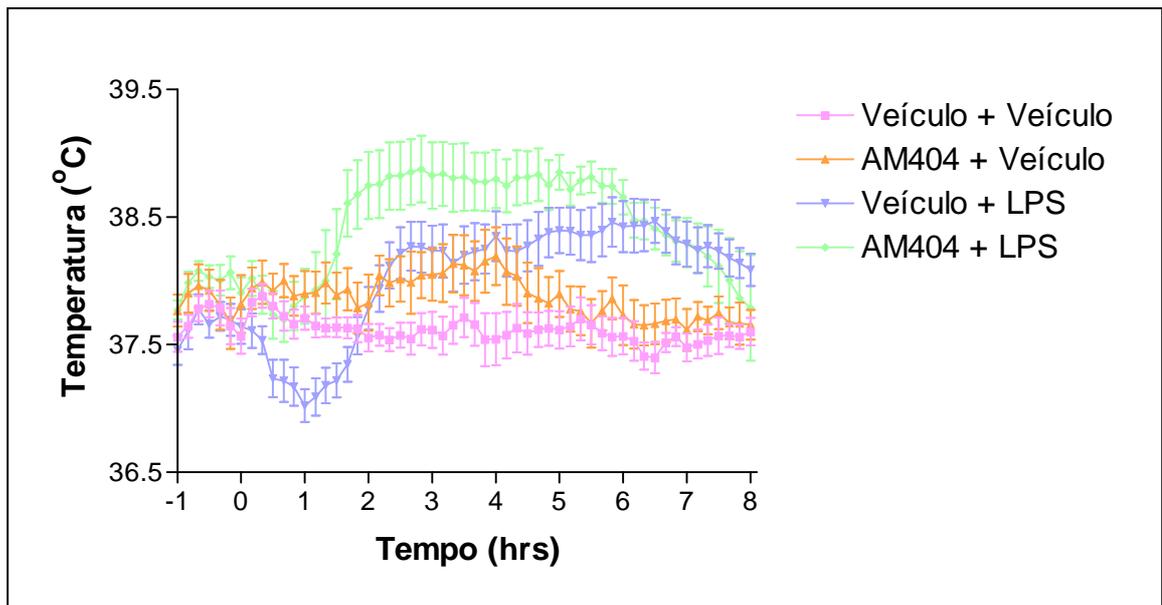


Gráfico 13- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10 µg/5 µL; i.c.v.) ou veículo seguido de LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina na temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após a administração de LPS sendo que cada linha representa a temperatura (°C) dos ratos. O tratamento com AM404 altera a resposta febril induzida pela sepse, atenuando a hipotermia e exacerbando a posterior febre.

Fonte: Da autora.

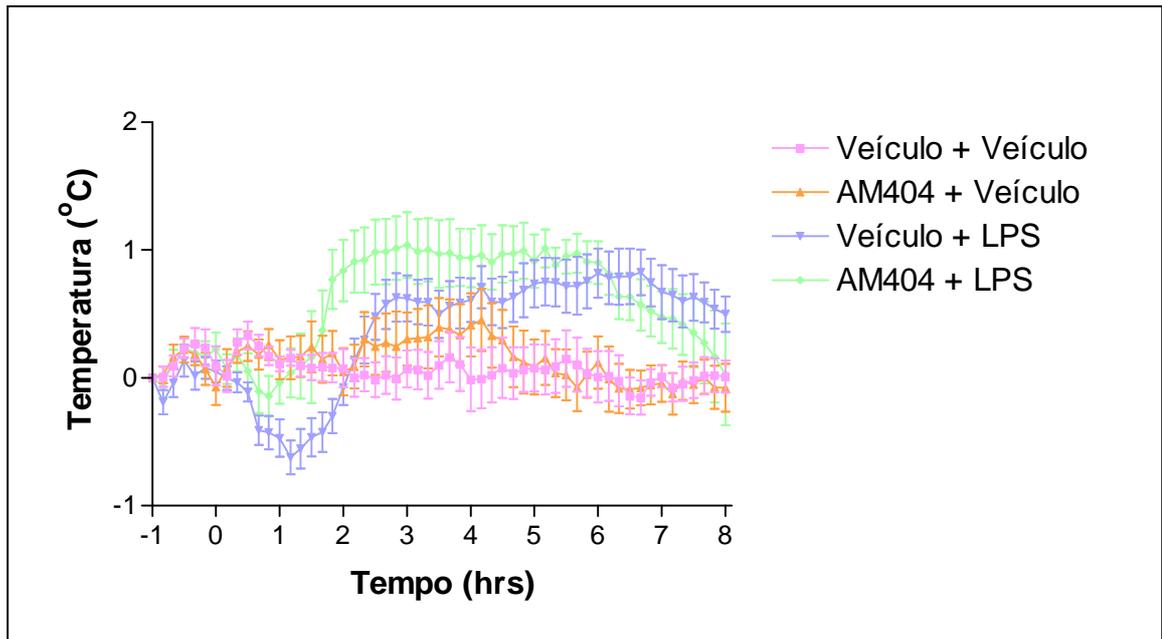


Gráfico 14- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ ; i.c.v.) ou veículo seguido de LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina na variação da temperatura em ratos. A temperatura foi mensurada até 8 horas após a administração de LPS sendo que cada linha representa a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos ratos. O tratamento com AM404 altera a resposta febril induzida pela sepse, atenuando a hipotermia e exacerbando a posterior febre.

Fonte: Da autora.

A partir do Gráfico 14 pode-se obter o índice térmico conforme demonstrado nos Gráficos 15 e 16. O Gráfico 15 mostra que o grupo tratado com AM404 reverteu a hipotermia induzida por LPS no I.T.<sub>0-2</sub> ( $F_{3,42} = 4,332$ ;  $p < 0,001$ ). O Gráfico 16 mostra que o grupo com sepse e pré-tratado com AM404 exibiu uma febre mais exacerbada que a febre dos animais tratados somente com o LPS no I.T.<sub>3-7</sub> ( $F_{3,42} = 5,390$ ;  $p < 0,0034$ ).

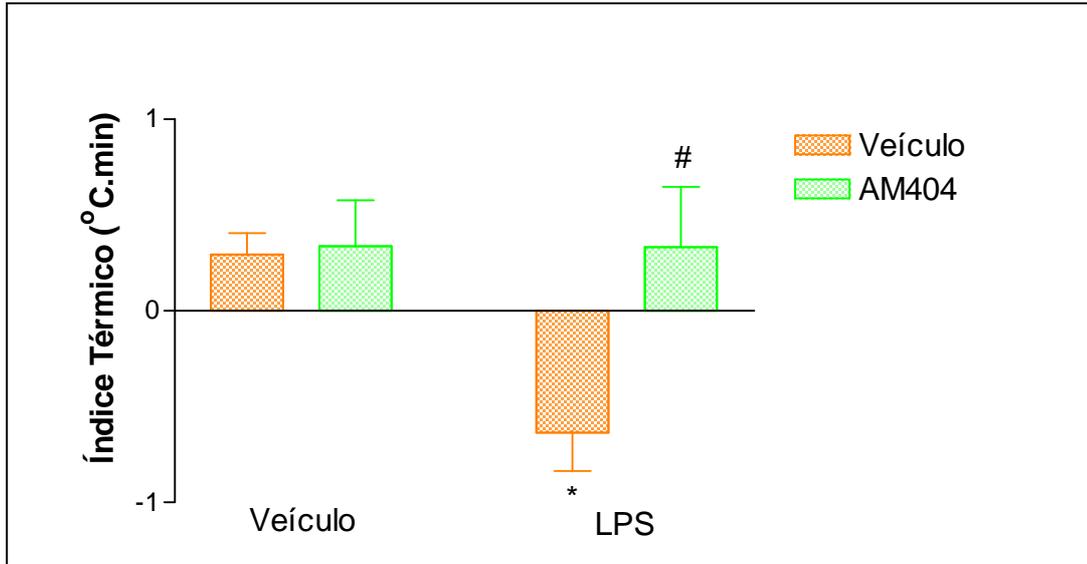


Gráfico 15- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ , i.c.v.) ou veículo no índice térmico do período de 0 a 2 horas após os animais serem tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}$ , ip) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + Veículo; # $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + LPS (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

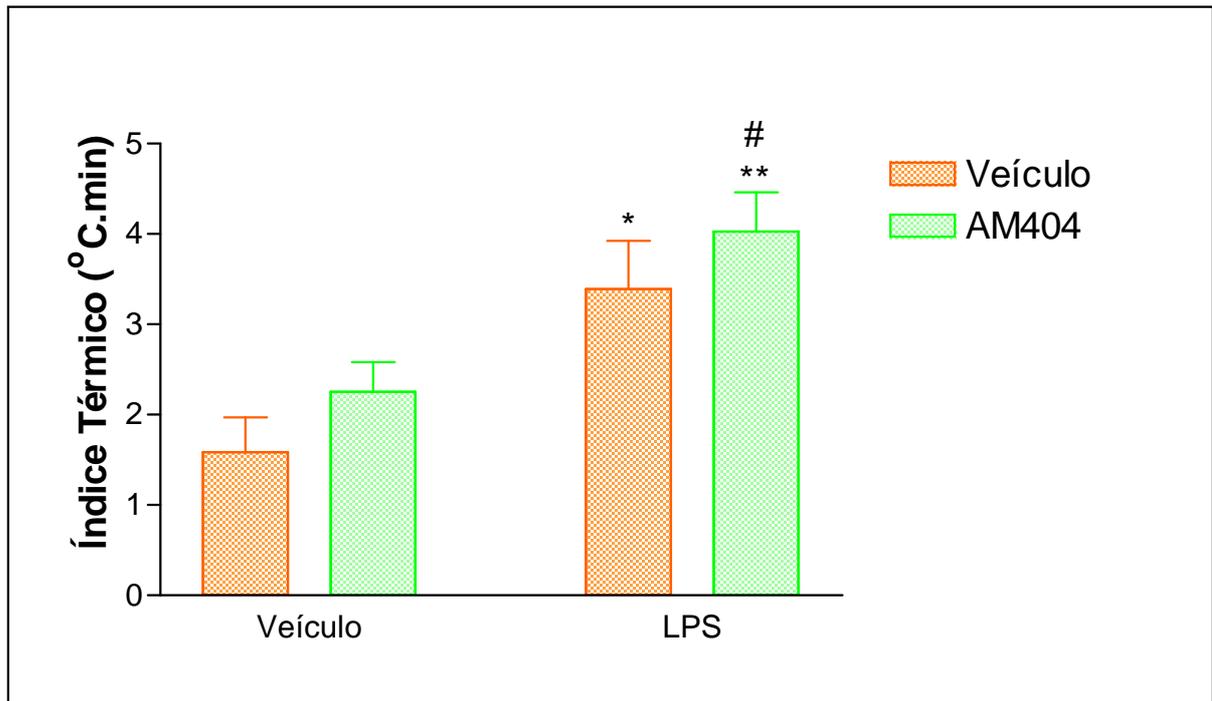


Gráfico 16- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ , i.c.v.) ou veículo no índice térmico do período de 3 a 7 horas após os animais serem tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}$ , ip) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo Veículo + Veículo; # $p < 0,05$  comparado com o grupo Veículo + LPS (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

### 4.3 Efeito dos endocanabinóides na interação social

O teste de interação social de 2 horas após administração de Veículo ou LPS indicou que o AM251 não alterou o comportamento do animal tratado. Já o animal tratado com AM404 quando exposto ao desafio imunológico demonstrou uma menor interação social mesmo comparado com o animal tratado somente com o LPS. Sugere-se então que o sistema endocanabinóide esteja relacionado nessa característica do comportamento doentio.

Conforme descrito na literatura os animais tratados com LPS possuem comportamento diferente dos animais tratados com Veículo, chamado comportamento doentio, conforme pode ser visto nos Gráficos 17 e 18.

Os grupos tratados com LPS desenvolveram um menor comportamento de interação social, o qual é evidente nos grupos tratados com Veículo ( $F_{3,50} = 11,76$ ;  $p < 0,001$  quando comparado Veículo + LPS e Veículo + Veículo;  $p < 0,0001$  quando comparado AM251 + LPS e AM251 + Veículo). O AM251 não alterou o comportamento doentio apresentado em animais com sepse. Portanto, o bloqueio da sinalização endocanabinóide, utilizando-se o antagonista do receptor  $CB_1$ , não interferiu na interação social.

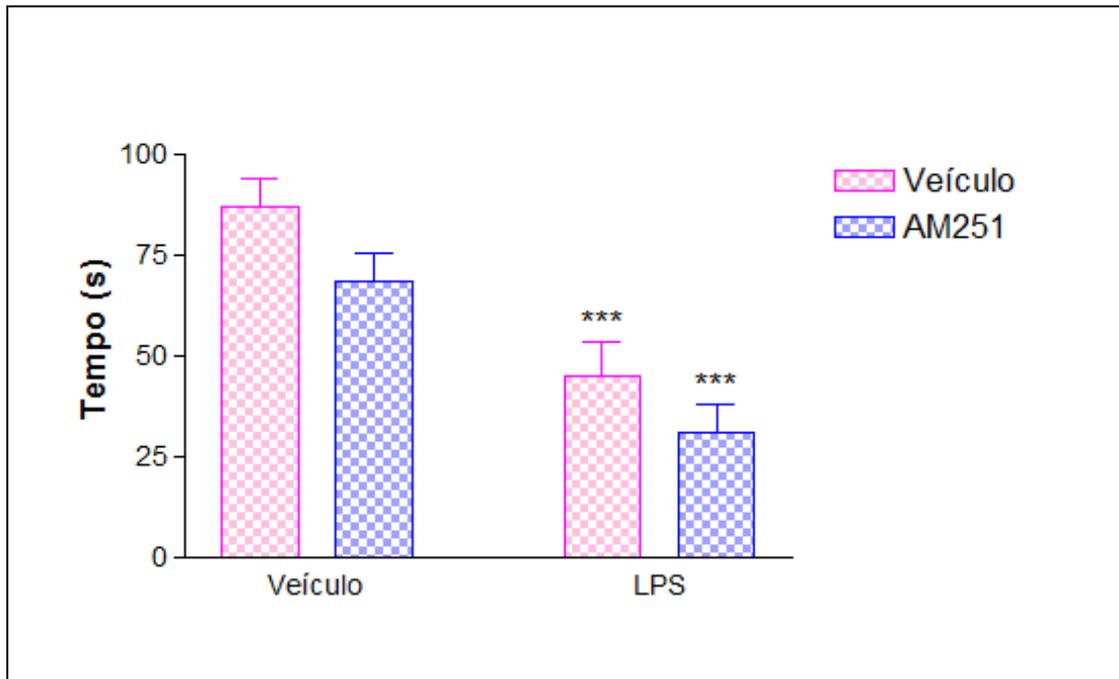


Gráfico 17- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo na interação social de 02 horas após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p<0,001 comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

Os grupos tratados com LPS desenvolveram redução da interação social evidenciado pelo menor tempo de interação com o animal intruso quando comparados com os grupos tratados com Veículo ( $F_{3,39} = 8,322$ ;  $p < 0,05$ ).

O AM404 alterou o comportamento doentio apresentado em animais com sepse, acentuando-o. Portanto, possivelmente a presença de uma maior disponibilidade de endocanabinóides interferiu na interação social (WISKERKE et al., 2012).

Pode-se observar que os animais tratados com LPS interagem menos como forma de poupar energia para tentar restabelecer sua homeostase, e nesse caso os animais tratados com o AM404 também pouparam energia.

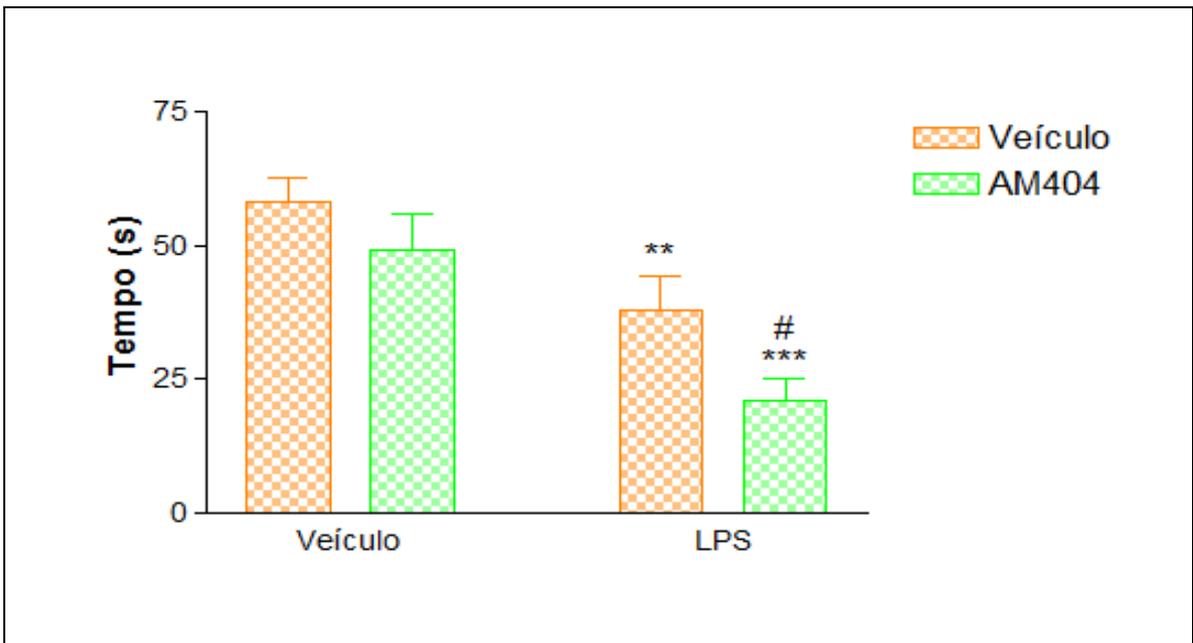


Gráfico 18- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 10 µg/5 µL, i.c.v.) ou veículo na interação social de 02 horas após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01 comparado com o grupo Veículo + Veículo; #p<0,05 comparado com o grupo Veículo + LPS (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

Quando se analisa a interação social 24 horas após o estímulo conclui-se que os animais apresentam comportamento de animais saudáveis, isso demonstra que depois de 24 horas o LPS já não causa mais seus efeitos, conforme pode ser visto nos Gráficos 19 e 20.

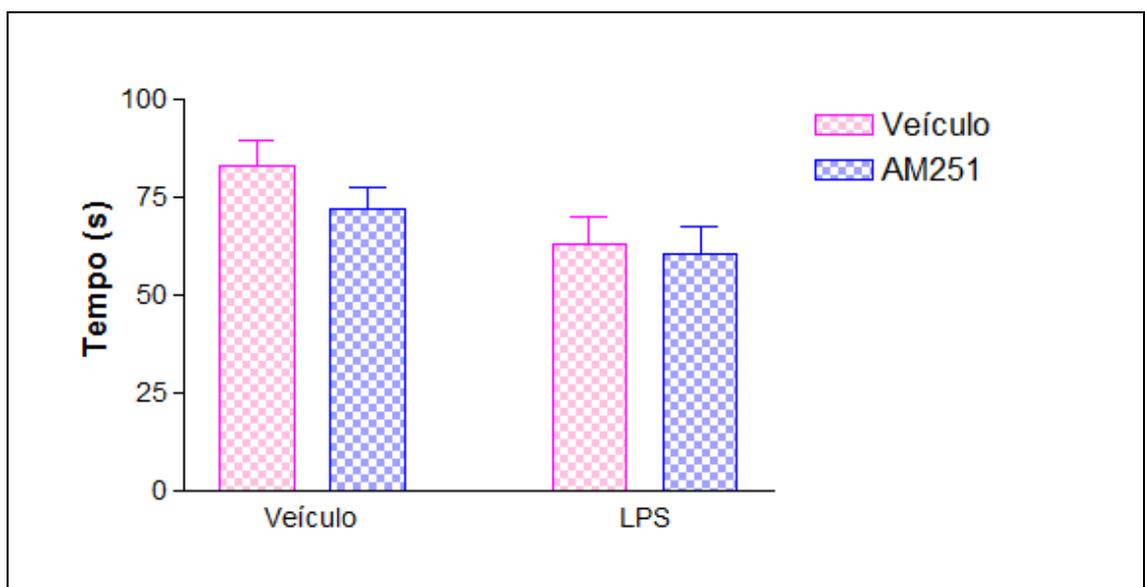


Gráfico 19- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo na interação social de 02 horas após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina.

Fonte: Da autora.

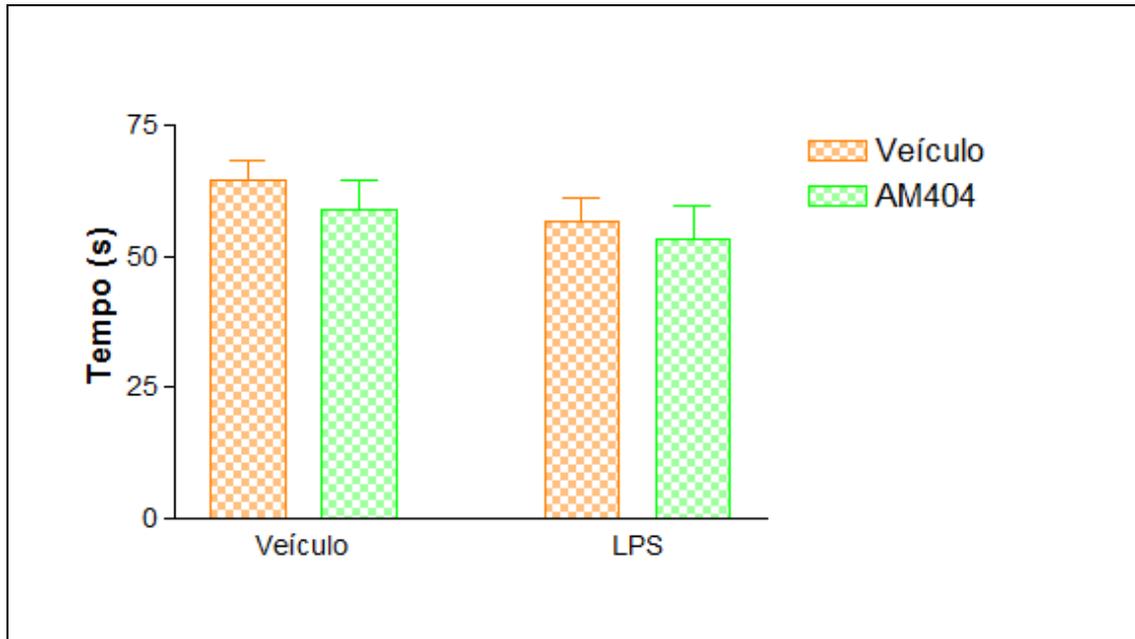


Gráfico 20- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10 µg/5 µL, i.c.v.) ou veículo na interação social de 02 horas após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. Fonte: Da autora.

#### 4.4 Efeito dos endocanabinóides no ganho de peso e ingestão alimentar

O ganho de peso e a ingestão alimentar fazem parte das características avaliadas no comportamento doentio. O ganho de peso e a ingestão alimentar não foram alterados quando administrou-se o AM251, conforme pode ser visto nos Gráficos 21 e 22. Os animais tratados com LPS apresentaram o comportamento de menor ganho de peso e menor ingestão alimentar quando comparados com o grupo tratado com o Veículo ( $F_{3,32}=26,98$ ;  $p<0,001$ ). A administração do pré-tratamento com AM251 não alterou este comportamento (Gráfico 21).

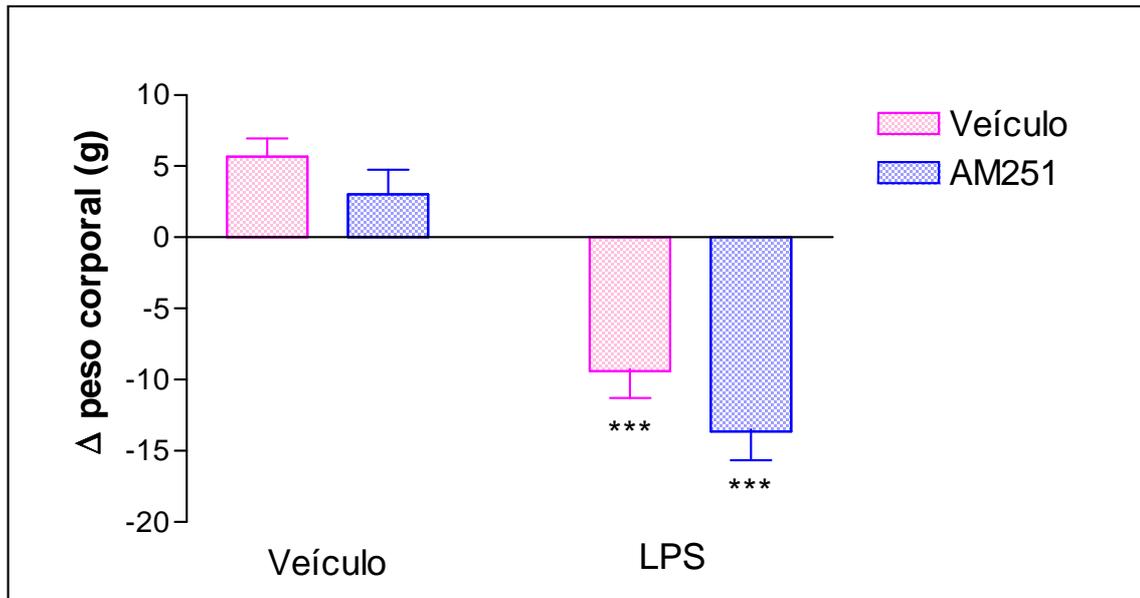


Gráfico 21- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , i.c.v.) ou veículo no ganho de peso após os animais serem tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina. O AM251 não alterou esse comportamento. Os animais tratados com LPS exibiram o comportamento doentio como esperado. Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

Os grupos tratados com LPS apresentaram menor ganho de peso e ingestão alimentar, o qual não é percebido nos grupos tratados com Veículo ( $F_{3,40} = 49,60$ ;  $p < 0,05$  após 24 horas o estímulo). O AM251 não alterou este comportamento nos animais com sepse. Portanto, o bloqueio dos receptores  $\text{CB}_1$  não interferiu tanto no ganho de peso quanto na ingestão.

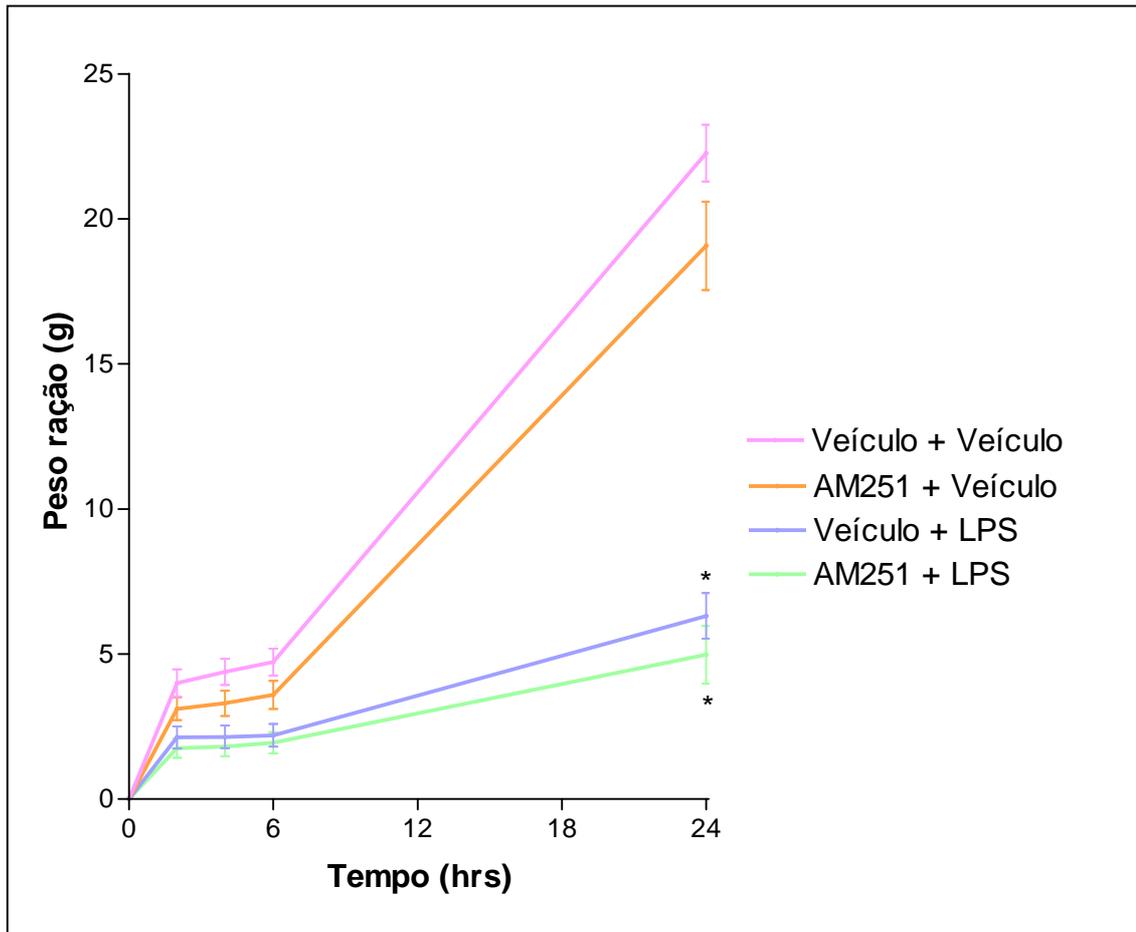


Gráfico 22- Efeito do pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo na ingestão após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. O tratamento com AM251 não alterou a ingestão. Os animais tratados com LPS exibiram o comportamento doentio como esperado. Valores expressos como média ± SEM \*p<0,05 comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

O ganho de peso e a ingestão alimentar não foram alterados quando administrou-se o AM404, conforme pode ser visto nos Gráficos 23 e 24. Os animais tratados com LPS apresentaram o comportamento de menor ganho de peso e menor ingestão alimentar quando comparados com o grupo tratado com o Veículo ( $F_{3,32}= 49,47$ ;  $p<0,001$ ). A administração do pré-tratamento com AM404 não alterou este comportamento.

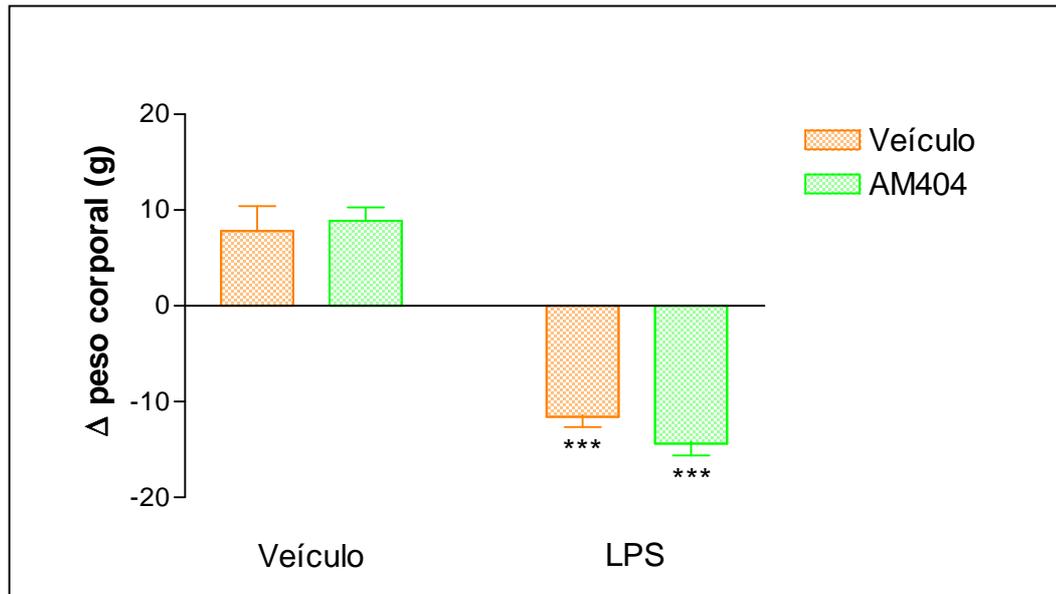


Gráfico 23- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10 µg/5 µL, i.c.v.) ou veículo no ganho de peso após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. O tratamento com AM404 não altera o ganho de peso. Os animais tratados com LPS exibiram o comportamento doentio como esperado. Valores expressos como média ± SEM \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

Os grupos tratados com LPS obtiveram menor ganho de peso e ingestão alimentar. No tempo de 4 horas os animais do grupo Veículo + LPS já começaram a exibir uma menor ingestão ( $F_{3,33} = 3,004$ ;  $p < 0,05$ ). No tempo de 6 horas os animais do grupo AM404 + LPS também começaram a exibir uma menor ingestão ( $F_{3,33} = 4,309$ ;  $p < 0,05$ ). No tempo de 24 horas tanto os animais do grupo Veículo + LPS quanto AM404 + LPS exibiram menor ingestão ( $F_{3,33} = 64,48$ ;  $p < 0,001$ ).

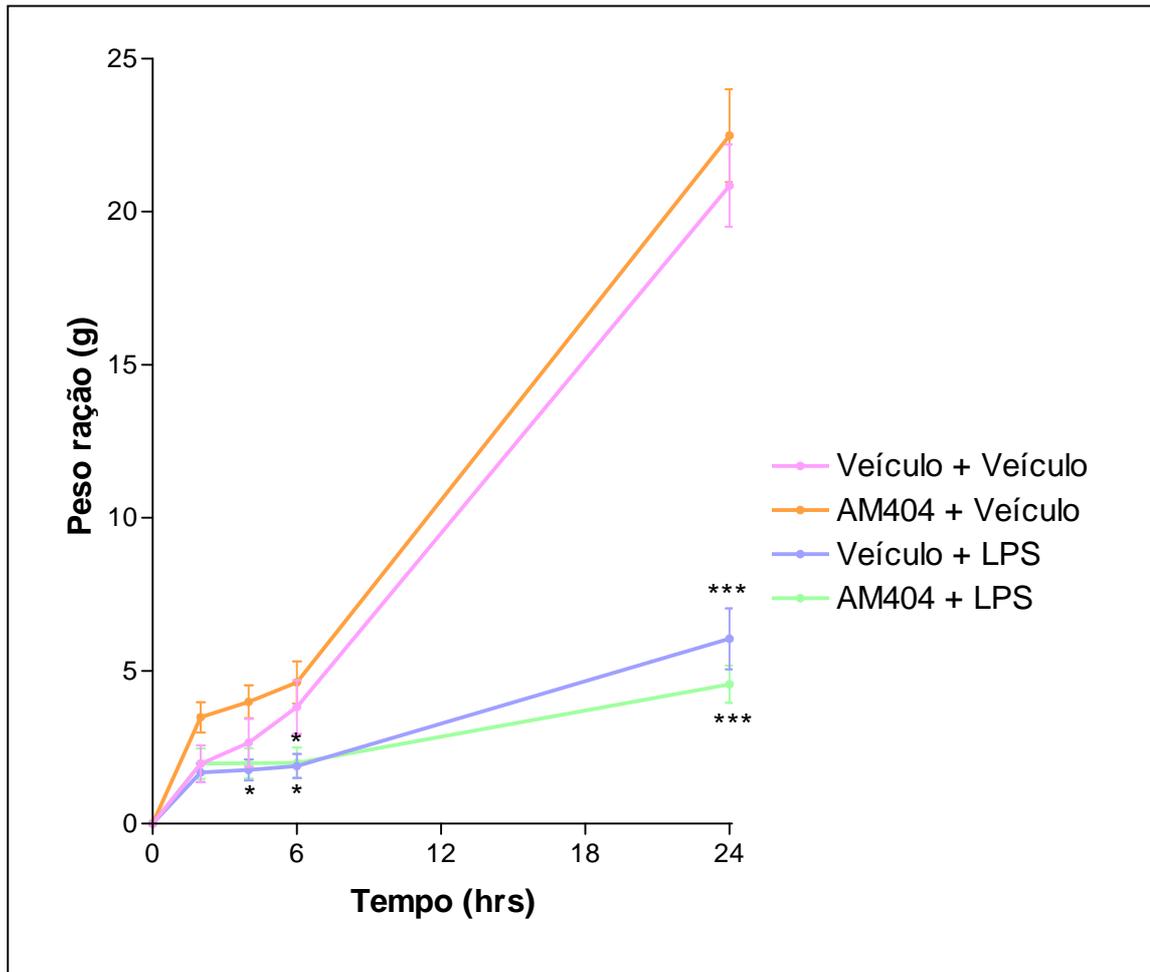


Gráfico 24- Efeito do pré-tratamento com AM404 (dose 10 µg/5 µL, i.c.v.) ou veículo na ingestão após os animais serem tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. O tratamento com AM404 altera a ingestão. Os animais tratados com LPS exibiram o comportamento doentio como esperado. Valores expressos como média ± SEM \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

O efeito de LPS nesse caso é perceptível, assim como no caso da interação social, pois o comportamento doentio também é visualizado. O animal tratado com LPS além de perder peso, ao contrário do animal tratado com veículo que ganhou, também ingeriu muito menos ração quando comparado ao grupo Veículo. Essa característica pode ser devida ao armazenamento de energia, pois para se alimentar o animal tem que se locomover e quando doente há preferência em permanecer parado estocando energia para restabelecer a homeostase.

Os parâmetros analisados relacionados ao comportamento doentio nos mostram que além da temperatura corpórea, a interação social também é alterado quando há modificações no sistema endocanabinóide. Já o ganho de peso e ingestão não estão inclusos nessa interação com o sistema endocanabinóide.

#### **4.5 Efeito da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal**

No Gráfico 25 pode-se observar que tanto os animais pré-tratados com AM251 quanto com Veículo e tratados com LPS aumentaram o número de células positivas para Fos no MnPO dorsal ( $F_{3,16} = 48,19$ ;  $p < 0,0001$ ) quando comparado com o grupo Veículo, sendo que o AM251 não altera esta resposta.

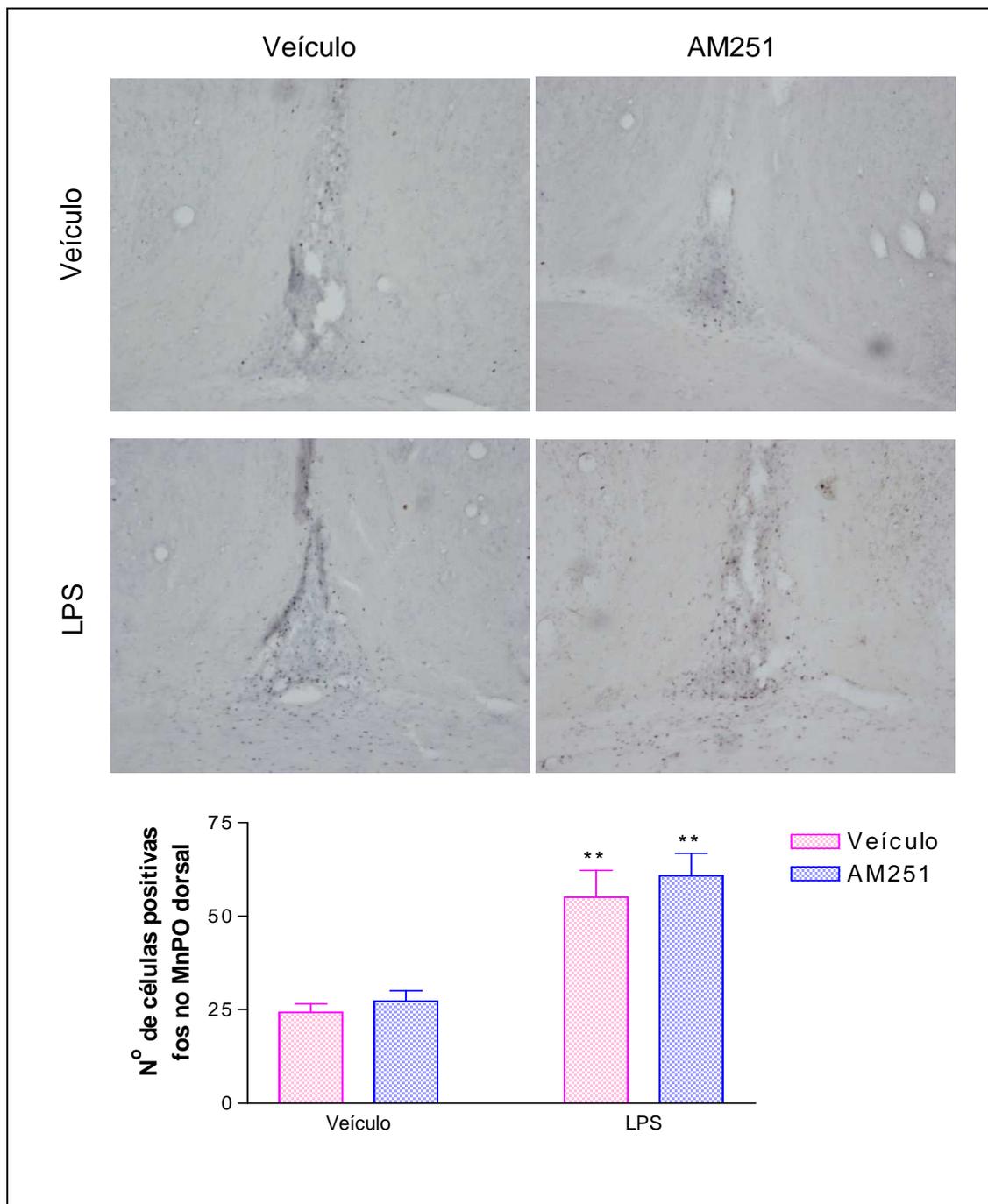


Gráfico 25- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no MnPO dorsal e seu respectivo gráfico. Pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo e em seguida tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. Escala: 100 µm. Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p<0,001 comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

No Gráfico 26 pode-se observar que tanto os animais pré-tratados com AM251 quanto com Veículo e tratados com LPS aumentaram o número de células positivas para Fos no MnPO ventral ( $F_{3,15}=13,81$ ;  $p<0,0003$ ) quando comparado com o grupo Veículo.

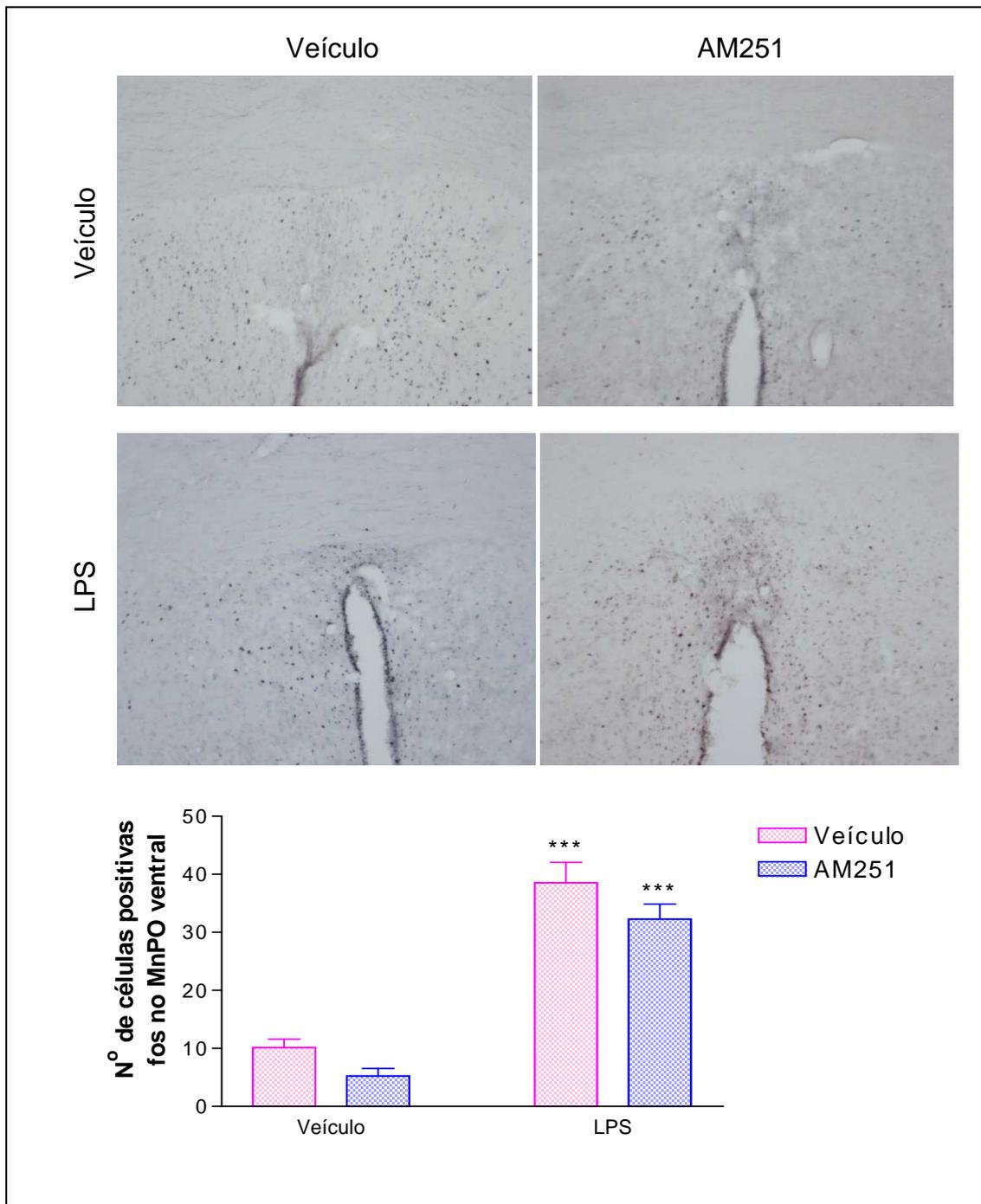


Gráfico 26- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no MnPO ventral e seu respectivo gráfico. Pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , i.c.v.) ou veículo e em seguida tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

No Gráfico 27 pode-se observar que o pré-tratamento com AM251 diminuiu o número de células positivas para Fos nos animais com sepse no PVN ( $F_{3,22} = 31,41$ ;  $p < 0,0001$ ) quando comparado com o grupo Veículo + LPS. O grupo AM251 + LPS e o grupo Veículo + LPS também se diferenciam estatisticamente do grupo controle. Houve interação entre o pré-tratamento e o tratamento ( $F_{1,19} = 6,948$ ;  $p < 0,05$ ).

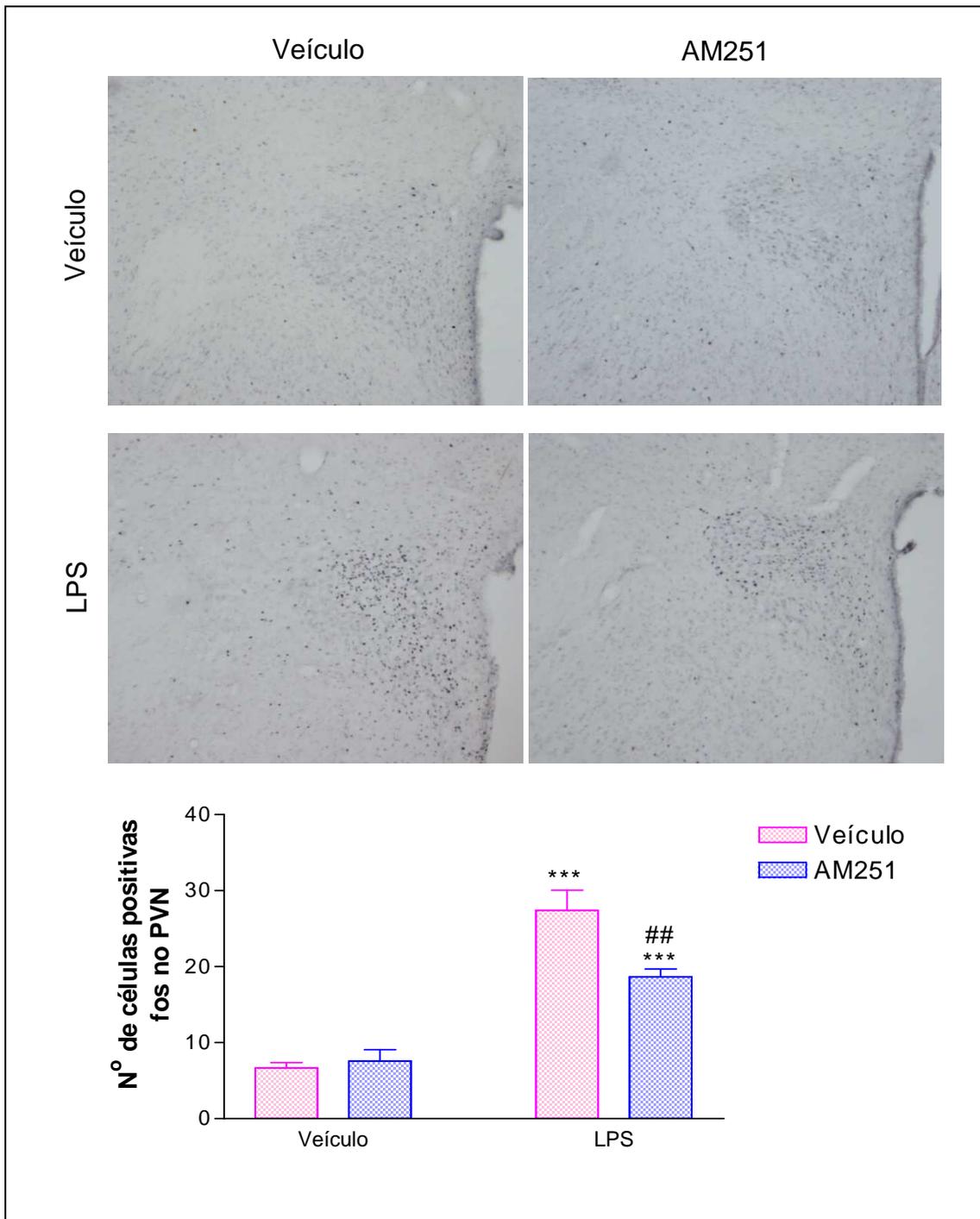


Gráfico 27- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no PVN e seu respectivo gráfico. Pré-tratamento com AM251 (dose 5 µg/µL, i.c.v.) ou veículo e em seguida tratados com LPS (1000 µg/kg; i.p.) ou salina. Escala: 100 µm. Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p<0,001 comparado com o grupo Veículo + Veículo; ##p<0,01 comparado ao grupo Veículo + LPS (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

No Gráfico 28 pode-se observar que tanto os animais pré-tratados com AM251 quanto com Veículo e tratados com LPS aumentaram o número de células

positivas para Fos no SON ( $F_{3,20} = 24,86$ ;  $p < 0,0001$ ) quando comparado com o grupo Veículo.

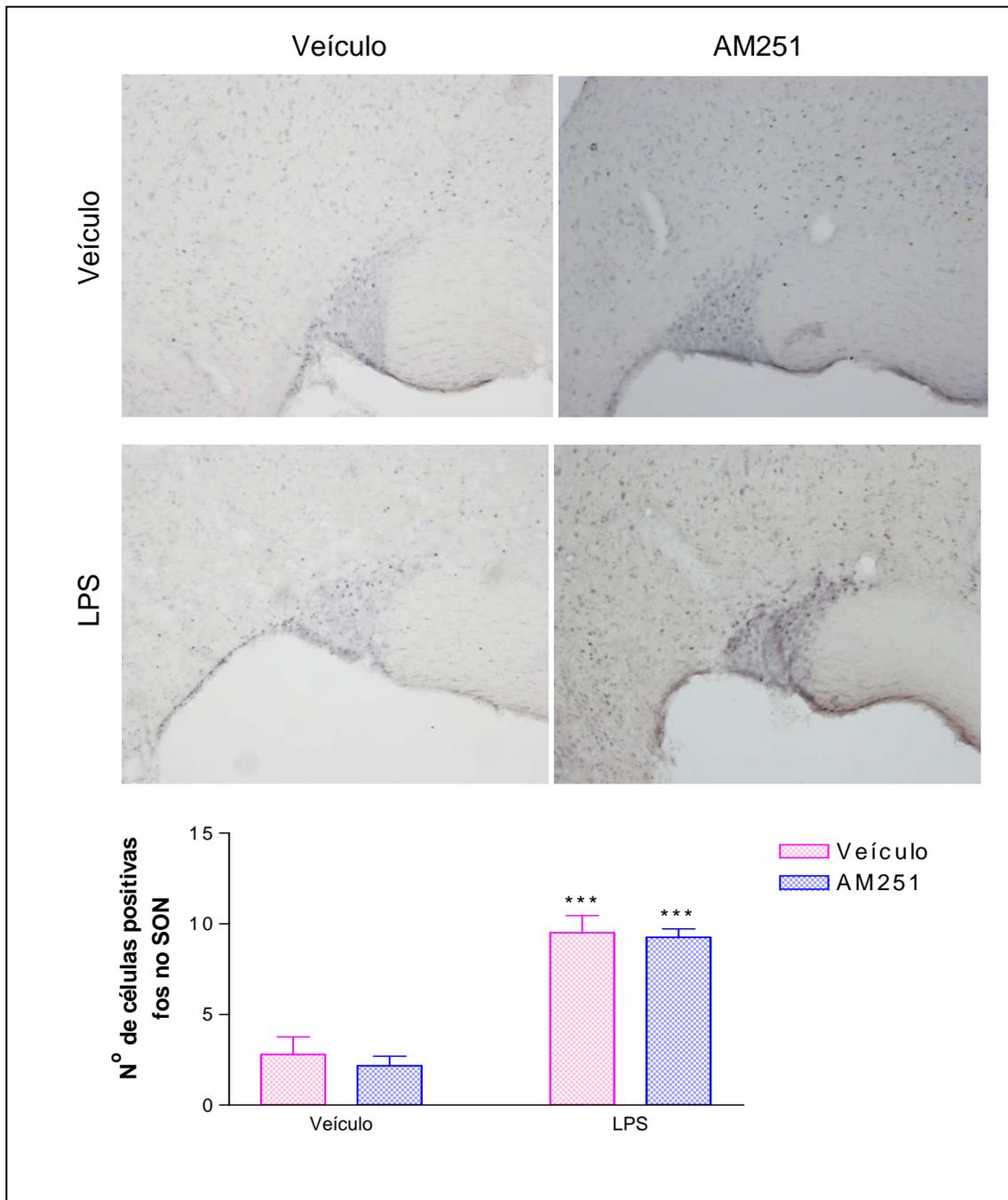


Gráfico 28- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de cérebros mostrando células positivas para fos no SON e seu respectivo gráfico. Pré-tratamento com AM251 (dose 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , i.c.v.) ou veículo e em seguida tratados com LPS (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou salina. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo Veículo + Veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Indução de hipotermia e febre pelo LPS

A resposta bifásica que acontece na sepse consiste em uma hipotermia seguida de febre (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; SAIA et al., 2013; SAIA et al., 2008). Essa mesma resposta foi observada em duas das três doses escolhidas de 500, 1000 e 2000 µg/kg. Elevadas doses de LPS (1000 e 2000µg) administradas perifericamente são suficientes para promover tanto hipotermia quanto febre.

Akarsu e Mamuk (2007) demonstraram que a dose de 250 µg causa uma pequena e ligeira hipotermia aproximadamente 2 horas após a administração do LPS, já Liu e colaboradores (2012) viram que ao se administrar 5000 µg perifericamente a resposta bifásica acontece notavelmente (BISON et al., 2009; ROMANOVSKY et al., 1998). A fim de elaborar uma curva de dose resposta escolheu-se as doses de 500, 1000 e 2000 µg/kg para escolher a que apresentasse resultados visíveis de hipotermia seguida de febre.

Al-Saffar e colaboradores (2013) viram que o LPS causa febre quando administrado tanto central quanto perifericamente, porém a hipotermia só foi visualizada com a administração periférica de LPS. A escolha pela administração i.p. de LPS é uma importante consideração a se fazer pois pode influenciar a termorregulação bem como a comunicação neuroimune (BASSI et al., 2012).

Outro fator crucial é a cepa da bactéria *E. coli* utilizada. Cada cepa possui suas características e pode causar sintomas mais ou menos evidentes, como por exemplo maior ou menor produção de prostaciclina e atividade da enzima conversora de angiotensina, entre outros (WATANABE e JAFFE, 1993). A cepa escolhida e utilizada pelo Laboratório de Ciências Fisiológicas da UNIFAL-MG é a 026:B6. Watanabe e Jaffe (1993) viram que as cepas de *E. coli* 055:B5 e 0111:B4 são mais potentes que 026:B6 quando estudada a produção de prostaciclina e a atividade enzima conversora de angiotensina. A cepa de *E. coli* 055:B5 produz somente febre enquanto que as cepas 0127:B8 e 0111:B4 produzem hipotermia seguida de febre, ou seja, realmente há diferenças quanto às respostas termorregulatórias e as cepas utilizadas (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 2000) . As

doses elevadas utilizadas justificam-se pela cepa com menor potência e que causam hipotermia ao animal.

A temperatura ambiente também deve ser considerada um importante fator no controle da termorregulação. Um problema existente no meio científico é que muitos experimentos são realizados em temperaturas ambiente muito divergentes (GOURINE et al., 2002). Nos estudos de Li e colaboradores (2003) a temperatura ambiente utilizada foi 22-25 °C, enquanto que Gourine e colaboradores (2002) utilizaram 29-31 °C. A resposta de termorregulação ao LPS depende da temperatura ambiente, sendo que uma diferença de poucos graus centígrados é suficiente para alterar a resposta drasticamente, por exemplo, a partir de hipotermia a febre (ROMANOVSKY et al., 1998; RUDAYA et al., 2005). A temperatura utilizada no presente estudo foi subneutra, ou seja, menor que a temperatura neutra dos ratos. Essa temperatura é utilizada para que possa haver o aparecimento de hipotermia. Em temperaturas maiores a hipotermia não é visualizada e a resposta é composta por 3 fases de febre (ALMEIDA et al., 2006).

No presente estudo a dose escolhida foi a de 1000 µg/kg de LPS i.p., pois essa dose resultou em hipotermia e febre, sendo que a hipotermia é o assunto de escolha em nosso trabalho.

## **5.2 Envolvimento dos endocanabinóides na temperatura corpórea em ratos**

A sepse causada pela administração de LPS pode ser visualizada através de várias alterações comportamentais que podem ser chamadas de comportamento doentio. No comportamento doentio os animais podem apresentar anorexia, anedonia, prostração, menor locomotividade e também o aparecimento da febre como descrito anteriormente (DE PAIVA et al., 2010; FABRICIO et al., 2005).

Os animais tratados com LPS apresentaram hipotermia seguida de febre, que é uma das alterações que ocorrem no comportamento doentio, e a administração de AM251 (antagonista CB1) além de atenuar a febre produzida pelo LPS, também aumentou a resposta hipotérmica.

A maioria dos processos biológicos está sujeita a um sistema de modulação endógena e o sistema endocanabinóide está incluso nessa modulação. Portanto, a sepse e o sistema endocanabinóide estão interligados.

A influência dos endocanabinóides no controle da regulação da temperatura corpórea durante a sepse é pouco abordada até agora. Estudos farmacológicos evidenciam os efeitos promovidos pelos canabinóides, incluindo antinocicepção, hipomotilidade, hipotermia, cataplexia, hiperfagia, e deterioração de processos de aprendizagem e memória (HILLARD, 2000; MURILLO-RODRÍGUEZ et al., 1998; STEIN et al., 1996; WILLIAMS; KIRKHAM, 2002).

A administração central e periférica da anandamida (endocanabinóide) induz mudanças comportamentais e celulares semelhantes aos promovidos por  $\Delta^9$ -THC. A maioria das alterações moleculares e de comportamento observados após a administração da anandamida é consequência da ativação dos receptores CB1 e CB2, esses efeitos podem ser bloqueados usando-se antagonistas específicos (MURILLO-RODRÍGUEZ, 2008).

Existem alguns antagonistas específicos para CB1 que são utilizados experimentalmente como rimonabant (SR141716) e AM251. Fraga e colaboradores (2009) realizaram experimentos a fim de analisar a contribuição do receptor central CB1 de canabinóides e os mecanismos envolvidos na resposta febril induzida por LPS. A administração sistêmica de LPS induziu febre nos animais, essa febre foi atenuada com o pré-tratamento com AM251 i.c.v. (5  $\mu$ g/1  $\mu$ L, mesma dose utilizada em nossos experimentos). Também foi mostrado que injeções i.c.v. unicamente de AM251 não alteraram a temperatura corpórea dos animais controle. Além disso, o tratamento com AM251 também atrasou o início da resposta febril ao LPS e o tempo necessário para o pico de seu efeito. Os endocanabinóides centrais parecem então desempenhar um papel relevante na termorregulação em animais com sepse (FRAGA et al., 2009).

Estudos relatam que o tratamento tanto sistêmico quanto central com canabinóides exógenos induz respostas hipotérmicas em roedores (HOLTZMAN et al, 1969; LOMAX; CAMPBELL, 1971; TAYLOR; FENNESSY, 1977; RAWLS et al, 2002). Da mesma forma, a administração sistêmica de anandamida em ratos pode causar respostas hipotérmicas, que são bloqueados por tratamento i.p. de antagonista do receptor CB1 SR141716A (CHAPERON; THIEBOT, 1999; COSTA et al., 1999). Inversamente, a administração de  $\Delta^1$ -THC ou  $\Delta^9$ -THC, ambos derivados

da *Cannabis*, causou efeitos duais em ratos, isto é, aumentos da temperatura corpórea em doses mais baixas, mas hipotermia profunda em doses mais elevadas (SOFIA, 1972; TAYLOR; FENNESSY, 1977).

Pesquisas indicam que a administração sistêmica do antagonista CB1 SR141716A impediu o desenvolvimento de febre induzida por LPS em ratos (BENAMAR et al., 2007). A mesma pesquisa descobriu que injeções periféricas de agonistas CB1 WIN-55212-2 ou  $\Delta^9$ -THC, em doses que não causam hipotermia per se, também inibiram a resposta febril ao LPS, e que o efeito antipirético de WIN-55212-2 (que também reduziu os níveis plasmáticos de IL-6), foi impedido por SR141716A. Os autores sugeriram que suas descobertas inesperadas poderiam talvez dever-se a uma atividade agonista parcial de SR141716A em receptores CB1. As conclusões diferentes, a respeito das mudanças de temperatura corpórea induzida periférica (BENAMAR et al., 2007) e central (FRAGA et al., 2009) através de injeções de agonistas e antagonistas do receptor CB1, podem indicar que endocanabinóides centrais e periféricos têm funções moduladoras específicas nas alterações da termorregulação induzidas por pirógenos.

Para melhor compreensão da fase hipotérmica induzida pela administração periférica de alta dose de LPS, a participação de neuromoduladores antipiréticos foi sugerido como nosso objetivo de estudo. Embora o mecanismo da regulação da hipotermia observada durante a sepse não seja completamente compreendido, é provável que resulte da interação de agentes pirogênicos e agentes antipiréticos. A AVP é um agente antipirético endógeno (PITTMAN et al., 1998; KOZAK et al., 2000; GIUSTI-PAIVA et al., 2003; ROTH et al., 2004). Uma elevação nos níveis plasmáticos de AVP tem sido associada com uma maior intensidade de hipotermia durante a endotoxemia (ROMANOVSKY et al., 2005). Derijk e Berkenbosch (1994) foram os primeiros a sugerir o envolvimento de AVP na hipotermia causada por LPS. Em seus estudos, esta hipotermia foi impedida por administração de um antagonista seletivo dos receptores de vasopressina V1 (2  $\mu$ g, i.c.v.). Oliveira-Pelegrin e colaboradores (2009) também relataram que a hipotermia foi relacionada com um aumento nos níveis plasmáticos de AVP em animais com punção e ligação cecal (cirurgia que também causa sepse). Isso sugere um papel da AVP na regulação da temperatura corpórea durante a sepse.

Experimentos forneceram provas de que a AVP funciona como uma substância endógena antipirética no sistema nervoso central (KASTING, 1989).

Injeção i.c.v. de PGE1 após injeção i.c.v. de um antagonista do receptor V1 da vasopressina produziu um aumento significativo na temperatura central (TANG, FEWELL; ELIASON, 1999). Da mesma maneira, em nossos experimentos observou-se que o antagonista do receptor V1 da vasopressina diminuiu a hipotermia induzida pelo LPS e exacerbada pela administração i.c.v. de AM251.

Terlouw e colaboradores (1996) demonstraram que a administração i.c.v. de AVP atenua a resposta de hipotermia. A resposta da temperatura, no entanto, não foi significativamente alterada pela administração i.c.v. unicamente de um antagonista do receptor V1 da vasopressina, sugerindo assim que em condições fisiológicas, a AVP não desempenha um papel na resposta à temperatura em ratos machos, somente quando há algum estímulo, como por exemplo o LPS.

Nas fases iniciais da sepse há um aumento acentuado nas concentrações plasmáticas de AVP. Com a progressão do quadro, por razões ainda não esclarecidas, esses níveis reduzem a concentrações próximas às basais mesmo permanecendo os sinais clínicos e laboratoriais de sepse (BRACKETT; SCHAEFER, 1985; LANDRY; LEVIN, 1997; SHARSHAR; BLANCHARD, 2003).

Apenas 10 a 20% do conteúdo hormonal dentro da neurohipófise podem ser liberados de uma vez só, e à medida que o conteúdo é descarregado na circulação, a AVP continua a ser secretada em resposta a estímulos apropriados, porém em uma velocidade reduzida (SKLAR; SCHRIER, 1983). Todo o processo de síntese, transporte e estoque na neurohipófise leva de 1 a 2 horas (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; HOLMES; PATEL, 2001). Em ratos, as concentrações plasmáticas de AVP aumentam nas 2 primeiras horas após a administração de LPS seguido de diminuição nas próximas 6 horas até sua queda em 24 horas (GIUSTI-PAIVA et al., 2002). Pode-se observar que o pico de hipotermia se encontra nesse intervalo de 2 horas.

Pode-se então afirmar que o bloqueio do sistema endocanabinóide em animais tratados com LPS modula a liberação de AVP que causa hipotermia acentuada nos animais.

Já a administração central de AM404 produziu aumento na temperatura corpórea dos ratos tratados com LPS, fazendo com que a hipotermia fosse atenuada e a febre subsequente fosse exacerbada.

Além da inibição da FAAH (URB 597), a principal enzima responsável pela degradação da anandamida, e da administração de agonistas, também existe outra

alternativa para aumentar a concentração endógena de endocanabinóides. Pode-se inibir o transporte para recaptação da anandamida utilizando-se o AM404. As ações do AM404 são similares às aquelas produzidas pela administração exógena de anandamida. Inibidores do transporte de anandamida podem ser utilizados experimentalmente para descobrir as funções do sistema endocanabinóide (PIOMELLI et al., 1998). Além disso, os inibidores de transporte de anandamida podem oferecer uma abordagem racional para a elevação dos níveis de anandamida em seus sítios de lançamento e podem resultar numa resposta mais seletiva do que a ativação farmacológica direta dos receptores CB1 através de agonistas (BELTRAMO et al., 2000).

Agonistas do receptor CB1 possuem um amplo espectro de respostas comportamentais que incluem catalepsia, analgesia, movimento reduzido, e hipotermia. O AM404 possui a capacidade de melhorar a sinalização da anandamida de uma forma dependente da demanda fazendo com que a anandamida se acumule em regiões específicas do SNC (PERTWEE, 1997). A liberação desta substância endocanabinóide é desencadeada por estímulos adequados, como por exemplo a alta dose de LPS.

Apesar disso, nossos resultados mostraram que a administração central do inibidor da recaptação da anandamida AM404 não causou hipotermia, e sim aumentou ainda mais a temperatura corporal do animal tratado com LPS.

Esse conflito de respostas encontradas pode ser encontrada na literatura já que alguns autores afirmam que a anandamida causa hipotermia (SMITH et al., 1994; PERTWEE, 1997) enquanto outros afirmam que a anandamida causa febre (FRAGA et al., 2009).

Conclui-se então que existem fatores que podem interferir na resposta termorregulatória do sistema endocanabinóide frente ao estímulo LPS. A ativação/inibição do sistema endocanabinóide regula a liberação de neurotransmissores que podem estar envolvidos diretamente na regulação da temperatura corporal. Embora o mecanismo da regulação da hipotermia observada durante a sepse não seja completamente compreendido, é provável que resulte da interação de agentes pirogênicos e agentes antipiréticos. A AVP é um agente antipirético endógeno e uma elevação nos níveis plasmáticos de AVP tem sido associada com uma maior intensidade no período de hipotermia durante a endotoxemia (PITTMAN et al., 1998; KOZAK et al., 2000; GIUSTI-PAIVA et al., 2003;

ROTH et al., 2004; ROMANOVSKY et al., 2005). Isso sugere um papel da AVP na regulação da temperatura corpórea durante a sepse.

### 5.3 Envolvimento dos endocanabinóides na interação social

Animais tratados com LPS apresentam interação social diminuída, conforme pode ser visto nas alterações envolvidas no comportamento doente. O antagonista  $CB_1$  não alterou esta resposta. O inibidor de recaptação de anandamida não alterou a interação social dos animais controle, porém diminuiu ainda mais esse comportamento quando tratados com LPS.

Os canabinóides podem tanto acentuar quanto inibir a interação social em ratos, dependendo de como o sistema endocanabinóide é estimulado. A ativação dos receptores canabinóides no cérebro, o qual ocorre por exemplo durante o uso de *Cannabis*, inibe a sociabilidade e a administração do agonista canabinóide WIN55,212-2 também reduz o comportamento social. Porém, o inibidor da enzima de recaptação da anandamida URB597 acentuou o comportamento social. Estes resultados ressaltam a relação paradoxal entre exposição à *Cannabis* e de sociabilidade (TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008).

Outro fator que pode ser levado em conta é a dose das drogas administradas. Isso faz com que a concentração dos endocanabinóides varie e por conseguinte haja alteração também no comportamento do animal devido às alterações de outros neurotransmissores como adrenalina e serotonina (FENESEY; TAYLOR, 1977).

Além de estar relacionada à termorregulação, a AVP modula uma variedade de comportamentos e processos cognitivos relacionados ao funcionamento social (CALDWELL; DONALDSON; YOUNG, 2008). Muitos dos efeitos comportamentais da AVP são mediados pela ação central do receptor subtipo V1. Uma longa história de experimentação em AVP e V1 elucidou um papel fundamental para a ativação desse receptor no reconhecimento social, bem como comportamentos sociais típicos mais complexos, como agressividade (ALBERS et al., 2006; BIELSKY; YOUNG, 2004).

Estudos demonstraram que a aplicação de AVP estende a memória de curto prazo e habilidades de reconhecimento social (FERGUSON; INSEL; YOUNG, 2002;

DONALDSON; SPIEGEL; YOUNG, 2010). Considerando-se que a AVP encontra-se elevada ao se bloquear os receptores CB1 dos canabinóides, o resultado esperado então era que a interação social ocorresse mais que nos animais controle. Já a resposta de fase aguda à infecção é acompanhada por reduções na investigação social (YEE; PRENDERGAST, 2012).

Estudos anteriores mostram que a aplicação aguda de SSR149415 (antagonista AVP V1b) faz com que os animais explorem lugares aversivos (labirinto elevado em ratos, claro/escuro em camundongos) e diminui a interação social (SERRADELEIL-LE et al., 2002; GRIEBEL et al., 2002). Em nossos estudos a administração do antagonista CB1 (AM251) não alterou a resposta social, enquanto a administração do inibidor da recaptção da anandamida (AM404) diminuiu o comportamento social dos animais. Isso corrobora com o encontrado na administração de SSR149415 que diminuiu o comportamento social (LITVIN; MURAKAMI; PFAFF, 2011). Como dito anteriormente, o papel dos endocannabinóides na interação social é paradoxal possuindo vários fatores que podem alterar isso, como método de administração, dose, estímulo, entre outros (TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008). Já 24 horas após o estímulo, o animal tratado com LPS não se diferenciou do animal controle quanto a interação social.

#### **5.4 Envolvimento dos endocannabinóides no ganho de peso e ingestão alimentar**

Durante a sepse o consumo de comida e água estão transitoriamente reduzidos e o peso corporal é diminuído (GRANGER et al., 2012). Essa característica não se altera quando há modulação do sistema endocanabinóide através de administração de agonistas e antagonistas.

Rorato e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de LPS estimula o eixo HHA e aumenta os níveis de CRF que possui efeitos anorexígenos. O LPS também estimula outro fator envolvido com hipofagia, a colecistoquinina, que também possui efeitos anorexígenos. Ambos tem seu papel na diminuição de ganho de peso e ingestão alimentar em animais com sepse.

Rimonabant quando administrado isoladamente inibe a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal, este agente produz náuseas e distúrbios psiquiátricos como efeito colateral em seres humanos (JANERO; MAKRIYANNIS, 2009). Em ratos o AM251 produz náusea e vômitos (MCLAUGHLIN et al., 2005). Outros antagonistas do receptor CB1 como o AM4113 também demonstraram reduzir a alimentação e o ganho de peso em ratos mas sem os efeitos secundários de náuseas ou vômitos (CHAMBERS et al., 2007; SALAMONE et al, 2007; SINK et al, 2008).

Quando associada sepse e sistema endocanabinóide observou-se que agonistas e antagonistas de CB1 não se diferenciaram de seus controles. Nossos resultados demonstraram que a administração tanto de AM251 quanto de AM404 i.c.v. em ratos não alterou a ingestão dos animais e nem o ganho de peso tanto dos animais controle quanto dos animais tratados com LPS.

### **5.5 Envolvimento da administração central de antagonista endocanabinóide (AM251) sobre a ativação neuronal**

Animais tratados com LPS apresentam um aumento na expressão de Fos. Quando os animais tratados com LPS foram pré-tratados com AM251, o PVN mostrou menor expressão de Fos enquanto nas áreas MnPO dorsal, MnPO ventral e no SON não houve alteração da expressão.

A expressão de Fos pode ser induzida por diferentes estímulos agudos incluindo hemorragia, contenção e estresse por éter, estímulos nocivos, febre induzida pela administração de endotoxina e administração de substâncias biologicamente ativas diferentes (ROBERTS et al, 1993; MIYATA et al, 1995; SMITH; DAY, 1994).

A sequência de eventos que conduzem à indução de proteína Fos no cérebro inclui a despolarização dos neurônios, a liberação e ligação do neurotransmissor aos receptores pós-sinápticos, ativação de sistemas de segundos mensageiros, e transcrição/tradução de Fos (KJAER et al, 1994). Estudos têm sugerido que a AVP, OT, CRF, ACTH, e os neurônios de encefalina podem estar envolvidos na expressão de Fos (KJAER et al, 1994). Foi demonstrado que a proteína Fos é induzida no PVN e SON por injeções sistêmicas de LPS, além disso, um aumento do número de

células Fos positivas foi observado em outras regiões do cérebro, como a área septal lateral, BNST, POA, amígdala, e locus coeruleus após indução de sepsis (D`COSTA et al., 1991). Nossos resultados corroboram com tais afirmações visto que houve aumento significativo de expressão de Fos nos animais tratados com LPS quando comparados com veículo nas seguintes áreas: MnPO dorsal, MnPO ventral, PVN e SON.

A liberação de prostaglandinas, bem como a histamina, representam os mediadores primários da ação da endotoxina nas aferências periféricas. Estes resultados sugerem que expressão de Fos induzida por LPS no cérebro é pelo menos parcialmente mediado pela liberação de histamina periférica, pois a administração de um antagonista H1 (difenidramina) reduz expressão de Fos. Assim como as prostaglandinas, pois a administração de indometacina pode tanto inibir quanto diminuir Fos (WAN et al., 1994).

Em resumo, estes resultados mostram que há um comum substrato neural que é ativado por uma variedade de estímulos que geram potentes respostas autonômicas e neuroendócrinas. No entanto, é evidente que existem diferentes vias neurais através do qual este circuito central comum pode ser ativado (WAN et al., 1994).

O aumento da corticosterona no plasma induzido por LPS é acompanhado por um aumento acentuado do número de células que expressam a proteína Fos no PVN consistente com a ativação do eixo HHA (HARE; CLARCKE; TOLCHARD, 1996).

No que diz respeito aos mecanismos centrais de hipotermia induzidos por LPS o BNST possui um importante papel. A parte dorsal deste núcleo contém neurônios vasopressinérgicos que se projetam para a área ventral do septo e estão envolvidos na antipirese endógena. A hipotermia induzida por LPS é acompanhado por um aumento acentuado do número de células que expressam a proteína Fos no BNST, enquanto que a febre sozinha induzida por LPS não ativa o BNST (HARE; CLARCKE; TOLCHARD, 1995).

Neurônios da POA são conhecidos por serem o local central da termointegração do SNC e é conhecido como centro termorregulatório (STEINER; ANTUNES-RODRIGUES; BRANCO, 2002). O MnPO e o MPO foram ambos implicados no controle da temperatura do corpo, a ativação ocorre nessas regiões

geralmente em resposta a ambientes quentes (MARUYAMA et al., 2003; SCAMMEL; PRICE; SAGAR, 1993).

O sistema hipotálamo-neurohipofisal é altamente composto de neurônios magnocelulares no PVN e SON, esses axônios se projetam para a neurohipófise. O PVN e o SON estão envolvidos nas atividades corpóreas, incluindo, mas não limitado a, regulação osmótica, controle cardiovascular, parto e lactação, homeostase energética e da resposta ao estresse, resultando em uma plasticidade funcional, permitindo a modulação necessária para responder às demandas fisiológicas de forma adequada (HINDMARCH; MURPHY, 2010). Sob condições normais, os neurônios magnocelulares do PVN e SON sintetizam principalmente AVP e OT (SWAAB; NIJVELDT; POOL, 1975). É importante notar que o hipotálamo é particularmente enriquecido com receptores CB1 (TSOU et al., 1998).

O sistema endocanabinóide medeia parte da termorregulação aguda e das respostas endócrinas ao LPS (FRAGA et al, 2009; STEINER et al., 2011). A ativação do eixo HHA, também uma característica da resposta ao LPS, faz com que haja uma rápida mudança no conteúdo endocanabinóide no cérebro e alteração na expressão de receptores de CB1 (WANG et al., 2012; HILL; HUNTER; MCEWEN, 2009).

O mecanismo pelo qual se altera a expressão de CB1 pelo LPS não é conhecido. No entanto, há evidências de que a febre induzida pelo LPS envolve endocanabinóides (FRAGA et al., 2009). A produção endocanabinóide pode causar regulação de CB1. De acordo com esta possibilidade, agonistas CB1 induzem *downregulation* do receptor dentro de minutos a horas (STRAIKER; WAGER-MILLER; MACKIE, 2012).

Anandamida foi administrado em ratos machos por meio de uma única injeção i.p. (0,02mg/kg). Em uma experiência paralela, a administração de anandamida foi precedida pela injeção de rimonabant (1,0 mg/kg), antagonista do receptor de canabinóide. Utilizando-se de marcação da proteína Fos por imunohistoquímica, observou-se que a parte parvocelular do PVN foi ativado 45 min após a injeção de anandamida, isto é, o PVN mostrou uma imunorreatividade aumentada. O pico de imunurreatividade foi observada 90 min após o tratamento. Já a prévia administração de rimonabant potencializou a secreção hormonal, assim como o número de duplas marcações para Fos/AVP no SON e PVN dos animais (WENGER et al., 1997).

O núcleo central da amígdala, o hipocampo e o giro dentado revelaram uma elevação na expressão de Fos após administração aguda de anandamida, resposta semelhante foi observada no BNST e na POA (PATEL et al., 1998). No hipotálamo, tanto o núcleo periventricular quanto o núcleo paraventricular mostraram elevação na expressão de Fos. O SON e a eminência mediana mostraram Fos quando comparados com os animais controle. Todos os núcleos positivos atingiram um nível máximo de expressão de Fos 2h após a injeção, no entanto, vários núcleos apresentaram uma variação na duração da ativação (PATEL et al., 1998).

Estudos mostraram que a administração de anandamida aumenta significativamente os níveis de ACTH e CRF. Este resultado é consistente com a expressão de Fos no PVN após a administração de anandamida (WENGER et al., 1997). Em conjunto, estes dados indicam que o PVN poderia ser o local no qual um aumento marcado em ACTH e corticosterona é iniciada pela anandamida (WEIDENFELD; FELDMAN; MECHOULAM, 1994).

O sistema endocanabinóide atua como um tampão contra os efeitos do estresse no cérebro. Episódios repetidos de tensão são acompanhados por um aumento nos níveis de endocanabinóides no sistema límbico e no hipotálamo. O tratamento agudo com um antagonista do receptor CB1 pode inverter esse estresse (PATEL et al, 2004).

O grupo tratado com AM251 + LPS possui uma menor expressão de Fos no PVN que o grupo Veículo + LPS, o PVN modula a homeostase energética e também está relacionada a termorregulação. Como a marcação de Fos é inespecífica, não se pode afirmar com certeza o que está diminuindo essa expressão.

Estes dados sugerem que o sistema endocanabinóide atua para modular ou diminuir a ativação do eixo de tensão neural (PATEL et al, 2005). Como dito anteriormente, essa teoria corrobora com nossos resultados pois o PVN mostrou uma menor expressão de Fos.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que a dose de 1000 µg/kg de LPS induz hipotermia seguida de febre. Essa hipotermia é acentuada e a febre atenuada quando há a administração do antagonista CB1 (AM251). A AVP é um antipirético endógeno que ao ser bloqueado atenua essa resposta de hipotermia, ou seja, o sistema endocanabinóide é neuromodulatório e está envolvido no controle da liberação de AVP e conseqüentemente da termorregulação. A administração do agonista CB1 (AM404) tem resposta antagônica, o animal tratado com LPS tem a hipotermia atenuada e a febre acentuada.

Algumas características do comportamento doentio, além da febre, como a interação social e o ganho de peso e ingestão também foram testados com agonista e antagonista CB1 em animais tratados com LPS, porém somente a interação social de 02 horas após o estímulo teve diferença dos animais controle. Os animais pré-tratados com AM251 e tratados com LPS apresentaram uma interação social menor.

A expressão de Fos dos animais tratados com LPS se apresenta acentuada quando comparada com animais controle. A administração de AM251 não alterou a expressão de Fos nas áreas MnPO ventral, MnPO dorsal e SON, já o PVN que é o núcleo relacionado a modulação da homeostase teve expressão de Fos diminuída.

Pode-se então concluir que o sistema endocanabinóide possui influência na hipotermia e febre em animais tratados com LPS, sendo que a hipotermia possui como um de seus causadores a AVP. Além da termorregulação, houve alteração da interação social que também é característico do comportamento doentio induzido na sepse.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, I. B.; MARTIN, B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, v. 91, p. 1585-1614, 1996.

AKARSU, E. S.; MAMUK, S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 61, n.5, p. 1846-1850, 2007.

AL-SAFFAR, H. et al. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 188-195, 2013.

ALBERS, H. E. et al. Role of V1a vasopressin receptors in the control of aggression in Syrian hamsters. **Brain Research**, v. 1073, p. 425-430, 2006.

ALMEIDA, M. C. et al. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *European Journal of Neuroscience*, v.23, p. 3359-3367, 2006.

ALVES, A. O.; SPANIOL, B.; LINDEN, R. Canabinoides sintéticos: drogas de abuso emergentes. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n.4, p.142-148, 2012.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 58, p. 315-348, 1999.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992.

ANGGADIREDDA, K. et al. Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1470-1478, 2004.

ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **American Journal of Medicine**, v. 111, n. 4, p. 304-315, 2001.

BASSI et al., Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 4, p. 359-369, 2012.

BELTRAMO, M. et al. Reversal of Dopamine D2 Receptor Responses by an Anandamide Transport Inhibitor. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 3401-3407, 2000.

BENAMAR, K. et al. A novel role of cannabinoids: implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p. 1127-1133, 2007.

BERK, M. L.; FINKELSTEIN, J. A. Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. **Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 1601-1624, 1981.  
BERTOK, L. Endotoxins and endocrine system. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 305-308, 1998.

BICEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 616-39, 2007.

BIELSKY, I. F.; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. **Peptides**, v. 25, n. 9, p. 1565-1574, 2004.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 32, p. 224-238, 2005.

BISON, S. et al. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v. 1, p. 1-13, 2009.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 194-223, 2006.

BLUTHE, R. M. et al. Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. **NeuroReport**, v. 7, n. 9, p. 1485-1488, 1996.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 108-115, 1998.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 157-161, 2000.

BRACKETT, D. J.; SCHAEFER, C. F. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circulatory Shock**, v. 17, n. 4, p. 273-284, 1985.

BURNSTOCK, G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 1-30, 2009.

CALDWELL, H. K. et al. Vasopressin: Behavioral roles of an "original" neuropeptide. **Progress in Neurobiology**, v. 84, n. 1, p. 1-24, 2008.

CARNIO, E. C. et al. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 137-142, 2006.

CHAMBERS, A. P. et al. A neutral CB<sub>1</sub> receptor antagonist reduces weight gain in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. 2185-2193, 2007.

CHAPERON, F.; THIEBOT, M. H. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 13, p. 243-281, 1999.

CLAPHAM, J. C. Central control of thermogenesis. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 111-123, 2012.

COELHO, M. M.; SOUZA, G. E. P.; PELÁ, I. R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. 423-427, 1992.

COHN, D. W.; DE SA-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiological Behavior**, v. 87, n. 5, p. 932-937, 2006.

COSTA, B.; VAILATI, S.; COLLEONI, M. SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, reverses the behavioural effects of anandamide-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 10, p. 327-331, 1999.

COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHOP, M. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 423-431, 2003.

CUNNINGHAM, E. T.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends in Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 406-411, 1991.

D' COSTA, A. et al. Attenuation of fos-like immunoreactivity induced by a single electroconvulsive shock in brains of aging mice. **Brain Research**, v. 567, p. 204-211, 1991.

DE LAURENTIIS, A. et al. Endocannabinoid system participates in neuroendocrine control of homeostasis. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 153-156, 2010.

DE PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 1, p. 146-51, 2010.

DE PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 765-774, 2004.

DE VRIES, T. J.; SHAHAM, Y. ; HOMBERG, J. R. A cannabinoid mechanisms in relapse to cocaine seeking. **Nature Medicine**, v. 7, p. 1099-1100, 2001.

- DERIJK, R. H.; BERKENBOSCH, F. Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. **American Journal of Physiology**, v.266, p. 9-14, 1994.
- DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 605-613, 1988.
- DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, p. 1946-1949, 1992.
- DI MARZO, V. et al. Endocannabinoid: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends in Neurosciences**, v. 21, p. 521-528, 1998.
- DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploration. **Nature Reviews**, v. 3, p. 771-784, 2004.
- DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 585-589, 2005.
- DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 168-189, 1988.
- DOGAN, M. D.; ATAOGU, H.; AKARSU, E. S. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 2319–2329, 2000.
- DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 900–904, 2008.
- DONALDSON, Z. R.; SPIEGEL, L.; YOUNG, L. J. Central vasopressin V1a receptor activation is independently necessary for both partner preference formation and expression in socially monogamous male prairie voles. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 159-163, 2010.
- EGERTOVA, M. et al. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. **Proceedings of the Royal Society**, v. 265, n. 1410, p. 2081-2085, 1998.
- ELMQUIST, J. K. et al. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 381, p. 119-129, 1997.
- ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 1, p. 5-15, 2002.
- ERICSSON, A.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P. E. Evidence for an intramedullary prostaglandin-independent mechanism in the activation of stress-related

neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 18, p. 7166-7179, 1997.

FABRÍCIO, A. S. C. et al. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Research**, v. 1066, p. 92-100, 2005.

FABRÍCIO, A. S. C. et al. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1 induced fever in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. 671-677, 2005.

FATTORE, L. et al. Cannabinoid mechanism in reinstatement of heroin-seeking after a long period of abstinence in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1723-1726, 2003.

FELDBERG, W.; SAXENA, P. N. Fever produced by prostaglandin E2. **The Journal of Physiology**, v. 217, p. 547-556, 1971.

FERGUSON, J. N.; YOUNG, L. J.; INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 2, p. 200-224, 2002.

FLESHNER, M. et al. Interleukin-1 induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Research**, v. 37, p. 605-610, 1995.

FOX, A. et al. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. **Pain**, v. 92, p. 91-100, 2001.

FRAGA, D. et al. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1494-1501, 2009.

GALLATE, J. E. et al. Increased motivation for beer in rats, following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 370, p. 233-240, 1999.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, p. 1646-1647, 1964.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1306-1310, 2002.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch**, v. 447, p. 175-180, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A.; MARTINEZ, M. R.; FELIX, J. V.; et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**, v. 21, n. 3, p. 271-275, 2004.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963-991, 1990.

GOURINE, A.V., et al. Role of 2-macroglobulin in fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p. 218–226, 2002.

GRANGER, J. I. et al. Sepsis-induced morbidity in mice: Effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, p. 345-349, 2012.

GRIEBEL, G. et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6370–6375, 2002.

GRIFFIN, J. D. Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 327-331, 2004.

GRUNFELD, C. et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 2152-2157, 1996.

GUZMAN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews**, v. 3, p. 745-755, 2003.

HADDAD, J. J.; SAADE, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 1-19, 2002.

HARE, A. S.; CLARCKE, G.; TOLCHARD, S. Bacterial lipopolysaccharide-induced changes in FOS protein expression in the rat brain: correlation with thermoregulatory changes and plasma corticosterone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, p. 791-799, 1995.

HARRIS, R. L. et al. Manifestation of sepsis. **Archives of Internal Medicine**, v. 147, p. 1895-1906, 1987.

HART, B. L. Biological Basis of the Behavior of Sick Animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, p. 123-137, 1988.

HILL, M. N.; HUNTER, R. G.; MCEWEN, B. S. Chronic stress differentially regulates cannabinoid CB1 receptor binding in distinct hippocampal subfields. **European Journal of Pharmacology**, v. 614, p. 66-69, 2009.

HILLARD, C. J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. **Prostaglandins and Lipids in Medicine**, v. 61, p. 3-18, 2000.

HINDMARCH, C. C.; MURPHY, D. The transcriptome and the hypothalamo-neurohypophyseal system. **Endocrine Development**, v. 17, p. 1-10, 2010.

HOLLANDER, P. Endocannabinoid blockade for improving glycemic control and lipids in patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, v. 120, p. 18-28, 2007.

HOLMES, C. L.; PATEL, B. M. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest Journal**, v. 120, n. 3, p. 989-1002, 2001.

HOLTZMAN, D. et al. 1-delta9-tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse. **Science**, v. 163, p. 1464-1467, 1969.

HWANG, D. et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 6, p. 455-460, 1998.

JANERO, D. R.; MAKRIYANNIS, A. Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 14, p. 1-23, 2009.

KAPCALA, L. P. et al. Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1 beta stimulation of adrenocorticotropin secretion. **Brain Research**, v. 728, p. 247-254, 1996.

KASTING, N. W. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in thermoregulation during fever and antipyresis. **Brain Research Reviews**, v. 14, n. 2, p. 143-153, 1989.

KATSUNAGA, W. et al. LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. **Brain Research**, v. 858, p. 9-18, 2000.

KATSUURA, G. et al. Involvement of organum vasculosum of the lamina terminalis and preoptic area in interleukin-1 b-induced ACTH release. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 163-171, 1990.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Science**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KJAER, A. et al. Histamine stimulates c-fos expression in hypothalamic vasopressin-, oxytocin-, and corticotropin-releasing hormone-containing neurons. **Endocrinology**, v. 134, p. 482-491, 1994.

KHAN, K. N. et al. Pharmacology of cyclooxygenases-2 inhibition in the kidney. **Kidney International**, v. 61, p. 1210-1219, 2002.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 1, p. 93-127, 1991.

KOMAKI, G.; ARIMURA, A.; KOVES, K. Effect of intravenous injection of IL-1 beta on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 2, p. 246-251, 1992.

KOZAK, W. et al. Molecular mechanisms of fever and endogenous antipyresis. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 917, p. 121-134, 2000.

KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 163, p. 373-383, 1988.

LANDRY, D. W.; LEVIN, H. R. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, v. 95, n. 5, p. 1122-1125, 1997.

LECHAN, R. M. et al. Immunoreactive interleukin-1 beta localization in the rat forebrain. **Brain Research**, v. 514, p. 135-140, 1990.

LEDEBOER, A. et al. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 1175-1185, 2002.

LITVIN, Y.; MURAKAMI, G.; PFAFF, D. W. Effects of chronic social defeat on behavioral and neural correlates of sociality: Vasopressin, oxytocin and the vasopressinergic V1b receptor. **Physiology & Behavior**, v. 103, p. 393-403, 2011.

LI, S., et al. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 and IL-18: pyrogenic and PGE2-mediated? **Brain Research**, v. 992, p. 76-84, 2003.

LIU, E. et al. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and E. coli induced systemic inflammation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, p. 1372-1383, 2012.

LOMAX, P.; CAMPBELL, C. Phenitron and marijuana induced hypothermia. **Experientia**, v. 27, p. 1191-1192, 1971.

LUHESHI, G; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 109, n.4, p. 301-307, 1996.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 29, n. 3, p. 27-46, 2006.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: Texto e Atlas**. 2<sup>a</sup> ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre, p. 133-134, 1998.

MARUYAMA, M. et al. Brain regions expressing Fos during thermoregulatory behavior in rats. **American Journal of Physiology**, v. 285, p. 1116-1123, 2003.

MATTES, R. D. et al. Cannabinoids and appetite stimulation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 187-195, 1994.

MCALLISTER, S. D., GLASS, M. CB1 and CB2 receptor mediated signalling: a focus on endocannabinoids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, p. 161-171, 2002.

MCCOY, J. G.; MATTA, S. G.; SHARP, B. M. Prostaglandins mediate the ACTH response to interleukin-1-beta instilled into the hypothalamic median eminence. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 4, p. 426-435, 1994.

MCLAUGHLIN, P. J. et al. The cannabinoid antagonist AM251 produces food avoidance and behaviors associated with nausea but does not impair feeding efficiency in rats. **Psychopharmacology**, v. 180, p. 286-293, 2005.

MECHOULAM, R. The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. **Cannabis as Therapeutic Agent**. Ed. Mechoulam. p. 1-19, 1986.

MILTON, A. S.; WEDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanesthetized cats and rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 218, p. 325-336, 1971.

MIYATA, S. et al. Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress. **Brain Research Bulletin**, v. 37, p. 391-395, 1995.

MOLDRICH, G.; WENGER, T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. **Peptides**, v. 21, p. 1735-1742, 2000.

MORETO, V. et al. Role of heme-oxygenase pathway on vasopressin deficiency during endotoxemic shock-like conditions. **Shock**, v. 26, n. 5, p. 472-476, 2006.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, 1993.

MURILLO-RODRÍGUEZ, E. et al. Anandamide modulates sleep and memory in rats. **Brain Research**, v. 812, p. 270-274, 1998.

MURILLO-RODRÍGUEZ, E. M. The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1420-1427, 2008.

MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 593-596, 1979.

NAVA, F. et al. Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 31-38, 1997.

OKAMOTO, Y. et al. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5298-5305, 2004.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Thermoregulation and Vasopressin Secretion during Polymicrobial Sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p. 45–53, 2009.

OOI, G. T.; TAWADROS, N.; ESCALONA, R. M. Pituitary cell lines and their endocrine applications. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 228, p. 1-21, 2004.

OPP, M. R.; TOTH, L. A. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1 beta and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. **Life Sciences**, v. 62, n. 10, p. 923-936, 1998.

PACACK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrinology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502-548, 2001.

PAGOTTO, U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 73-100, 2006.

PANIKASHIVILI, D. et al. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. **Nature**, v. 25, p. 527-531, 2001.

PATEL, N. A. et al. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. **Brain Research**, v. 797, p. 225-233, 1998.

PATEL, S. et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, p. 5431-5438, 2004.

PATEL, S. et al. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1057-1069, 2005.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, p. 129 -180, 1997.

PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Sciences**, v. 76, n. 12, p. 1307-1324, 2005.

PESTONJAMASP, V. K; BURSTEIN, S. H. Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1394, p. 249-260, 1998.

PIOMELLI, D. et al. Endogenous cannabinoid signaling. **Neurobiology of Disease**, v. 5, p. 462-473, 1998.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

PITTMAN, Q. J. et al. Arginine vasopressin, fever and temperature regulation. **Progress in Brain Research**, v. 119, p. 383-392, 1998.

PORTER, A. C.; FELDER, C. C. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 45-60, 2001.

RAWLS, S. M. et al. CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4-(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenylcarbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1]quinolin-6-one)]-induced hypothermia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, p. 963-968, 2002.

RAWLS, S. M. et al. GABA<sub>A</sub> receptors modulate cannabinoid-evoked hypothermia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 83-91, 2004.

ROBERTS, M. M. et al. C-fos expression in vasopressin and oxytocin neurons reveals functional heterogeneity within magnocellular neurons. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 388-400, 1993.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Endotoxin shock-associated hypothermia. How and why does it occur? **The New York Academy of Sciences**, v. 813, p. 733-737, 1997.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 332-338, 1998.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

RORATO, R. et al. Cholecystokinin and hypothalamic corticotrophin-releasing factor participate in endotoxin-induced hypophagia. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 4, p. 439-450, 2010.

ROTH, J.; SOUZA, G. E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.

ROTH, J. et al. Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 816-826, 2004.

ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurologic Clinics**, v. 24, p. 42-49, 2006.

RUDAYA, A. Y. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, p. 1244-1252, 2005.

RUMMEL, C. et al. Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? **American Journal**

of **Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, p. 340-347, 2005.

SAIA, R. S.; ANSELMO-FRANCI, J.; CÁRNIO, E.C. Hypothermia during endotoxemic shock in female mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Shock**, v. 29, p. 119-126, 2008.

SAIA, R. S., et al. Cardiovascular and Inflammatory Response to Cholecystokinin During Endotoxemic Shock. **Shock**, v. 39, p. 104-113, 2013.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinóide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 557-514, 2010.

SALAMONE, J. D. et al. Cannabinoid CB1 receptor inverse agonists and neutral antagonists: Effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. **Physiology & Behavior**, v. 91, p. 383-388, 2007.

SAPER, B.; BREDER, C. The neurologic basis of fever. **The Journal of Medicine**, v. 330, n. 26, p. 1880-1886, 1994.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. **Progress in Brain Research**, v. 60, p.19-29, 1983.

SCAMMEL, T. E.; PRICE, K. J.; SAGAR, S. M. Hyperthermia induces c-Fos expression in the preoptic area. **Brain Research**, v. 618, p. 303-307, 1993.

SCHEEN, A. J. CB1 receptor blockade and its impact on cardiometabolic risk factors: overview of the RIO programme with rimonabant. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 139-146, 2008.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 32, 1936.

SERGEYEV, V.; BROBEGER, C.; HOKFELT, T. Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. **Molecular Brain Research**, v. 90, p. 93-100, 2001.

SERRADELEIL-LE, G. C. et al. Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 1122–1130, 2002.

SHARSHAR, T.; BLANCHARD, R. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 3, p. 497-500, 2003.

SINK, K. S. et al. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behaviour but does not induce signs of nausea in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 946-955, 2008.

SKLAR, A. H.; SCHRIER, R. W. Central nervous system mediators of vasopressin release. **Physiological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 1243-1280, 1983.

SMITH, D. W.; DAY, T. A. C-fos expression in hypothalamic neurosecretory and brainstem catecholamines cells following noxious somatic stimuli. **Neuroscience**, v. 58, p. 765-775, 1994.

SOARES, D.M. Estudo da resposta febril induzida por peritonite causada pela injeção i.p. de *Escherichia coli*. 2008. 134f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

SOFIA, R. D. A paradoxical effect for 1 -tetrahydrocannabinol on rectal temperature in rats. **Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology**, v. 4, p. 281-288, 1972.

SOUZA, G. E. P. et al. A comparative study of antipyretic profiles of indomethacin and dipyron in rats. **Inflammation Research**, v. 51, p. 24-32, 2002.

STEIN, E. A. et al. Physiological and behavioral effects of the endogenous cannabinoid, arachidonylethanolamide (anandamide), in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 107-114, 1996.

STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. **Brain Research**, v. 944, p. 135-145, 2002.

STEINER, A. A. et al. The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. **Journal of Physiology**, v. 589, p. 2415-2431, 2011.

STITT, J. T. Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 232, p. 163-179, 1973.

STRAIKER, A.; WAGER-MILLER, J.; MACKIE, K. The CB1 cannabinoid receptor C-terminus regulates receptor desensitization in autaptic hippocampal neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 2652-2659, 2012.

SWAAB, D. F.; NIJVELDT, F.; POOL, C. W. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. **Journal of Endocrinology**, v. 67, p. 461-462, 1975.

TANG, P. A.; FEWELL, J. E.; ELIASON, H. L. Role of AVP in mediating the altered core temperature response to a simulated open field in pregnant rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, p. 170-174, 1999.

TAYLOR, D. A.; FENNESSY, M. R. Biphasic nature of the effects of D9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amines of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 93-99, 1977.

TERLOUW, E. M. C. et al. Effect of intracerebroventricular administration of vasopressin on stress-induced hyperthermia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 60, p. 417-424, 1996.

THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCE (IUPS THERMAL COMMISSION). Glossary of Terms for Thermal Physiology. **Japanese Journal of Physiology**, v. 5, p. 245-280, 2001.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 437-455, 1999.

TOLCHARD, S. et al. TNF $\alpha$  Mimics the Endocrine but not the Thermoregulatory Responses of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS): Correlation with FOS-expression in the Brain. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 3, p. 243-248, 1996.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, p. 217-227, 2008.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M. C.; et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, p. 393-411, 1998.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 2-71, 1999.

VOLICER, I. et al. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 12, p. 913-919, 1997.

WAGNER, J. A. et al. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB1 receptors. **The European Journal of Pharmacology**, v. 423, p. 203-210, 2001.

WAN, W. et al. Neural and Biochemical Mediators of Endotoxin and Stress-Induced c-fos Expression 1 in the Rat Brain. **Brain Research Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 7-14, 1994.

WANG, M. et al. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, p. 56-70, 2012.

WATANABE, K; JAFFE, E. A. Comparison of the potency of various serotypes of E. coli lipopolysaccharides in stimulating PGI<sub>2</sub> production and suppressing ACE activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 49, n. 6, p. 955-958, 1993.

WATKINS, L. R. et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**, v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

WENGER, T. et al. Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 3, p. 724-728, 1997.

WENGER, T. et al. The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, p. 363-368, 2001.

WEIDENFELD, J., FELDMAN, S.; MECHOULAM, M. Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 59, p. 110-112, 1994.

WILLIAMS, C. M.; KIRKHAM, T. C. Observational analysis of feeding induced by Delta(9)-THC and anandamide. **Physiology & Behavior**, v. 76, p. 241-250, 2002.

WISKERKE, J. et al. Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 407-417, 2012

YEE, J. R.; PRENDERGAST, B. J. Endotoxin elicits ambivalent social behaviors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 7, p. 1101-1105, 2012.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Metabolites in the Brain During Systemic Infection: Is Survival Possible Without Arachidonate? **Physiology**, v. 18, p. 137-142, 2003.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology**, v. 24, p. 287-326, 1999.