

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

CLARISSA MARIA DIAS MOTA

Efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da serotonina

Ribeirão Preto

2019

CLARISSA MARIA DIAS MOTA

Efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da serotonina

Versão Corrigida

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Fisiologia.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mota, Clarissa Maria Dias

Efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da serotonina / Clarissa Maria Dias Mota; orientador Luiz Guilherme de Siqueira Branco – Ribeirão Preto, 2019.

119 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

1. 5-hidroxitriptamina. 2. Termorregulação. 3. Lipopolissacarídeo. 4. Inflamação. 5. Febre. 6. Hipotálamo.

Tese de autoria de Clarissa Maria Dias Mota, sob o título "**Efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da serotonina**", apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Fisiologia, na área de concentração Fisiologia, aprovada em 04 de dezembro de 2019 pela comissão julgadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Presidente

Prof. Dr. Helio Cesar Salgado

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná

Ribeirão Preto

2019

Aos meus pais maravilhosos: minha mãe, Ilza, e meu pai, José Cleber.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela proteção e por me sustentar nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha família, a quem amo muito e dedico todas as minhas vitórias. Minha mãe, Ilza, e meu pai, José Cleber. Obrigada pelo seu amor incondicional. Obrigada por acreditarem no meu potencial e pelo suporte emocional, financeiro, psicológico. Obrigada por todo o apoio que tornou possível a realização de um sonho, um projeto de vida, uma nova etapa na minha vida profissional. Eu amo muito vocês! Agradeço ao apoio das minhas amadas avós, vó Arlete (*in memoriam*) e vó Maria José. Agradeço ao apoio dos meus tios, em especial à tia Matilde Dias por sempre me alegrar e me fortalecer e ao meu tio José Carlos Mota (*in memoriam*) por ter me inspirado a ser forte e a perseguir meus objetivos. Agradeço pelo apoio e pelas orações da minha amada madrinha Zenóbia (*in memoriam*) e da minha querida prima Martinha. Agradeço a Lais e ao Heitor pelo grande apoio e amizade. Vocês estão no meu coração!

Agradeço ao meu amor e grande parceiro João Gabriel por todo o amor, carinho, amizade, compreensão e apoio durante todos esses anos.

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia pelo saber acadêmico, pelos ensinamentos e pelas grandes oportunidades acadêmicas e profissionais.

Agradeço ao Professor Luiz Guilherme de Siqueira Branco, por ter sido meu orientador de doutorado, por contribuir para meu crescimento intelectual, pelas oportunidades que me foram dadas, pela parceria científica e pela dedicação empenhada na construção da minha formação profissional.

Agradeço à *Oregon Health & Science University* e, especialmente, ao Professor Shaun Morrison e ao Professor Christopher Madden por terem me acolhido em seu laboratório nos Estados Unidos, por contribuírem com a minha formação profissional e pessoal e, mais importante, agradeço por terem se tornado grandes amigos meus. Eu também agradeço a Ellen Conceição por ter sido tão companheira e tão amiga e por me ensinar. Agradeço a Rubing Xing pelo apoio técnico com as técnicas de histologia e imunohistoquímica e por ser sempre gentil comigo. Obrigada a todos vocês! (*I thank the Oregon Health & Science University and, specially, Professor Shaun Morrison, and Professor Christopher Madden for welcoming me into their laboratory in the United States, for contributing to my professional and personal development, and, most importantly, I thank them for becoming great friends of mine. I also thank Ellen Conceição for being such a great companion and friend, and also for teaching*

me. I thank Rubing Xing for histological and immunohistological support and for always being kind to me. Thank you all!)

Agradeço aos técnicos de laboratório Ruither Carolino, Maria Valci Silva e Mauro Ferreira pela ajuda na realização dos experimentos e no cuidado com os animais, bem como aos colegas de laboratório pelas contribuições e pela ajuda na realização dos experimentos.

Agradeço à Professora Janete Anselmo-Franci, ao Professor José Antunes Rodrigues e à Professora Evelin Cárnio pela colaboração científica.

Agradeço ao Professor Ricardo Leão por ter sido meu Avaliador pelo Programa de Pós-graduação em Fisiologia e por sempre se fazer disponível a contribuir com minha formação profissional.

Agradeço aos funcionários do biotério da FORP pelo auxílio na manutenção e cuidados com os animais

Agradeço aos animais e por suas vidas, que foram dedicadas à construção da ciência brasileira.

Agradeço ao auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, com suporte financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelos processos nº 2016/17681-9, 2017/01633-8 e 2017/24232-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil.

Agradeço também ao auxílio financeiro do *National Institutes of Health* (NIH, EUA) que deu suporte à minha pesquisa no exterior: NIH R01-DK112198 (ao Professor Christopher Madden) e NIH R01-NS091066 (ao Professor Shaun Morrison). (*I thank the financial support by the National Institutes of Health (NIH, USA) that made possible my research abroad: NIH R01-DK112198 (to Professor Christopher Madden) and NIH R01-NS091066 (to Professor Shaun Morrison).*)

Resumo

MOTA, Clarissa Maria Dias. **Efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da serotonina**. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) desempenha um papel importante na regulação de vários mecanismos fisiológicos, como temperatura corporal, imunidade, apetite, respiração, sono e humor. Além disso, a 5-HT é importante para o tratamento de doenças, sendo extensivamente estudada e utilizada terapêuticamente em transtornos psiquiátricos. O presente estudo investigou: (Estudo 1) os efeitos da 5-HT sistêmica e no sistema nervoso central (SNC) sobre respostas termorregulatórias, (Estudo 2) os efeitos terapêuticos da administração intracerebroventricular (icv) de 5-HT durante a inflamação sistêmica leve e (Estudo 3) grave, bem como a relação entre esses efeitos e o reflexo anti-inflamatório esplênico, incluindo esse neurotransmissor como um importante elo de comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune. Esses estudos empregaram registros eletrofisiológicos e de parâmetros fisiológicos, injeções intravenosas (iv), injeções intracerebrais em regiões de interesse ou icv em ratos anestesiados ou não anestesiados, além de realizar a quantificação de prostaglandinas (PG) e neurotransmissores na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO), de óxido nítrico (NO) e corticosterona plasmáticos, bem como de citocinas plasmáticas e esplênicas. Os resultados do Estudo 1 demonstram que a atividade nervosa simpática (ANS) para o tecido adiposo marrom (TAM) e a termogênese pelo TAM durante o frio são inibidas pela administração sistêmica ou local de 8-OH-DPAT via ativação de receptores (R) 5-HT_{1A} no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa). Por outro lado, a administração sistêmica de 5-HT ativa uma circuitaria neural que resulta na ativação de GABA_AR na região dorsomedial do hipotálamo (DMH), a qual inibe a termogênese pelo TAM induzida pelo frio. Adicionalmente, o presente estudo demonstra que há um tônus serotoninérgico para o rRPa, que 5-HT_{1A}R e contribui para a inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM em animais com corpo aquecido. Em conjunto, os resultados dos Estudos 2 e 3 demonstram que uma injeção icv de 5-HT apresenta efeitos anti-inflamatórios sistemicamente, devido à redução dos níveis de PGE₂ na AVPO e de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no baço. Além de reduzir a febre causada pela inflamação sistêmica leve, a 5-HT icv foi capaz de prevenir a hipotermia e a hipotensão causadas pela inflamação sistêmica grave, além de reduzir os níveis de NO plasmático. A esplenectomia preveniu parte do efeito anti-inflamatório sistêmico da 5-HT icv durante a inflamação sistêmica leve. Em conjunto, esses resultados indicam que a 5-HT apresenta efeitos criogênicos, em animais expostos a uma situação que mimetiza o frio, e durante a inflamação sistêmica leve, além de ativar tonicamente 5-HT_{1A}R em neurônios no rRPa que contribuem para a inibição da ANS TAM e da a termogênese pelo TAM. Ademais, a 5-HT apresenta efeitos anti-inflamatórios importantes em dois diferentes modelos de inflamação sistêmica: leve, que mimetiza, por exemplo, uma resposta a uma infecção bacteriana leve, e grave, que mimetiza o choque endotoxêmico, possivelmente via ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico.

Palavras-chave: 5-hidroxitriptamina. Termorregulação. Lipopolissacarídeo. Inflamação. Febre. Hipotálamo.

Abstract

MOTA, Clarissa Maria Dias. **Thermoregulatory and neuroimmunomodulatory effects of serotonin**. 2019. 119 p. Thesis (Doctor of Science) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) plays an important role in regulating various physiological mechanisms such as body temperature, immunity, appetite, breathing, sleep, and mood. In addition, 5-HT is important for the treatment of diseases, being extensively studied and used therapeutically in psychiatric disorders. The present study investigated: (Study 1) the effects of 5-HT administered systemically and within the central nervous system (CNS) on thermoregulatory responses, (Study 2) the therapeutic effects of intracerebroventricular (icv) administration of 5-HT during mild systemic inflammation and (Study 3) severe systemic inflammation, as well as the relationship between these effects and the splenic anti-inflammatory reflex, including this neurotransmitter as an important communication link between the nervous system and the immune system. The present studies used electrophysiological recording and physiological parameters, intravenous (iv) injections, intracerebral injections within regions of interest or icv in anesthetized or non-anesthetized rats, as well as the quantification of prostaglandins (PG) and neurotransmitters in the anteroventral region of the preoptic area of the hypothalamus (AVPO), plasma nitric oxide (NO), corticosterone, as well as splenic and plasma cytokine levels. The results of Study 1 demonstrate that brown adipose tissue (BAT) sympathetic nerve activity (SNA) and BAT thermogenesis are inhibited by systemic or local administration of 8-OH-DPAT via 5-HT_{1A}R activation in the rostral raphe pallidus (rRPa) during skin cooling. On the other hand, systemic administration of 5-HT activates a neural circuitry that results in GABA_AR activation in the dorsomedial hypothalamus (DMH), which inhibits skin cooling-evoked increases in BAT thermogenesis. Additionally, the present study demonstrates that there is a serotonergic tone to sympathetic neurons in the rRPa, activating 5-HT_{1A}R and contributing to the inhibition of BAT SNA and BAT thermogenesis in rats under a warm condition. Taken together, the results of the Studies 2 and 3 demonstrate that icv injection of 5-HT presents systemic anti-inflammatory effects, *i.e.*, reduced AVPO PGE₂ levels and reduced plasma and spleen cytokine levels. In addition to reducing fever caused by mild systemic inflammation, 5-HT icv prevented severe systemic inflammation-induced hypothermia and hypotension and reduced plasma NO levels. Splenectomy prevented part of the systemic anti-inflammatory effect of 5-HT icv during mild systemic inflammation. Altogether, these results indicate that 5-HT presents cryogenic effects in animals exposed to skin cooling and during mild systemic inflammation, besides tonically activating 5-HT_{1A}R in rRPa neurons contributing to the inhibition of BAT SNA and BAT thermogenesis under a warm condition. Additionally, 5-HT presents important anti-inflammatory effects in two different models of systemic inflammation: mild, which mimics, for example, a response to mild bacterial infection and severe, which mimics endotoxemic shock, possibly via activation of the splenic anti-inflammatory reflex.

Keywords: 5-hydroxytryptamine. Thermoregulation. Lypopolysaccharide. Inflammation. Fever. Hypothalamus.

Lista de figuras

- Figura 1 – A ativação de 5-HT_{1A}R na rRPa pelo 8-OH-DPAT iv inibe a ANS TAM e, consequentemente, inibe a termogênese pelo TAM.....38
- Figura 2 – O bloqueio de 5-HT_{1A}R no rRPa aumentou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM em animais intactos cuja pele/corpo estava(m) aquecida(os) e em animais não intactos cuja pele/corpo estava(m) resfriado(s)41
- Figura 3 – A nanoinjeção de 5-HT no rRPa inibe o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM durante o resfriamento da pele via ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa, mas a inibição da ANS TAM pela 5-HT sistêmica não requer 5-HT_{1A}R no rRPa.....44
- Figura 4 – A 5-HT iv atenuou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pelo bloqueio de GABA_AR, mas não atenuou a ativação do TAM devido à nanoinjeção de NMDA no rRPa.47
- Figura 5 – A inibição de neurônios da região dorsomedial do hipotálamo (DMH) atenuou a ANS TAM e a termogênese evocada pelo bloqueio de GABA_AR, mas não pela ativação de receptores glutamatérgicos no rRPa50
- Figura 6 – A 5-HT iv atenuou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pela ativação de receptores glutamatérgicos, mas não atenuou a ativação do TAM devido à nanoinjeção de bicuculina na DMH.....53
- Figura 7 – A inflamação sistêmica causa redução das concentrações endógenas de 5-HT e 5-HIAA na AVPO e aumento da corticosterona plasmática.57
- Figura 8 – A administração icv de 5-HT preveniu a febre induzida pela inflamação sistêmica leve.....58
- Figura 9 – A administração icv de 5-HT atenuou o aumento de PGE₂ na AVPO, de corticosterona e da IL-6 plasmática durante a inflamação sistêmica leve.....59
- Figura 10 – A administração icv de 5-HT preveniu a redução da perda de calor pela cauda durante a inflamação sistêmica leve61
- Figura 11 – A esplenectomia previne o efeito antipirético da 5-HT icv durante a inflamação sistêmica leve.....62
- Figura 12 – A esplenectomia não previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o aumento dos níveis de PGE₂ na AVPO induzido pela inflamação sistêmica leve.63
- Figura 13 – A esplenectomia previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o TNF- α plasmático induzido pela inflamação sistêmica leve.65

| | |
|--|----|
| Figura 14 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ esplênicos durante a inflamação sistêmica leve. | 66 |
| Figura 15 – A inflamação sistêmica grave induziu a redução nos níveis endógenos de 5-HT e 5-HIAA enquanto aumentou os níveis de DA, DOPAC e NA na AVPO | 68 |
| Figura 16 – A 5-HT icv preveniu a hipotensão e o aumento dos níveis plasmáticos de nitrato durante a inflamação sistêmica grave. | 69 |
| Figura 17 – A 5-HT icv preveniu a hipotermia sem reduzir os níveis de PGE ₂ na AVPO durante a inflamação sistêmica grave. | 71 |
| Figura 18 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de citocinas plasmáticas durante a inflamação sistêmica grave. | 73 |
| Figura 19 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de TNF- α e IL-10 esplênicos durante a inflamação sistêmica grave. | 74 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Papel de 5-HT _{1A} R nos efeitos do 8-OH-DPAT iv ou da nanoinjeção local de 8-OH-DPAT no rRPa na termogênese pelo TAM evocada pelo resfriamento da pele/corpo. | 39 |
| Tabela 2 – Efeito da nanoinjeção local de WAY100635 no rRPa na ANS TAM e na termogênese pelo TAM. | 42 |
| Tabela 3 – Papel de 5-HT _{1A} R nos efeitos da nanoinjeção local de 5-HT no rRPa e da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pelo resfriamento da pele/corpo..... | 45 |
| Tabela 4 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA ou de bicuculina (BIC) no rRPa. | 48 |
| Tabela 5 – Efeito da inibição de neurônios da DMH na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA ou de bicuculina (BIC) no rRPa. | 51 |
| Tabela 6 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA na DMH. | 54 |
| Tabela 7 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de bicuculina (BIC) na DMH. | 55 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|-----------------|--|
| µg | Micrograma |
| 3V | Terceiro ventrículo |
| 5-HIAA | Ácido 5-hidroxi-indolacético |
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina ou serotonina |
| 5-HTP | 5-hidroxitriptofano |
| 8-OH-DPAT | 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina |
| ACh | Acetilcolina |
| ALDH | Enzima aldeído desidrogenase |
| ANS TAM | Atividade nervosa simpática para o tecido adiposo marrom |
| ANS | Atividade nervosa simpática |
| AVE | Acidente vascular encefálico |
| AVPO | Região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo |
| BIC | Bicuculina |
| bpm | Batimento(s) por minuto |
| CINC | Citocina indutora de quimioatração de neutrófilos induzido por citocinas |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| DA | Dopamina |
| DH | Região hipotalâmica dorsal |
| DMH | Região dorsomedial do hipotálamo |
| DOPAC | Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético |
| ECD | Detecção eletroquímica |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Teste imunoenzimático por ensaio de imunoabsorção enzimática |
| FC | Frequência cardíaca |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GMPC | Monofosfato cíclico de guanosina |
| h | Hora(s) |
| HPA | Hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta <i>performance</i> |

| | |
|----------------|---|
| Hz | Hertz |
| Icv | Intracerebroventricular ou intracerebroventricularmente |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IML | Coluna intermediolateral da medula espinal |
| iNOS | Isoforma indutível da enzima óxido nítrico sintase |
| Ip | Intraperitoneal ou intraperitonealmente |
| Iv | Intravenoso(a) ou intravenosamente |
| kg | Quilograma(s) |
| LBP | Proteína ligante de lipopolissacarídeo |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MAO | Enzima monoamino oxidase |
| MAT | Proteína transportadora de monoaminas |
| min | Minuto(s) |
| ml | Mililitro(s) |
| mm | Milímetro(s) |
| mM | Milimolar(ess) |
| mmHg | Milímetro(s) de mercúrio |
| MnPO | Região mediana da área pré-óptica |
| MPA | Área pré-óptica medial |
| mPGES-1 | Prostaglandina E sintase-1 microssomal |
| Mt | Trato mamilotalâmico |
| NA | Noradrenalina |
| NF-κB | Fator nuclear κB |
| NMDA | N-metil D-Aspartato |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| O ₂ | Oxigênio |
| PAM | Pressão arterial média |
| PAMP | Moléculas associadas a patógenos |
| PG | Prostaglandina |
| PKA | Proteína quinase A |
| PVN | Núcleo paraventricular do hipotálamo |
| Py | Trato piramidal |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| R | Receptor(es) |
| rms | Raiz da média ao quadrado |
| rpm | Rotação(ões) por minuto |
| rRPa | Núcleo rostral pálido da rafe |
| SERT | Proteína transportadora de serotonina |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNS | Sistema nervoso simpático |
| Ta | Temperatura ambiente |
| TAM | Tecido adiposo marrom |
| Tc | Temperatura corporal |
| Tcauda | Temperatura da cauda |
| TLR | Receptor reconhecedor de padrão |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| Tpele | Temperatura da pele |
| TPH | Enzima triptofano hidroxilase |
| TTAM | Temperatura do tecido adiposo marrom |
| UCP1 | Proteína(s) desacopladora(s) 1 |
| vs | Versus |
| $\alpha 7$ nAChR | Receptor(es) nicotínicos $\alpha 7$ |
| μm | Micrômetro(s) |
| μM | Micromolar(es) |

Lista de símbolos

| | |
|--------------------|---------------|
| β | Beta |
| κ | Kappa |
| α | Alfa |
| γ | Gama |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução..... | 19 |
| 1.1 | <i>Serotonina</i> | <i>19</i> |
| 1.2 | <i>Termorregulação.....</i> | <i>20</i> |
| 1.2.1 | <i>Termofetores e controle neural da temperatura corporal.....</i> | <i>20</i> |
| 1.2.2 | <i>Efeitos da 5-HT na termorregulação</i> | <i>23</i> |
| 1.3 | <i>Inflamação sistêmica.....</i> | <i>23</i> |
| 1.3.1 | <i>Inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo</i> | <i>23</i> |
| 1.3.2 | <i>Febre e sinalização pirogênica.....</i> | <i>25</i> |
| 1.3.3 | <i>Reflexo anti-inflamatório</i> | <i>26</i> |
| 2 | Objetivos | 28 |
| 2.1 | <i>Objetivo geral.....</i> | <i>28</i> |
| 2.2 | <i>Objetivos específicos.....</i> | <i>28</i> |
| 3 | Material e métodos..... | 29 |
| 3.1 | <i>Animais.....</i> | <i>29</i> |
| 3.2 | <i>Fármacos.....</i> | <i>30</i> |
| 3.3 | <i>Procedimentos experimentais realizados no Estudo 1.....</i> | <i>30</i> |
| 3.4 | <i>Procedimentos experimentais realizados nos Estudos 2 e 3.....</i> | <i>31</i> |
| 3.5 | <i>Temperatura da cauda (Tcauda) e índice de perda de calor pela cauda.....</i> | <i>33</i> |
| 3.6 | <i>Coleta de amostras.....</i> | <i>33</i> |
| 3.7 | <i>Cromatografia líquida de alta performance por detecção eletroquímica (HPLC-ECD).....</i> | <i>33</i> |
| 3.8 | <i>Dosagem de corticosterona por radioimunoensaio.....</i> | <i>34</i> |
| 3.9 | <i>Dosagem de óxido nítrico</i> | <i>34</i> |
| 3.10 | <i>Teste imunoenzimático por ensaio de imonoabsorção enzimática (ELISA) para dosagem de PGD₂ e PGE₂.....</i> | <i>35</i> |
| 3.11 | <i>Dosagem de citocinas plasmáticas e esplênicas.....</i> | <i>35</i> |
| 3.12 | <i>Análises estatísticas.....</i> | <i>36</i> |
| 4 | Resultados | 37 |
| 4.1 | <i>Resultados do Estudo 1: A 5-HT sistêmica inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM via inibição GABAérgica da DMH</i> | <i>37</i> |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 4.1.1 | A ativação de 5-HT _{1A} R na rRPa pelo 8-OH-DPAT iv inibe a ANS TAM e, consequentemente, inibe a termogênese pelo TAM | 37 |
| 4.1.2 | Atividade tônica de 5-HT _{1A} R no rRPa contribui para a inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM enquanto a pele/corpo está aquecida, mas não resfriada..... | 40 |
| 4.1.3 | A administração de 5-HT tanto iv quanto no rRPa inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM, mas por mecanismos diferentes | 43 |
| 4.1.4 | A 5-HT sistêmica atenua o aumento da ANS TAM e a termogênese pelo TAM causado pelo bloqueio de GABA _A R, mas não pela ativação de receptores glutamatérgicos no rRPa..... | 46 |
| 4.1.5 | Neurônios da DMH que são simpatoexcitatórios para o TAM estão ativos e mantêm o aumento da ANS TAM após o bloqueio de GABA _A R no rRPa | 49 |
| 4.1.6 | A 5-HT sistêmica atenua a termogênese pelo TAM induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos, mas não a termogênese pelo TAM induzida pelo bloqueio de GABA _A R na DMH | 52 |
| 4.2 | <i>Resultados do Estudo 2: A administração intracerebroventricular de 5-HT atenua a inflamação sistêmica leve.....</i> | <i>55</i> |
| 4.2.1 | A inflamação sistêmica leve causa redução das concentrações endógenas de 5-HT na AVPO, as quais estão correlacionadas negativamente aos níveis de corticosterona | 55 |
| 4.2.2 | A administração icv de 5-HT preveniu a febre induzida pela inflamação sistêmica leve..... | 56 |
| 4.2.3 | A administração icv de 5-HT atenuou o aumento os níveis de PGE ₂ na AVPO, de corticosterona e da IL-6 plasmática durante a inflamação sistêmica leve | 58 |
| 4.2.4 | A administração icv de 5-HT preveniu a redução da perda de calor pela cauda durante a inflamação sistêmica leve | 60 |
| 4.2.5 | A esplenectomia inibe o efeito antipirético da 5-HT icv durante a inflamação sistêmica leve | 60 |
| 4.2.6 | A esplenectomia não previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o aumento dos níveis de PGE ₂ na AVPO induzido pela inflamação sistêmica leve..... | 62 |
| 4.2.7 | A esplenectomia previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o TNF- α plasmático induzido pela inflamação sistêmica leve | 63 |
| 4.4 | <i>Resultados do Estudo 3: A administração intracerebroventricular de 5-HT previne a hipotensão e a hipotermia, além de reduzir os níveis de citocinas plasmáticas e esplênicas durante a inflamação sistêmica grave</i> | <i>67</i> |

| | | |
|------------------|--|------------|
| 4.4.1 | A inflamação sistêmica grave induziu a redução nos níveis endógenos de 5-HT e 5-HIAA enquanto aumentou os níveis de DA, DOPAC e NA na AVPO | 67 |
| 4.4.2 | A 5-HT icv preveniu a hipotensão e o aumento dos níveis plasmáticos de NO durante a inflamação sistêmica grave | 68 |
| 4.4.3 | A 5-HT preveniu a hipotermia sem reduzir os níveis de PGE ₂ na AVPO durante a inflamação sistêmica grave | 70 |
| 4.4.4 | A 5-HT icv atenuou os níveis de citocinas plasmáticas e de TNF- α e IL-10 esplênicos durante a inflamação sistêmica grave..... | 72 |
| 5 | Discussão | 75 |
| 5.1 | <i>Discussão do Estudo 1</i> | 75 |
| 5.2 | <i>Discussão do Estudo 2</i> | 78 |
| 5.3 | <i>Discussão do Estudo 3</i> | 82 |
| 7 | Conclusão | 87 |
| | Referências | 88 |
| Anexo A – | Artigo publicado na revista <i>Acta Physiologica</i> | 101 |
| Anexo B – | Artigo publicado na revista <i>Brain, Behavior, and Immunity</i> | 102 |
| Anexo C – | Artigo publicado na revista <i>Brain, Behavior, and Immunity</i> | 112 |
| Anexo D – | Artigo publicado na revista <i>The Journal of Physiology</i>, no formato de <i>Journal Club</i>... .. | 113 |
| Anexo E – | Comentário publicado na revista <i>Brain, Behavior, and Immunity</i> sobre os artigos publicados por Mota et al. no mesmo periódico | 114 |
| Anexo F – | Matéria publicada pela Agência FAPESP | 115 |
| Anexo G – | Entrevista publicada pela TV Bandeirantes..... | 119 |

1 Introdução

1.1 Serotonina

Em 1948, foi divulgada a descoberta de um potente vasoconstritor que viria a ser denominado serotonina (1-3). No ano seguinte, com a descoberta de sua estrutura química, a serotonina recebeu a denominação de 5-hidroxitriptamina (5-HT) (4). A 5-HT é um importante neurotransmissor e hormônio derivado do aminoácido essencial triptofano, o qual é adquirido a partir da dieta (5, 6). Na circulação sanguínea, o triptofano é carregado pela albumina (7), é estocado nas plaquetas (8), ou está livre no plasma. O triptofano livre no plasma pode atravessar a barreira hematoencefálica (9) e servir de substrato para a síntese neuronal de 5-HT. Da 5-HT sintetizada no organismo, 95% provêm das células enterocromafins e de neurônios serotoninérgicos intestinais (10-13), sendo também produzida por células do sistema imune (14, 15), enquanto 5% são sintetizados pelo sistema nervoso central (SNC) (16), em neurônios encontrados nos núcleos da rafe (17, 18). Nas células o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) 1, presente fora do SNC, ou pela TPH2, presente apenas no SNC e em neurônios entéricos (19-21). O 5-HTP é descarboxilado pelo ácido L-aromático descarboxilase e, então, convertido em 5-HT, a qual é transportada para o interior de vesículas por meio de uma proteína transportadora de monoaminas (MAT). A 5-HT, então, pode ser degradada pelas enzimas monoamino oxidase (MAO)-A e aldeído desidrogenase (ALDH), gerando o metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (22).

A 5-HT, liberada na fenda sináptica, ativa receptores serotoninérgicos pré-sinápticos e pós-sinápticos. Há seis famílias de receptores (R) serotoninérgicos (5-HT₁₋₇R) e 15 tipos de receptores, sendo que o 5-HT₃R é um receptor ionotrópico catiônico e os demais são receptores metabotrópicos (23). A 5-HT livre pode ser captada por células que expressam a proteína transportadora de 5-HT (SERT). Uma vez no citoplasma, a 5-HT pode ser armazenada em vesículas ou metabolizada em 5-HIAA (24). Estudos *in vitro* demonstraram que as SERT podem realizar o transporte de 5-HT em ambos os sentidos (influxo e efluxo) (25). A presença de SERT em vasos sanguíneos da barreira hematoencefálica de ratos (26) reforça a descoberta de que a 5-HT atravessa essa barreira, deslocando-se do SNC para a circulação sistêmica (27). Entretanto, não há na literatura estudos que demonstrem diretamente a existência do transporte da 5-HT através da barreira hematoencefálica da

periferia para o SNC, sendo improvável que a 5-HT cruze essa barreira em condições fisiológicas (28).

Uma variedade de condições, incluindo a ativação do sistema imune (29, 30) e o consumo de dieta rica em gordura (31), assim como distúrbios circulatórios, como a hipertensão (32), podem afetar o sistema serotoninérgico. Alterações dos níveis de 5-HT circulante podem influenciar a regulação de funções homeostáticas por meio da ativação de terminações nervosas aferentes (33, 34) ou diretamente em receptores centrais, apesar de o transporte da 5-HT através da barreira hematoencefálica ainda ser um assunto controverso (27, 28, 32). Interessantemente, camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentam níveis elevados de 5-HT no soro sanguíneo (31) e no TAM (35) e a inibição da síntese periférica de 5-HT reduz a adiposidade e a disfunção metabólica (35, 36). A importância da 5-HT está pautada nos seus efeitos sobre, basicamente, todos os sistemas do organismo, modulando diversas funções fisiológicas (37), como, por exemplo, as funções cardiovascular (32), cognitivo-comportamental (38), respiratória (39), imune (24, 40), metabólica (41-43) e termorregulatória (44-49).

A redução da temperatura corporal (T_c) costumava ser um dos efeitos adversos de alguns medicamentos antidepressivos e ansiolíticos (50, 51), incluindo o agonista de 5-HT_{1A}R, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) (52-55). Esse efeito revela o potencial da 5-HT em influenciar a T_c e tem estimulado o interesse no estudo dos mecanismos pelos quais a 5-HT induz hipotermia.

1.2 Termorregulação

1.2.1 Termoefetores e controle neural da temperatura corporal

O aumento da T_c ocorre tanto pelo aumento da geração de calor (termogênese) como pela redução da perda de calor (56). A termogênese é classificada em dois tipos: termogênese de tremor e termogênese de não-tremor. A termogênese pelo tremor ocorre pela contração muscular, enquanto a termogênese pelo não-tremor ocorre pela termogênese gerada pelo tecido adiposo marrom (TAM). Em roedores, os termoefetores mais estudados são a pele, em especial a pele da cauda, o TAM e os músculos esqueléticos (57, 58).

O controle do tônus simpático dos vasos sanguíneos cutâneos é um dos métodos pelo qual se dá o controle da perda de calor evaporativo. Em ratos, a cauda é um importante

termoefetor (59, 60) que controla 20% da perda de calor (61), permitindo a dissipação de calor quando o tônus vasoconstritor é reduzido e a retenção de calor quando esse tônus é aumentado (62, 63). Dada à importância da cauda, a temperatura da cauda (T_{cauda}) é utilizada para a mensuração do índice de perda de calor pela cauda, o que representa uma medida indireta do tônus simpático cutâneo (61).

O TAM está presente nos mamíferos e, especialmente em roedores, representa uma fonte importante de controle da T_c . A termogênese pelo TAM ocorre pela ativação de receptores adrenérgicos beta 3 (β_3) localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons. A ativação desses receptores pela sua interação com a noradrenalina (NA) liberada pelos nervos simpáticos que inervam o TAM, por exemplo, provoca a ativação da proteína quinase A (PKA), levando à quebra de triglicérides de ácidos graxos, os quais são substratos para a termogênese (64). Tais substratos ativam as proteínas desacopladoras (UCP) 1 (65), que são proteínas localizadas na membrana interna das mitocôndrias (64, 66). A ativação das UCP1, por sua vez, aumenta a condutância da membrana interna das mitocôndrias a prótons, dissipando, assim, o gradiente mitocondrial de prótons e convertendo a energia da oxidação dos substratos em calor (64). Com a atividade das UCP1, uma parte considerável dos nutrientes e oxigênio (O_2) (64) é utilizada como combustível para o TAM, o que pode ser mensurado indiretamente pelo aumento das taxas de dióxido de carbono (CO_2) expirado (46, 67). A termogênese pelo TAM contribui significativamente para a manutenção da T_c durante desafios ambientais, como frio (68) e desafios internos, como febre causada pela inflamação sistêmica (69) e febre causada pelo estresse (70), além de ser muito importante para a regulação da homeostase metabólica (35, 71-73).

A circuitaria neural que controla os termoefetores, em especial a vasoconstrição cutânea, a termogênese pelo TAM e a termogênese pelo tremor, foi revisada por Morrison e Nakamura (2019) (57, 58, 74), que reconciliaram resultados de diversos estudos para o desenvolvimento de um modelo, ainda em progresso, da circuitaria neural que controla a T_c . Esse modelo descreve que termorreceptores cutâneos (ativados de acordo com a temperatura da pele (T_{pele})) de neurônios aferentes sensoriais primários cuja primeira sinapse ocorre no corno dorsal da medula espinal, são ativados de acordo com um estímulo térmico e provocam a inibição ou a ativação dos termoefetores. Os neurônios de segunda ordem cujo corpo celular está localizado nos cornos dorsais da medula espinal que são ativados por estímulos térmicos, apresentam projeções glutamatérgicas para os núcleos parabraquiais laterais no tronco encefálico os quais, por sua vez, apresentam projeções glutamatérgicas para a região mediana da área pré-óptica do hipotálamo (57, 58, 74). O presente estudo menciona a região

anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO), que abrange a área pré-óptica medial (MPA), o núcleo pré-óptico medial, a área pré-óptica lateral, a região ventral da área pré-óptica lateral e parte da região mediana da área pré-óptica (MnPO).

A região mediana da área pré-óptica do hipotálamo apresenta projeções glutamatérgicas e GABAérgicas para a região medial da área pré-óptica do hipotálamo e projeções GABAérgicas para a região ventrolateral da área pré-óptica do hipotálamo. As regiões medial e ventrolateral da área pré-óptica, por sua vez, apresentam neurônios GABAérgicos que se projetam para diversas regiões encefálicas, como a região dorsomedial do hipotálamo (DMH) e o núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) (57, 75, 76). Conseqüentemente, a ativação de neurônios GABAérgicos da área pré-óptica medial e da região ventral da área pré-óptica lateral causa a inibição de neurônios simpatoexcitatórios (que são também glutamatérgicos) na DMH, a qual inclui a região dorsal hipotalâmica. A DMH é uma região essencial no modelo de circuitaria neural pelo qual os termorreceptores da pele ativam a termogênese por tremor muscular e pelo TAM (57, 58, 77). A ativação de neurônios simpatoexcitatórios da DMH excita neurônios simpatoexcitatórios no rRPa, uma região que apresenta populações neuronais simpáticas e somatomotoras, que enviam projeções glutamatérgicas e serotoninérgicas (78-81) para neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula espinal (IML). Parte dos neurônios da IML enviam projeções para neurônios do gânglio estrelado que, por sua vez, inervam o TAM (82).

Em termos práticos, a uma Ta e/ou Tpele aquecida, termorreceptores ativados pelo calor são estimulados, ativando neurônios do núcleo parabraquial lateral dorsal, que ativam neurônios glutamatérgicos na região mediana da área pré-óptica, os quais, por sua vez, ativam neurônios GABAérgicos na região medial e ventrolateral da área pré-óptica. A ativação dessa via inibe neurônios na DMH e no rRPa, causando a inibição da atividade nervosa simpática (ANS) para o TAM (ANS TAM) e, conseqüentemente, a inibição da termogênese (57, 58, 74).

Por outro lado, a uma Ta fria e/ou Tpele resfriada, termorreceptores ativados pelo frio são ativados, causando a ativação de neurônios do núcleo parabraquial lateral externo, que ativam neurônios GABAérgicos na região mediana da área pré-óptica, causando, assim, a inibição de neurônios das regiões medial e ventrolateral da área pré-óptica. Dessa maneira, ocorre a desinibição de neurônios simpatoexcitatórios na DMH e no rRPa, os quais recebem influência excitatória de regiões encefálicas ainda não estabelecidas, resultando na ativação da DMH e do rRPa e, conseqüentemente, no aumento da ANS TAM e na termogênese pelo TAM (57, 58, 74).

1.2.2 Efeitos da 5-HT na termorregulação

A administração intracerebroventricular (icv) de 5-HT ou 5-HTP causa hipotermia transitória (83), um efeito que pode ser atribuído ao aumento dos níveis encefálicos de 5-HT (84). O 8-OH-DPAT, um agonista de 5-HT_{1A}R, causa hipotermia (54, 55) por agir centralmente (85) inibindo tanto a ANS TAM e, conseqüentemente, reduzindo a termogênese pelo TAM (44, 45) e a termogênese pelo tremor (46, 86) durante o frio. Além disso, o 8-OH-DPAT causa vasodilatação cutânea e, conseqüentemente, provoca a perda de calor não evaporativo (87). Semelhantemente, a ativação sistêmica de 5-HT_{1A}R promove redução da febre e da vasoconstrição cutânea durante a inflamação sistêmica (88).

Nesse mesmo sentido, a administração de antagonistas de 5-HT_{1A}R e 5-HT₇R na AVPO atenua a hipotermia induzida por hipóxia (89), corroborando o papel criogênico da 5-HT. A administração icv da própria 5-HT e de um agonista de 5-HT₇R promove redução da Tc de maneira dose-dependente (90), enquanto que a administração subcutânea e em doses altas de um agonista de 5-HT₇R causa hipotermia (91). Além disso, animais *knockout* para 5-HT₇R não desenvolvem hipotermia após administração sistêmica de 5-HT, diferentemente dos animais controle (92). Ademais, identificou-se que a exposição ao estresse crônico produz disfunções termorregulatórias duradouras, que pode ter como causa a redução da liberação de 5-HT na AVPO (93). Diante disso, pode-se identificar que o sistema serotoninérgico desempenha um papel importante na termorregulação. Assim, uma das hipóteses desse estudo é que a 5-HT desempenha um papel central nas alterações termorregulatórias causada pela inflamação sistêmica.

1.3 Inflamação sistêmica

1.3.1 Inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo

O sistema imune desempenha um papel de defesa do organismo no combate a lesões ou a agentes nocivos (94). A inflamação é um sinal de interação neuroimune que apresenta quatro sinais cardenais: dor, calor, rubor e tumor. A inflamação ocorre diante da ativação do sistema imune frente a uma ameaça ao organismo, ao combate a lesões ou a agentes nocivos e à recuperação de lesões por meio do reparo tecidual (94). As respostas inflamatórias ocorrem

com a mobilização do sistema imune e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanoides (95).

Desafios imunes, como ocorrem em infecções bacterianas, podem ser experimentalmente mimetizados pela administração sistêmica de uma endotoxina chamada lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma molécula associada a patógenos (PAMP) e composto por moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas da membrana externa de bactérias gram-negativas (96). Uma vez no sangue, o LPS se liga à proteína ligante de LPS (LBP), que funciona como uma proteína carreadora de LPS para a proteína CD14 presente na membrana plasmática de macrófagos. A proteína CD14 está associada a um receptor reconhecedor de patógenos (TLR) 4, que são expressos em células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (97). O domínio extracelular do TLR4 está associado à proteína MD-2, que é essencial para a ligação do LPS ao TLR4 (98). Mudanças conformacionais ocorrem no TLR4 via interações entre proteínas intracelulares associadas ao seu domínio intracelular (99), causando a ativação dos TLR4 na membrana das células do sistema imune, que causa a ativação e translocação do fator nuclear (NF)- κ B para o núcleo celular (100). No núcleo, o NF- κ B ativa a transcrição de genes que codificam a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas (101), quimiocinas, moléculas de adesão celular, receptores (102), a enzima fosfolipase A2 e a forma induzível de enzimas que participam do processo inflamatório, como a óxido nítrico sintase (iNOS), a ciclooxigenase (COX)-2, a prostaglandina E sintase-1 microsomal (mPGES-1), que ativam circuitarias neurais que modulam a inflamação sistêmica (103-105).

As citocinas, usualmente mais estudadas em função de sua relevância, são o fator de necrose tumoral (TNF)- α (56, 106), as interleucinas (IL) 1 β , 6 e 8 e o interferon (IFN) γ (97, 105). Essas moléculas são produzidas durante infecções ou em resposta a endotoxinas bacterianas. As citocinas atuam sistemicamente e em células endoteliais dos vasos sanguíneos encefálicos, induzindo a expressão de COX-2, que catalisa a reação que produz PGH₂ a partir do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um ácido graxo polinsaturado liberado dos fosfolípídeos da membrana celular pela enzima fosfolipase A2 que é substrato de vias enzimáticas que resultam na produção dos eicosanoides, tromboxano A₂, fator de ativação plaquetária e da prostaglandina (PG) H₂. A mPGES-1, então, catalisa a reação que produz PGE₂ a partir da PGH₂, enquanto a PGD sintase catalisa a reação que produz PGD₂ a partir da PGH₂ (97, 105, 107, 108).

Há quatro vias pelas quais as citocinas influenciam diretamente o SNC:

- 1- ativação de terminações nervosas sensoriais pelos nervos vagal (109) e glossofaríngeo (110);
- 2- difusão de citocinas para órgãos circunventriculares, permitindo, assim, a entrada de substâncias imunoativas no SNC (111, 112). Os órgãos circunventriculares não apresentam barreira hematoencefálica, permitindo, assim, uma rota alternativa para a comunicação neuroimune (105);
- 3- secreção de substâncias imunoativas, como citocinas e prostaglandinas, pelas células da barreira hematoencefálica (113, 114);
- 4- sistema de transporte saturável de citocinas pelas células que constituem a barreira hematoencefálica (115).

1.3.2 Febre e sinalização pirogênica

A febre é o marco da inflamação sistêmica, sendo definida como o aumento regulado da Tc (96) produzido pela mobilização do sistema imune com ativação de células da imunidade inata e, conseqüentemente produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanoides. A febre surge, então, como resultado das respostas inflamatórias a patógenos, funcionando como um importante sinal da inflamação sistêmica (56, 97, 116). As citocinas circulantes induzem a produção de PGE₂ no endotélio hipotalâmico, causando o aumento dos níveis de PGE₂ na área pré-óptica do hipotálamo, que causa a elevação da Tc devido ao aumento da produção de calor e à redução da perda de calor (56, 61, 69, 117).

O aumento dos níveis de PGE₂ na AVPO é, na maioria dos casos, crucial para o desenvolvimento da febre (46, 118-120). A resposta febril diante da inflamação sistêmica leve induzida por LPS requer a síntese de PGE₂ por vasos sanguíneos localizados na AVPO (121), causando, assim, o aumento dos níveis de PGE₂ na AVPO (120, 122). Na AVPO, a PGE₂ atua em receptores EP3 (123) localizados, majoritariamente, em neurônios GABAérgicos (124), que contribuem para o aumento da Tc (125-127), e em receptores EP4 (128), que contribuem para a redução da Tc (129). A administração de PGE₂ na AVPO (mais especificamente nas regiões mediana e medial da área pré-óptica do hipotálamo), assim como a exposição ao frio, remove a influência de sinapses inibitórias na DMH e no rRPa, o que é suficiente para promover termogênese pelo TAM, vasoconstrição periférica e termogênese pelo tremor (44, 57, 124, 130-135).

Endogenamente, a PGD_2 é a prostaglandina que apresenta maior expressão no encéfalo de ratos (136). Em contraste aos efeitos pirogênicos da PGE_2 , a PGD_2 medeia a redução da Tc, apresentando, assim, efeitos criogênicos na inflamação sistêmica induzida por LPS (137), na privação alimentar (138) e na hipertermia induzida por radiação (139). Na AVPO, a PGD_2 é produzida por neurônios sensíveis à temperatura (≥ 36 °C) diante do aumento da Tc (e manutenção em Tc elevada por 30 min, em estudo *in vitro*) e ativa receptores DP1, causando redução da Tc (140). Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o aumento da concentração de PGD_2 na AVPO após a incubação da AVPO com LPS e pela administração ip de LPS, respectivamente (137), o que poderia ser um mecanismo de controle que resulta na manutenção da Tc em níveis menos elevados. Corroborando esses estudos, a administração icv ou intra-AVPO de PGD_2 provoca redução da temperatura interna de maneira dose-dependente (137, 139).

A inflamação sistêmica leve aumenta o catabolismo da NA no hipotálamo, o que sugere o aumento da liberação de NA nessa região (141). O aumento dos níveis de NA, na AVPO, contribui para a febre induzida pelo LPS (142-144). A inflamação sistêmica também causa o aumento dos níveis de dopamina (DA) (145, 146) e do seu principal metabólito, o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) (147) no encéfalo e, mais precisamente, no hipotálamo (141). A administração de um inibidor da recaptção de NA e DA causa elevação dos níveis de NA e DA na AVPO, vasoconstrição periférica, aumento da Tc e aumento da temperatura do encéfalo (148). Entretanto, o papel da DA na regulação da Tc e da inflamação sistêmica permanece desconhecido.

1.3.3 Reflexo anti-inflamatório

Há cerca de duas décadas atrás, a descoberta de que as respostas pró-inflamatórias são controladas por circuitos neurais conectou os campos da fisiologia, imunologia e neurociência (149-151). O “reflexo inflamatório” é uma resposta fisiológica que atenua aspectos inflamatórios diante da inflamação sistêmica, sendo, então, uma resposta anti-inflamatória (149-151). Pelo seu caráter anti-inflamatório, o “reflexo inflamatório” passou a ser denominado reflexo anti-inflamatório (152). Esse reflexo estabelece que a atividade neuronal modula a imunidade atuando por meio de um sistema aferente, de um sistema de integração no SNC e de um sistema eferente (151, 153).

A via aferente do reflexo anti-inflamatório consiste em terminais aferentes vagais que são ativados por citocinas circulantes (154). Os terminais axonais periféricos do nervo vago aferente projetam-se para o núcleo do trato solitário (NTS), uma região importante na integração da informação neural aferente e ajustes autonômicos (155). Neurônios do NTS projetam-se para diversas regiões do tronco cerebral e do prosencéfalo (156), ativando uma resposta simpática generalizada (157, 158), que inclui o aumento da liberação de NA na AVPO durante a hipotensão induzida por LPS (159). Estudos anteriores documentaram que as projeções noradrenérgicas do NTS para a AVPO (160) estão relacionadas à febre (161) e à hipotensão precoce (162) observadas na inflamação sistêmica grave. Além do NTS, neurônios noradrenérgicos localizados na área C1, a qual está localizada na região ventrolateral do bulbo, participam dos efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo estresse de restrição (163). Assim, a área C1 parece estar envolvida na integração e orquestração da eferência do reflexo anti-inflamatório. Entretanto, mais estudos são necessários para que o sistema de controle neural supraespinal do reflexo anti-inflamatório seja desvendado (153).

A via eferente do reflexo anti-inflamatório consiste em vias simpáticas e parassimpáticas, mediadas pelos nervos esplâncnico e vago, respectivamente (150, 151, 164). A ativação de tais vias eleva a atividade do nervo esplênico (165), que inerva o baço (149, 151). O baço é uma das fontes de células imunes recrutadas durante inflamação e infecções (166), sendo a maior fonte de TNF- α durante a inflamação sistêmica induzida pelo LPS (167). No baço, a NA liberada pelas terminações nervosas do nervo esplênico ativa receptores adrenérgicos β_2 que estão presentes em células T que expressam a enzima colina acetiltransferase, que catalisa a reação entre acetil-CoA e colina, resultando na formação de acetilcolina (ACh). A ACh produzida e liberada pelas células T ativa receptores nicotínicos α_7 (α_7 nAChR) que estão presentes em macrófagos residentes no baço o que, por sua vez, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias e controla a inflamação sistêmica (151). A perda de nervos noradrenérgicos no baço de pacientes que morreram de sepse sugere que a perda desses nervos prejudica a neuroimunomodulação (168). Camundongos sobreviventes à sepse polimicrobiana apresentam redução da resposta inflamatória frente ao desafio imune por LPS. Entretanto, essa resposta pode ser recuperada pela secção do nervo vago, o que indica que o nervo vago está continuamente ativo, reduzindo a ativação imune, um efeito que está associado ao número de células T produtoras de ACh no baço (169). Desse modo, propôs-se que a ativação constante do reflexo anti-inflamatório esplênico previne a exacerbação da resposta imune que causa a morte em animais com sepse. Corroborando essa proposta, foi demonstrado que o bloqueio de α_7 nAChR restaura a resposta inflamatória reduzida ao desafio

imune por LPS nesses sobreviventes (169). Adicionalmente, o uso de agonistas de receptores $\alpha 7nAChR$ reduz parâmetros pró-inflamatórios durante condições inflamatórias em roedores (170-175) e melhora da função cognitiva em adultos saudáveis (176).

Um estudo de Martelli et al. (2019) demonstrou que o reflexo anti-inflamatório resulta do aumento da atividade do nervo esplâncnico (152, 154) e que depende não somente do baço, mas também das glândulas supra-renais, do intestino, do estômago, do pâncreas e do fígado (152). Em vista dos potentes efeitos do reflexo anti-inflamatório, a sua ativação tem demonstrado potenciais terapêuticos em desordens inflamatórias, como a endotoxemia, sepse, choque hemorrágico, artrite reumatoide, obesidade e diabetes tipo 2 (164, 173).

2 Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

Investigar os efeitos termorregulatórios e neuroimunomodulatórios da 5-HT no sistema nervoso central e os efeitos termorregulatórios da 5-HT administrada no rRPa e sistemicamente, bem como estudar os mecanismos pelos quais a 5-HT modula variáveis termorregulatórias, cardiovasculares e neuroimunes.

2.2 *Objetivos específicos*

Objetivos do Estudo 1:

- Investigar os efeitos da administração de um agonista de 5-HT_{1A}R tanto iv quanto no rRPa sobre a ANS TAM e a termogênese pelo TAM durante o frio.
- Investigar o papel da 5-HT endógena no rRPa em animais com a pele aquecida ou resfriada.
- Investigar os efeitos da administração de 5-HT tanto iv quanto no rRPa sobre a ANS TAM e a termogênese pelo TAM e os mecanismos neurais envolvidos nos efeitos da 5-HT durante o frio.

Objetivos dos Estudos 2 e 3:

- Investigar os efeitos da inflamação sistêmica leve e grave nos níveis endógenos de neurotransmissores na AVPO, com ênfase na 5-HT.
- Investigar os efeitos da administração icv de 5-HT sobre os níveis de PGE₂ e PGD₂ na AVPO e em variáveis termorregulatórias, cardiovasculares e neuroimunes durante a inflamação sistêmica leve e/ou grave.
- Investigar os efeitos da esplenectomia sobre a Tc e sobre os níveis de PGE₂ e PGD₂ na AVPO, bem como de citocinas plasmáticas em ratos esplenectomizados durante a inflamação sistêmica leve.

3 Material e métodos

3.1 Animais

Os experimentos do Estudo 1 foram realizados na *Oregon Health & Science University*, onde foram utilizados ratos Sprague Dawley machos (Charles River, Indianapolis, IN, EUA), pesando 300-490 g. Os procedimentos realizados no Estudo 1 foram aprovados e realizados conforme orientações do *Institutional Animal Care and Use Committee* daquela universidade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (Ta) controlada (22-23 °C) em estante ventilada e submetidos a um ciclo claro:escuro de 12:12h com livre acesso à água e ração.

Os experimentos dos Estudos 2 e 3 foram realizados na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, onde foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, pesando 280-350 g. Os animais foram mantidos em ambiente com umidade (50-65%) e Ta (25±1 °C) controladas em estante ventilada e submetidos a um ciclo claro:escuro de 12:12h com livre acesso à água e ração. Os procedimentos realizados nos Estudos 2 e 3 foram aprovados e realizados conforme orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolos CEUA: 2015.1.1107.58.1 e 2018.1.113.58.0). Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). No dia anterior e no dia dos experimentos dos Estudos 2 e 3, os animais foram submetidos à Ta de 29 °C e 22±0,5 °C, respectivamente. Essas Ta correspondem à zona termoneutra e subtermoneutra para ratos (61, 62, 177).

3.2 *Fármacos*

Endotoxina obtida de *Escherichia coli* (LPS sorotipo 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi dissolvida em solução salina estéril nas doses de 100 µg/kg e 1,5 mg/kg, ambos no volume de 1 ml. Essas doses de LPS são capazes de induzir febre (178) e hipotermia seguida de febre (179, 180), respectivamente. No Estudo 1, a 5-HT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada na concentração de 500 µg/ml a um fluxo de infusão de 1 ml/h (181, 182) para a administração iv e na concentração de 33 mM (60 nl) para a administração no rRPa; já nos Estudos 2 e 3, a 5-HT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada nas concentrações de 5, 10 e 40 µg/µl para administração intracerebroventricular (icv) no volume de 1 µl. A 5-HT foi diluída em solução salina estéril com ácido ascórbico 0,1%. As concentrações de 5-HT icv (183) e o tempo de 30 min entre a microinjeção e a administração de LPS (184-186) foram escolhidos com base em outros estudos previamente publicados. Além disso, as respostas obtidas foram consistentes. O 8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em solução salina estéril e administrado via iv em bolus na concentração de 0,2 µg/µl (500 µl), uma concentração capaz de provocar hipotermia (55), ou no rRPa na concentração de 10 mM (60 nl), uma concentração capaz de inibir a ANS TAM durante o frio (44). WAY100635 foi administrado no rRPa na concentração de 10 mM (100 nl), a fim de realizar o bloqueio de 5-HT_{1A}R (45). N-methyl-d-aspartate (NMDA, 0,2 mM, 60 nl), bicuculina (500 µM, 100 nl) (44, 76) e muscimol (2 mM, 80 nl) (44) foram obtidos da Tocris (Bristol, Reino Unido) e diluídos em solução salina estéril.

3.3 *Procedimentos experimentais realizados no Estudo 1*

Os animais foram anestesiados com isoflurano (2%-3%) em oxigênio 100%. Então, foi realizada a tricotomia do tronco dos animais e foram implantadas cânulas de polipropileno na artéria e veia femorais. Foi feita a transição para anestesia iv (uretana e cloralose, 750 e 60 mg/kg, respectivamente) e os animais receberam D-tubocurarina iv (0,6 mg/rato iv, com suplementação de 0,3 mg/h) para causar paralisia muscular. Uma cânula foi inserida na traqueia para ventilação artificial com O₂ 100% a, aproximadamente, 180-240 ml/min. Os animais foram posicionados em um estereotáxico e com um fixador espinhal ao nível lombar. Um cobertor de silicone perfundido com água corrente foi enrolado no tronco do animal a fim de controlar a T_{pele} dos animais. Uma lâmpada de aquecimento foi utilizada para manter a

temperatura ambiente constante. Sensores de temperatura foram posicionados no reto para registro da T_c, no TAM interescapular para registro da TTAM e na região lombar, entre a superfície da pele e o cobertor térmico para registro da T_{pele}. A eficácia da anestesia foi verificada pela ausência de reflexos motores ao aperto forte da cauda. A ANS TAM foi registrada (CyberAmp 380, Axon Instruments, Union City, CA, EUA) de um nervo simpático dissecado do TAM e posicionado sobre um eletrodo bipolar imerso em óleo. A ANS TAM foi amplificada (5.000–50.000 vezes), filtrada (1-300 Hz), digitalizada e registrada usando o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design, CED, Cambridge, Reino Unido). Todas as variáveis foram analisadas e digitalizadas usando o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design, CED, Cambridge, Reino Unido). A administração de soluções veículo foi realizada iv, no rRPa e na DMH. Em nenhum desses casos as soluções veículo causaram mudanças na ANS TAM, termogênese pelo TAM ou variáveis cardiovasculares. Para a realização das nanoinjeções, micropipetas de vidro (diâmetro da ponta: aproximadamente 20-40 µm) foram colocadas nas regiões encefálicas de interesse utilizando um micromanipulador conectado ao estereotáxico. Com a barra dos dentes incisivos a -4 ou -5 mm, mantendo o crânio plano, as coordenadas para o rRPa foram: anteroposterior: de -2,8 a -3,5 mm do lambda, dorsoventral: de 9,6 a 9,7 mm ventral à superfície dural, na linha mediana. As coordenadas para a DMH foram: anteroposterior: de -3,0 a -3,2 mm do bregma, dorsoventral: de 8,0 a 8,2 mm ventral à superfície dural, lateral: 0,3 a 0,4 mm à linha mediana. Esferas fluorescentes (1:100, v/v, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foram injetadas nos sítios de injeção dos fármacos a fim de identificá-los histologicamente. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram coletados e pós-fixados por, no mínimo, 12 horas em paraformaldeído 5% e seccionados em um micrótomo. Secções histológicas de 60 µm foram montadas em lâminas e fotografadas.

3.4 Procedimentos experimentais realizados nos Estudos 2 e 3

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 100 mg/kg, respectivamente), via intraperitoneal (ip), e, enquanto os animais estavam anestesiados, tiveram seu abdômen e superfície do crânio tricotomizados. Foi realizada uma incisão na pele e músculo na linha abdominal média para o implante de um dispositivo portátil (*datalogger*) de registro da T_c (registrada em intervalos de 5 min no dia do experimento) na cavidade peritoneal (SubCue, Calgary, AB, Canadá). Nos animais que foram submetidos aos

experimentos relacionados ao papel do baço na febre induzida por inflamação sistêmica leve, a incisão cirúrgica foi realizada ao nível do baço, ou seja, no quadrante dorsolateral superior esquerdo do abdômen para a extração do baço, com sutura dos vasos sanguíneos para evitar sangramento, e inserção de *datalogger* na cavidade peritoneal nos grupos de animais esplenectomizados. Ao final dessas cirurgias (lapatomia e/ou esplenectomia), a camada muscular foi suturada e a pele dos animais foi fixada com grampos cirúrgicos. Nos grupos de animais com cirurgia fictícia, comparados aos animais esplenectomizados, os procedimentos foram os mesmos destes animais, sendo que o baço foi mantido intacto. Então, os animais foram posicionados no estereotáxico a fim da implantação de uma cânula (22 G de diâmetro e 16 mm de comprimento) no terceiro ventrículo cerebral (3V) com a barra dos dentes incisivos a -3,3 mm utilizando as coordenadas: anteroposterior: -0,4 mm ao bregma, anteroventral: -4,5 mm ventral à superfície do crânio, na linha mediana. O posicionamento correto da cânula foi observado pelo refluxo de líquido cefalorraquidiano após a inserção da cânula (187). A cânula foi fixada ao crânio por parafusos e acrílico odontológico e um mandril de aço foi inserido na cânula para prevenir oclusão e entrada de microrganismos. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram tratados com pentabiótico veterinário (24.000 UI/kg; Zoetis, Brazil) e analgésico (niglumine 2,5 mg/kg) e alojados individualmente por sete dias até o dia do experimento, sete dias após a cirurgia. Um dia antes do experimento, os animais destinados ao Estudo 3 foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 100 mg/kg, respectivamente), via ip, e, enquanto os animais estavam anestesiados, tiveram sua região inguinal tricotomizada e uma incisão na pele próxima à linha inguinal foi realizada a fim de realizar o implante de cânulas de polipropileno na veia e artéria femorais a fim de realizar a administração de fármacos e de acessar parâmetros cardiovasculares, respectivamente. Ambos os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente na região interescapular e suturados à pele. No dia seguinte, o cateter arterial foi conectado a um transdutor conectado a um amplificador ligado a um computador. O registro da pressão arterial pulsátil (PAP) foi utilizado para o cálculo da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), utilizando o software LabChart (ADInstruments, USA). Os animais foram deixados em aclimatação por 30 min e, então, foi realizada a microinjeção icv de 5-HT ou veículo utilizando uma seringa de Hamilton de 5 µl conectada a uma agulha dental (30 G de diâmetro e 20 mm de comprimento) por um cateter de polipropileno. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta sanguínea, do baço, do encéfalo e do *datalogger*. Os dados contidos no *datalogger* foram extraídos (Subcue, Calgary, AB, Canadá) e calibrados de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 *Temperatura da cauda (Tcauda) e índice de perda de calor pela cauda*

A Tcauda do 2º terço do comprimento da cauda foi mensurada utilizando-se uma câmera de captação de ondas de infravermelho (FLIR ONE for iOS P/N: 435-002-02-00, EUA). Os valores da Tcauda foram utilizados no cálculo do índice de perda de calor pela cauda, o qual indica o nível de fluxo sanguíneo pela cauda (61). Esse índice varia de 0 a 1 (máxima vasoconstrição e máxima vasodilatação) e foi calculado pela seguinte fórmula: índice de perda de calor = $(T_{cauda} - T_a)/(T_c - T_a)$, considerando Ta como a temperatura ambiente.

3.6 *Coleta de amostras*

O sangue foi coletado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugado (2.200 g, 3.500 rpm, 20 min, 4°C) para coleta do plasma. Os encéfalos e os baços foram rapidamente extraídos e congelados em isopentano (-55°C) resfriado em gelo seco. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C. Amostras da AVPO foram coletadas de fatias de 500 µm (Estudo 2) ou 1.500 µm (Estudo 3) seccionadas em criostato a -20°C utilizando uma agulha de 0,9 mm de diâmetro para obter amostras bilateralmente. A dissecação foi feita com base nas coordenadas: anteroposterior: 0 mm e dorsoventral: -8 mm, ambos em relação ao bregma, ao nível da visualização do quiasma óptico, da comissura anterior e dos ventrículos laterais (188).

3.7 *Cromatografia líquida de alta performance por detecção eletroquímica (HPLC-ECD)*

Amostras da AVPO foram homogeneizadas em uma solução de ácido perclórico (PCA 0,15 M) e EDTA (0,1 mM) contendo isoproterenol como padrão interno. Os homogenatos foram centrifugados (18.000 g, 5 min, 4°C). Os sobrenadantes obtidos foram filtrados (membrana de 0,22 µm de diâmetro, Durapore, Millipore) e submetidos à hidrólise por aquecimento a 94°C durante 5 min antes da injeção no sistema de HPLC-ECD (Estudo 2: SIL-10ADvp; Shimadzu, Kyoto, Japão; estudo 3: UltiMate 3000 acoplado ao Coulochem III; Dionex, Germering, Alemanha). A separação foi realizada a 32 ou 35°C em coluna de fase reversa, precedida por uma pré-coluna. A fase móvel foi constituída por fosfato de sódio monobásico (75 mM), cloreto de sódio (10 mM), EDTA (25 µM), ácido octano-sulfônico de

sódio (1,7 mM) e acetonitrila 4%, sendo o pH da solução ajustado para 3,5 com ácido fosfórico. Cada amostra gerou um cromatograma, o qual foi analisado (Estudo 2: Class-VP, Shimadzu, Kyoto, Japão; estudo 3: Chromeleon, versão 6.8; Dionex, Germering, Alemanha) pelo tempo de retenção de pico de cada analito e foi quantificado pelo método de padrão interno em função da altura de cada pico. Todas as amostras referentes ao mesmo estudo foram processadas na mesma análise para evitar discrepâncias. As concentrações foram normalizadas em relação à quantidade de proteína total, detectada pelo método de Bradford modificado (Bio-Rad Laboratories, EUA) (189).

3.8 *Dosagem de corticosterona por radioimunoensaio*

A corticosterona foi extraída de 25 µl de plasma sanguíneo por meio da adição de 1 ml de etanol 100 %. A solução foi agitada e centrifugada (1.200 rpm, 15 min, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e liofilizado. Os níveis de corticosterona foram analisados por radioimunoensaio utilizando-se um anticorpo anti-corticosterona (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA). Os limites de detecção foram de 0,12 a 2.000 µg/dl.

3.9 *Dosagem de óxido nítrico*

Os valores plasmáticos de NO foram mensurados indiretamente pelos valores de nitrato pelo método de quimioluminescência. As amostras foram desproteinizadas por precipitação adicionando etanol 100% e mantendo em agitação a 4°C seguido por agitação e resfriando a -20°C por 30 min. As amostras foram, então, centrifugadas (4.000 g, 10 min, 25°C) e injetadas na câmara de reação com VCl₃ 0,8% com HCl 1N a 95°C, convertendo, assim, nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO foi, então, transposto a uma câmara de quimioluminescência NO/ozônio de um analisador de NO (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA). As reações resultaram em emissão de fótons, a qual foi detectada e convertida em um sinal elétrico que foi detectado, amplificado e processado por um transdutor analógico-digital, criando um traçado gráfico, no qual a área sob a curva corresponde à concentração de nitrato.

3.10 Teste imunoenzimático por ensaio de imonoabsorção enzimática (ELISA) para dosagem de PGD₂ e PGE₂

Amostras da AVPO foram homogeneizadas em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, contendo EDTA (1 mM) e indometacina (10 µg/ml) e centrifugadas (18.000 g, 10 min, 4 °C) para a coleta do sobrenadante. A dosagem de PGD₂ e PGE₂ foi determinada por kits ELISA e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Para o Estudo 2, os limites de detecção para PGD₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) e PGE₂ (Abcam, Cambridge, MA, EUA) foram de 19,5 a 2.500 pg/ml e 39,1 a 2.500 pg/ml. Para o Estudo 3, os limites de detecção para PGD₂ e PGE₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) foram de 2 a 5.000 pg/ml e 7,8 a 1.000 pg/ml. A concentração das proteínas no sobrenadante foi analisada pelo método de Bradford modificado (Bio-Rad Laboratories, EUA) (189) e utilizada para a normalização dos resultados.

3.11 Dosagem de citocinas plasmáticas e esplênicas

As citocinas plasmáticas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ foram analisadas por kits ELISA de acordo com as instruções dos fabricantes (rat DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os limites de detecção foram: 62,5 a 4.000 pg/ml, 62,5 a 4.000 pg/ml, 125 a 8.000 pg/ml, 62,5 a 4.000 pg/ml e 39,1 a 2.500 pg/ml para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ , respectivamente. Para as dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ no baço, as amostras foram homogeneizadas em PBS com um coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e centrifugadas (18.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado e analisado utilizando esferas superparamagnéticas codificadas por cor para anticorpos específicos para cada citocina (rat magnetic Luminex, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As esferas foram incubadas com as amostras e as citocinas foram identificadas por anticorpos biotinizados e um conjugado ficoeritrina-estreptavidina. Os limites de detecção para esse ensaio foram: 232 a 56.400 pg/ml, 18,5 a 4.500 pg/ml, 170 a 41.300 pg/ml, 19,7 a 4.790 pg/ml e 509 a 123.600 pg/ml para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ , respectivamente.

3.12 Análises estatísticas

Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

No Estudo 1, a ANS TAM foi calculada (Spike 2, CED) como a raiz da média ao quadrado (rms) do poder total de 0,1 a 20 Hz da frequência de banda do autoespectro por médias não sobrepostas de 4 s. Todos os valores de ANS TAM são expressos em % basal, onde o valor 'basal', em μV , é definido individualmente nos experimentos e representa a média do valor de rms durante 30 s de atividade simpática quiescente, registrada enquanto a pele do animal está aquecida acima de 36°C . As variáveis são mostradas como controle ou valores basais obtidos durante 30 s antes de um tratamento e 30 s durante a máxima resposta observada, entre 3 ou 5 min após um tratamento. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não atenderam à distribuição normal, o teste de Wilcoxon foi utilizado para analisar todas as comparações pareadas.

No Estudo 2, o índice térmico foi calculado a partir da área sob a curva do período que compreende entre 120 e 300 min, tendo como linha de base $37,5^\circ\text{C}$. A área sob a curva é uma maneira usual de se mensurar a amplitude da resposta febril (190, 191). Os valores do índice térmico foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Bonferroni, quando mais de dois grupos foram analisados, ou por teste t não-pareado, quando dois grupos foram analisados. Os níveis de 5-HT, 5-HIAA, PGE_2 , PGD_2 , corticosterona, bem como os níveis de plasmáticos e esplênicos de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6, IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$ foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Bonferroni. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para determinar a correlação entre as variáveis, sendo que -1 e +1 representam correlação máxima negativa e positiva, respectivamente. A Tcauda e o índice de perda de calor pela cauda foram analisados utilizando o teste ANOVA de duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni.

No Estudo 3, os valores basais da PAM e da FC foram obtidos utilizando a média de 15 min de registro antes da injeção icv. Foi realizada a média dos valores de 1 min de registro a cada 20 min ao longo do experimento. PAM, FC e Tc foram analisadas pelo teste ANOVA para amostras repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os níveis de 5-HT, 5-HIAA, DA, DOPAC, NA, nitrato, PGE_2 , PGD_2 , bem como os níveis de $\text{IL-1}\beta$, IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$ plasmáticos e de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6, IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$ esplênicos foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Bonferroni. O $\text{TNF-}\alpha$ plasmático foi

analisado pelo teste de Mann Whitney. A IL-6 plasmática e a metabolização da 5-HT (5-HIAA/5-HT) e da DA (DOPAC/DA) foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os valores não detectáveis não foram incluídos nas análises estatísticas.

4 Resultados

4.1 Resultados do Estudo 1: A 5-HT sistêmica inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM via inibição GABAérgica da DMH

4.1.1 A ativação de 5-HT_{1A}R na rRPa pelo 8-OH-DPAT iv inibe a ANS TAM e, consequentemente, inibe a termogênese pelo TAM

Primeiramente, foi investigado se a inibição da termogênese pelo TAM devido à ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa (44, 45) seria um dos mecanismos que contribuem para a hipotermia induzida pela administração sistêmica de 8-OH-DPAT (54, 55, 85, 192). Como a administração iv de 8-OH-DPAT causa bradicardia e hipotensão (193), bem como a administração intracisternal de 8-OH-DPAT reduz os componentes vasomotor e cardíaco em resposta à ativação da DMH e ao estresse agudo psicológico (194), o presente estudo também investigou se a ativação de 5-HT_{1A}R na rRPa contribui para os efeitos cardiovasculares do 8-OH-DPAT iv.

A fim de se investigar os potenciais efeitos inibitórios do 8-OH-DPAT iv, reduziu-se a T_{pele} e, consequentemente, a T_c, a fim de aumentar a ANS TAM e TTAM. A administração iv de 8-OH-DPAT inibiu a ANS TAM e, consequentemente, causou a redução da TTAM e do CO₂ expirado, além de reduzir a FC e a PAM, durante o frio (Figura 1A, Tabela 1).

Com o objetivo de determinar se a inibição da ANS TAM e termogênese pelo TAM observada após a administração do 8-OH-DPAT iv ocorreria devido à ativação de receptores 5HT_{1A} no rRPa, o animal foi pré-tratado no rRPa com um antagonista de 5HT_{1A}R, o WAY100635. O pré-tratamento com WAY100635 preveniu completamente a inibição da ANS TAM induzida pelo 8-OH-DPAT iv, assim como a redução da TTAM, do CO₂ expirado e da FC, mas não da PAM (Figuras 1A e 1B, Tabela 1).

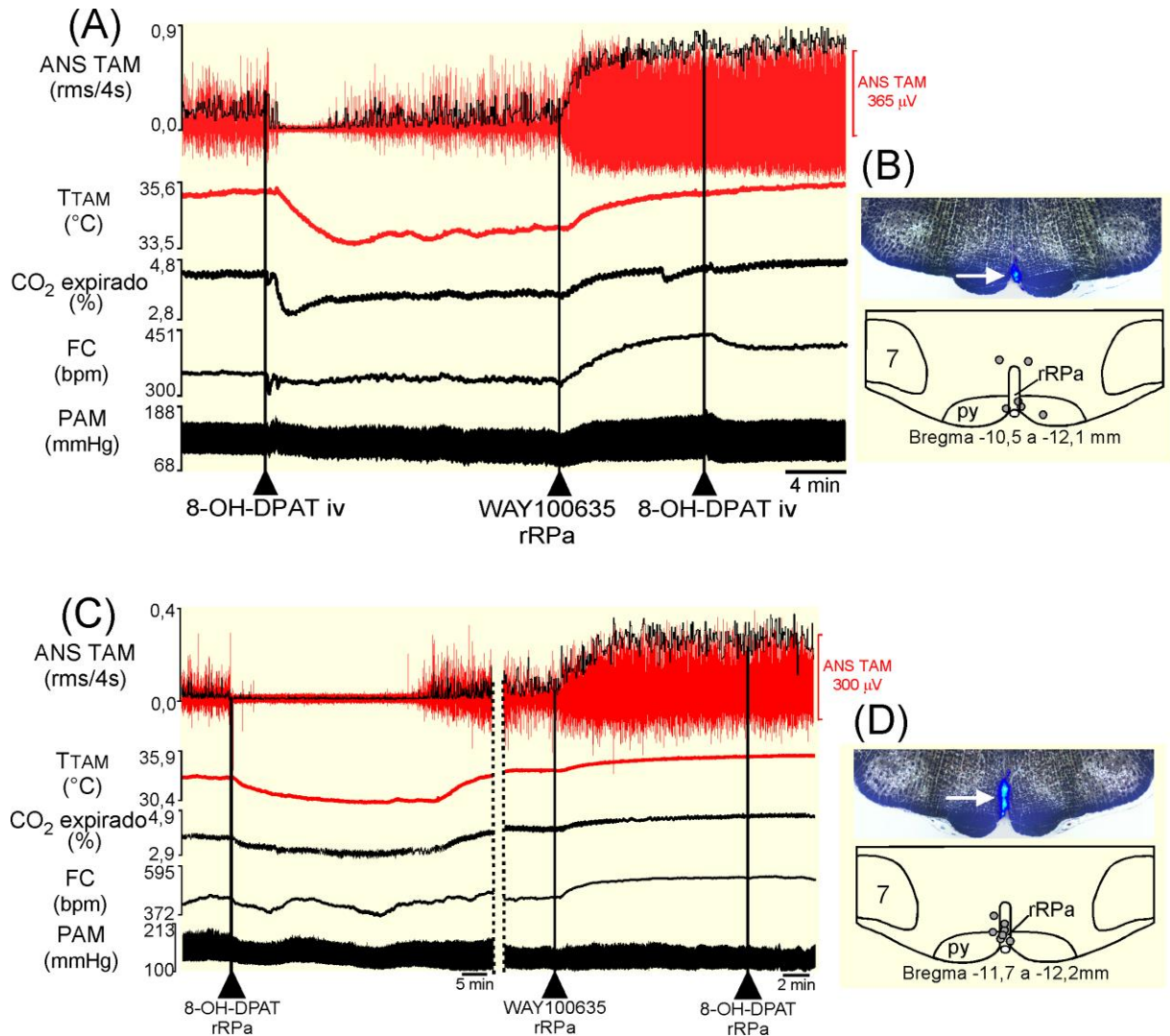


Figura 1 – A ativação de 5-HT_{1A}R na rRPa pelo 8-OH-DPAT iv inibe a ANS TAM e, consequentemente, inibe a termogênese pelo TAM. (A) A administração iv de 8-OH-DPAT (100 µg, 500 µl) reduziu a atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM), o CO₂ expirado, a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM). A nanoinjeção de WAY100635 no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) potencializou a ANS TAM e preveniu a inibição na ANS TAM e a termogênese pelo TAM induzida pelo 8-OH-DPAT. (B e D) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais do rRPa com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. py: trato piramidal, 7: núcleo motor facial. (C) A nanoinjeção de 8-OH-DPAT (10 mM, 60 nl) no rRPa reduziu a ANS TAM, TTAM, CO₂ expirado e FC. O pré-tratamento do rRPa com WAY100635 preveniu a inibição da termogênese pelo TAM induzida pelo 8-OH-DPAT. As linhas verticais pontilhadas representam um intervalo de 23 min. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

A nanoinjeção de 8-OH-DPAT diretamente no rRPa inibe o tremor e o aumento da ANS TAM causado pela leptina ou pelo resfriamento da pele/corpo (44-46) e causa bradicardia (45). Tal afirmação vai ao encontro dos resultados do presente estudo, que demonstra os efeitos simpatoinibitórios do 8-OH-DPAT administrado no rRPa sobre a ANS TAM, causando, assim, a redução da TTAM e do CO₂ expirado (Figuras 1C e 1D, Tabela 1). A administração de 8-OH-DPAT no rRPa também reduziu a FC e a PAM. O pré-tratamento com WAY100635 no rRPa preveniu completamente a redução da ANS TAM, da TTAM, do

CO₂ expirado, da FC e da PAM (Figuras 1C e 1D, Tabela 1). Esses resultados indicam que a inibição na ANS TAM e da termogênese pelo TAM induzida pela administração de 8-OH-DPAT tanto iv quanto no rRPa requer a ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa.

Tabela 1 – Papel de 5-HT_{1A}R nos efeitos do 8-OH-DPAT iv ou da nanoinjeção local de 8-OH-DPAT no rRPa na termogênese pelo TAM evocada pelo resfriamento da pele/corpo.

| | | 8-OH-DPAT iv (n=6) | | 8-OH-DPAT no rRPa (n=7) | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | | Pré-WAY100635 | Pós-WAY100635 | Pré-WAY100635 | Pós-WAY100635 |
| ANS TAM (% basal) | Pré-8-OH-DPAT | 901±151 | 1576±717 | 652±249 | 1237±404§ |
| | Efeito do 8-OH-DPAT | -774±155* | -82±350# | -500±233* | -148±82# |
| TTAM (°C) | Pré-8-OH-DPAT | 35,4±0,2 | 35,2±0,3 | 34,3±0,5 | 35,5±0,3§ |
| | Efeito do 8-OH-DPAT | -0,8±0,1* | 0,0±0,0# | -0,8±0,1* | 0,0±0,0# |
| CO₂ expirado (%) | Pré-8-OH-DPAT | 5,4±0,2 | 5,6±0,3 | 4,8±0,5 | 5,3±0,5§ |
| | Efeito do 8-OH-DPAT | -0,7±0,1* | -0,1±0,1# | -0,3±0,1* | 0,0±0,0# |
| FC (bpm) | Pré-8-OH-DPAT | 406±16 | 421±19 | 408±11 | 445±17§ |
| | Efeito do 8-OH-DPAT | -50±7* | -18±10# | -28±5* | -5±2# |
| PAM (mmHg) | Pré-8-OH-DPAT | 115±2 | 110±4 | 112±8 | 124±3 |
| | Efeito do 8-OH-DPAT | -10±3* | -11±2* | -7±3* | -3±1 |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Foi administrado 8-OH-DPAT intravenosamente (iv) ou no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) e WAY100635 no rRPa em ratos com pele/corpo resfriada(o) (T_{pele}=35,4±0,1 °C, T_c=35,8±0,1 °C), sob elevados níveis de ANS TAM e de termogênese pelo TAM. Os valores das variáveis no período “Pré” foram obtidos durante o período de 30 s antes da administração do fármaco. Os valores das variáveis no período “Pós” foram obtidos durante o período de 30 s durante o período de maior inibição da ANS TAM durante o efeito do fármaco até 3 min após a sua administração. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-8-OH-DPAT, §P<0,05 vs Pré-WAY100635 e Pré-8-OH-DPAT e #P<0,05 vs Efeito do 8-OH-DPAT Pré-WAY100635. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.1.2 Atividade tônica de 5-HT_{1A}R no rRPa contribui para a inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM enquanto a pele/corpo está aquecida, mas não resfriada

O tratamento do rRPa com WAY100635 causou o aumento da ANS TAM (Figura 2A, Tabela 2). Tal achado é consistente com uma inibição tônica de neurônios simpáticos no rRPa mediada por 5-HT_{1A}R. A fim de investigar essa hipótese, os animais foram separados em dois grupos, um grupo de animais intactos, ou seja, que não receberam nenhum agonista serotoninérgico, e outro grupo de animais não-intactos, ou seja, que receberam pelo menos um agonista serotoninérgico. A administração de WAY100635 no rRPa em animais intactos com a pele aquecida aumentou a ANS TAM, a TTAM, o CO₂ expirado, a FC e a PAM (Figuras 2A e 2B, Tabela 2). Em contrapartida, em animais intactos cuja pele/corpo foi resfriada(o) a administração de WAY100635 no rRPa não mudou significativamente a ANS TAM, a TTAM, o CO₂ expirado, nem as variáveis cardiovasculares (Figuras 2C e 2D, Tabela 2). Por outro lado, em animais não intactos cuja pele/corpo foi resfriada(o), a administração de WAY100635 no rRPa potencializou a ANS TAM, aumentou a TTAM, o CO₂ expirado, a FC e a PAM (Figuras 2E e 2F, Tabela 2). Esses resultados sugerem que existe uma ativação tônica de 5HT_{1A}R sobre os neurônios simpáticos do rRPa que contribui para a inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM em animais com a pele/corpo aquecida(o).

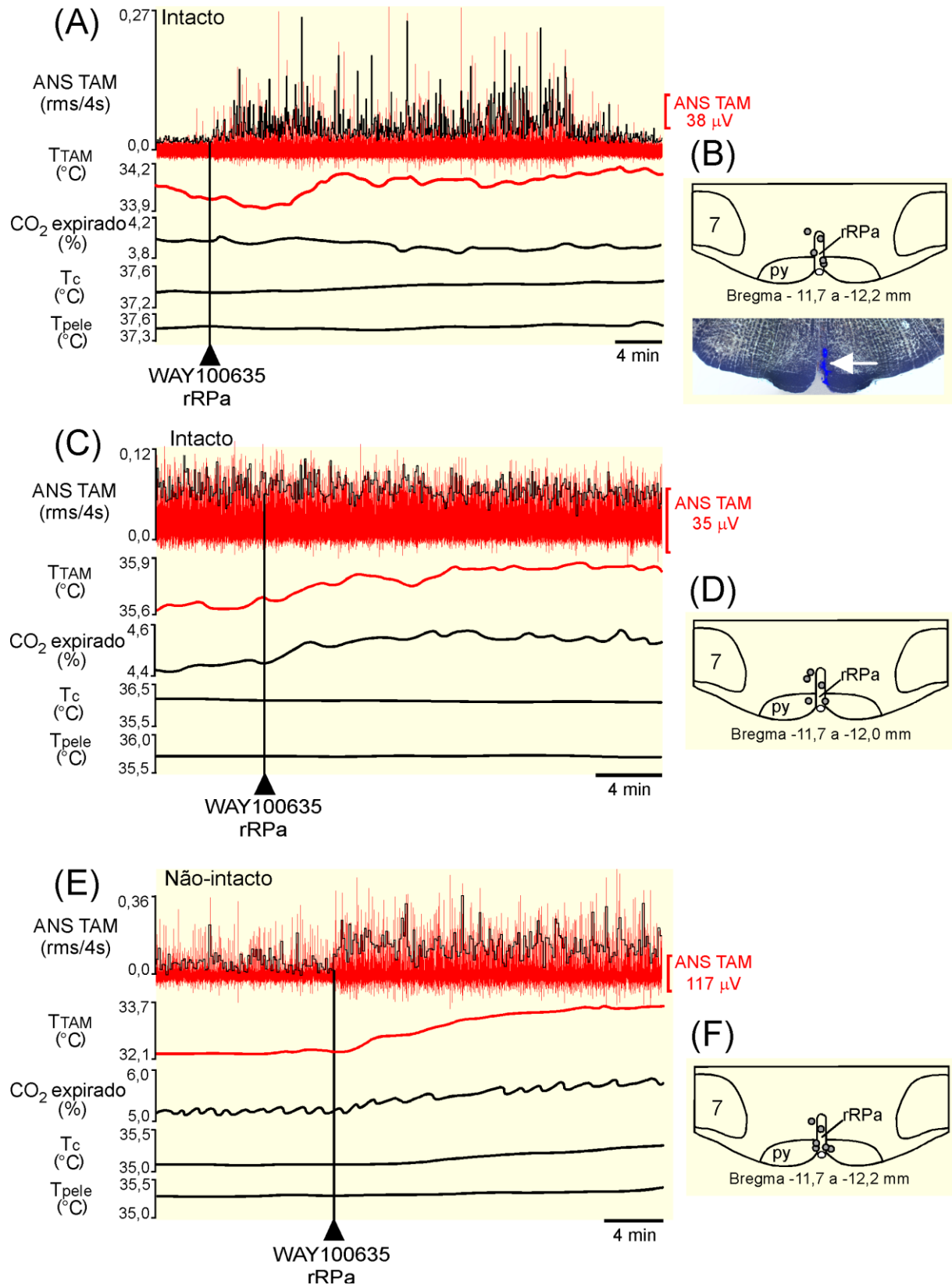


Figura 2 – O bloqueio de 5-HT_{1A}R no rRPa aumentou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM em animais intactos cuja pele/corpo estava(m) aquecida(os) e em animais não intactos cuja pele/corpo estava(m) resfriado(s). (A) A nanoinjeção de WAY100635 (10 mM, 100 nl) no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) de animais intactos (que não receberam a administração de agonista(s) serotoninérgico(s) previamente ao WAY100635) com pele/corpo aquecida(o) aumentou a atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo

marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM) e o CO₂ expirado. (B, D e F) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais do rRPa com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. py: trato piramidal, 7: núcleo motor facial. (C) A nanoinjeção de WAY100635 (10 mM, 100 nl) no rRPa de animais intactos não afetou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pelo resfriamento da pele/corpo. (E) A nanoinjeção de WAY100635 (10 mM, 100 nl) no rRPa de animais não intactos (que receberam a administração de agonista(s) serotoninérgico(s) previamente ao WAY100635) exacerbou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pelo resfriamento da pele/corpo, potencializando o aumento da ANS TAM, da TTAM e do CO₂ expirado. Tc: temperatura corporal, Tpele: temperatura da pele. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 2 – Efeito da nanoinjeção local de WAY100635 no rRPa na ANS TAM e na termogênese pelo TAM.

| | | Intacto | | Não-intacto |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | Pele aquecida (n=5) | Pele resfriada (n=5) | Pele resfriada (n=6) |
| ANS TAM | Pré-WAY100635 | 167±17 | 752±333 | 542±154 |
| | Efeito do WAY100635 | +423±108* | +121±74 | +700±187* |
| TTAM (°C) | Pré-WAY100635 | 34,2±0,8 | 35,6±0,3 | 34,0±0,4 |
| | Efeito do WAY100635 | +0,8±0,3* | 0,0±0,1 | +1,0±0,1* |
| CO₂ expirado (%) | Pré-WAY100635 | 4,4±0,4 | 5,3±0,3 | 4,2±0,5 |
| | Efeito do WAY100635 | +0,3±0,1* | +0,1±0,1 | +0,4±0,0* |
| FC (bpm) | Pré-WAY100635 | 362±24 | 454±13 | 397±11 |
| | Efeito do WAY100635 | 54±20* | 6±3 | 49±8* |
| PAM (mmHg) | Pré-WAY100635 | 117±5 | 133±4 | 112±8 |
| | Efeito do WAY100635 | 7±4* | 2±1 | 8±2* |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). A nanoinjeção de WAY100635 no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) foi realizada em ratos intactos sob pele aquecida (Tpele=36,4±0,2 °C, Tc=36,5±0,2 °C) ou resfriada (intactos ou não-intactos) (Tpele=35,5±0,1 °C, Tc=35,8±0,1 °C). Ratos não-intactos, mas não ratos intactos, receberam a injeção prévia de algum agonista serotoninérgico antes da nanoinjeção de WAY100635 no rRPa. Os valores das variáveis no período “Pré” foram obtidos durante o período de 30 s antes da administração do fármaco. Os valores das variáveis no período “Pós” foram obtidos durante o período de 30 s durante o pico da resposta do fármaco até 10 min após a sua administração. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-WAY100635. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.1.3 A administração de 5-HT tanto iv quanto no rRPa inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM, mas por mecanismos diferentes

Foi testada a hipótese de que, assim como o 8-OH-DPAT, a administração de 5-HT no rRPa reduziria a ANS TAM e a termogênese pelo TAM via ativação de $5HT_{1A}R$ no rRPa. Durante o resfriamento da pele/corpo, a nanoinjeção de 5-HT no rRPa (Figuras 3A e 3B) inibiu a ANS TAM, resultando na redução da TTAM e do CO_2 expirado, além de reduzir a FC e a PAM (Figuras 3A e 3B, Tabela 3). O pré-tratamento do rRPa com WAY100635 preveniu completamente a redução da ANS TAM induzida pela 5-HT, da TTAM, do CO_2 expirado, da FC, mas não da PAM (Figuras 3A e 3B, Tabela 3). Esse resultado confirmou que a 5-HT no rRPa inibe a termogênese pelo TAM via $5HT_{1A}R$.

Posteriormente, foi investigado se a administração iv de 5-HT reduziria a ANS TAM e a termogênese pelo TAM via ativação de receptores $5HT_{1A}$ no rRPa, similarmente ao 8-OH-DPAT iv. Em animais com a pele resfriada, a infusão iv de 5-HT inibiu a ANS TAM, resultando, assim, na redução da TTAM e do CO_2 expirado, além de reduzir a PAM, mas não a FC (Figura 3C, Tabela 3). Entretanto, em contraste com a efetividade do WAY100635 em prevenir o efeito inibitório do 8-OH-DPAT ou da 5-HT no rRPa, o pré-tratamento do rRPa com WAY100635 (Figura 3D) não afetou a inibição da ANS TAM, da TTAM, do CO_2 expirado ou da PAM causada pela 5-HT iv (Figuras 3C e 3D, Tabela 3). Assim, apesar de, localmente, a 5-HT ativar $5HT_{1A}R$ causando a inibição da e da termogênese pelo TAM, a 5-HT iv causa um efeito semelhante no TAM via um mecanismo que não requer a ativação desses receptores no rRPa.

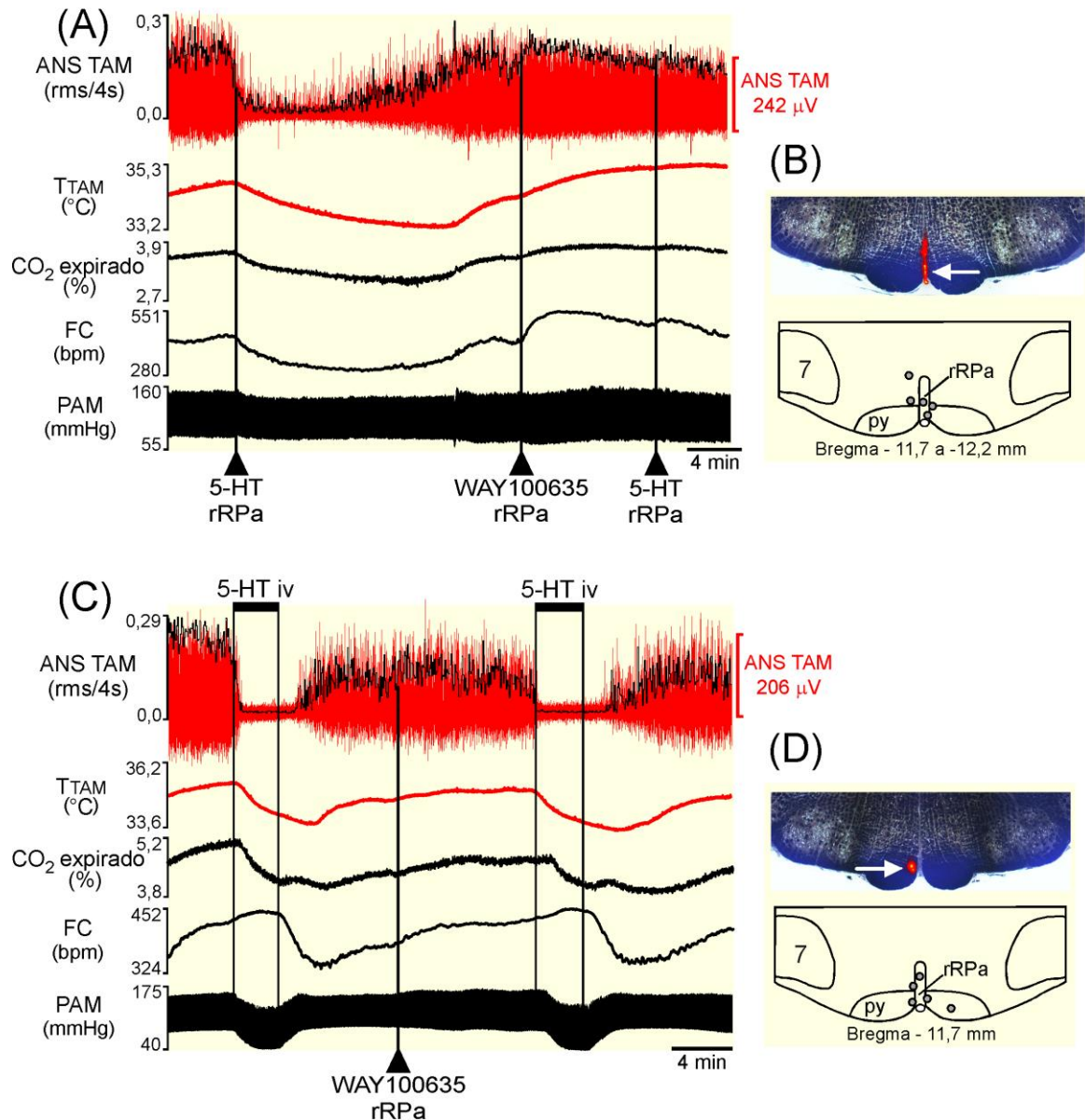


Figura 3 – A nanoinjeção de 5-HT no rRPa inibe o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM durante o resfriamento da pele via ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa, mas a inibição da ANS TAM pela 5-HT sistêmica não requer 5-HT_{1A}R no rRPa. (A) A nanoinjeção de 5-HT (33 mM, 60 nl) no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) reduziu a atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM), o CO₂ expirado e a frequência cardíaca (FC). O pré-tratamento do rRPa com WAY100635 preveniu a inibição da termogênese pelo TAM induzida pela 5-HT no rRPa. (B e D) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais do rRPa com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. py: trato piramidal, 7: núcleo motor facial. (C) A infusão intravenosa (iv) de 5-HT (500 μ g/ml/h) reduziu a ANS TAM, a TTAM, o CO₂ expirado (Exp CO₂) e a PAM. A nanoinjeção de WAY100635 no rRPa não teve efeito na inibição da ANS TAM pela 5-HT iv. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 3 – Papel de 5-HT_{1A}R nos efeitos da nanoinjeção local de 5-HT no rRPa e da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pelo resfriamento da pele/corpo.

| | | 5-HT no rRPa (n=5) | | 5-HT iv (n=5) | |
|------------------------------------|----------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Pré-WAY100635 | Pós-WAY100635 | Pré-WAY100635 | Pós-WAY100635 |
| ANS TAM (% basal) | Pré-5-HT | 428±62 | 1343±405§ | 540±131 | 673±135 |
| | Efeito da 5-HT | -245±67* | -131±34# | -403±106* | -502±152* |
| TTAM (°C) | Pré-5-HT | 34,0±0,5 | 35,3±0,4§ | 35,0±0,2 | 35,8±0,2 |
| | Efeito da 5-HT | -0,6±0,1* | +0,1±0,0# | -0,7±0,1* | -0,7±0,2* |
| CO₂ expirado (%) | Pré-5-HT | 4,1±0,5 | 4,6±0,5§ | 5,5±0,3 | 5,8±0,4 |
| | Efeito da 5-HT | -0,3±0,1* | 0,0±0,0# | -0,4±0,1* | -0,4±0,1* |
| FC (bpm) | Pré-5-HT | 421±16 | 437±21§ | 393±16 | 424±12§ |
| | Efeito da 5-HT | -68±14* | +11±12# | -5±13 | -9±12 |
| PAM (mmHg) | Pré-5-HT | 112±7 | 122±4 | 112±6 | 110±4 |
| | Efeito da 5-HT | -12±6* | -7±3* | -15±3* | -18±4* |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Foi administrado 5-HT intravenosamente (iv) ou no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) e WAY100635 no rRPa em ratos com pele resfriada (T_{pele}=35,6±0,2 °C, T_c=35,8±0,2 °C), sob elevados níveis de ANS TAM e de termogênese pelo TAM. Os valores das variáveis no período “Pré” foram obtidos durante o período de 30 s antes da administração do fármaco. Os valores das variáveis no período “Pós” foram obtidos durante o período de 30 s durante o período de maior inibição da ANS TAM durante o efeito do fármaco até 5 min após o início da infusão de 5-HT ou 3 min após a nanoinjeção de 5-HT no rRPa. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-5-HT, §P<0,05 vs Pré-WAY100635 e Pré-5-HT e #P<0,05 vs Efeito da 5-HT Pré-WAY100635. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.1.4 A 5-HT sistêmica atenua o aumento da ANS TAM e a termogênese pelo TAM causado pelo bloqueio de GABA_AR, mas não pela ativação de receptores glutamatérgicos no rRPa

A fim de determinar as vias neurais pelas quais a 5-HT iv inibe a ANS TAM com base em um modelo de controle neural da Tc mundialmente aceito (57). A ativação de receptores NMDA no rRPa ativa neurônios simpáticos, causando o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM (131). Em animais com pele aquecida, a nanoinjeção de NMDA no rRPa causa o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM (131), do CO₂ expirado, da FC e da PAM. Em comparação ao controle, a 5-HT iv não afetou a amplitude destas respostas induzidas pelo NMDA no rRPa. Entretanto, o aumento da PAM induzido pelo NMDA foi maior durante a 5-HT iv, em comparação ao controle (Figuras 4A e 4B, Tabela 4). Como a 5-HT iv não causou alteração da termogênese pelo TAM induzida pelo NMDA, a 5-HT iv provavelmente age sobre um circuito neural de controle da Tc no rRPa ou antecedente a ele.

A atividade de neurônios simpáticos do rRPa que ativam o TAM é afetada pelo balanço entre as suas sinapses excitatórias e inibitórias. Assim, o aumento da atividade da ANS TAM após o bloqueio local de GABA_AR no rRPa com bicuculina (196) proporciona uma oportunidade de acessar indiretamente a influência da 5-HT iv na ANS TAM. Em animais com a pele aquecida, o aumento da ANS TAM, da TTAM, do CO₂ expirado e da FC causado pela nanoinjeção de bicuculina no rRPa foi menor durante uma infusão iv de 5-HT (Figuras 4C e 4D, Tabela 4). Esses resultados sugerem que a inibição na ANS TAM envolve a redução da excitação de neurônios no rRPa após a nanoinjeção de bicuculina no rRPa.

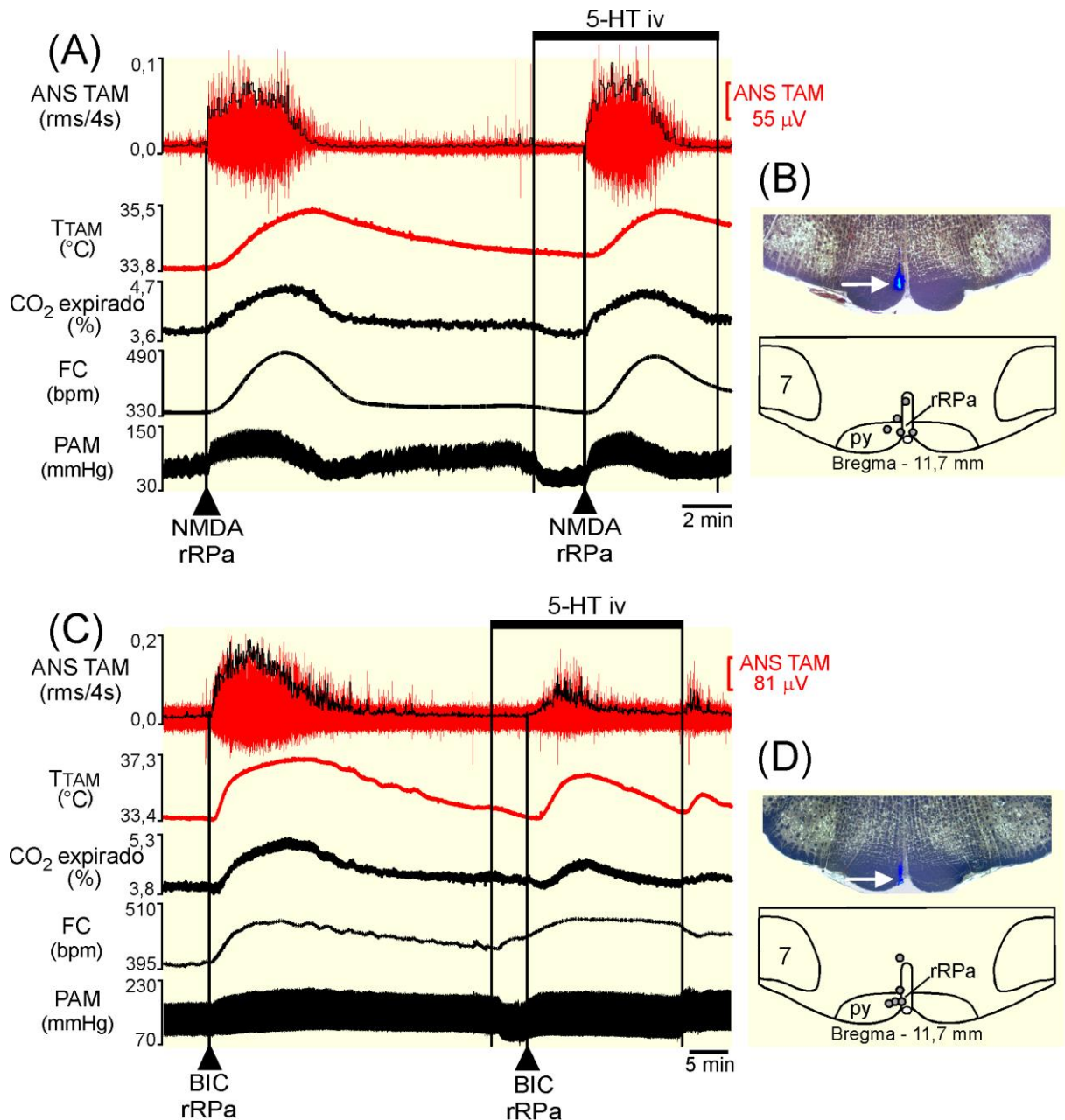


Figura 4 – A 5-HT iv atenuou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pelo bloqueio de GABA_AR, mas não atenuou a ativação do TAM devido à nanoinjeção de NMDA no rRPa. (A) A nanoinjeção de NMDA (0,2 mM, 60 nl) no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) aumentou a atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM), o CO₂ expirado, a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM). A 5-HT iv reduziu a PAM basal, mas não afetou a simpatoexcitação provocada pelo NMDA. (B e D) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais do rRPa com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. py: trato piramidal, 7: núcleo motor facial. (C) A nanoinjeção de bicuculina (BIC, 500 μM, 100 nl) no rRPa aumentou a ANS TAM, a TTAM, o CO₂ expirado e a FC e a infusão intravenosa (iv) de 5-HT atenuou as respostas do TAM evocadas pela BIC. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 4 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA ou de bicuculina (BIC) no rRPa.

| | | NMDA no rRPa (n=5) | | BIC no rRPa (n=5) | |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------|-----------|-------------------|-------------|
| | | Controle | 5-HT iv | Controle | 5-HT iv |
| ANS TAM (% basal) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 235±44 | 167±24 | 182±22 | 172±18 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +787±228* | +930±404* | +1495±456* | +1145±417*# |
| TTAM (°C) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 34,4±0,7 | 34,5±0,5 | 34,6±0,4 | 34,9±0,4 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +0,9±0,2* | +0,4±0,3 | +1,4±0,3* | +0,7±0,4# |
| CO₂ expirado (%) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 4,3±0,2 | 4,1±0,2 | 3,7±0,1 | 3,8±0,2 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +0,5±0,1* | +0,4±0,1* | +0,7±0,1* | +0,3±0,1*# |
| FC (bpm) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 417±27 | 422±28 | 414±18 | 438±21 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +74±18* | +67±19* | +60±12* | +33±12# |
| PAM (mmHg) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 104±10 | 80±8§ | 113±3 | 103±7 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +27±5* | +33±6*# | +8±3* | +9±4* |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Os valores das variáveis nos períodos pré- e pós- nanoinjeção no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) foram obtidos em uma situação controle (sem 5-HT) ou durante a infusão intravenosa (iv) de 5-HT. NMDA ou bicuculina (BIC) foram nanoinjetados no rRPa de ratos sob condição aquecida (T_{pele}=37,0±0,1 °C, T_c=37,0±0,1 °C). Os valores das variáveis no período “Pré” foram obtidos durante o período de 30 s antes da nanoinjeção no rRPa. Os valores das variáveis no período “Pós” foram obtidos durante o período de 30 s durante o pico da resposta até 5 min após a nanoinjeção no rRPa. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-nanoinjeção no rRPa, §P<0,05 vs Pré-nanoinjeção no rRPa no Controle e #P<0,05 vs Efeito da nanoinjeção no rRPa no Controle. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.1.5 Neurônios da DMH que são simpatoexcitatórios para o TAM estão ativos e mantêm o aumento da ANS TAM após o bloqueio de GABA_AR no rRPa

A(s) fonte(s) de projeção(ões) excitatória(s) para neurônios simpatoexcitatórios para o TAM que desencadeiam o aumento da ANS TAM pelo aumento da atividade glutamatérgica no rRPa (131) devido à administração local de bicuculina (196) permanece(m) não identificado(s). Como neurônios na DMH que contribuem para a ANS TAM desempenham um papel importante na termogênese evocada pelo resfriamento da pele e pela febre (57, 197), foi testada a hipótese de que neurônios na DMH enviam projeções excitatórias para o rRPa. Para tal, foi realizada a nanoinjeção de bicuculina e NMDA no rRPa antes e após a inibição de neurônios na DMH.

Em animais com a pele aquecida, a nanoinjeção bilateral de muscimol, um antagonista de GABA_AR, na DMH não preveniu o aumento da ANS TAM, do CO₂ expirado e da FC causados pela nanoinjeção de NMDA no rRPa, mas preveniu o aumento da PAM (Figuras 5A a 5C, Tabela 5). Esse resultado indica que o aumento da ANS TAM induzido pela ativação via receptores NMDA de neurônios no rRPa é independente da atividade de neurônios na DMH, mas que neurônios na DMH são necessários para o controle da PAM.

Por outro lado, a nanoinjeção bilateral de muscimol na DMH atenuou o aumento da ANS TAM causado pela nanoinjeção de bicuculina no rRPa em comparação a uma nanoinjeção controle (Tabela 5) (comparar bicuculina controle na resposta evocada no rRPa na Figura 5A com aquela no mesmo experimento após muscimol na DMH na Figura 5B). Ao encontro disso, a nanoinjeção de muscimol na DMH também atenuou o aumento da TTAM e do CO₂ expirado, mas não preveniu o aumento da FC nem da PAM em resposta à nanoinjeção de bicuculina no rRPa. A nanoinjeção de muscimol na DMH reduziu a PAM antes mesmo da nanoinjeção de bicuculina (Tabela 5). Assim, mesmo em uma condição na qual a pele/corpo do animal está aquecida, a atividade tônica de neurônios na DMH é responsável pela excitação de neurônios no rRPa, contribuindo, assim, para o aumento da ANS TAM e termogênese pelo TAM em resposta à bicuculina no rRPa.

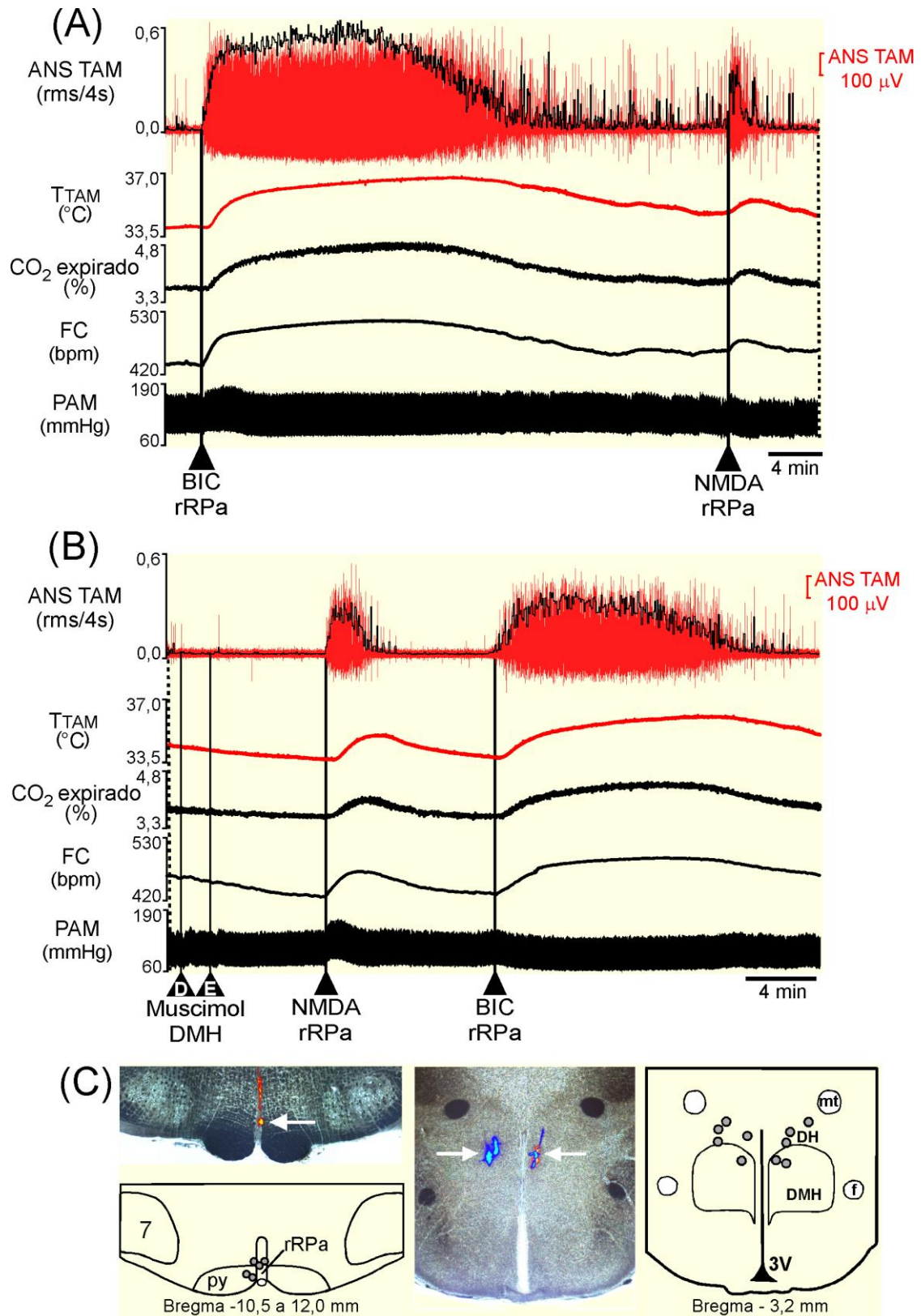


Figura 5 – A inibição de neurônios da região dorsomedial do hipotálamo (DMH) atenuou a ANS TAM e a termogênese evocada pelo bloqueio de $GABA_A$ R, mas não pela ativação de receptores glutamatérgicos no rRPa. (A) A nanoinjeção de bicuculina (BIC, 500 μ M, 100 nl) no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) aumentou a atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM), o CO₂ expirado e a frequência cardíaca (FC). A nanoinjeção de NMDA (0,2 mM, 60 nl) no rRPa aumentou ANS TAM, a TTAM, o CO₂ expirado e a PAM. **(B)** Registro continuado do experimento descrito em A, com intervalo de 5 min entre os experimentos A e B, evidenciados pela linha vertical pontilhada, demonstrando que, após a

nanoinjeção bilateral de muscimol (2 mM, 60 nl) na DMH, a amplitude das respostas na ANS TAM, na TTAM, no CO₂ expirado e na PAM causadas pela nanoinjeção de NMDA no rRPa não mudaram. Em contrapartida, a administração de muscimol na região dorsomedial do hipotálamo (DMH) causou a redução da amplitude das respostas na ANS TAM, na TTAM, no CO₂ expirado e na FC causadas pela nanoinjeção de BIC no rRPa. (C) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais do rRPa e da DMH com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. py: trato piramidal, 7: núcleo motor facial, mt: trato mamilotalâmico, f: fórnix, 3V: terceiro ventrículo, DH: região hipotalâmica dorsal. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 5 – Efeito da inibição de neurônios da DMH na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA ou de bicuculina (BIC) no rRPa.

| | | NMDA no rRPa (n=5) | | BIC no rRPa (n=5) | |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| | | Controle | Após muscimol na DMH | Controle | Após muscimol na DMH |
| ANS TAM (% basal) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 150±28 | 126±13 | 144±24 | 125±9 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +1244±241* | +909±195* | +2560±92* | +1768±756*# |
| TTAM (°C) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 34,6±0,3 | 34,8±0,4 | 35,0±0,2 | 34,8±0,5 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +0,7±0,2* | +0,4±0,2 | +1,3±0,2* | +0,6±0,2*# |
| CO₂ expirado (%) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 3,7±0,2 | 3,5±0,2 | 3,8±0,2 | 3,6±0,2 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +0,4±0,1* | +0,4±0,1* | +0,8±0,1* | +0,6±0,1*# |
| FC (bpm) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 393±22 | 382±23 | 405±23 | 385±15 |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +34±7* | +30±12* | +74±14* | +55±5* |
| PAM (mmHg) | Pré-nanoinjeção no rRPa | 106±12 | 98±13 | 115±11 | 95±12§ |
| | Efeito da nanoinjeção no rRPa | +16±5* | +8±5# | +7±3* | +6±2* |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Os valores das variáveis nos períodos pré- e pós- nanoinjeção no núcleo rostral pálido da rafe (rRPa) foram obtidos em uma situação controle (sem a nanoinjeção de muscimol na região dorsomedial do hipotálamo (DMH)) ou após a nanoinjeção de muscimol na DMH. NMDA ou bicuculina (BIC) foram nanoinjetados no rRPa de ratos sob condição aquecida (T_{pele}=37,2±0,1 °C, T_c=37,2±0,1 °C). Os valores das variáveis no período “Pré” foram obtidos durante o período de 30 s antes da nanoinjeção no rRPa. Os valores das variáveis no período “Pós” foram obtidos durante o período de 30 s durante o pico da resposta até 5 min após a nanoinjeção no rRPa. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-nanoinjeção no rRPa, §P<0,05 vs Pré-nanoinjeção no rRPa no Controle e #P<0,05 vs Efeito da nanoinjeção no rRPa no Controle. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.1.6 A 5-HT sistêmica atenua a termogênese pelo TAM induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos, mas não a termogênese pelo TAM induzida pelo bloqueio de GABA_AR na DMH

Foi testado o efeito da 5-HT iv no aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM induzidos pela excitação direta de neurônios na DMH utilizando a nanoinjeção de NMDA. Em animais com a pele aquecida, a 5-HT iv preveniu o aumento da ANS TAM, da TTAM, do CO₂ expirado e da FC induzidos pela nanoinjeção de NMDA na DMH (Figuras 6A e 6B, Tabela 6). Como observado anteriormente, a 5-HT iv promoveu hipotensão e o aumento da PAM causado pela nanoinjeção de NMDA na DMH durante a infusão de 5-HT foi maior que o aumento durante a nanoinjeção controle. Esses resultados demonstram que a 5-HT iv reduz a excitabilidade de neurônios da DMH que são excitatórios para a termogênese pelo TAM.

Com o objetivo de investigar se a 5-HT iv ativa uma via GABAérgica para neurônios na DMH, foi realizada a infusão de 5-HT durante a termogênese pelo TAM evocada pelo bloqueio de GABA_AR na DMH (132, 198). Em animais com a pele aquecida, a 5-HT iv não teve efeito na ANS TAM resultante da nanoinjeção de bicuculina na DMH. Ao encontro desse achado, a termogênese pelo TAM e o CO₂ expirado permaneceram elevados durante a 5-HT iv (Figuras 6C e 6D, Tabela 7). A 5-HT iv também não alterou a taquicardia nem o aumento da PAM causados pela nanoinjeção de bicuculina na DMH (Figura 6C, Tabela 7). Esses resultados demonstram um mecanismo de ação pelo qual a 5-HT sistêmica causa o aumento da inibição de neurônios simpatoexcitatórios da DMH que aumentam a ANS TAM e ativam a termogênese pelo TAM evocadas pelo frio.

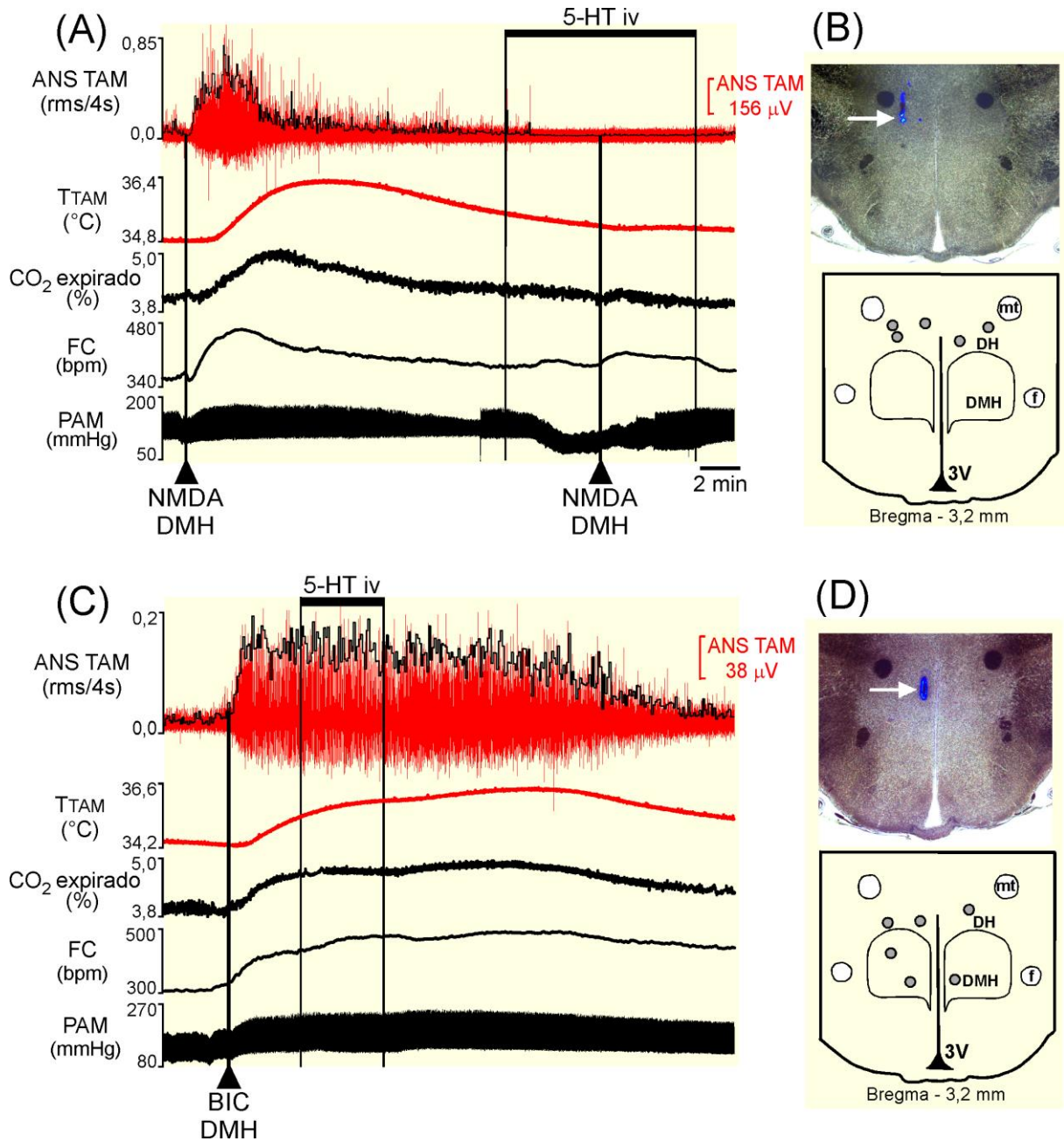


Figura 6 – A 5-HT iv atenuou a ANS TAM e a termogênese pelo TAM causados pela ativação de receptores glutamatérgicos, mas não atenuou a ativação do TAM devido à nanoinjeção de biculina na DMH. (A) A nanoinjeção de NMDA (0,2 mM, 60 nl) na região dorsomedial do hipotálamo (DMH) aumentou atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM), a temperatura do TAM (TTAM) e a frequência cardíaca (FC). A infusão de 5-HT reduziu a PAM e inibiu o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM induzido pelo NMDA. (B e D) Secções histológicas ilustrando os sítios das nanoinjeções (setas) e desenhos representativos de secções coronais da DMH com a localização do centro das nanoinjeções e relativa localização em relação ao bregma. mt: trato mamilotalâmico, f: fórnix, 3V: terceiro ventrículo, DH: região hipotalâmica dorsal. (C) A nanoinjeção de biculina (BIC, 500 μ M, 100 nl) na DMH aumentou a ANS TAM. A infusão de 5-HT não alterou o aumento da ANS TAM e da termogênese pelo TAM induzidos pela BIC. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 6 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de NMDA na DMH.

| | | NMDA na DMH (n=5) | |
|------------------------------------|----------------|-------------------|-----------|
| | | Controle | 5-HT iv |
| ANS TAM (% basal) | Pré-NMDA | 184±4 | 123±6 |
| | Efeito do NMDA | +1099±418* | +110±48*# |
| TTAM (°C) | Pré-NMDA | 33,7±0,3 | 34,0±0,3 |
| | Efeito do NMDA | +0,7±0,2* | 0,0±0,0# |
| CO₂ expirado (%) | Pré-NMDA | 3,7±0,1 | 3,6±0,2 |
| | Efeito do NMDA | +0,3±0,1* | 0,0±0,0# |
| FC (bpm) | Pré-NMDA | 391±17 | 419±20 |
| | Efeito do NMDA | +54±11* | +16±4*# |
| PAM (mmHg) | Pré-NMDA | 110±6 | 82±5§ |
| | Efeito do NMDA | +5±2* | +15±1*# |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Os valores das variáveis nos períodos “Pré-NMDA na DMH” e “NMDA na DMH” foram obtidos em uma situação controle (sem 5-HT) ou durante a infusão intravenosa (iv) de 5-HT. O NMDA foi nanoinjetado na região dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos sob condição aquecida (T_{pele}=36,6±0,1 °C, T_c=37,1±0,1 °C). Os valores das variáveis no período “Pré-NMDA na DMH” foram obtidos durante o período de 30 s antes da nanoinjeção na DMH. Os valores das variáveis no período “NMDA na DMH” foram obtidos durante o período de 30 s durante o pico da resposta até 5 min após a nanoinjeção na DMH. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Pré-NMDA na DMH, §P<0,05 vs Pré-NMDA na DMH no Controle e #P<0,05 vs Efeito do NMDA no Controle. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

Tabela 7 – Efeito da 5-HT iv na termogênese pelo TAM evocada pela nanoinjeção de bicuculina (BIC) na DMH.

| | | BIC na DMH (n=6) | |
|------------------------------------|---------------|-------------------------|-----------------|
| | | Pré-5-HT iv | Durante 5-HT iv |
| ANS TAM (% basal) | Pré-BIC | 179±32 | |
| | Efeito da BIC | +1457±700* | +776±292* |
| TTAM (°C) | Pré-BIC | 35,1±0,7 | |
| | Efeito da BIC | +0,6±0,2* | +0,9±0,2* |
| CO₂ expirado (%) | Pré-BIC | 4,0±0,3 | |
| | Efeito da BIC | +0,3±0,2 | +0,4±0,1* |
| FC (bpm) | Pré-BIC | 415±32 | |
| | Efeito da BIC | +59±17* | +64±25* |
| PAM (mmHg) | Pré-BIC | 117±9 | |
| | Efeito da BIC | +13±6 | +7±4 |

Valores da atividade nervosa simpática (ANS) pelo tecido adiposo marrom (TAM) mostrados como % basal, temperatura do TAM (TTAM), CO₂ expirado, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Bicuculina (BIC) foi nanoinjetada na região dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos com pele/corpo aquecido (T_{pele}=37,0±0,1 °C, T_c=37,0±0,1 °C). Foi realizada uma infusão intravenosa (iv) de 5-HT com duração de 3 min com início de 3 a 4 min após a nanoinjeção de BIC na DMH. A coluna “Basal” representa os valores das variáveis durante o período de 30 s antes da nanoinjeção de BIC na DMH. A coluna “Pré-5-HT iv” representa os valores das variáveis durante o período de 30 s antes da infusão de 5-HT. A coluna “Durante 5-HT iv” representa os valores das variáveis durante os últimos 30 s da infusão de 5-HT. Os dados são expressos em média ± EPM. Não há diferenças significativas entre os períodos Pré-5-HT iv e Durante 5-HT iv, utilizando o teste pareado de Wilcoxon. *P<0,05 vs Pré-BIC. Fonte: Mota et al., 2019 (195).

4.2 *Resultados do Estudo 2: A administração intracerebroventricular de 5-HT atenua a inflamação sistêmica leve*

4.2.1 A inflamação sistêmica leve causa redução das concentrações endógenas de 5-HT na AVPO, as quais estão correlacionadas negativamente aos níveis de corticosterona

Os animais que receberam LPS apresentaram um aumento da T_c ao longo do tempo, quando comparado ao grupo veículo (Figuras 7A e 7B), que caracteriza o modelo clássico de

febre induzida por LPS (199). A administração de antagonistas de receptores serotoninérgicos na AVPO atenua a hipotermia induzida por hipóxia (89). Esse achado indica que alterações nos níveis endógenos de 5-HT, na AVPO, podem estar envolvidos em alterações termorregulatórias. Por esse motivo, no presente estudo, foi realizada a dosagem para determinação dos níveis endógenos de 5-HT e de seu principal metabólito, 5-HIAA, na AVPO de ratos que receberam injeção ip de veículo ou LPS, o que revelou a redução das concentrações de 5-HT ($F_{2,31}=3,52$, $P=0,04$) e 5-HIAA ($F_{4,45}=6,59$, $P=0,0003$) 300 min após a administração de LPS, o que indica que houve a redução da disponibilidade de 5-HT na AVPO, coincidindo com o período de estabelecimento da febre (Figuras 7C e 7D).

A inflamação sistêmica induzida pelo LPS causa a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais (HPA) e, conseqüentemente, o aumento dos níveis de corticosterona (200). Como esperado, houve aumento dos níveis de corticosterona 45 e 300 min após a administração de LPS ($F_{5,34}=6,36$, $P=0,0003$, Figura 7E). O teste de correlação de Pearson indicou a correlação moderada negativa entre 5-HT e corticosterona ($r = -0,41$, $P=0,04$, Figura 7F), demonstrando um potencial da 5-HT em modular a atividade do eixo HPA no modelo experimental de inflamação sistêmica.

4.2.2 A administração icv de 5-HT preveniu a febre induzida pela inflamação sistêmica leve

Diante da redução dos níveis endógenos de 5-HT (Figura 1C), bem como de seu metabólito na AVPO, o próximo passo do estudo foi determinar o efeito da administração icv de 5-HT sobre a Tc em animais que receberam a injeção ip de veículo e em animais com inflamação sistêmica. Em animais eutérmicos e febris (Figuras 8A e 8B), a administração icv de 5-HT causou uma leve redução da Tc entre os períodos de -30 e 30 min após a administração ip e não alterou o índice térmico entre os animais eutérmicos (Figura 8C).

Em animais febris (Figura 8B), a administração icv de 5-HT na dose de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mas não nas doses de 5 e 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, atenuou a febre induzida pelo LPS, como foi evidenciado pela redução do índice térmico em relação ao grupo com inflamação sistêmica ($F_{3,26}=5,59$, $P=0,004$, Figura 8D). Nos experimentos seguintes, foi utilizada a dose de 5-HT de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por esta dose ser eficaz na redução da febre. A análise do índice térmico demonstrou que não houve diferenças entre os animais eutérmicos ($F_{3,16}=0,27$, $P=0,85$, Figura 8C).

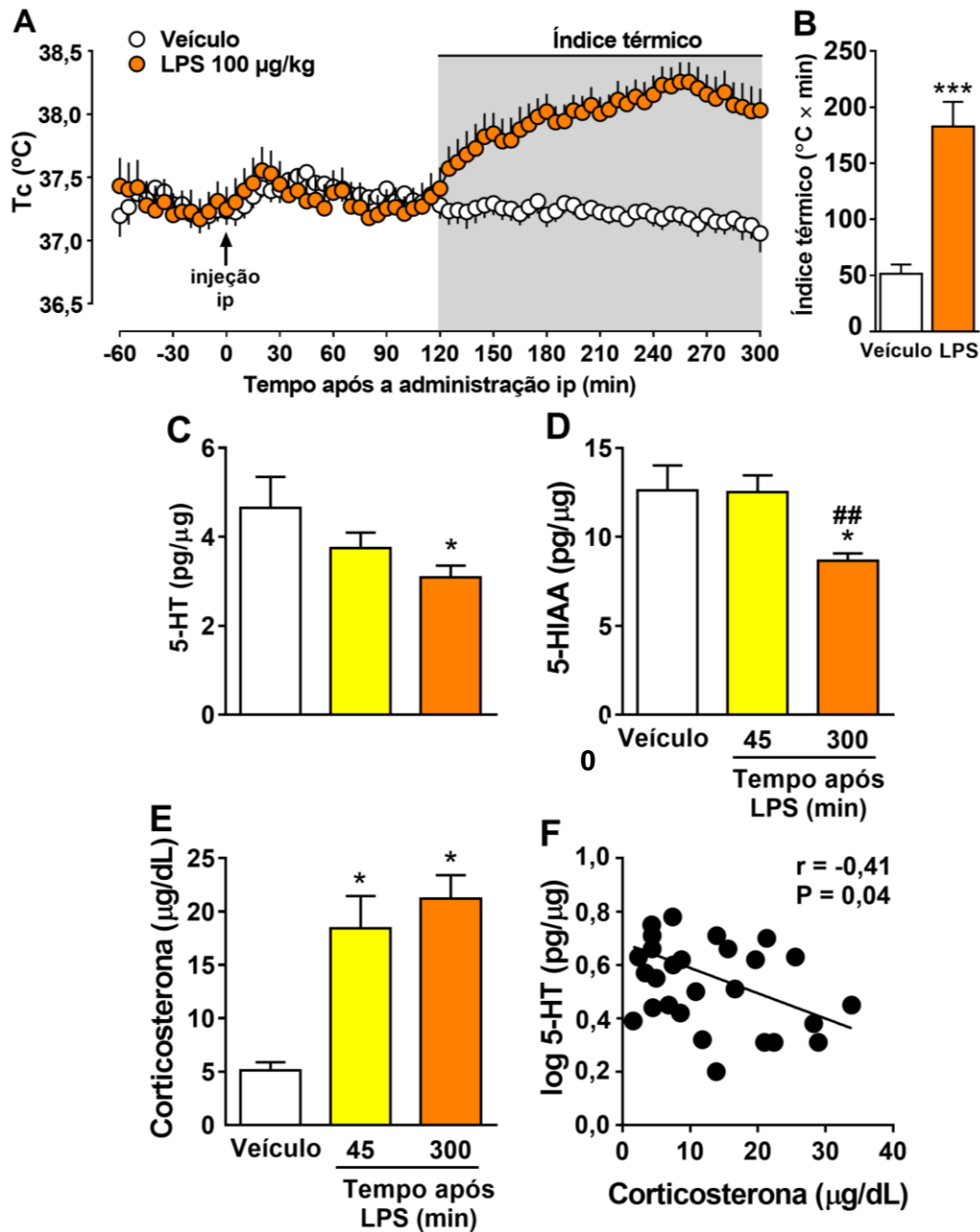
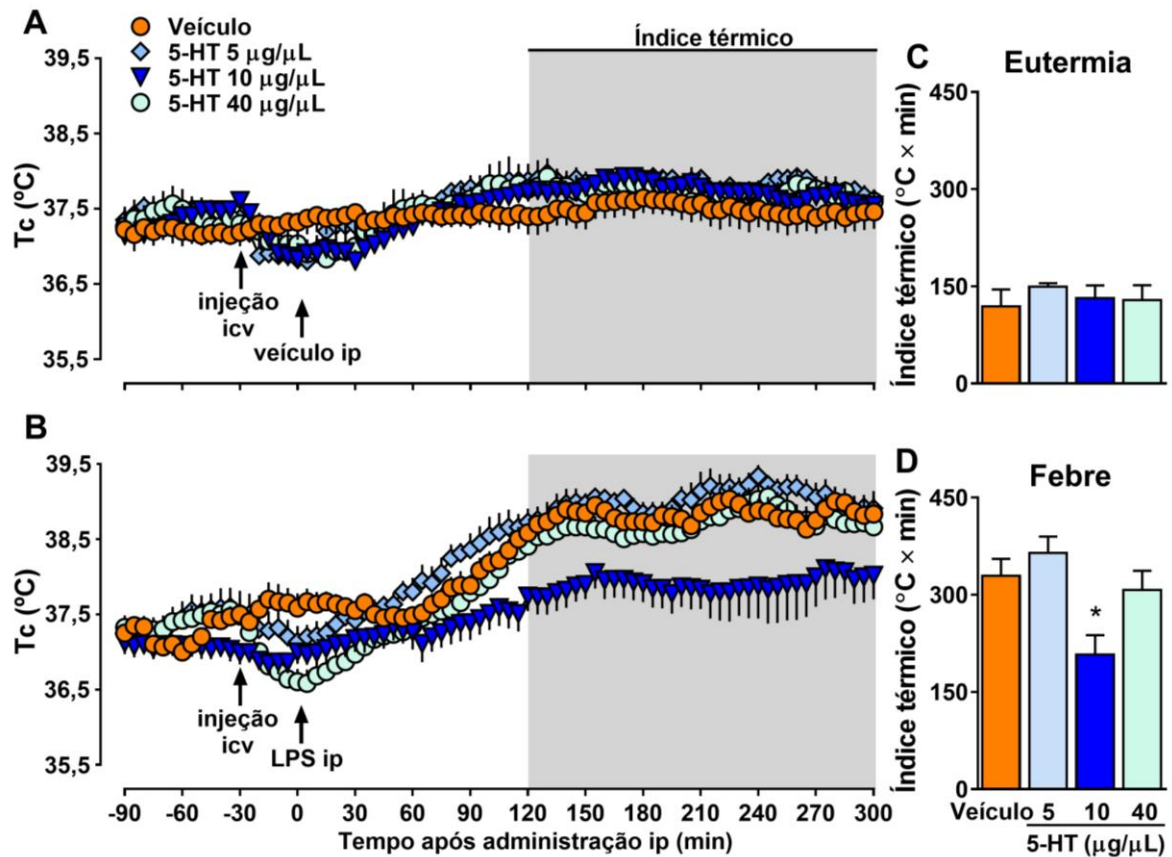


Figura 7 – A inflamação sistêmica causa redução das concentrações endógenas de 5-HT e 5-HIAA na AVPO e aumento da corticosterona plasmática. (A) Decurso temporal da temperatura corporal (T_c) (°C) de ratos que receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de veículo (grupo controle) ou de lipopolissacarídeo (LPS) (100 µg/kg) no tempo zero (0). (B) Índice térmico (°C × min) do grupo controle e do grupo tratado com LPS representado pela área sob a curva da fase febril e indica a magnitude da febre. (C) Concentrações de serotonina (5-HT) e (D) ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO) (pg/µg) e (E) corticosterona (µg/dl) do grupo controle e do grupo tratado com LPS 45 e 300 min após a administração de LPS. Dados apresentados como média ± SEM. (F) O log das concentrações de 5-HT na AVPO (pg/µg) foi correlacionado às concentrações de corticosterona (µg/dl) usando o teste de Pearson dos grupos descritos em C, D e E. (n=9-14/grupo). *P<0,05 vs grupo controle, ##P<0,01 vs grupo 45 min após o LPS. Fonte: adaptado de: Mota et al., 2017 (49).



4.2.3 A administração icv de 5-HT atenuou o aumento os níveis de PGE_2 na AVPO, de corticosterona e da IL-6 plasmática durante a inflamação sistêmica leve

A inflamação sistêmica leve causou o aumento das concentrações de PGE_2 na AVPO 300 min, mas não 120 min, após a administração de LPS ($F_{5,21}=9,49$, $P<0,0001$, Figura 9A), de corticosterona 120 e 300 min após a administração de LPS ($F_{5,34}=6,36$, $P=0,0003$, Figura 9C) e da IL-6 plasmática 300 min após a administração de LPS ($P=0,03$, Figura 9E). Ao encontro do efeito antipirético da 5-HT na T_c , a administração icv de 5-HT atenuou o aumento dos níveis de PGE_2 na AVPO (Figura 9A), de corticosterona (Figura 9C) e de IL-6 (Figura 9E). O teste de correlação de Pearson confirmou a correlação, a qual foi moderada positiva, entre PGE_2 e T_c ($r = 0,44$, $P=0,04$) (Figura 9D), o que confirma a importância da

PGE₂ no desenvolvimento da febre induzida por LPS. Não houve alteração das concentrações de PGD₂ na AVPO em animais com inflamação sistêmica ($F_{5,28}=9,49$, $P=0,15$, Figura 9B).

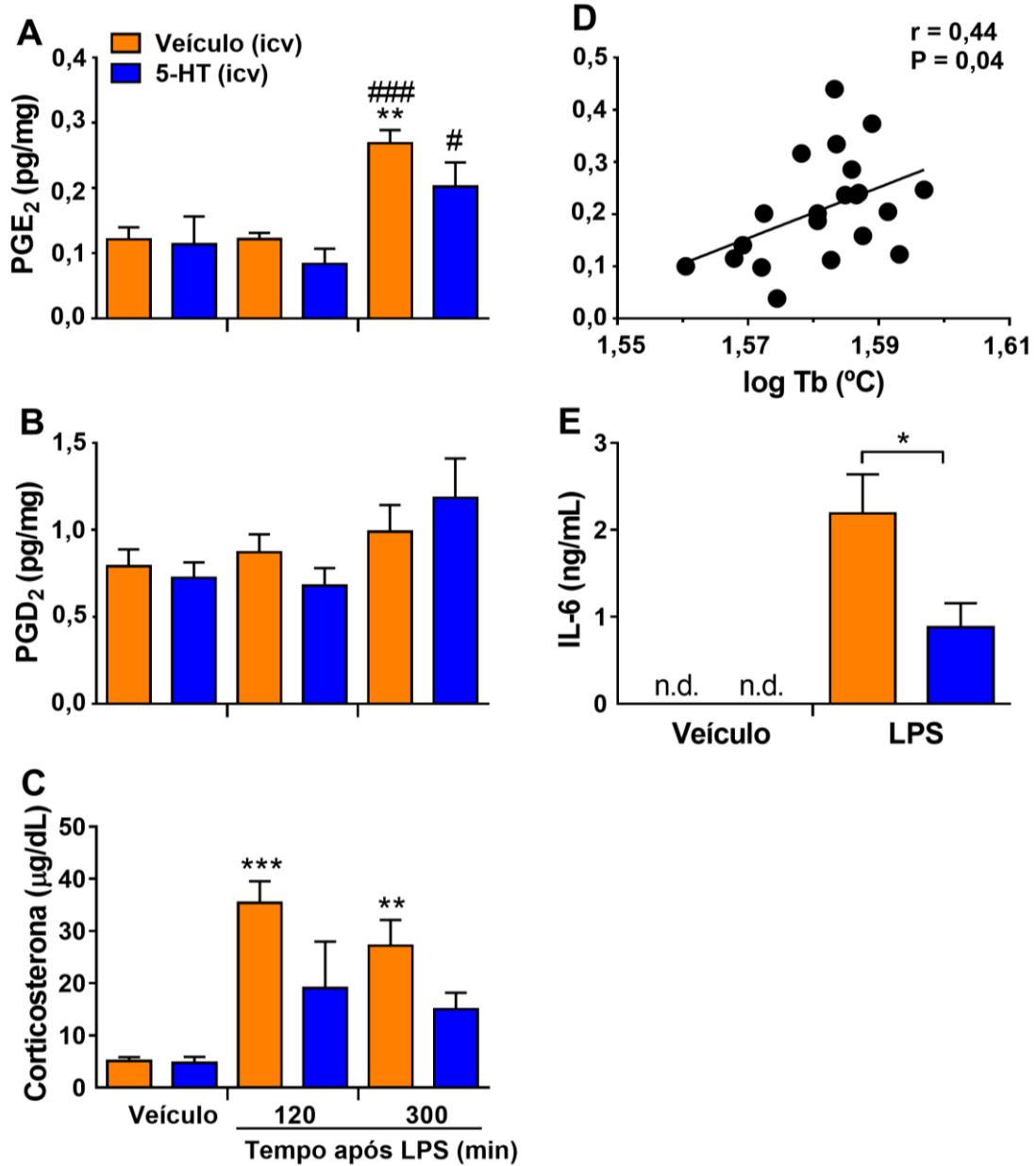


Figura 9 – A administração icv de 5-HT atenuou o aumento de PGE₂ na AVPO, de corticosterona e da IL-6 plasmática durante a inflamação sistêmica leve. Concentrações de (A) prostaglandina (PG) E₂ (pg/mg) e (B) PGD₂ (pg/mg) na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO). (C) Níveis de corticosterona (µg/dl) de ratos que receberam microinjeção intracerebroventricular (icv) de veículo (1 µl) ou de serotonina (5-HT) (10 µg/µl) e injeção intraperitoneal (ip) de veículo (1 ml/kg) ou de lipopolissacarídeo (LPS) (100 µg/kg) 120 e 300 min após a administração ip. (D) Concentrações de PGE₂ na AVPO foram correlacionados ao log da temperatura corporal (Tc) dos grupos descritos anteriormente utilizando o teste de Pearson. (E) Níveis de interleucina (IL)-6 no plasma (ng/ml) de ratos que receberam microinjeção icv de veículo (1 µl) ou 5-HT (10 µg/µl) e injeção ip de veículo (1 ml/kg) ou LPS (100 µg/kg) 300 min após a administração ip. (n=5-6/grupo). * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs grupo controle, # $P<0,05$ e ### $P<0,001$ vs grupo que recebeu 5-HT e LPS, 120 min após a administração de LPS. N.d.: níveis não detectáveis. Fonte: adaptado de: Mota et al., 2017 (49).

4.2.4 A administração icv de 5-HT preveniu a redução da perda de calor pela cauda durante a inflamação sistêmica leve

O aumento da Tc ocorre tanto por aumento da produção de calor como por redução da perda de calor (57), a qual é um resultado da vasoconstrição cutânea, sendo que, em roedores, 20% da perda de calor ocorre pela cauda (61). No presente estudo, a inflamação sistêmica causou a redução da Tcauda 120 e 300 min após a administração de LPS (Figura 10A). Houve efeito significativo do tratamento ($F_{3,39}=12,88$, $P<0,0001$), mas não do tempo ($F_{2, 39}=0,09$, $P=0,9148$), havendo interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{6,39}=3,87$, $P=0,004$). Houve também redução do índice de perda de calor pela cauda 120 e 300 min após a administração de LPS, indicando, assim, que a vasoconstrição cutânea contribuiu para o desenvolvimento e manutenção da febre. Houve efeito significativo do tratamento ($F_{3,42}=4,68$, $P=0,006$), mas não do tempo ($F_{2,42}=0,71$, $P=0,50$), havendo interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{6,42}=2,24$, $P=0,04$). A Figura 10 (C-F) mostra imagens termográficas representativas de um animal por grupo experimental aos 120 min após a administração de LPS, por ser o momento da máxima resposta observada.

4.2.5 A esplenectomia inibe o efeito antipirético da 5-HT icv durante a inflamação sistêmica leve

Os valores de índice térmico não foram diferentes entre os grupos eutérmicos, demonstrando que a esplenectomia *per se* não altera a Tc ($F_{3,21}=0,50$, $P=0,69$, Figura 11A e 11C). Entre os grupos febris ($F_{3,22}=10,12$, $P<0,001$, Figura 11B e 11D), os animais esplenectomizados apresentaram redução da febre em relação aos animais não esplenectomizados ($P<0,05$). Além disso, a 5-HT icv reduziu a febre em animais com o baço intacto ($P<0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos esplenectomizados com inflamação sistêmica ($P>0,05$), indicando que a esplenectomia aboliu o efeito antipirético da 5-HT icv.

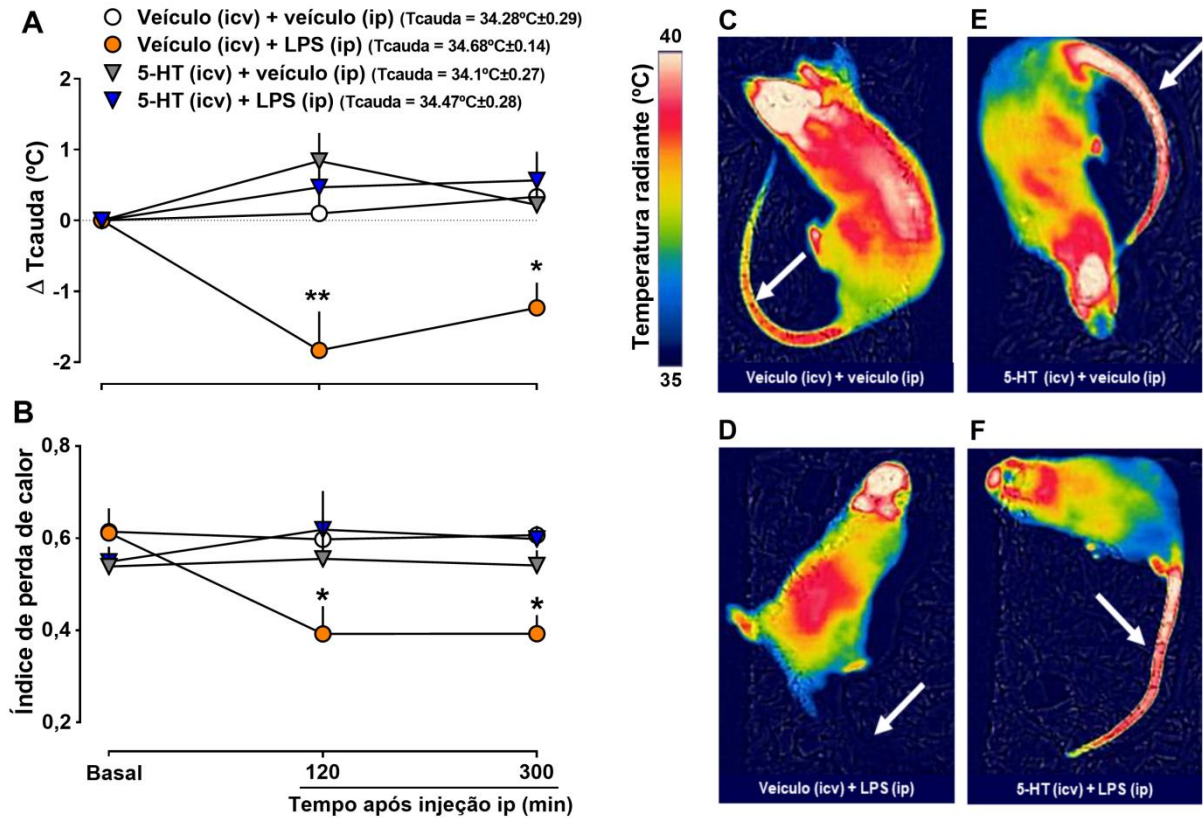
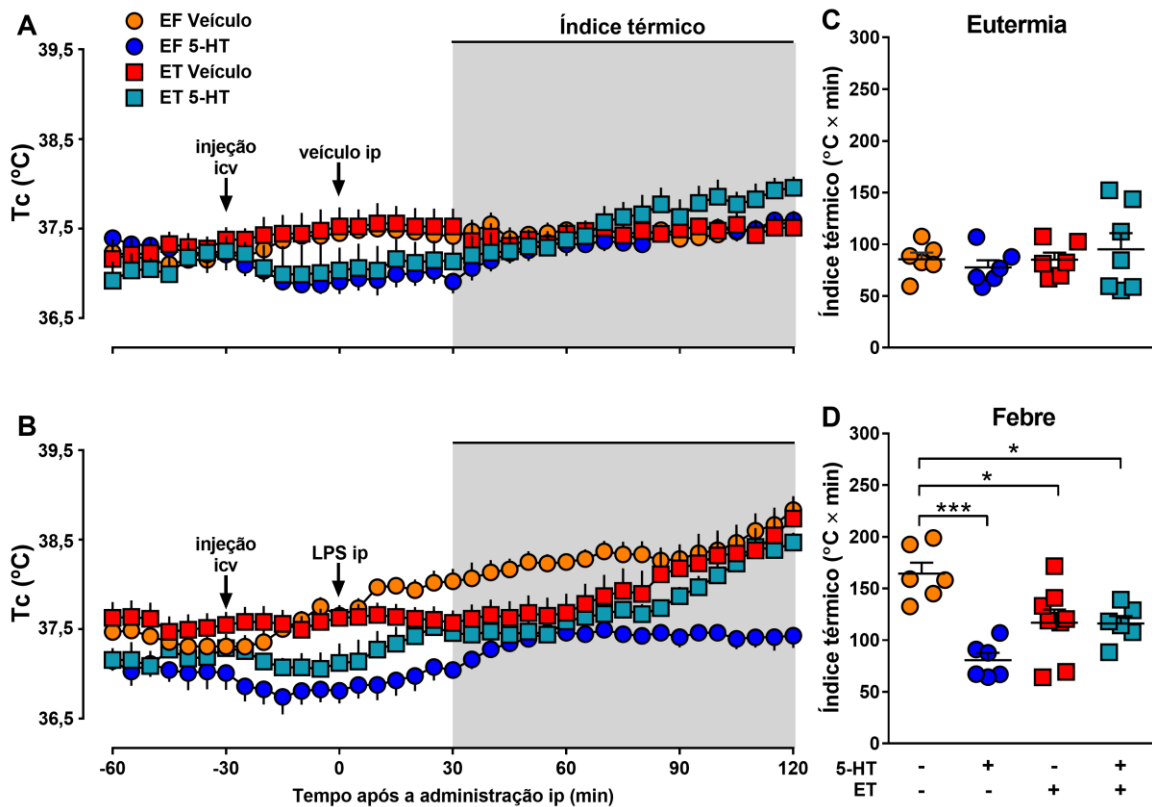


Figura 10 – A administração icv de 5-HT preveniu a redução da perda de calor pela cauda durante a inflamação sistêmica leve. (A) Decurso temporal da temperatura da cauda (ΔT_{cauda}) ($^{\circ}\text{C}$) e o (B) índice de perda de calor de ratos que receberam microinjeção intracerebroventricular (icv) de veículo (1 μl) ou de serotonina (5-HT) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e injeção intraperitoneal (ip) de veículo (1 ml/kg) ou lipopolissacarídeo (LPS) (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no momento basal, 120 e 300 min após a administração ip. ($n=5-6/\text{group}$). T_{cauda} : temperatura da cauda. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs grupo controle. Imagens termográficas representativas de ratos que receberam (C) veículo (icv) e veículo (ip), (D) veículo (icv) e LPS (ip), (E) 5-HT (icv) e veículo (ip) e (F) 5-HT (icv) e LPS (ip). As setas indicam o ponto de mensuração da T_{cauda} . Fonte: adaptado de: Mota et al., 2017 (49).



4.2.6 A esplenectomia não previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o aumento dos níveis de PGE_2 na AVPO induzido pela inflamação sistêmica leve

Houve aumento dos níveis de PGE_2 na AVPO ($F_{11,60}=5,10$, $P<0,001$, Figura 12A) dos animais não-esplenectomizados (EF) ($P<0,05$ vs grupos controle EF) e esplenectomizados (ET) ($P<0,01$ vs grupos controle ET e EF) 120 min após a administração de LPS, os quais foram atenuados pela 5-HT icv tanto nos animais não-esplenectomizados ($P>0,05$ vs grupos controle ET e EF) quanto nos esplenectomizados ($P=0,004$ vs grupo ET tratado com veículo icv e LPS ip). Os valores de PGD_2 não foram diferentes entre os grupos ($F_{11,60}=1,17$, $P = 0,33$, Figura 12B).

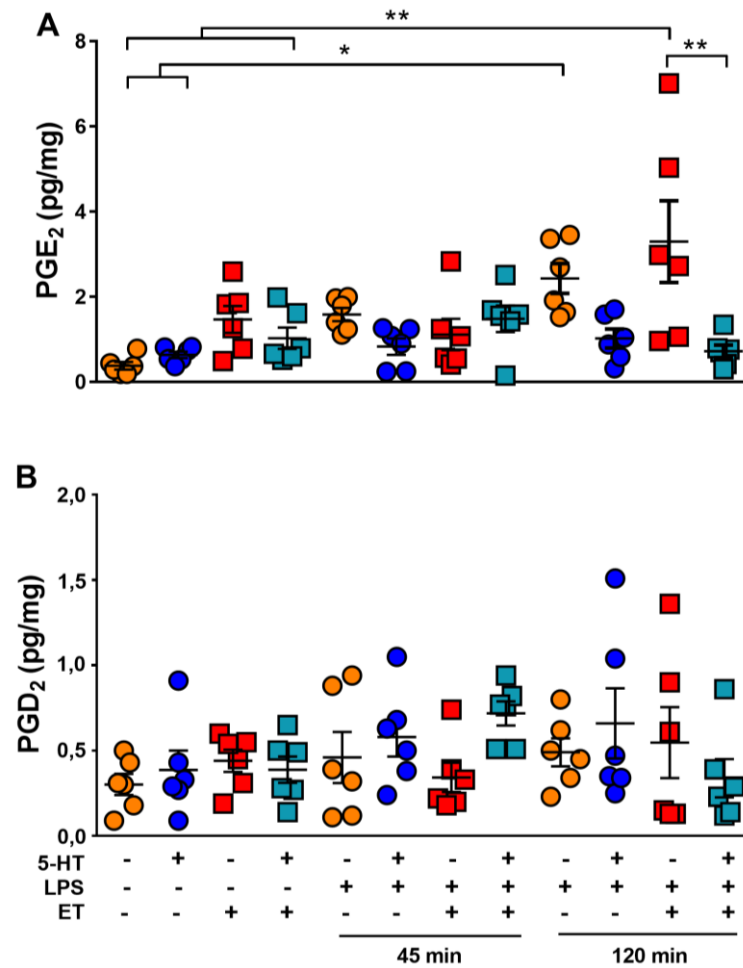


Figura 12 – A esplenectomia não previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o aumento dos níveis de PGE₂ na AVPO induzido pela inflamação sistêmica leve. Concentrações de (A) prostaglandina (PG) E₂ (pg/mg) e (B) PGD₂ (pg/mg) na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO) de ratos que foram submetidos à esplenectomia fictícia (EF) ou à esplenectomia total (ET) e que receberam uma microinjeção intracerebroventricular (icv) de veículo ou serotonina (5-HT) (10 µg/1 µL) e injetados intraperitonealmente (ip) com veículo (grupo controle) ou lipopolissacarídeo (LPS) (100 µg/kg) 45 e 120 min após a administração ip. (n=6/grupo). *P<0,05, e ***P<0,001. Fonte: Mota et al., dados não publicados.

4.2.7 A esplenectomia previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o TNF- α plasmático induzido pela inflamação sistêmica leve

A inflamação sistêmica leve causou o surgimento de TNF- α ($F_{5,29}=10,25$, $P<0,001$, Figura 13A), IL-1 β ($F_{7,54}=9,90$, $P<0,001$, Figura 13B), IL-6 ($F_{5,41}=9,15$, $P<0,001$, Figura 13C), IL-10 ($F_{7,52}=4,60$, $P<0,001$, Figura 13D) e IFN- γ ($F_{7,38}=0,27$, $P=0,96$, Figura 13E) plasmáticos 45 e 120 min após a administração de LPS em animais que passaram pela esplenectomia fictícia (EF). Os animais esplenectomizados (ET) apresentaram níveis não detectáveis de TNF- α e IL-6, indicando que o baço participa da produção dessas citocinas no período inicial da resposta inflamatória ao LPS. Entre as citocinas analisadas, a administração

de 5-HT icv atenuou apenas os níveis de TNF- α 120 min após a administração de LPS ($P < 0,05$, grupo EF tratado com 5-HT icv e LPS ip vs grupo EF tratado com veículo icv e LPS ip); tal redução dos níveis de TNF- α foi inibida pela esplenectomia ($P < 0,001$, grupos ET vs EF, tratados com 5-HT icv e LPS ip), corroborando a hipótese de que a 5-HT icv promove a ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico. Ademais, não houve diferenças significativas dos níveis plasmáticos de IFN- γ entre os grupos.

A inflamação sistêmica leve causou o aumento dos níveis esplênicos de TNF- α ($F_{5,34}=18,36$, $P < 0,001$, Figura 14A) e IL-1 β ($F_{5,40}=8,96$, $P < 0,001$, Figura 14B) 45 min após a administração de LPS, enquanto os níveis de IL-1 β , IL-6 ($F_{5,39}=3,20$, $P=0,02$, Figura 14C) e IFN ($F_{5,39}=3,43$, $P=0,01$, Figura 14E) aumentaram 120 min após a administração de LPS. Entre as citocinas analisadas, a administração de 5-HT icv atenuou apenas os níveis de TNF- α 45 min após a administração de LPS ($P < 0,05$, grupo tratado com 5-HT icv e LPS ip vs grupo tratado com veículo icv e LPS ip). Não houve alteração significativa dos níveis esplênicos de IL-10 ($F_{5,41}=1,86$, $P=0,12$, Figura 14D).

PLASMA

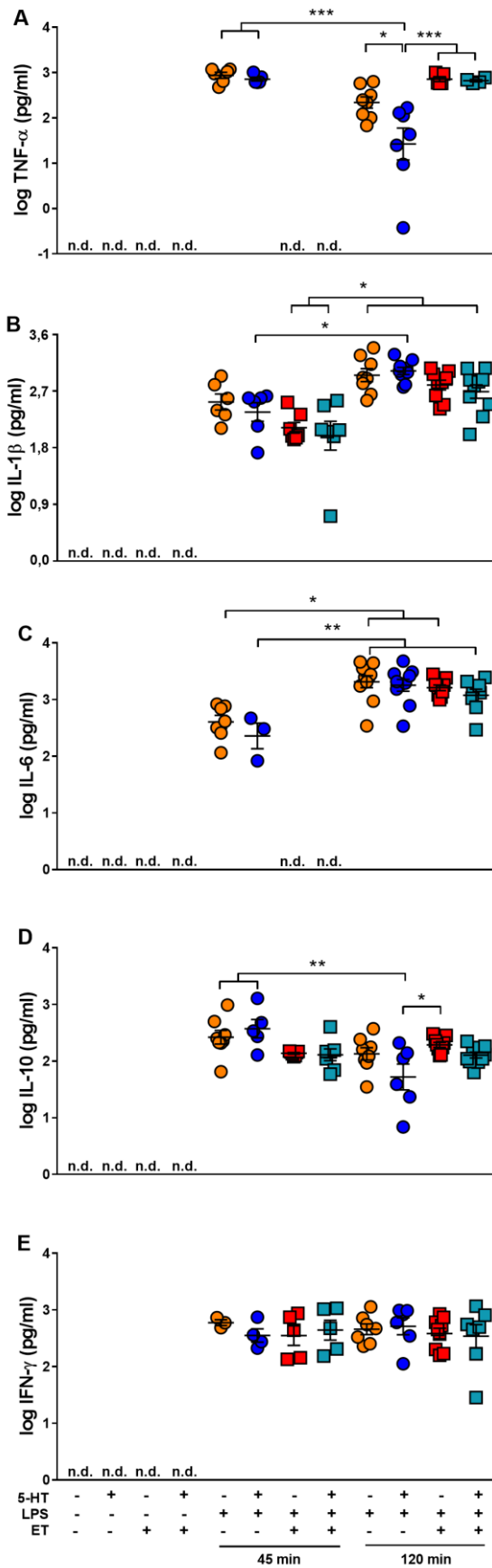


Figura 13 – A esplenectomia previne o efeito inibitório da 5-HT icv sobre o TNF- α plasmático induzido pela inflamação sistêmica leve. Log dos níveis plasmáticos de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e IFN- γ (E) (pg/ml) de ratos que foram submetidos a esplenectomia fictícia (EF) ou esplenectomia total (ET) e que receberam uma microinjeção intracerebroventricular (icv) de veículo ou de serotonina (5-HT) (10 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$) e injetados intraperitonealmente (ip) com veículo (grupo controle) ou lipopolissacarídeo (LPS) (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 45 e 120 min após a administração ip. Dados apresentados como média \pm SEM. (n=6-7/grupo). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. N.d.: níveis não detectáveis. Fonte: Mota et al., dados não publicados.

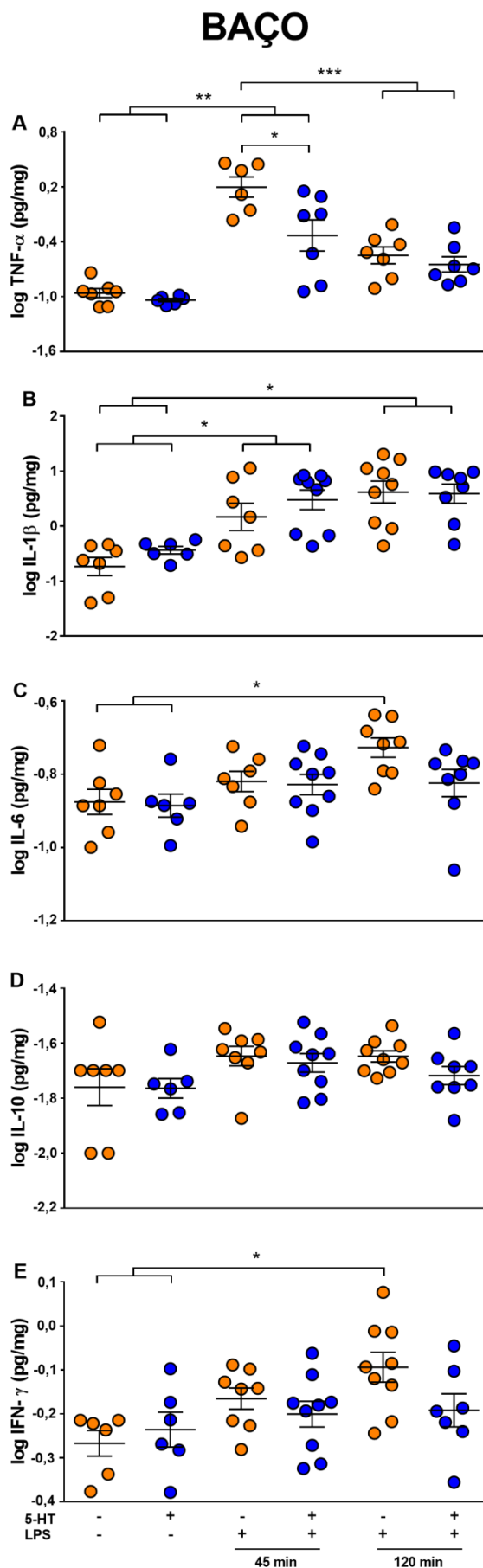


Figura 14 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ esplênicos durante a inflamação sistêmica leve. Log dos níveis esplênicos de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e IFN- γ (E) (pg/mg) de ratos que foram submetidos a esplenectomia fictícia (EF) ou esplenectomia total (ET) e que receberam uma microinjeção intracerebroventricular (icv) de veículo ou de serotonina (5-HT) (10 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$) e injetados intraperitonealmente (ip) com veículo (grupo controle) ou lipopolissacarídeo (LPS) (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 45 e 120 min após a administração ip. Dados apresentados como média \pm SEM. (n=6-7/grupo). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. Fonte: Mota et al., 2019, dados não publicados.

4.4 *Resultados do Estudo 3: A administração intracerebroventricular de 5-HT previne a hipotensão e a hipotermia, além de reduzir os níveis de citocinas plasmáticas e esplênicas durante a inflamação sistêmica grave*

4.4.1 A inflamação sistêmica grave induziu a redução nos níveis endógenos de 5-HT e 5-HIAA enquanto aumentou os níveis de DA, DOPAC e NA na AVPO

Os resultados do Estudo 2 demonstram que a 5-HT apresenta um papel anti-inflamatório importante durante a inflamação sistêmica leve. O Estudo 3 investigou os efeitos da 5-HT em um modelo de inflamação sistêmica grave, que mimetiza o choque endotoxêmico, a fim de identificar a magnitude e possíveis limitações do pré-tratamento com 5-HT em uma condição mais grave.

A inflamação sistêmica grave causou a redução dos níveis de 5-HT na AVPO ($F_{2,15}=9,08$, $P=0,002$, Figura 15A) e o aumento da razão 5-HIAA/5-HT ($F_{2,15}=14,79$, $P=0,003$, Figura 15C) 300 min após a administração de LPS, indicando que a redução dos níveis de 5-HT ocorre devido ao aumento da sua metabolização. O aumento dos níveis de 5-HIAA foi observado 75 min após a administração de LPS ($F_{2,15}=4,28$, $P=0,033$, Figura 15B).

Além de influenciar nos níveis de 5-HT na AVPO, outros neurotransmissores foram afetados pela inflamação sistêmica grave. Houve aumento dos níveis de DA ($F_{2,15}=20,96$, $P=0,0001$, Figura 15D) e seu principal metabólito DOPAC ($F_{2,15}=60,60$, $P<0,0001$, Figura 15E), bem como da razão DOPAC/DA ($F_{2,15}=5,87$, $P=0,01$, Figura 15F) 75 min após a administração de LPS. Também houve aumento dos níveis de NA na AVPO 300 min após a administração de LPS ($F_{2,13}=7,72$, $P=0,006$, Figura 15G).

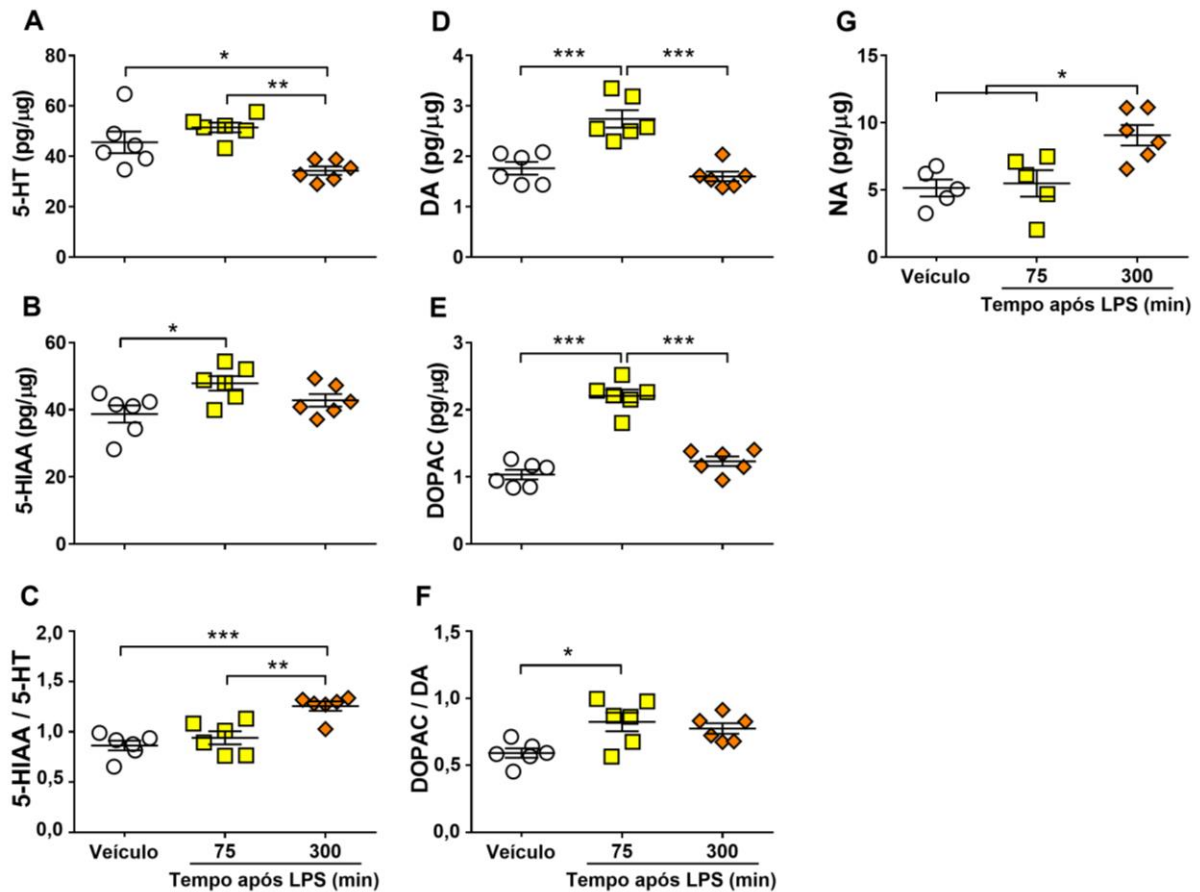


Figura 15 – A inflamação sistêmica grave induziu a redução nos níveis endógenos de 5-HT e 5-HIAA enquanto aumentou os níveis de DA, DOPAC e NA na AVPO. Concentrações de serotonina (5-HT) (A), ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (B), 5-HIAA/5-HT (C), dopamina (DA) (D), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (E), DOPAC/DA (F) e noradrenalina (NA) (G) na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO) (pg/μg). Amostras do grupo controle (veículo) intravenosamente (iv) foram obtidas 300 min após a administração e as amostras dos grupos tratados com LPS (1,5 mg/kg, iv) foram obtidas 75 e 300 min após a administração. Dados apresentados como média ± SEM. (n = 5-6/grupo). *P<0,05, **P<0,01, e ***P<0,0001. Fonte: adaptado de: Mota et al., 2019 (201).

4.4.2 A 5-HT icv preveniu a hipotensão e o aumento dos níveis plasmáticos de NO durante a inflamação sistêmica grave

O pré-tratamento com veículo ou 5-HT não causou mudanças significativas na PAM ou na FC de animais tratados com veículo iv. Houve efeito significativo do tempo ($F_{18,468}=6,00$, $P<0,0001$) e tratamento ($F_{3,468}=7,54$, $P=0,0009$), bem como interação entre ambos ($F_{54,468}=2,66$, $P<0,0001$, Figura 16A), demonstrando que a inflamação sistêmica grave causou uma típica redução significativa da pressão arterial média (MAP) aos 80 min (-6 ± 1 vs 4 ± 2 mmHg, $P<0,05$) entre 240 e 300 min (ponto mínimo aos 300 min: -9 ± 2 vs 1 ± 1 mmHg, $P<0,05$) após a administração de LPS. Os animais tratados com 5-HT icv e LPS iv apresentaram valores de MAP significativamente mais elevados que os valores do grupo

tratado com veículo icv LPS (ponto mínimo aos 80 min: 9 ± 2 vs -6 ± 1 mmHg, $P < 0,001$, Figura 16A).

As análises da FC demonstraram que houve efeito significado tanto do tempo ($F_{18,432}=38,21$, $P < 0,0001$) quanto do tratamento ($F_{3,432}=20,48$, $P < 0,0001$), bem como interação entre ambos ($F_{54,432}=15,31$, $P < 0,0001$, Fig. 16B), demonstrando que a inflamação sistêmica causou taquicardia, que teve início 120 min após a administração de LPS (ponto máximo aos 260 min: 146 ± 12 vs 13 ± 8 bpm, $P < 0,001$, Figura 16B). Os animais tratados com 5-HT icv e LPS iv também apresentaram taquicardia, que teve início 100 min após a administração de LPS (ponto máximo aos 240 min: 164 ± 11 vs 12 ± 12 bpm, $P < 0,001$, Figura 16B).

Corroborando a hipotensão, houve aumento dos níveis de nitrato, uma medida indireta da concentração de óxido nítrico (NO) ($F_{5,36}=45,11$, $P < 0,0001$, Figura 16C), 300 min após a administração de LPS ($P < 0,0001$). Em contrapartida, os animais que receberam LPS e pré-tratamento com 5-HT icv apresentaram níveis mais baixos de nitrato ($P < 0,0001$), o que vai ao encontro dos valores mais elevados da PAM em relação aos animais hipotensos.

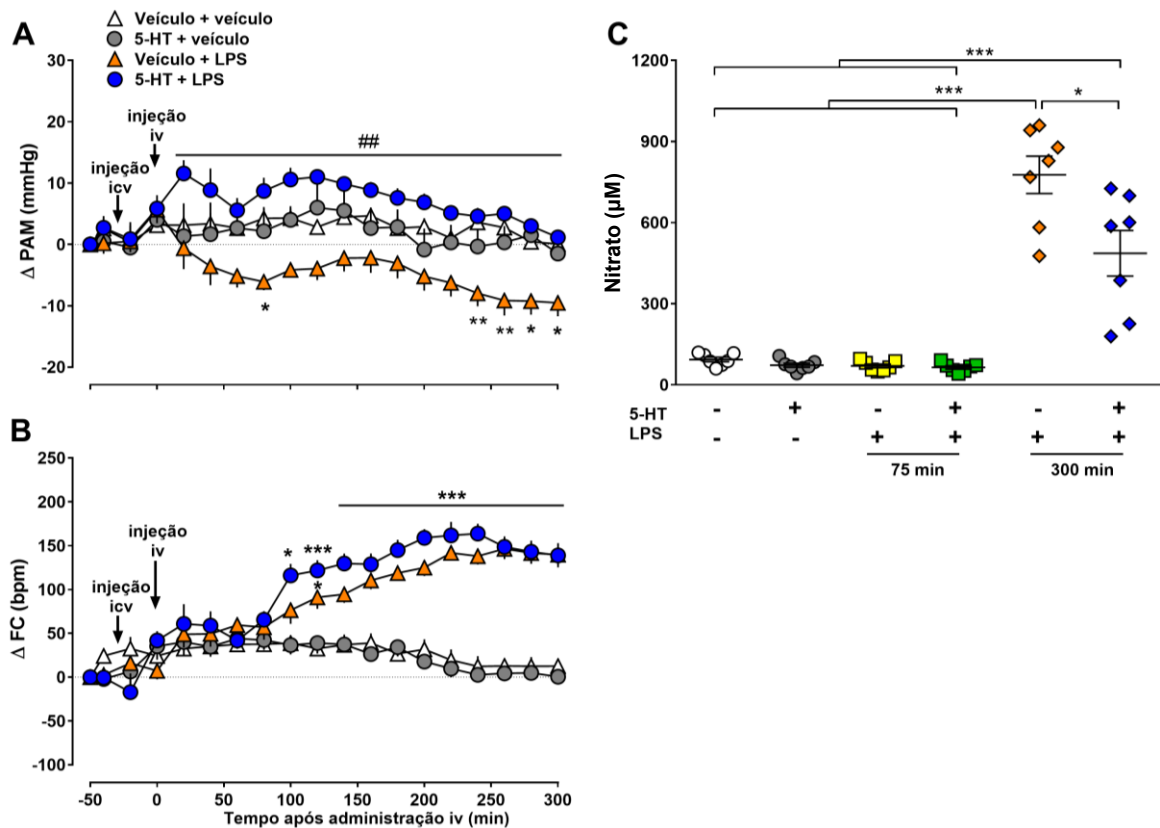


Figura 16 – A 5-HT icv preveniu a hipotensão e o aumento dos níveis plasmáticos de nitrato durante a inflamação sistêmica grave. Evolução temporal da variação da pressão arterial média, PAM (Δ mmHg) (A) e da frequência cardíaca, FC (Δ bpm) (B) de ratos tratados com veículo ou serotonina (5-HT) ($10 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) intracerebroventricularmente (icv) e veículo ou lipopolissacarídeo (LPS) ($1,5 \text{ mg}/\text{kg}$) intravenosamente (iv). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo icv e veículo iv e ## $P < 0,01$ vs grupo tratado com veículo icv e LPS iv. Níveis plasmáticos de nitrato (μM) (C) de ratos tratados com veículo ou 5-HT icv e

veículo ou LPS iv. As amostras do grupo tratado com veículo icv e veículo iv foram obtidas 300 minutos após a administração e amostras de ratos tratados com LPS foram obtidas 75 e 300 minutos após a administração. Os valores basais de PAM e FC foram de 95 ± 7 mmHg e 355 ± 22 bpm, respectivamente. Dados apresentados como média \pm SEM. (n = 6-10/grupo). * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$. Fonte: adaptado de: Mota et al., 2019 (201).

4.4.3 A 5-HT preveniu a hipotermia sem reduzir os níveis de PGE_2 na AVPO durante a inflamação sistêmica grave

Houve efeitos significativos tanto do tempo ($F_{67,1407}=37,39$, $P < 0,0001$) e tratamento ($F_{201,1407} = 14,2$, $P < 0,0001$), bem como uma interação entre tempo e tratamento ($F_{54,432}=15,31$, $P < 0,0001$, Figura 17A), demonstrando que os ratos tratados com o 5-HT icv e veículo iv apresentaram uma redução significativa da Tc em comparação com o grupo tratado com veículo icv e veículo iv, desde o tempo -15 a 30 min (ponto mínimo aos -10 min: $-0,94 \pm 0,18$ vs $0,03 \pm 0,21$ °C, $P < 0,05$) e em comparação com o grupo tratado com veículo icv e LPS iv no tempo -10 a 10 min (ponto mínimo aos 5 min: $-0,70 \pm 0,12$ vs $0,64 \pm 0,19$ °C, $P < 0,05$) após a administração de LPS. O LPS causou hipotermia em comparação com o grupo tratado com veículo icv e veículo iv no tempo 60 a 95 min (ponto mínimo aos 75 min: $-0,88 \pm 0,27$ vs $0,25 \pm 0,27$ °C, $P < 0,05$) e em comparação com o grupo tratado com 5-HT icv e veículo iv desde o tempo 70 a 100 min (ponto mínimo aos 75 min: $-0,88 \pm 0,27$ vs $0,23 \pm 0,17$ °C, $P < 0,05$) após a administração de LPS. Após a hipotermia, o LPS causou febre em comparação com o grupo tratado com veículo icv e veículo iv no período de 175 a 300 min (ponto máximo aos 300 min: $2,03 \pm 0,25$ vs $-0,04 \pm 0,28$ °C, $P < 0,05$) após a administração de LPS e em comparação com o grupo tratado com 5-HT icv e veículo iv de 195 até 300 min (ponto máximo aos 300 min: $2,03 \pm 0,25$ vs $0,23 \pm 0,21$ °C $P < 0,05$) após a administração de LPS. A administração de 5-HT induziu um aumento de Tc em comparação com o grupo tratado com veículo icv e veículo iv do tempo 55 a 300 min (ponto máximo aos 270 min: $2,86 \pm 0,30$ vs $0,08 \pm 0,27$ °C, $P < 0,05$), bem como em comparação com o grupo tratado com 5-HT icv e veículo iv de 25 a 300 min (ponto máximo aos 270 min: $2,86 \pm 0,30$ vs $0,28 \pm 0,17$ °C, $P < 0,05$) e em comparação com o grupo tratado com veículo icv e LPS iv entre 35 e 270 min após a administração de LPS (ponto máximo aos 75 min: $1,21 \pm 0,29$ vs $-0,88 \pm 0,27$ °C, $P < 0,05$).

Os níveis de PGE_2 na AVPO ($F_{5,33}=17,37$, $P < 0,0001$) aumentaram 300 min após a administração de LPS em comparação com grupos tratados com veículo ($P < 0,0001$ vs grupo controle, Figura 17B). O pré-tratamento com 5-HT icv não causou alterações significativas nos níveis de PGE_2 na AVPO ($P > 0,05$). Além disso, as concentrações de PGD_2 não se

alteraram significativamente após a administração de LPS ou 5-HT ($F_{5,36}=1,57$, $P=0,19$, Figura 17C).

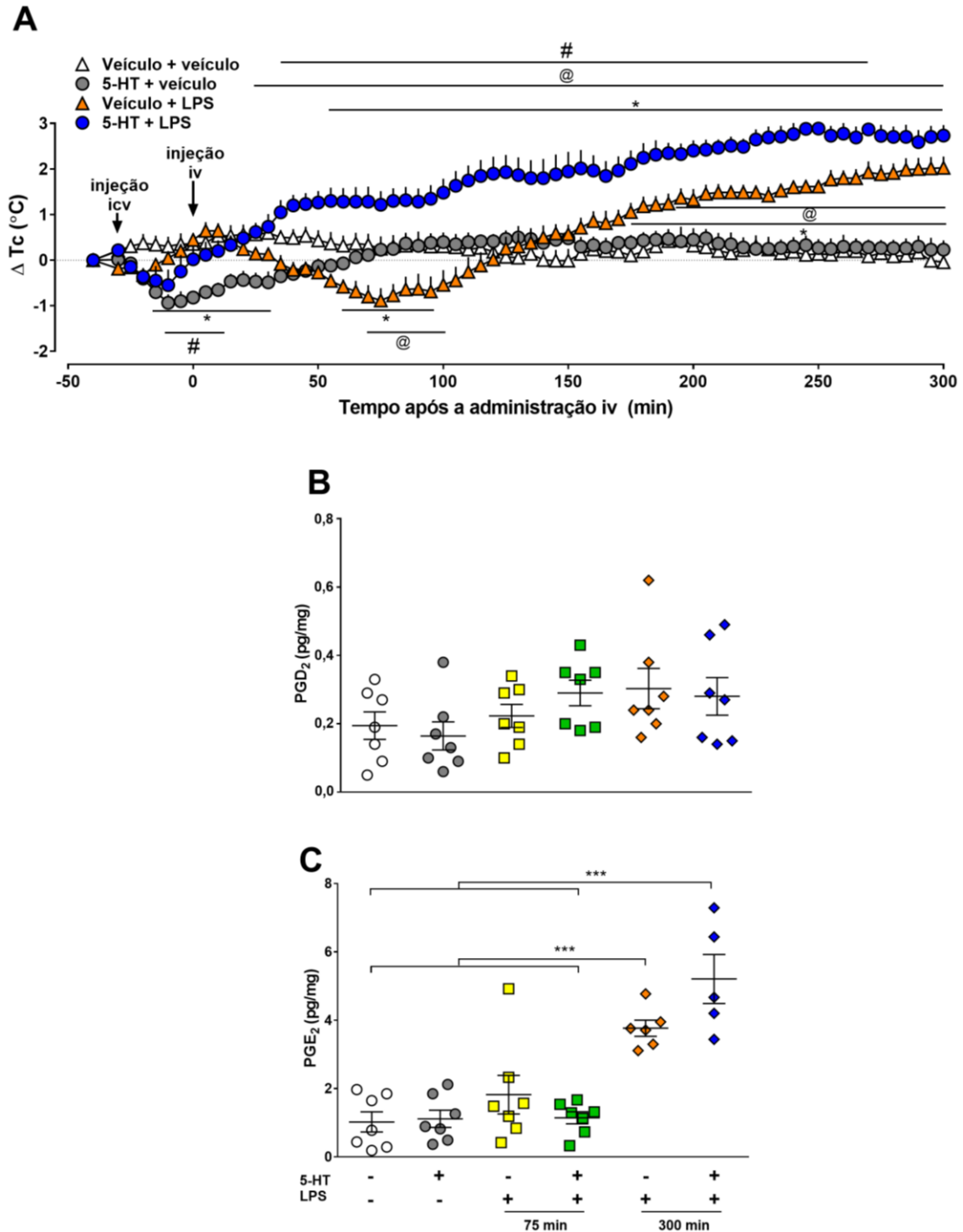


Figura 17 – A 5-HT icv preveniu a hipotermia sem reduzir os níveis de PGE₂ na AVPO durante a inflamação sistêmica grave. Curso de tempo da temperatura corporal (T_c) (Δ °C) (A) de ratos tratados com veículo ou serotonina (5-HT) (10 μ g/1 μ l) intracerebroventricularmente (icv) e veículo ou lipopolissacarídeo (LPS) (1,5 mg/kg) intravenosamente (iv). * $P<0,05$ versus grupo tratado com veículo icv e veículo iv, # $P<0,05$ vs grupo tratado com veículo icv mais LPS iv e @ $P<0,05$ vs grupo tratado com 5-HT icv e veículo iv. Concentrações de prostaglandina (PG) D₂ (B) e PGE₂ (C) na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO) (pg/mg). As amostras do grupo tratado com veículo mais veículo foram obtidas 300 minutos após a administração e as amostras dos grupos tratados com LPS foram obtidas 75 e 300 minutos após a

administração. *** $P < 0,001$. Os valores basais de Tc foram $37,33 \pm 0,75$ °C. Dados apresentados como média \pm SEM. (n = 6-7/grupo). Fonte: adaptado de: Mota et al., 2019 (201).

4.4.4 A 5-HT icv atenuou os níveis de citocinas plasmáticas e de TNF- α e IL-10 esplênicos durante a inflamação sistêmica grave

A inflamação sistêmica causou o surgimento de TNF- α ($P < 0,001$, Figura 18A), IL-1 β ($F_{3,21}=26,45$, $P < 0,001$, Figura 18B), IL-6 ($P < 0,001$, Figura 18C) e IL-10 ($F_{3,24}=32,96$, $P < 0,001$, Figura 18D) plasmáticos 75 min após a administração de LPS e de IFN- γ 300 min após a administração de LPS. Os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6 e IL-10 mantiveram-se elevados 300 min após a administração de LPS, enquanto os níveis de TNF- α não foram detectados. O pré-tratamento com 5-HT icv atenuou os níveis de TNF- α ($P < 0,001$), IL-6 ($P < 0,05$) e IL-10 ($P < 0,01$) 75 min após a administração de LPS em comparação com o grupo tratado com veículo icv e LPS no mesmo período de tempo (Figura 18), além de atenuar os níveis de IL-1 β ($P < 0,001$) 300 min após a administração de LPS, em comparação com o grupo tratado com veículo icv e LPS iv no mesmo período (Figura 18B). Em contraste, a administração de 5-HT não causou alteração significativa nos níveis plasmáticos de IFN- γ ($P = 0,08$, Figura 18E).

Os níveis de TNF- α ($F_{5,35}=253,20$, $P < 0,001$, Figura 19A), IL-6 ($F_{5,35}=13,11$, $P < 0,001$, Figura 19C) e IL-10 ($F_{5,35}=9,52$, $P < 0,0001$, Figura 19D) esplênicos aumentaram 75 min ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P = 0,002$, $P < 0,001$) enquanto a IL-1 β ($F_{5,35}=32,03$, $P < 0,001$, Figura 19B) aumentou aos 75 e 300 min após a administração de LPS ($P < 0,001$), em comparação ao grupo tratado com veículo icv e veículo iv. Não houve alteração significativa dos níveis de IFN- γ ($F_{5,35}=2,42$, $P = 0,06$, Figura 19E). Além disso, a administração de 5-HT atenuou os níveis de TNF- α ($P = 0,004$) e IL-10 ($P = 0,01$) 75 min após a administração de LPS em comparação com o grupo tratado com veículo icv e LPS iv no mesmo período de tempo (Figuras 19A e 19D).

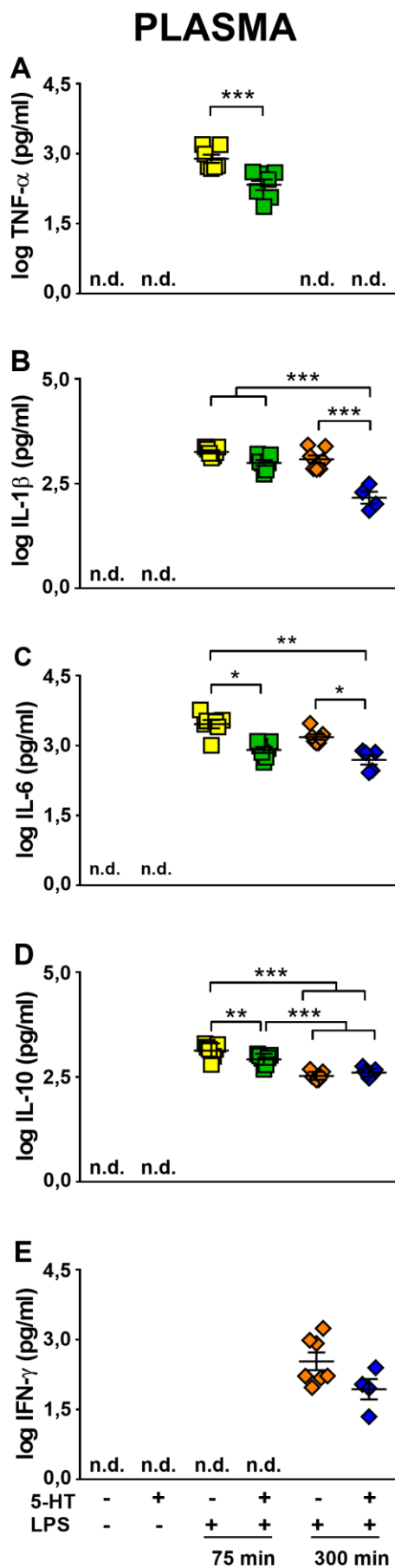


Figura 18 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de citocinas plasmáticas durante a inflamação sistêmica grave. Log dos níveis plasmáticos de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e IFN- γ (E) (pg/ml). As amostras do grupo tratado com veículo intracerebroventricularmente (icv) e veículo intravenosamente (iv) foram obtidas 300 min após a administração e as amostras dos grupos tratados com LPS foram obtidas 75 e 300 minutos após a administração. Dados apresentados como média \pm SEM. (n = 4-7 / grupo). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. 5-HT: serotonina (10 μ g/1 μ l), LPS: lipopolissacarídeo (1,5 mg/kg, iv), N.d.: níveis não detectáveis. Fonte: adaptado de: Mota et al., 2019 (201).

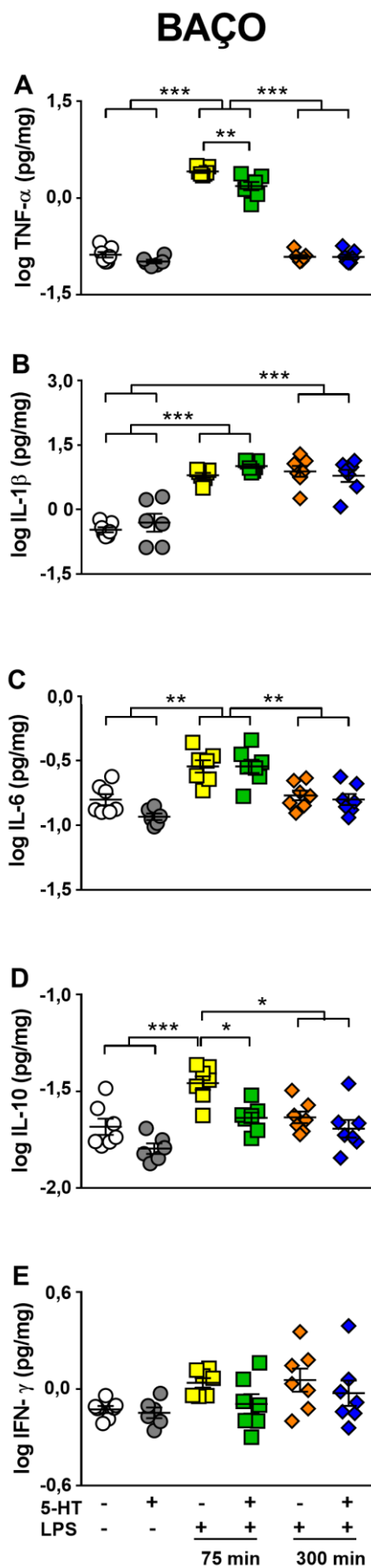


Figura 19 – A 5-HT icv preveniu o aumento dos níveis de TNF- α e IL-10 esplênicos durante a inflamação sistêmica grave. Log dos níveis esplênicos de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e IFN- γ (E) (pg/mg). As amostras do grupo tratado com veículo intracerebroventricularmente (icv) e veículo intravenosamente (iv) foram obtidas 300 min após a administração e as amostras dos grupos tratados com LPS foram obtidas 75 e 300 minutos após a administração. Dados apresentados como média \pm SEM. (n = 6-7/grupo). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. 5-HT: serotonina (10 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$, icv), LPS: lipopolissacarídeo (1,5 mg/kg, iv). Fonte: adaptado de: Mota et al., 2019 (201).

5 Discussão

Nos presentes estudo, foram utilizadas abordagens farmacológicas, eletrofisiológicas e moleculares que demonstraram a importância da 5-HT como um mediador importante na inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM durante o frio, sistemicamente e centralmente, além de ser importante ao contribuir com a inibição tônica da atividade de neurônios no rRPa em animais sob temperatura aquecida (Estudo 1). Os Estudos 2 e 3 demonstram que a 5-HT medeia a comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune, ou seja, o eixo neuroimune, ativando o reflexo anti-inflamatório esplênico (Estudo 2) e, conseqüentemente, apresentando efeitos terapêuticos tanto na inflamação sistêmica leve como na inflamação sistêmica grave, a qual mimetiza alterações fisiopatológicas do choque endotoxêmico (Estudo 3).

5.1 *Discussão do Estudo 1*

O Estudo 1 demonstra o envolvimento da 5-HT sistêmica na inibição do fluxo simpático para o TAM e, conseqüentemente, na redução da termogênese pelo TAM, a qual contribui para a manutenção da temperatura corporal em níveis fisiológicos durante a exposição ao frio. A 5-HT sistêmica inibe completamente a ANS TAM evocada pelo frio ao causar a inibição de neurônios da DMH que provêm a excitação necessária para a excitação de neurônios no rRPa que medeiam a termogênese pelo TAM em resposta ao frio (44, 57, 80, 202). Outro achado importante desse estudo é que neurônios da DMH que são simpatoexcitatórios para o TAM contribuem tonicamente para a excitação de neurônios simpáticos no rRPa mesmo quando a pele/corpo está aquecida(o) e a termogênese pelo TAM é extremamente baixa (vide Figuras 5A e 5B). Adicionalmente, desse estudo revela que 5HT_{1A}R presentes em neurônios simpatoexcitatórios do rRPa são tonicamente ativados, presumidamente, pela 5-HT endógena, contribuindo para a inibição desses neurônios e, conseqüentemente, para a supressão da ANS TAM e termogênese pelo TAM.

Alguns fármacos antidepressivos e ansiolíticos (50, 51), como, por exemplo, o 8-OH-DPAT (52-55), apresentam efeitos hipotérmicos, o que levou ao estudo do uso de agonistas de 5HT_{1A}R tanto em humanos (203, 204) quanto em roedores (54, 55, 205, 206) em causar efeitos hipotérmicos. Os efeitos antidepressivos e a hipotermia pelo 8-OH-DPAT são prevenidos pela administração sistêmica de antagonistas de 5HT_{1A}R que são ativos

centralmente (85, 205, 207). Como a ativação de $5HT_{1A}R$ no rRPa inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM (44, 45), o rRPa é um alvo importante que contribui para a hipotermia induzida por antidepressivos que atuam sobre $5HT_{1A}R$. O presente estudo demonstra que tanto o 8-OH-DPAT sistêmico como a nanoinjeção de 5-HT no rRPa ativam $5HT_{1A}R$ no rRPa, causando a inibição da ANS TAM e da termogênese pelo TAM. Desse modo, a combinação entre a perda de calor pela vasodilatação (192, 208, 209) e a inibição da termogênese pelo TAM e pelo tremor (46) induzidos pelo 8-OH-DPAT são responsáveis pela hipotermia induzida pelo 8-OH-DPAT sistêmico.

O bloqueio de $5HT_{1A}R$ no rRPa não teve efeito sobre a inibição da ANS TAM e na termogênese pelo TAM induzida pela 5-HT iv, apesar de ter prevenido os efeitos simpatoinibitórios da 5-HT no rRPa. Esse resultado indica que a 5-HT sistêmica não tem acesso a $5HT_{1A}R$ em neurônios simpatoexcitatórios no rRPa ou que a 5-HT iv age em receptores serotoninérgicos inibitórios localizados caudalmente ao rRPa (58). Esta última possibilidade é menos provável, pois a ativação de $5HT_{1A}R$ na medula espinal causa potencialização da ANS TAM e da termogênese pelo TAM evocadas pela nanoinjeção de NMDA na IML (81, 210) e contribui para a termogênese pelo TAM induzida pelo frio (48). Como a 5-HT iv não teve efeito na simpatoexcitação do TAM causada pela nanoinjeção de NMDA no rRPa, pode-se concluir que o efeito inibitório da 5-HT iv na ANS TAM não é mediado por um efeito em uma estrutura anatômica caudal ao rRPa (211).

Desse modo, foi proposta a hipótese de que a 5-HT iv atua em uma circuitaria neural que antecede o rRPa. A atividade de neurônios simpatoexcitatórios no rRPa é fortemente influenciada pelo balanço entre sinapses excitatórias, principalmente glutamatérgicas (44, 80, 131), e inibitórias, incluindo sinapses GABAérgicas (196). Por exemplo, quando a pele e o corpo estão aquecidos, a ANS TAM e a termogênese pelo TAM são extremamente baixas, espera-se que a influência inibitória sobre os neurônios do rRPa seja maior que a influência excitatória, resultando na inibição dos neurônios que contribuem para a termogênese pelo TAM. O aumento da ANS TAM após o bloqueio de $GABA_A R$ no rRPa (131, 196) revela a existência de uma atividade glutamatérgica sobre os neurônios simpatoexcitatórios no rRPa para o TAM, mesmo com o animal aquecido, sugerindo a existência de uma forte influência excitatória tônica para esses neurônios (131). Contudo, a fonte dessa excitação tônica ainda não foi descoberta, apesar de ser conhecido que diversas regiões encefálicas se projetam para o rRPa (82, 212-215). O achado de que a 5-HT iv foi eficaz em inibir a ANS TAM e a termogênese TAM evocadas pelo bloqueio de $GABA_A R$ no rRPa demonstra que a inibição do TAM induzida pela 5-HT iv não depende da ativação de $GABA_A R$ no rRPa. Desse modo,

pode-se formular a hipótese de que a 5-HT iv reduz a atividade excitatória para o rRPa. Neurônios do rRPa recebem projeções excitatórias da DMH, contribuindo, assim, para a termogênese pelo TAM na defesa contra o frio e na febre (44, 57, 130, 132, 133). O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a DMH provém pelo menos parte da excitação tônica a neurônios do rRPa, contribuindo para a ANS TAM e a termogênese pelo TAM evocadas pela remoção da influência GABAérgica na atividade neuronal do rRPa.

Como os resultados do presente estudo sugerem que pelo menos uma das projeções excitatórias para o rRPa ser inibida pela 5-HT iv, investigou-se o envolvimento da DMH na resposta simpatoinibitória da 5-HT iv. O aumento da ANS TAM induzido pela ativação de receptores NMDA na DMH foi completamente inibido pela 5-HT iv, o que demonstra que a 5-HT iv ativa ou aumenta o componente inibitório para os neurônios simpatoexcitatórios da DMH. Essa hipótese foi confirmada pela prevenção do efeito simpatoinibitório da 5-HT iv sobre a ANS TAM evocada pelo bloqueio de GABA_AR na DMH.

A fonte de inibição para neurônios na DMH e a circuitaria neural mediando o efeito da 5-HT iv permanece não identificada. Há várias possibilidades que podem ser testadas para responder a essa questão, pois a DMH recebe projeções GABAérgicas de maneira difusa por regiões do SNC que estão envolvidas no controle da termorregulação (75, 135, 216-221) e qualquer uma delas poderia ser influenciada pela 5-HT iv.

A influência direta da 5-HT iv em receptores serotoninérgicos no SNC permanece um assunto em aberto, devido ao transporte da 5-HT através da barreira hematoencefálica ainda ser um assunto controverso (27, 28, 32). Entretanto, existe a possibilidade de a 5-HT atuar em órgãos circunventriculares, os quais apresentam a barreira hematoencefálica incompleta. Outra possibilidade é que a 5-HT iv atua em receptores periféricos, como por exemplo, termorreceptores cutâneos e quimiorreceptores arteriais, relacionados a algum reflexo neural que aumenta a inibição GABAérgica de neurônios da DMH (222). Tal(is) mecanismo(s) aferente(s) sensível(is) à 5-HT, bem como os receptores envolvidos nos resultados obtidos nesse estudo ainda não são conhecidos.

Outro importante achado do presente estudo é a identificação da atividade tônica de 5HT_{1A}R no rRPa, contribuindo para a supressão da ANS TAM e da termogênese pelo TAM em animais com corpo aquecido, mas não no frio (Figura 2), sendo que a fonte do suprimento de 5-HT para o rRPa ainda não foi identificada. Houve exacerbação da ANS TAM e da termogênese pelo TAM em animais que haviam recebido previamente a administração de algum agonista serotoninérgico (8-OH-DPAT ou 5-HT), o que poderia ser explicado pela existência de resíduos do agonista administrado no rRPa.

O bloqueio dos efeitos bradicárdicos do 8-OH-DPAT administrado sistemicamente ou diretamente no rRPa, assim como da 5-HT administrada no rRPa indica que a ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa inibe a atividade de neurônios simpáticos cardíacos nessa região (223). Em contraste com os efeitos simpatoinibitórios da 5-HT iv na ANS TAM, a 5-HT iv não afetou a FC. Desse modo, pode-se concluir que o mecanismo pelo qual a 5-HT iv aumenta o tônus GABAérgico para neurônios simpatoexcitatórios da DMH que modulam a atividade do TAM, não apresenta efeitos nos neurônios simpatoexcitatórios cardíacos da DMH.

Ademais, foi corroborado o efeito hipotensivo agudo da 5-HT iv (181, 182), que causa redução aguda da PAM devido à vasodilatação venosa periférica dependente de 5-HT₇R (224, 225). Já o efeito hipotensivo do 8-OH-DPAT iv deve-se ao fato do seu efeito diretamente em 5-HT_{1A}R em neurônios simpatoexcitatórios na região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), pois é sabido que o 8-OH-DPAT atravessa a barreira hematoencefálica (226-228). Desse modo, corroborando esses estudos, o bloqueio de 5-HT_{1A}R no rRPa não preveniu a hipotensão induzida pelo 8-OH-DPAT.

Uma aplicação do conhecimento gerado sobre os mecanismos pelos quais a 5-HT iv inibe a ANS TAM e a termogênese pelo TAM é a investigação de mecanismos que causam a obesidade, pois a termogênese pelo TAM apresenta-se comprometida em ratos mantidos cronicamente em dieta rica em gordura (229, 230), similarmente ao que acontece em pessoas obesas (231, 232). Além disso, camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentam níveis elevados de 5-HT no soro sanguíneo (31) e no TAM (35) e a inibição da síntese periférica de 5-HT reduz a adiposidade e a disfunção metabólica (35, 36). Tais efeitos podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo aumento da termogênese pelo TAM mediada por receptores adrenérgicos β_3 e pela atividade das UCP1 (35). Reconciliando os resultados do presente estudo com a literatura, pode-se levantar a interessante hipótese de que a 5-HT sistêmica contribui para a obesidade não somente por agir localmente no TAM, causando redução da termogênese (35, 233), como também pela ativação de um mecanismo neural que inibe a ANS TAM e o consumo de energia pelo TAM.

5.2 *Discussão do Estudo 2*

O conjunto de resultados do Estudo 2 fornece evidências de que a inflamação sistêmica leve causa a redução dos níveis endógenos de 5-HT e 5-HIAA na AVPO, acompanhada por um quadro inflamatório leve típico, no qual há febre, aumento dos níveis de

PGE₂ na AVPO, vasoconstrição periférica, aumento dos níveis de corticosterona, aumento dos níveis de citocinas esplênicas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e surgimento de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ). Nesse cenário, a administração icv de 5-HT atenuou a maior parte dos parâmetros da inflamação sistêmica leve, ou seja, reduziu a febre, os níveis de PGE₂ na AVPO, a vasoconstrição periférica, os níveis de corticosterona, bem como os níveis de TNF- α e IL-6 plasmáticos e de TNF- α esplênico. A redução da febre e dos níveis de TNF- α pela 5-HT icv foi abolida por uma esplenectomia prévia, indicando que parte do efeito anti-inflamatório da 5-HT depende do baço e deve estar relacionado à ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico.

A inflamação central ou periférica altera a disponibilidade de triptofano para a síntese de 5-HT (234), que é a fonte para a produção endógena de 5-HT (235). A inflamação sistêmica leve também é capaz de aumentar o catabolismo da 5-HT no hipotálamo (141). Nakagawa e colaboradores (2016) demonstraram a associação entre a redução dos níveis de 5-HT na AVPO e o aumento da Tc em ratos após a exposição aguda ou crônica à Ta de 32 °C (236). Além disso, a inflamação sistêmica leve induzida pelo LPS reduz a atividade serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe (237), o qual é uma das fontes produtoras de 5-HT mais importantes do SNC (17). Estudos demonstraram que a hipotermia induzida por mefedrona (238) e 4-metilanfetamina (239) dependem dos efeitos centrais da 5-HT (240). Adicionalmente, a 5-HT endógena participa da hipotermia induzida pela hipóxia via ativação de 5-HT_{1A}R e 5-HT₇R na AVPO (89). Os resultados do presente estudo corroboram esses achados ao demonstrar que a inflamação sistêmica causa a redução dos níveis de 5-HT na AVPO.

Entretanto, há espaço para controvérsias relacionadas aos efeitos da 5-HT sobre a Tc. O presente estudo diverge de outros estudos que encontraram que a depleção de 5-HT no SNC atenua (241) ou previne a febre induzida por LPS (242). As divergências encontradas podem ser, pelo menos em parte, explicadas pelo fato de que a depleção de 5-HT altera aspectos fisiológicos do organismo de forma geral (243-245), o que pode acarretar em respostas inespecíficas. Por outro lado, outros estudos demonstraram que não há alterações nos níveis de 5-HT hipotalâmicos de ratos seis horas após a administração de LPS (146) ou nos níveis de 5-HT e 5-HIAA na AVPO de ratos submetidos ao frio (5°C) ou calor (35°C) (246). O presente estudo, baseado na redução de 5-HT na AVPO durante a inflamação sistêmica leve, investigou, então, se a administração icv de 5-HT seria eficaz em reduzir a febre e demonstrou que, de fato, a 5-HT icv foi eficaz na redução da febre induzida pelo LPS.

Em seguida, foram investigados os mecanismos pelos quais a 5-HT icv apresenta esse efeito antipirético. Os resultados desse estudo demonstram que, pelo menos parte desse efeito, deve-se à redução dos níveis de PGE₂ e da vasoconstrição da cauda reduzindo, assim, a retenção de calor pela cauda (61, 177, 247). A PGE₂ é o pirógeno endógeno proximal da febre induzida pela inflamação sistêmica (248), sendo produzida por vasos sanguíneos na AVPO (121), e atuando localmente em neurônios dessa região (249, 250).

O resultado da ativação de receptores para PGE₂ em neurônios localizados na AVPO causa redução da atividade desses neurônios que são GABAérgicos, em sua maioria, e se projetam para neurônios simpatoexcitatórios da DMH e do rRPa (57). A inibição dessa projeção GABAérgica resulta no aumento da atividade de neurônios da DMH e do rRPa, contribuindo, assim, para a vasoconstrição periférica, termogênese pelo TAM e tremor (57, 76). Portanto, é possível que os efeitos da 5-HT icv ocorram devido à ativação de 5-HT_{1A}R e 5-HT₇R na AVPO, os quais contribuem para a redução da Tc (89). Por outro lado, a ação direta da 5-HT sobre inibição da produção de PGE₂ é improvável, pois estudos demonstram que a 5-HT potencialmente contribui para a produção de PGs via 5-HT₂R (251-255).

Uma das hipóteses levantadas pelo estudo é que a 5-HT icv estaria relacionada ao aumento da produção da PGD₂, a qual é um mediador importante na regulação da Tc, desempenhando um papel criogênico (137-140). Entretanto, no presente estudo, não foram encontradas alterações nos níveis de PGD₂ na AVPO, o que não descarta que a sinalização intracelular mediada pela atuação da PGD₂ em receptores na AVPO possa estar influenciando de algum modo as alterações encontradas na Tc.

A inflamação sistêmica leve causa aumento da atividade do eixo HPA, causando o aumento dos níveis de glicocorticoides (256-258), que possivelmente funcionam como um sistema de retroalimentação negativa no controle da febre induzida pelo LPS, o que pode ser evidenciado pelo fato de que o tratamento com um glicocorticoide exógeno reduz a febre induzida pela inflamação sistêmica (258). Os glicocorticoides apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras que são atribuídas à inativação do NF-κB (259, 260) e, conseqüentemente, por diminuir a síntese e secreção de citocinas inflamatórias (261, 262). No presente estudo, encontrou-se que os níveis de corticosterona estão correlacionados negativamente aos níveis de 5-HT na AVPO, indicando uma possível relação entre 5-HT e a regulação neuroendócrina da resposta imune. A ativação de 5-HT_{1A}R na DMH inibe a atividade do eixo HPA durante o estresse (263). Por outro lado, a ativação de 5-HT_{2C}R no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) ativa o eixo HPA (264). No presente estudo, a 5-HT icv não alterou os níveis de corticosterona em animais eutérmicos, mas sim em animais

febris. Portanto, pode-se concluir que os efeitos anti-inflamatórios da 5-HT não ocorrem devido à potencialização dos níveis de corticosterona plasmáticos, que poderia ocorrer via ativação de neurônios do PVN, mas sim por outro mecanismo que reduz a ativação do eixo HPA, que poderia ocorrer via ativação de 5-HT_{1A}R em neurônios da DMH, ou, ainda, por um terceiro mecanismo no qual a 5-HT reduz a inflamação e, por sua vez, reduz o estímulo para a produção de corticosterona.

A resposta imune em resposta ao LPS causa inflamação generalizada, ou seja, sistêmica, afetando os órgãos viscerais e o SNC (97, 105, 265-267). Os resultados do presente estudo vão ao encontro desse cenário, corroborando que a inflamação sistêmica induzida por LPS resulta na produção sistêmica de mediadores inflamatórios plasmáticos (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ) e esplênicos (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ). A 5-HT icv reduziu os níveis esplênicos de TNF- α 45 min após a administração de LPS e os níveis plasmáticos de TNF- α e de IL-6 120 min e 300 min após a administração de LPS, respectivamente, em animais com o baço intacto. A redução do TNF- α pela 5-HT icv foi abolida pela esplenectomia prévia, indicando que pelo menos parte do efeito anti-inflamatório da 5-HT depende do baço e deve estar relacionado à ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico. Além do baço, os órgãos efetores do reflexo anti-inflamatório abrangem as glândulas supra-renais, o intestino, o estômago, o pâncreas e o fígado, além do baço (152), é possível que a 5-HT icv esteja ativando não somente o reflexo anti-inflamatório esplênico, como também o reflexo anti-inflamatório de uma maneira difusa entre esses outros órgãos. Nesse cenário, mais estudos são necessários para se compreender as áreas encefálicas, os receptores envolvidos e os órgãos efetores envolvidos na ativação do reflexo anti-inflamatório pela 5-HT.

Há pelo menos duas hipóteses que poderiam justificar a redução dos efeitos anti-inflamatórios e antipiréticos da 5-HT (os quais foram a redução dos níveis de PGE₂ na AVPO, dos níveis plasmáticos e esplênicos de TNF- α e dos níveis plasmáticos de IL-6). A primeira hipótese consiste nos efeitos centrais da 5-HT, que poderiam resultar na redução dos níveis de PGE₂ na AVPO, com consequente ativação do reflexo anti-inflamatório (151) e redução dos níveis de citocinas. Por outro lado, ainda não se sabe se a PGE₂ hipotalâmica desempenha algum papel sobre o reflexo anti-inflamatório. Essa hipótese parece ser improvável, pois a 5-HT icv diminuiu os níveis de PGE₂ tanto em animais submetidos à esplenectomia fictícia como em animais submetidos à esplenectomia total, mas não reduziu os níveis das citocinas plasmáticas ou esplênicas em animais esplenectomizados, indicando que a redução da PGE₂ na AVPO não é suficiente para ativar o reflexo anti-inflamatório, pelo menos não por outra(s) via(s) que não seja a via esplênica. A segunda hipótese consiste na ativação direta da 5-HT

sobre a circuitaria neural que ativa o reflexo anti-inflamatório que, por sua vez, reduz os níveis de citocinas circulantes (152) e resulta, conseqüentemente, na redução do estímulo para a produção de PGE₂ hipotalâmica e, conseqüentemente, na redução da febre (121). Esta segunda hipótese parece ser mais consistente quando se adiciona o fato de que a administração de 5-HT no ventrículo lateral cerebral de gatos aumenta a atividade do nervo simpático esplâncnico (268), um nervo cuja ativação promove os efeitos anti-inflamatórios sistêmicos atribuídos ao reflexo anti-inflamatório (151, 152).

5.3 *Discussão do Estudo 3*

O Estudo 3 aborda os efeitos anti-inflamatórios da 5-HT icv em um modelo de inflamação sistêmica grave, que mimetiza o choque endotoxêmico, e corrobora alguns dos resultados obtidos no Estudo 2. O conjunto dos resultados do Estudo 3 demonstram que a inflamação sistêmica grave causa, na AVPO, a redução dos níveis endógenos de 5-HT e aumento da sua metabolização. Diante da redução do aporte endógeno de 5-HT, o presente estudo utilizou novamente como alternativa terapêutica a 5-HT icv. A administração de 5-HT preveniu a hipotensão e reduziu os níveis de NO induzidas pela administração sistêmica de LPS. Além disso, a 5-HT preveniu a hipotermia induzida por LPS e foi capaz de atenuar os níveis de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-6 e IL-10 75 min após a administração de LPS e de IL-1 β e IL-6 300 min após a administração de LPS) e esplênicas (TNF- α e IL-10 75 min após a administração de LPS).

A inflamação sistêmica causa o aumento dos níveis de DA (145, 146) e do seu principal metabólito, o DOPAC (147) no encéfalo. No presente estudo, os níveis de DA na AVPO estavam elevados durante o pico da hipotermia induzida pelo LPS. Desse modo, pode-se colocar a hipótese de que a DA apresenta um papel criogênico. Essa hipótese vai de encontro a um estudo no qual a administração de um inibidor da recaptação de NA e DA causa elevação dos níveis de NA e DA na AVPO, vasoconstrição periférica, aumenta a Tc e a temperatura do encéfalo (148). Entretanto, esses efeitos poderiam ser atribuídos ao aumento dos níveis de NA, e não da DA, pois a administração de NA na AVPO aumenta a Tc em ratos (269) e a administração de NA na AVPO medeia a febre induzida por LPS em cobaias (142). Assim, o papel da DA na regulação da Tc permanece desconhecido.

O presente estudo sugere que a 5-HT, no SNC, ativa o reflexo esplênico anti-inflamatório durante a inflamação sistêmica grave, uma vez que a administração de 5-HT

reduziu os níveis de citocinas plasmáticas e de TNF- α e IL-10 no baço. A 5-HT icv reduziu os níveis de TNF- α e IL-10, mas não de IL-1 β e IL-6. Essa resposta específica provavelmente é finamente regulada no baço, recrutando vias de sinalização específicas que inibem a produção de TNF- α (270, 271), que parecem não incluir a IL-1 β (como observado em outro estudo (154)) e IL-6. Assim, o presente estudo está de acordo com a ênfase no TNF- α como um mediador chave da inflamação sistêmica induzida por endotoxina (272, 273) e, conseqüentemente, como o alvo principal do reflexo anti-inflamatório (151, 274, 275), o que é coerente com a sugestão de que a 5-HT ativa o reflexo anti-inflamatório esplênico, o mesmo mecanismo pelo qual a 5-HT promove efeitos anti-inflamatórios durante a inflamação sistêmica leve (Estudo 2).

Além de alterar os níveis de 5-HT e DA na AVPO, a inflamação sistêmica grave também causou aumento nos níveis de NA nessa região, bem como aumento dos níveis de NO plasmático durante a hipotensão. Esse achado está de acordo com estudos anteriores que propuseram que tal hipotensão é mediada pela ativação vagal que transmite sinais aferentes para o NTS, estimulando a liberação de NA na AVPO (159, 162). Além disso, neste modelo animal, a taquicardia acompanha a hipotensão (180). Este efeito é explicado, pelo menos em parte, pelo estado inflamatório sistêmico e pela produção anormal de NO (276). Sabe-se que a hipotensão é causada por uma miríade de fatores e por induzir uma série de respostas metabólicas e fisiológicas [por exemplo, diminuição da sensibilidade adrenérgica nos músculos lisos arteriais, redução das funções regulatórias do endotélio e aumento da produção de NO (277)]. Esse aumento na produção de NO parece resultar de uma maior expressão da isoforma indutível da NOS (iNOS) por qualquer célula sob estímulos apropriados, como citocinas e o próprio LPS (278). Uma vez produzido, o NO atua como um importante modulador das células musculares lisas arteriolares, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel e aumentando os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual é o mediador final do relaxamento dos músculos lisos arteriais (279). De acordo com isso, a produção de NO em pacientes com choque séptico está intimamente relacionada a distúrbios hemodinâmicos (277), o que também é consistente com um estudo anterior mostrando que a hipotensão induzida por LPS é atenuada em camundongos que não expressam iNOS (280). O presente estudo fornece evidências adicionais que indicam que o NO é, de fato, um fator-chave que medeia a hipotensão induzida por LPS. Quanto à frequência cardíaca, observou-se taquicardia persistente induzida por LPS, que poderia ter resultado do aumento da atividade simpática cardíaca (281), pelo menos em parte mediada pelo barorreflexo (282).

Uma vez que a produção de NO é modulada por citocinas (283), a diminuição da produção de NO observada quando a 5-HT foi administrada centralmente pode ter sido resultado dos níveis reduzidos de citocinas plasmáticas. Além disso, essas citocinas são conhecidas por estimular a produção de PGE₂ na AVPO (284). Milton e Wendlandt (1971) foram os primeiros a relatar que a administração central de PGE₂ evoca uma rápida resposta febril (285). Atualmente, a PGE₂ é reconhecida como um modulador chave envolvido nas respostas fisiopatológicas mediadas pelo SNC durante a inflamação sistêmica (284). Reconciliando os dados disponíveis com os resultados do presente estudo, pode-se especular que a redução da produção de NO causada pela 5-HT explica não apenas como a hipotensão foi inibida, mas também esclarece um possível mecanismo relacionado à redução da dissipação de calor que pode ter ocorrido para aumentar a T_c. Este último cenário foi elegantemente demonstrado ser verdadeiro para a leptina (286).

O LPS causou uma hipotermia típica seguida por febre em animais expostos a uma temperatura ambiente sub-neutra (22 °C) (287), que foi atenuada pela 5-HT. É plausível que a 5-HT, de alguma forma, inibe a resposta hipotérmica ao LPS principalmente pela inibição de uma sinalização inflamatória criogênica, que poderia envolver PGD₂. No entanto, os níveis de PGD₂ não foram afetados pela 5-HT. A administração de 5-HT não apenas preveniu a hipotermia, mas antecipou o início da febre de 170 para 55 min após a administração de LPS. Essa observação não pôde ser justificada por níveis aumentados de citocinas no plasma ou níveis mais elevados de PGE₂. Este resultado difere do nosso achado anterior, no qual a 5-HT reduziu a febre induzida por LPS possivelmente por reduzir os níveis de PGE₂ na AVPO (Estudo 2) (49). Essa diferença pode ser atribuída às diferenças patofisiológicas entre modelos experimentais utilizados, pois animais expostos à uma T_a termoneutra e dose baixa de LPS desenvolvem febre, enquanto animais expostos à uma T_a subtermoneutra e dose alta de LPS desenvolvem hipotermia seguida de febre (288). Além disso, há mediadores independentes da PGE₂ que podem estar envolvidos nos efeitos observados na T_c, como a endotelina-1 e a citocina indutora de quimioatração de neutrófilos induzido por citocinas (CINC) -1, que estão envolvidos na resposta da febre não mediada por citocinas (289). Estas podem estar envolvidas na potencialização da febre observada em ratos tratados com 5-HT durante a inflamação sistêmica.

No presente estudo, a hipotermia foi acompanhada por níveis aumentados de TNF- α e IL-10 plasmáticos, enquanto que a 5-HT icv aboliu a hipotermia e, simultaneamente, reduziu os níveis de TNF- α e IL-10 plasmáticos. Estudos mostram que TNF- α (290-296) e IL-10 (297, 298) circulantes podem ser mediadores da hipotermia durante a inflamação sistêmica.

Assim, nossos resultados estão de acordo com a noção de que TNF- α e IL-10 são mediadores criogênicos. A hipotermia induzida pela inflamação sistêmica tem sido considerada muito importante na clínica (299). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por essa resposta. Há cerca de 20 anos atrás, a hipotermia era considerada uma falha na termorregulação durante a inflamação sistêmica. Essa ideia foi reavaliada na última década por estudos que relatam mecanismos termorregulatórios específicos de hipotermia (300). Com base na noção de que a hipotermia tem sido relacionada ao pior prognóstico em pacientes sépticos (301), especula-se que as ações da 5-HT central em pacientes com choque endotóxico e/ou sepse poderiam ser benéficas.

A administração periférica de inibidores de NOS atenuam a febre em roedores expostos a uma T_a subneutra e aumenta a febre em T_a neutra (302). Corroborando essa afirmação, a administração periférica de nitrito reduz a hipotermia induzida por LPS e TNF em camundongos (303). Foi demonstrado que o NO desempenha um papel que aumenta o fluxo sanguíneo do TAM (304) e a produção de calor pelo TAM (305) em resposta à NA. O TAM é uma importante fonte de calor durante a febre induzida por LPS (306, 307), sendo recrutado pelo sistema nervoso simpático (SNS) durante a febre (308). Considerando uma hipótese na qual o NO é essencial para o aumento da atividade do TAM induzida por LPS, níveis reduzidos de NO causariam uma redução na atividade do TAM, reduzindo, assim, a T_c . No presente estudo, a 5-HT icv reduziu os níveis de NO e a hipotensão, mas não os níveis da PGE₂ nem a febre, o que é condizente com o recrutamento de termofetores, como é observado durante a febre induzida por PGE₂ (308). Pode-se também sugerir que a febre está sendo mantida pelo aumento da ativação simpática, contribuindo para a vasoconstrição e redução na perda de calor. Em resumo, pode-se sugerir que a superprodução de NO não é essencial para manter a febre e que o NO estaria ligado à hipotensão em vez de estar ligado à febre induzida por LPS em ratos pré-tratados com 5-HT.

A hipotermia e a hipotensão poderiam estar relacionadas, uma vez que ambas ocorrem simultaneamente (309). Essa hipótese é realmente apoiada pelo presente estudo, uma vez que a 5-HT aboliu a hipotensão e a hipotermia induzidas por LPS. No entanto, segundo Al-Saffar et al. (2013), pode haver outras diferenças entre os mecanismos de hipotermia e hipotensão na inflamação sistêmica (309), envolvendo as vias neuronais responsáveis por cada resposta, uma vez que a lesão da AVPO reduz a hipotensão induzida por LPS (162), mas não tem qualquer efeito na hipotermia induzida por LPS (310).

A administração icv de 5-HT induziu uma hipotermia transitória, a qual também ocorre em camundongos (83), e, após a administração de LPS, os animais tratados com 5-HT

não desenvolveram hipotermia, mas desenvolveram febre. Os efeitos terapêuticos da 5-HT icv poderiam estar relacionados não somente à ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico, como também pelo possível efeito terapêutico da hipotermia leve e transitória. Estudos demonstraram a eficácia da hipotermia terapêutica para o acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico e lesão cerebral (311, 312). Por exemplo, a hipotermia induzida por um agonista de 5-HT_{1A}R reduz o volume do infarto no AVE experimental, um efeito que não é observado quando a T_c é mantida em valores normais (206).

7 Conclusão

Os estudos permitem traçar três conclusões: (1) A termogênese pelo TAM durante o frio é inibida pela administração sistêmica ou local de 8-OH-DPAT via ativação de 5-HT_{1A}R no rRPa. Por outro lado, a administração sistêmica de 5-HT ativa uma circuitaria neural que resulta na ativação de GABA_AR na DMH, a qual inibe a termogênese pelo TAM induzidas pelo frio. Ademais, o presente estudo demonstra que neurônios simpatoexcitatórios da DMH ativam tonicamente neurônios simpatoexcitatórios do rRPa. Outro achado crucial desse estudo é a descoberta do papel da 5-HT endógena no rRPa contribuindo para a supressão da ANS TAM e da termogênese pelo TAM em animais com o corpo aquecido; (2) a inflamação sistêmica leve reduz os níveis endógenos de 5-HT na AVPO. A 5-HT exógena é um potente antipirético e reduz a atividade do eixo HPA e dos níveis de mediadores inflamatórios plasmáticos e esplênicos, sendo que o seu efeito antipirético deve-se, pelo menos em parte, pela ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico, causando a redução dos níveis de TNF- α plasmático durante a inflamação sistêmica leve; (3) a inflamação sistêmica grave, um modelo de choque endotoxêmico, reduz os níveis endógenos de 5-HT na AVPO. A 5-HT exógena previne a hipotensão e a hipotermia induzidas por LPS, além de reduzir significativamente os parâmetros pró-inflamatórios sistêmicos (NO e citocinas) provavelmente via ativação do reflexo anti-inflamatório esplênico. Os achados desses estudos permitem sugerir uma nova estratégia farmacológica a ser usada no tratamento de condições nas quais a resposta imune está comprometida.

Referências

1. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem.* 1948;176(3):1243-51.
2. Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem.* 1948;174(2):735-41.
3. Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science.* 1948;108(2804):329-30.
4. Rapport MM. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem.* 1949;180(3):961-9.
5. Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science.* 2017;357(6349).
6. Platten M, Nollen EAA, Rohrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(5):379-401.
7. Mc MR, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem.* 1958;233(6):1436-47.
8. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem.* 2007;102(1):206-15.
9. Pardridge WM. The role of blood-brain barrier transport of tryptophan and other neutral amino acids in the regulation of substrate-limited pathways of brain amino acid metabolism. *J Neural Transm Suppl.* 1979(15):43-54.
10. Wade PR, Tamir H, Kirchgessner AL, Gershon MD. Analysis of the Role of 5-Ht in the Enteric Nervous-System Using Antiidiotopic Antibodies to 5-Ht Receptors. *American Journal of Physiology.* 1994;266(3):G403-G16.
11. Bertaccini G. Tissue 5-hydroxytryptamine and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid after partial or total removal of the gastro-intestinal tract in the rat. *J Physiol.* 1960;153(2):239-49.
12. Erspamer V. Observations of the metabolism of endogenous 5-hydroxytryptamine (enteramine) in the rat. *Experientia.* 1954;10(11):471-2.
13. Erspamer V, Testini A. Observations on the release and turnover rate of 5-hydroxytryptamine in the gastrointestinal tract. *J Pharm Pharmacol.* 1959;11:618-23.
14. Crivellato E, Damiani D, Mallardi F, Travan L. Suggestive evidence for a microanatomical relationship between mast cells and nerve fibres containing substance P, calcitonin gene related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and somatostatin in the rat mesentery. *Acta Anat (Basel).* 1991;141(2):127-31.
15. Kushnir-Sukhov NM, Brown JM, Wu Y, Kirshenbaum A, Metcalfe DD. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(2):498-9.
16. Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase regulation - Drug-induced modifications that alter serotonin neuronal function. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:19-27.
17. Nieuwenhuys R. Chemoarchitecture of the brain. Berlin ; New York: Springer-Verlag; 1985. x, 246 p.
18. Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(4):331-43.
19. Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13525-30.
20. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 2003;299(5603):76.
21. Neal KB, Parry LJ, Bornstein JC. Strain-specific genetics, anatomy and function of enteric neural serotonergic pathways in inbred mice. *J Physiol.* 2009;587(3):567-86.
22. Best J, Nijhout HF, Reed M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. *Theor Biol Med Model.* 2010;7:34.
23. Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(6):507-28.
24. Baganz NL, Blakely RD. A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin. *ACS chemical neuroscience.* 2013;4(1):48-63.
25. Hilber B, Scholze P, Dorostkar MM, Sandtner W, Holy M, Boehm S, et al. Serotonin-transporter mediated efflux: a pharmacological analysis of amphetamines and non-amphetamines. *Neuropharmacology.* 2005;49(6):811-9.
26. Young LW, Darios ES, Watts SW. An immunohistochemical analysis of SERT in the blood-brain barrier of the male rat brain. *Histochemistry and cell biology.* 2015;144(4):321-9.

27. Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A, Seki Y, Fumoto M, et al. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci*. 2008;27(9):2466-72.
28. Hardebo JE, Owman C. Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface. *Ann Neurol*. 1980;8(1):1-31.
29. Kushnir-Sukhov NM, Gilfillan AM, Coleman JW, Brown JM, Bruening S, Toth M, et al. 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol*. 2006;177(9):6422-32.
30. Inoue H, Nagata N, Koshihara Y. Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema. *Jpn J Pharmacol*. 1995;69(1):61-8.
31. Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res*. 2011;10(2):722-31.
32. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*. 2012;64(2):359-88.
33. Zhang M, Fearon IM, Zhong H, Nurse CA. Presynaptic modulation of rat arterial chemoreceptor function by 5-HT: role of K⁺ channel inhibition via protein kinase C. *J Physiol*. 2003;551(Pt 3):825-42.
34. Troy AE, Simmonds SS, Stocker SD, Browning KN. High fat diet attenuates glucose-dependent facilitation of 5-HT₃ -mediated responses in rat gastric vagal afferents. *J Physiol*. 2016;594(1):99-114.
35. Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*. 2015;21(2):166-72.
36. Pan Q, Liu Q, Wan R, Kalavagunta PK, Liu L, Lv W, et al. Selective inhibition of intestinal 5-HT improves neurobehavioral abnormalities caused by high-fat diet mice. *Metab Brain Dis*. 2019.
37. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355-66.
38. Olivier B. Serotonin: a never-ending story. *Eur J Pharmacol*. 2015;753:2-18.
39. Sevoz C, Callera JC, Machado BH, Hamon M, Laguzzi R. Role of serotonin₃ receptors in the nucleus tractus solitarii on the carotid chemoreflex. *Am J Physiol*. 1997;272(3 Pt 2):H1250-9.
40. Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(3):561-74.
41. Marston OJ, Garfield AS, Heisler LK. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur J Pharmacol*. 2011;660(1):70-9.
42. Xu Y, Jones JE, Kohno D, Williams KW, Lee CE, Choi MJ, et al. 5-HT₂CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron*. 2008;60(4):582-9.
43. D'Agostino G, Lyons D, Cristiano C, Lettieri M, Olarte-Sanchez C, Burke LK, et al. Nucleus of the Solitary Tract Serotonin 5-HT_{2C} Receptors Modulate Food Intake. *Cell metabolism*. 2018;28(4):619-30 e5.
44. Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(1):R127-36.
45. Morrison SF. Activation of 5-HT_{1A} receptors in raphe pallidus inhibits leptin-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(5):R832-7.
46. Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J Physiol*. 2011;589(Pt 14):3641-58.
47. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, et al. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci*. 2008;28(10):2495-505.
48. Madden CJ, Morrison SF. Endogenous activation of spinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors contributes to the thermoregulatory activation of brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(3):R776-83.
49. Mota CMD, Rodrigues-Santos C, Fernandez RAR, Carolino ROG, Antunes-Rodrigues J, Anselmo-Franci JA, et al. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2017;66:372-81.
50. Lesch KP, Disselkamp-Tietze J, Schmidtke A. 5-HT_{1A} receptor function in depression: effect of chronic amitriptyline treatment. *J Neural Transm Gen Sect*. 1990;80(2):157-61.
51. Anderson IM, Cowen PJ. Effect of pindolol on endocrine and temperature responses to buspirone in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992;106(3):428-32.
52. Detke MJ, Wieland S, Lucki I. Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT_{1A} receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;119(1):47-54.
53. Luscombe GP, Martin KF, Hutchins LJ, Gosden J, Heal DJ. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol*. 1993;108(3):669-77.
54. Hjorth S. Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. *J Neural Transm*. 1985;61(1-2):131-5.

55. Aulakh CS, Wozniak KM, Haas M, Hill JL, Zohar J, Murphy DL. Food intake, neuroendocrine and temperature effects of 8-OHDPAT in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1988;146(2-3):253-9.
56. Blatteis CM, Sehic E, Li S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 5:S168-77.
57. Morrison SF, Nakamura K. Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:285-308.
58. Morrison SF. Efferent neural pathways for the control of brown adipose tissue thermogenesis and shivering. *Handb Clin Neurol.* 2018;156:281-303.
59. Romanovsky AA. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210(3):498-507.
60. Fusco MM, Hardy JD, Hammel HT. Interaction of central and peripheral factors in physiological temperature regulation. *Am J Physiol.* 1961;200:572-80.
61. Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol (1985).* 2002;92(6):2667-79.
62. Gordon CJ. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav.* 1990;47(5):963-91.
63. O'Leary DS, Johnson JM, Taylor WF. Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. *J Appl Physiol (1985).* 1985;59(5):1533-8.
64. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
65. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 2012;151(2):400-13.
66. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 1984;64(1):1-64.
67. Nedergaard J, Cannon B. Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handb Clin Neurol.* 2018;156:137-52.
68. Blondin DP, Labbe SM, Phoenix S, Guerin B, Turcotte EE, Richard D, et al. Contributions of white and brown adipose tissues and skeletal muscles to acute cold-induced metabolic responses in healthy men. *J Physiol.* 2015;593(3):701-14.
69. Madden CJ, Tupone D, Cano G, Morrison SF. alpha2 Adrenergic receptor-mediated inhibition of thermogenesis. *J Neurosci.* 2013;33(5):2017-28.
70. Kataoka N, Hioki H, Kaneko T, Nakamura K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell metabolism.* 2014;20(2):346-58.
71. Prusiner SB, Cannon B, Lindberg O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 1. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration. *Eur J Biochem.* 1968;6(1):15-22.
72. Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Saraf MK, Annamalai P, et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab.* 2016;23(6):1200-6.
73. Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 2014;63(12):4089-99.
74. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 2014;19(5):741-56.
75. Zhao ZD, Yang WZ, Gao C, Fu X, Zhang W, Zhou Q, et al. A hypothalamic circuit that controls body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(8):2042-7.
76. Conceicao EPS, Madden CJ, Morrison SF. Neurons in the rat ventral lateral preoptic area are essential for the warm-evoked inhibition of brown adipose tissue and shivering thermogenesis. *Acta Physiol (Oxf).* 2018:e13213.
77. Madden CJ, Morrison SF. Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci Lett.* 2018;696:225-32.
78. Allen GV, Cechetto DF. Serotonergic and nonserotonergic neurons in the medullary raphe system have axon collateral projections to autonomic and somatic cell groups in the medulla and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1994;350(3):357-66.
79. Bowker RM, Westlund KN, Coulter JD. Origins of serotonergic projections to the spinal cord in rat: an immunocytochemical-retrograde transport study. *Brain Res.* 1981;226(1-2):187-99.
80. Nakamura K, Matsumura K, Hubschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, et al. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci.* 2004;24(23):5370-80.
81. Madden CJ, Morrison SF. Serotonin potentiates sympathetic responses evoked by spinal NMDA. *J Physiol.* 2006;577(Pt 2):525-37.

82. Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol.* 2003;460(3):303-26.
83. Yamada J, Sugimoto Y, Wakita H, Horisaka K. The involvement of serotonergic and dopaminergic systems in hypothermia induced in mice by intracerebroventricular injection of serotonin. *Jpn J Pharmacol.* 1988;48(1):145-8.
84. Lin MT, Chow CF, Chern YF, Wu KM. Elevating serotonin levels in brain with 5-hydroxytryptophan produces hypothermia in rats. *Pflugers Arch.* 1978;377(3):245-9.
85. Gudelsky GA, Koenig JJ, Meltzer HY. Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT) receptor stimulation in the rat. Evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology.* 1986;25(12):1307-13.
86. Brown JW, Sirlin EA, Benoit AM, Hoffman JM, Darnall RA. Activation of 5-HT_{1A} receptors in medullary raphe disrupts sleep and decreases shivering during cooling in the conscious piglet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(3):R884-94.
87. Ootsuka Y, Blessing WW. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors inhibit cold-induced sympathetically mediated cutaneous vasoconstriction in rabbits. *J Physiol.* 2003;552(Pt 1):303-14.
88. Blessing WW. 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation reduces cutaneous vasoconstriction and fever associated with the acute inflammatory response in rabbits. *Neuroscience.* 2004;123(1):1-4.
89. Gargaglioni LH, Steiner AA, Branco LG. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Res.* 2005;1044(1):16-24.
90. Naumenko VS, Kondaurova EM, Popova NK. On the role of brain 5-HT₇ receptor in the mechanism of hypothermia: comparison with hypothermia mediated via 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptor. *Neuropharmacology.* 2011;61(8):1360-5.
91. Brenchat A, Rocasalbas M, Zamanillo D, Hamon M, Vela JM, Romero L. Assessment of 5-HT(7) Receptor Agonists Selectivity Using Nociceptive and Thermoregulation Tests in Knockout versus Wild-Type Mice. *Adv Pharmacol Sci.* 2012;2012:312041.
92. Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, Sutcliffe JG. No hypothermic response to serotonin in 5-HT₇ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):1375-80.
93. Natarajan R, Northrop NA, Yamamoto BK. Protracted effects of chronic stress on serotonin-dependent thermoregulation. *Stress.* 2015;18(6):668-76.
94. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009;31(5):711-21.
95. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):511-23.
96. Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.* 1991;71(1):93-127.
97. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):335-49.
98. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458(7242):1191-5.
99. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014;5:316.
100. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
101. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(11):887-99.
102. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1066-71.
103. Schneiders J, Fuchs F, Damm J, Herden C, Gerstberger R, Soares DM, et al. The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. *Brain Behav Immun.* 2015;48:147-64.
104. Qi HY, Shelhamer JH. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 2005;280(47):38969-75.
105. Roth J, Blatteis CM. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol.* 2014;4(4):1563-604.
106. Blomqvist A, Engblom D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. *Neuroscientist.* 2018;24(4):381-99.
107. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294(5548):1871-5.

108. Jayakumar AR, Tong XY, Curtis KM, Ruiz-Cordero R, Abreu MT, Norenberg MD. Increased toll-like receptor 4 in cerebral endothelial cells contributes to the astrocyte swelling and brain edema in acute hepatic encephalopathy. *J Neurochem*. 2014;128(6):890-903.
109. Bluthe RM, Walter V, Parnet P, Laye S, Lestage J, Verrier D, et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*. 1994;317(6):499-503.
110. Romeo HE, Tio DL, Rahman SU, Chiappelli F, Taylor AN. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J Neuroimmunol*. 2001;115(1-2):91-100.
111. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry*. 2000;5(6):604-15.
112. Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*. 1998;83(1):281-93.
113. Konsman JP, Vigues S, Mackerlova L, Bristow A, Blomqvist A. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*. 2004;472(1):113-29.
114. Schiltz JC, Sawchenko PE. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci*. 2002;22(13):5606-18.
115. Banks WA. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(2):223-8.
116. Blatteis CM, Sehic E. Cytokines and fever. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:608-18.
117. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:74-104.
118. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt 2):R1712-25.
119. Li S, Wang Y, Matsumura K, Ballou LR, Morham SG, Blatteis CM. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res*. 1999;825(1-2):86-94.
120. Sehic E, Szekely M, Ungar AL, Oladehin A, Blatteis CM. Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull*. 1996;39(6):391-9.
121. Eskilsson A, Matsuwaki T, Shionoya K, Mirrasekhian E, Zajdel J, Schwaninger M, et al. Immune-Induced Fever Is Dependent on Local But Not Generalized Prostaglandin E2 Synthesis in the Brain. *J Neurosci*. 2017;37(19):5035-44.
122. Kwiatkoski M, Soriano RN, Araujo RM, Azevedo LU, Batalhao ME, Francescato HD, et al. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. *Exp Neurol*. 2013;240:88-95.
123. Nakamura K, Kaneko T, Yamashita Y, Hasegawa H, Katoh H, Ichikawa A, et al. Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 1999;260(2):117-20.
124. Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci*. 2002;22(11):4600-10.
125. Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, et al. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci*. 2007;10(9):1131-3.
126. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*. 1998;395(6699):281-4.
127. Oka K, Oka T, Hori T. Prostaglandin E2 may induce hyperthermia through EP1 receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. *Brain Res*. 1997;767(1):92-9.
128. Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol*. 2000;428(1):20-32.
129. Oka T, Oka K, Saper CB. Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res*. 2003;968(2):256-62.
130. Madden CJ, Morrison SF. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus mediate prostaglandin-evoked thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(2):R320-5.
131. Madden CJ, Morrison SF. Excitatory amino acid receptor activation in the raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis. *Neuroscience*. 2003;122(1):5-15.
132. Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Shekhar A, DiMicco JA. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res*. 2002;928(1-2):113-25.
133. Cao WH, Morrison SF. Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):426-37.

134. Tanaka M, Ootsuka Y, McKinley MJ, McAllen RM. Independent vasomotor control of rat tail and proximal hairy skin. *J Physiol*. 2007;582(Pt 1):421-33.
135. Nakamura Y, Nakamura K, Morrison SF. Different populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions. *Neuroscience*. 2009;161(2):614-20.
136. Shimizu T, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain. *J Biol Chem*. 1979;254(12):5222-8.
137. Ueno R, Narumiya S, Ogorochi T, Nakayama T, Ishikawa Y, Hayaishi O. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(19):6093-7.
138. Krall CM, Yao X, Hass MA, Feleder C, Steiner AA. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(6):R1512-21.
139. Kandasamy SB, Hunt WA. Involvement of prostaglandins and histamine in radiation-induced temperature responses in rats. *Radiat Res*. 1990;121(1):84-90.
140. Wang TA, Teo CF, Akerblom M, Chen C, Tynan-La Fontaine M, Greiner VJ, et al. Thermoregulation via Temperature-Dependent PGD2 Production in Mouse Preoptic Area. *Neuron*. 2019;103(2):309-22 e7.
141. Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261(3):964-9.
142. Feleder C, Perlik V, Blatteis CM. Preoptic norepinephrine mediates the febrile response of guinea pigs to lipopolysaccharide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):R1135-43.
143. Linthorst AC, Reul JM. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:139-52.
144. Linthorst AC, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic--pituitary--adrenocortical axis activity. *Eur J Neurosci*. 1995;7(12):2418-30.
145. Petrucci JR, Kalish B, Nabulsi NB, Huang Y, Hannestad J, Morris ED. Systemic inflammation enhances stimulant-induced striatal dopamine elevation. *Transl Psychiatry*. 2017;7(3):e1076.
146. Sens J, Schneider E, Mauch J, Schaffstein A, Mohamed S, Fasoli K, et al. Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017;153:168-81.
147. van Heesch F, Prins J, Konsman JP, Korte-Bouws GA, Westphal KG, Rybka J, et al. Lipopolysaccharide increases degradation of central monoamines: an in vivo microdialysis study in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of mice. *Eur J Pharmacol*. 2014;725:55-63.
148. Hasegawa H, Meeusen R, Sarre S, Diltor M, Piacentini MF, Michotte Y. Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;99(4):1397-401.
149. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(6917):853-9.
150. Martelli D, Yao ST, Mancera J, McKinley MJ, McAllen RM. Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained and independent of anesthesia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(9):R1085-91.
151. Okusa MD, Rosin DL, Tracey KJ. Targeting neural reflex circuits in immunity to treat kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(11):669-80.
152. Martelli D, Farmer DGS, McKinley MJ, Yao ST, McAllen RM. Anti-inflammatory reflex action of splanchnic sympathetic nerves is distributed across abdominal organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019;316(3):R235-R42.
153. Abe C, Inoue T. Role of C1 neurons in anti-inflammatory reflex: Mediation between afferents and efferents. *Neurosci Res*. 2018;136:6-12.
154. Komegae EN, Farmer DGS, Brooks VL, McKinley MJ, McAllen RM, Martelli D. Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2018;73:441-9.
155. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci*. 2000;85(1-3):1-17.
156. Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity*. 2017;46(6):927-42.
157. Tkacs NC, Strack AM. Systemic endotoxin induces Fos-like immunoreactivity in rat spinal sympathetic regions. *J Auton Nerv Syst*. 1995;51(1):1-7.
158. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):595-638.

159. Villanueva A, Yilmaz SM, Millington WR, Cutrera RA, Stouffer DG, Parsons LH, et al. Central cannabinoid 1 receptor antagonist administration prevents endotoxic hypotension affecting norepinephrine release in the preoptic anterior hypothalamic area. *Shock*. 2009;32(6):614-20.
160. Palkovits M, Zaborszky L, Feminger A, Mezey E, Fekete MI, Herman JP, et al. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental biochemical and electron microscopic studies. *Brain Res*. 1980;191(1):161-71.
161. Feleder C, Perlik V, Blatteis CM. Preoptic nitric oxide attenuates endotoxic fever in guinea pigs by inhibiting the POA release of norepinephrine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):R1144-51.
162. Yilmaz MS, Goktalay G, Millington WR, Myer BS, Cutrera RA, Feleder C. Lipopolysaccharide-induced hypotension is mediated by a neural pathway involving the vagus nerve, the nucleus tractus solitarius and alpha-adrenergic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area. *J Neuroimmunol*. 2008;203(1):39-49.
163. Abe C, Inoue T, Inglis MA, Viar KE, Huang L, Ye H, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci*. 2017;20(5):700-7.
164. Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(12):743-54.
165. MacNeil BJ, Jansen AH, Janz LJ, Greenberg AH, Nance DM. Peripheral endotoxin increases splenic sympathetic nerve activity via central prostaglandin synthesis. *Am J Physiol*. 1997;273(2 Pt 2):R609-14.
166. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
167. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic anti-inflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med*. 2006;203(7):1623-8.
168. Hoover DB, Brown TC, Miller MK, Schweitzer JB, Williams DL. Loss of Sympathetic Nerves in Spleens from Patients with End Stage Sepsis. *Front Immunol*. 2017;8:1712.
169. Rana M, Fei-Bloom Y, Son M, La Bella A, Ochani M, Levine YA, et al. Constitutive Vagus Nerve Activation Modulates Immune Suppression in Sepsis Survivors. *Front Immunol*. 2018;9:2032.
170. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1822-30.
171. Giebelen IA, van Westerloo DJ, LaRosa GJ, de Vos AF, van der Poll T. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF-alpha release in the mouse lung. *Shock*. 2007;28(6):700-3.
172. The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, Cash JL, Bennink R, Larosa GJ, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1219-28.
173. van Maanen MA, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(4):229-32.
174. Waldburger JM, Boyle DL, Pavlov VA, Tracey KJ, Firestein GS. Acetylcholine regulation of synovial cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3439-49.
175. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1939-52.
176. Kitagawa H, Takenouchi T, Azuma R, Wesnes KA, Kramer WG, Clody DE, et al. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(3):542-51.
177. Almeida MC, Steiner AA, Coimbra NC, Branco LG. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. *J Physiol*. 2004;558(Pt 1):283-94.
178. da Silva AO, Gargaglioni LH, Branco LG. 5-HT2A serotonergic receptor in the locus coeruleus participates in the first phase of lipopolysaccharide-induced fever. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(5):497-501.
179. Giusti-Paiva A, Branco LG, de Castro M, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. *Pflugers Arch*. 2003;447(2):175-80.
180. Stabile AM, Moreto V, Batalhao ME, Rocha MJ, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Differential Role of Neurohypophysial Hormones in Hypotension and Nitric Oxide Production During Endotoxaemia. *J Neuroendocrinol*. 2016;28(6).
181. Diaz J, Ni W, Thompson J, King A, Fink GD, Watts SW. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325(3):1031-8.
182. Darios ES, Barman SM, Orer HS, Morrison SF, Davis RP, Seitz BM, et al. 5-Hydroxytryptamine does not reduce sympathetic nerve activity or neuroeffector function in the splanchnic circulation. *Eur J Pharmacol*. 2015;754:140-7.

183. Xu WJ, Zhao Y, Huo FQ, Du JQ, Tang JS. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1-7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. *Neuroscience*. 2013;238:252-7.
184. Castro L, Varjao B, Silva I, Duque B, Batista A, Santana R, et al. Effect of the intracerebroventricular administration of GR 113808, a selective 5-HT₄ antagonist, on water intake during hyperosmolarity and hypovolemia. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(6):791-6.
185. Maleki N, Nayebi AM, Garjani A. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(12):1723-30.
186. Sharma HS, Patnaik R, Patnaik S, Mohanty S, Sharma A, Vannemreddy P. Antibodies to serotonin attenuate closed head injury induced blood-brain barrier disruption and brain pathology. *Ann Ny Acad Sci*. 2007;1122:295-312.
187. Flanagan TRJ, Emerich DF, Winn SR. Providing pharmacological access to the brain : alternate approaches. San Diego: Academic Press; 1994. xviii, 508 p. p.
188. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Seventh edition. ed. Amsterdam: Elsevier, Academic Press; 2014. 1 volume (unpaged) p.
189. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
190. Steiner AA, Colombari E, Branco LG. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. *Am J Physiol*. 1999;277(2):R499-507.
191. Steiner AA, Branco LG. Central CO-heme oxygenase pathway raises body temperature by a prostaglandin-independent way. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(5):1607-13.
192. Ootsuka Y, Tanaka M. Control of cutaneous blood flow by central nervous system. *Temperature (Austin)*. 2015;2(3):392-405.
193. Fozard JR, Mir AK, Middlemiss DN. Cardiovascular response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) in the rat: site of action and pharmacological analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;9(3):328-47.
194. Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA. Role of 5-HT_{1A} receptors in the lower brainstem on the cardiovascular response to dorsomedial hypothalamus activation. *Auton Neurosci*. 2008;142(1-2):71-6.
195. Mota CMD, Branco LGS, Morrison SF, Madden CJ. Systemic serotonin inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity via a GABA input to the dorsomedial hypothalamus, not via 5HT_{1A} receptor activation in raphe pallidus.0(ja).
196. Morrison SF, Sved AF, Passerin AM. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol*. 1999;276(2):R290-7.
197. Madden CJ, Morrison SF. Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci Lett*. 2019;696:225-32.
198. Cao WH, Morrison SF. Responses of adrenal sympathetic preganglionic neurons to stimulation of cardiopulmonary receptors. *Brain Res*. 2000;887(1):46-52.
199. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Simons CT, Sugimoto N. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? *Am J Physiol*. 1998;275(1):R332-8.
200. Cabrera R, Korte SM, Lentjes EG, Romijn F, Schonbaum E, De Nicola A, et al. The amount of free corticosterone is increased during lipopolysaccharide-induced fever. *Life Sci*. 2000;66(7):553-62.
201. Mota CMD, Borges GS, Amorim MR, Carolino ROG, Batalhao ME, Anselmo-Franci JA, et al. Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2019.
202. Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci*. 2008;11(1):62-71.
203. Lesch KP, Poten B, Sohnle K, Schulte HM. Pharmacology of the hypothermic response to 5-HT_{1A} receptor activation in humans. *Eur J Clin Pharmacol*. 1990;39(1):17-9.
204. Meltzer HY, Maes M. Effects of ipsapirone on plasma cortisol and body temperature in major depression. *Biol Psychiatry*. 1995;38(7):450-7.
205. Wozniak KM, Aulakh CS, Hill JL, Murphy DL. The effect of 8-OH-DPAT on temperature in the rat and its modification by chronic antidepressant treatments. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988;30(2):451-6.
206. Johansen FF, Hasseldam H, Nybro Smith M, Rasmussen RS. Drug-induced hypothermia by 5HT_{1A} agonists provide neuroprotection in experimental stroke: new perspectives for acute patient treatment. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2879-87.
207. De Vry J, Schreiber R, Melon C, Dalmus M, Jentzsch KR. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2004;14(6):487-95.
208. Stubbs CM, Trezise D, Connor HE, Feniuk W. Vasodilator effect of 8-OH-DPAT in the isolated perfused mesenteric bed of the rat: no evidence for involvement of 5-HT_{1A} receptors. *J Auton Pharmacol*. 1991;11(4):237-45.

209. Young AA, Dawson NJ. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982;60(3):392-8.
210. Madden CJ, Morrison SF. Brown adipose tissue sympathetic nerve activity is potentiated by activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A/5-HT7 receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology.* 2008;54(3):487-96.
211. Morrison SF, Ramamurthy S, Young JB. Reduced rearing temperature augments responses in sympathetic outflow to brown adipose tissue. *J Neurosci.* 2000;20(24):9264-71.
212. Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvet M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J Chem Neuroanat.* 1997;13(1):1-21.
213. Oldfield BJ, Giles ME, Watson A, Anderson C, Colvill LM, McKinley MJ. The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience.* 2002;110(3):515-26.
214. Yoshida K, Li X, Cano G, Lazarus M, Saper CB. Parallel preoptic pathways for thermoregulation. *J Neurosci.* 2009;29(38):11954-64.
215. Nogueira MI, de Rezende BD, do Vale LE, Bittencourt JC. Afferent connections of the caudal raphe pallidus nucleus in rats: a study using the fluorescent retrograde tracers fluorogold and true-blue. *Ann Anat.* 2000;182(1):35-45.
216. Thompson RH, Swanson LW. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998;27(2):89-118.
217. Myers B, Mark Dolgas C, Kasckow J, Cullinan WE, Herman JP. Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct Funct.* 2014;219(4):1287-303.
218. Tan CL, Cooke EK, Leib DE, Lin YC, Daly GE, Zimmerman CA, et al. Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. *Cell.* 2016;167(1):47-59 e15.
219. Kroeger D, Absi G, Gagliardi C, Bandaru SS, Madara JC, Ferrari LL, et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nat Commun.* 2018;9(1):4129.
220. Lundius EG, Sanchez-Alavez M, Ghochani Y, Klaus J, Tabarean IV. Histamine influences body temperature by acting at H1 and H3 receptors on distinct populations of preoptic neurons. *J Neurosci.* 2010;30(12):4369-81.
221. Nakamura Y, Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S, Kaneko T, Morrison SF. Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2005;22(12):3137-46.
222. Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8848-53.
223. Cao WH, Morrison SF. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain Res.* 2003;980(1):1-10.
224. De Vries P, De Visser PA, Heiligers JP, Villalón CM, Saxena PR. Changes in systemic and regional haemodynamics during 5-HT7 receptor-mediated depressor responses in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 1999;359(4):331-8.
225. Seitz BM, Orer HS, Krieger-Burke T, Darios ES, Thompson JM, Fink GD, et al. 5-HT causes splanchnic venodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;313(3):H676-h86.
226. Kubo T, Taguchi K, Ozaki S, Amano M, Ishizuka T. 8-OH-DPAT-induced hypotensive action and sympathoexcitatory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res Bull.* 1995;36(4):405-11.
227. Nosjean A, Guyenet PG. Role of ventrolateral medulla in sympatholytic effect of 8-OHDPAT in rats. *Am J Physiol.* 1991;260(3 Pt 2):R600-9.
228. Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA. Role of 5-HT(1A) receptors in the lower brainstem on the cardiovascular response to dorsomedial hypothalamus activation. *Auton Neurosci.* 2008.
229. Sakaguchi T, Arase K, Fisler JS, Bray GA. Effect of a high-fat diet on firing rate of sympathetic nerves innervating brown adipose tissue in anesthetized rats. *Physiol Behav.* 1989;45(6):1177-82.
230. Madden CJ, Morrison SF. A high-fat diet impairs cooling-evoked brown adipose tissue activation via a vagal afferent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(2):E287-92.
231. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
232. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500-8.
233. Oh CM, Namkung J, Go Y, Shong KE, Kim K, Kim H, et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat Commun.* 2015;6:6794.

234. Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry*. 2002;7(5):468-73.
235. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:45-60.
236. Nakagawa H, Matsumura T, Suzuki K, Ninomiya C, Ishiwata T. Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J Therm Biol*. 2016;58:15-22.
237. Couch Y, Martin CJ, Howarth C, Raley J, Khrapitchev AA, Stratford M, et al. Systemic inflammation alters central 5-HT function as determined by pharmacological MRI. *Neuroimage*. 2013;75:177-86.
238. Shortall SE, Spicer CH, Ebling FJ, Green AR, Fone KC, King MV. Contribution of serotonin and dopamine to changes in core body temperature and locomotor activity in rats following repeated administration of mephedrone. *Addict Biol*. 2016;21(6):1127-39.
239. Rubio M, Lopez-Arnau R, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Serotonin is involved in the psychostimulant and hypothermic effect of 4-methylamphetamine in rats. *Neurosci Lett*. 2015;590:68-73.
240. Baumann MH, Ayestas MA, Jr., Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, et al. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropharmacology*. 2012;37(5):1192-203.
241. Matuszek M, Ishikawa Y. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine and 6-hydroxydopamine on fever response in conscious rats. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1981;33(3):305-12.
242. Ford DM, Klugman KP. Contrasting roles of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in fever in rats. *J Physiol*. 1980;304:51-7.
243. Blazevic S, Merkler M, Persic D, Hranilovic D. Chronic postnatal monoamine oxidase inhibition affects affiliative behavior in rat pupso. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017;153:60-8.
244. Murray NM, Buchanan GF, Richerson GB. Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep*. 2015;38(12):1985-93.
245. Pratelli M, Migliarini S, Pelosi B, Napolitano F, Usiello A, Pasqualetti M. Perturbation of Serotonin Homeostasis during Adulthood Affects Serotonergic Neuronal Circuitry. *eNeuro*. 2017;4(2).
246. Ishiwata T, Saito T, Hasegawa H, Yazawa T, Otokawa M, Aihara Y. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci*. 2004;75(22):2665-75.
247. Fraga D, Zanoni CIS, Rae GA, Parada CA, Souza GEP. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. *Brit J Pharmacol*. 2009;157(8):1494-501.
248. Scammell TE, Elmquist JK, Griffin JD, Saper CB. Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci*. 1996;16(19):6246-54.
249. Elmquist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol*. 1996;371(1):85-103.
250. Heller HC, Crawshaw LI, Hammel HT. The thermostat of vertebrate animals. *Sci Am*. 1978;239(2):102-10, 12-3.
251. Hagen AA, White RP, Robertson JT. Synthesis of prostaglandins and thromboxane B2 by cerebral arteries. *Stroke*. 1979;10(3):306-9.
252. Menard G, Turmel V, Bissonnette EY. Serotonin modulates the cytokine network in the lung: involvement of prostaglandin E2. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(2):340-8.
253. Knauss T, Abboud HE. Effect of serotonin on prostaglandin synthesis in rat cultured mesangial cells. *Am J Physiol*. 1986;251(5 Pt 2):F844-50.
254. Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(6):2187-91.
255. Stroebel M, Goppelt-Struebe M. Signal transduction pathways responsible for serotonin-mediated prostaglandin G/H synthase expression in rat mesangial cells. *J Biol Chem*. 1994;269(37):22952-7.
256. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987;238(4826):522-4.
257. Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975;150(2):466-70.
258. Coelho MM, Souza GE, Pela IR. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am J Physiol*. 1992;263(2 Pt 2):R423-7.
259. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995;270(5234):286-90.
260. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. 1995;270(5234):283-6.

261. Waage A, Bakke O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology*. 1988;63(2):299-302.
262. Zuckerman SH, Shellhaas J, Butler LD. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur J Immunol*. 1989;19(2):301-5.
263. Stamper CE, Hassell JE, Jr., Kapitz AJ, Renner KJ, Orchinik M, Lowry CA. Activation of 5-HT1A receptors in the rat dorsomedial hypothalamus inhibits stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*. 2017;20(2):223-30.
264. Heisler LK, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, et al. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci*. 2007;27(26):6956-64.
265. Breder CD, Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res*. 1996;713(1-2):64-9.
266. Kox M, van Eijk LT, Zwaag J, van den Wildenberg J, Sweep FC, van der Hoeven JG, et al. Voluntary activation of the sympathetic nervous system and attenuation of the innate immune response in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):7379-84.
267. Meltzer JC, MacNeil BJ, Sanders V, Pylypas S, Jansen AH, Greenberg AH, et al. Contribution of the adrenal glands and splenic nerve to LPS-induced splenic cytokine production in the rat. *Brain Behav Immun*. 2003;17(6):482-97.
268. Anderson IK, Martin GR, Ramage AG. Evidence that activation of 5-HT2 receptors in the forebrain of anaesthetized cats causes sympathoexcitation. *Br J Pharmacol*. 1995;116(2):1751-6.
269. Veale WL, Whishaw IQ. Body temperature responses at different ambient temperatures following injections of prostaglandin E1 and noradrenaline into the brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 1976;4(2):143-50.
270. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005;6(8):844-51.
271. Lu B, Kwan K, Levine YA, Olofsson PS, Yang H, Li J, et al. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release. *Mol Med*. 2014;20:350-8.
272. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*. 1986;234(4775):470-4.
273. Cai B, Chen F, Ji Y, Kiss L, de Jonge WJ, Conejero-Goldberg C, et al. Alpha7 cholinergic-agonist prevents systemic inflammation and improves survival during resuscitation. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3774-85.
274. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(31):11008-13.
275. Martelli D, Yao ST, McKinley MJ, McAllen RM. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *J Physiol*. 2014;592(7):1677-86.
276. Levy B, Fritz C, Tahon E, Jacquot A, Auchtet T, Kimmoun A. Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. *Crit Care*. 2018;22(1):52.
277. Miranda M, Balarini M, Caixeta D, Bouskela E. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(1):H24-35.
278. Salvemini D, Korbut R, Anggard E, Vane J. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2593-7.
279. Branco LG, Soriano RN, Steiner AA. Gaseous mediators in temperature regulation. *Compr Physiol*. 2014;4(4):1301-38.
280. Carnio EC, Stabile AM, Batalhao ME, Silva JS, Antunes-Rodrigues J, Branco LG, et al. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Pflugers Arch*. 2005;450(6):390-4.
281. DellaVolpe JD, Moore JE, Pinsky MR. Arterial blood pressure and heart rate regulation in shock state. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21(5):376-80.
282. Roberts BK. Basic Shock Physiology and Critical Care. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2016;19(2):347-60.
283. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 2010;88(6):1157-62.
284. Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci*. 2012;15(8):1088-95.
285. Milton AS, Wendlandt S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol*. 1971;218(2):325-36.

286. Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JMA, Petrovic N, Mittag J, et al. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Rep.* 2016;14(7):1621-31.
287. Steiner AA, Hunter JC, Phipps SM, Nucci TB, Oliveira DL, Roberts JL, et al. Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(2):R485-94.
288. Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(5):R1244-52.
289. Yamashiro LH, de Souza GEP, de Melo Soares D. Role of CINC-1 and CXCR2 receptors on LPS-induced fever in rats. *Pflugers Arch.* 2019;471(2):301-11.
290. Kozak W, Conn CA, Klir JJ, Wong GH, Kluger MJ. TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 2):R23-9.
291. Long NC, Kunkel SL, Vander AJ, Kluger MJ. Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol.* 1990;258(2 Pt 2):R332-7.
292. Ruetten H, Thiemermann C. Combination immunotherapy which neutralises the effects of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *J Physiol Pharmacol.* 1997;48(4):605-21.
293. Leon LR, White AA, Kluger MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol.* 1998;275(1):R269-77.
294. Leon LR, Kozak W, Peschon J, Kluger MJ. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 2):R563-9.
295. Tollner B, Roth J, Storr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflugers Arch.* 2000;440(6):925-32.
296. Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci.* 2005;10:2193-216.
297. Leon LR, Kozak W, Rudolph K, Kluger MJ. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am J Physiol.* 1999;276(1):R81-9.
298. Harden LM, Rummel C, Laburn HP, Damm J, Wiegand F, Poole S, et al. Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflugers Arch.* 2014;466(7):1451-66.
299. Clemmer TP, Fisher CJ, Jr., Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1992;20(10):1395-401.
300. Steiner AA, Fonseca MT, Soriano FG. Should we assume that hypothermia is a dysfunction in sepsis? *Crit Care.* 2017;21(1):8.
301. Rumbus Z, Matics R, Hegyi P, Zsiboras C, Szabo I, Illes A, et al. Fever Is Associated with Reduced, Hypothermia with Increased Mortality in Septic Patients: A Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170152.
302. Steiner AA, Rudaya AY, Ivanov AI, Romanovsky AA. Febrigenic signaling to the brain does not involve nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 2004;141(7):1204-13.
303. Cauwels A, Buys ES, Thoonen R, Geary L, Delanghe J, Shiva S, et al. Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J Exp Med.* 2009;206(13):2915-24.
304. Nagashima T, Ohinata H, Kuroshima A. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci.* 1994;54(1):17-25.
305. Hugie T, Halvorson I, Thornhill J. Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 1992;575(1):57-62.
306. Jennings G, Elia M. Effect of *E. coli* endotoxin on temperature, oxygen consumption and brown adipose tissue thermogenesis in rats and mice. *Biosci Rep.* 1987;7(6):517-23.
307. Jepson MM, Millward DJ, Rothwell NJ, Stock MJ. Involvement of sympathetic nervous system and brown fat in endotoxin-induced fever in rats. *Am J Physiol.* 1988;255(5 Pt 1):E617-20.
308. Morrison SF. Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience.* 2003;121(1):17-24.
309. Al-Saffar H, Lewis K, Liu E, Schober A, Corrigan JJ, Shibata K, et al. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. *Brain Behav Immun.* 2013;28:188-95.
310. Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. *PLoS One.* 2006;1:e1.

311. Kurisu K, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology*. 2018;134(Pt B):302-9.
312. Tahsili-Fahadan P, Farrokh S, Geocadin RG. Hypothermia and brain inflammation after cardiac arrest. *Brain Circ*. 2018;4(1):1-13.

Anexo A – Artigo publicado na revista *Acta Physiologica*




Received: 16 August 2019 | Revised: 4 October 2019 | Accepted: 5 October 2019

DOI: 10.1111/apha.13401

REGULAR PAPER

ACTA PHYSIOLOGICA

Systemic serotonin inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity via a GABA input to the dorsomedial hypothalamus, not via 5HT_{1A} receptor activation in raphe pallidus

Clarissa M. D. Mota^{1,2}  | Luiz G. S. Branco^{2,3}  | Shaun F. Morrison¹ | Christopher J. Madden¹ 

¹Department of Neurological Surgery, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA

²Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

³Department of Morphology, Physiology, and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Correspondence

Christopher Madden, Department of Neurological Surgery, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA.
Email: maddench@ohsu.edu

Funding information

NIH National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Grant/Award Number: NIH R01-NS091066; NIH National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), Grant/Award Number: NIH R01-DK112198; São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: 2017/24232-9

Abstract

Aim: Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), an important neurotransmitter and hormone, modulates many physiological functions including body temperature. We investigated neural mechanisms involved in the inhibition of brown adipose tissue (BAT) sympathetic nerve activity (SNA) and BAT thermogenesis evoked by 5-HT.

Methods: Electrophysiological recordings, intravenous (iv) injections and nanoinjections in the brains of anaesthetized rats.

Results: Cooling-evoked increases in BAT SNA were inhibited by the intra-rostral raphe pallidus (rRPa) and the iv administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT or 5-HT. The intra-rRPa 5-HT, the intra-rRPa and the iv 8-OH-DPAT, but not the iv 5-HT-induced inhibition of BAT SNA were prevented by nanoinjection of a 5-HT_{1A} receptor antagonist in the rRPa. The increase in BAT SNA evoked by nanoinjection of NMDA in the rRPa was not inhibited by iv 5-HT, indicating that iv 5-HT does not inhibit BAT SNA by acting in the rRPa or in the sympathetic pathway distal to the rRPa. In contrast, under a warm condition, blockade of 5HT_{1A} receptors in the rRPa increased BAT SNA and BAT thermogenesis, suggesting that endogenous 5-HT in the rRPa contributes to the suppression of BAT SNA and BAT thermogenesis. The increases in BAT SNA and BAT thermogenesis evoked by nanoinjection of NMDA in the dorsomedial hypothalamus (DMH) were inhibited by iv 5-HT, but those following bicuculline nanoinjection in the DMH were not inhibited.

Conclusions: The systemic 5-HT-induced inhibition of BAT SNA requires a GABAergic inhibition of BAT sympathoexcitatory neurones in the DMH. In addition, during warming, 5-HT released endogenously in rRPa inhibits BAT SNA.

KEYWORDS

5-hydroxytryptamine, brown adipose tissue, hypothalamus, raphe pallidus, thermoregulation

1 | INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important neurotransmitter and hormone that modulates many

physiological functions including cardiovascular,¹ respiration,² immune,³ energy balance⁴⁻⁶ and body temperature.⁷⁻¹² Changes in the level of circulating 5-HT have the potential to influence the CNS regulation of homeostatic

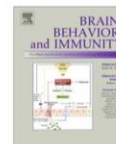
Anexo B – Artigo publicado na revista *Brain, Behavior, and Immunity*

Brain, Behavior, and Immunity 66 (2017) 372–381



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Full-length Article

Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation

Clarissa M.D. Mota^a, Caroline Rodrigues-Santos^b, Rodrigo A.R. Fernández^a, Ruither O.G. Carolino^b, José Antunes-Rodrigues^a, Janete A. Anselmo-Franci^{a,b}, Luiz G.S. Branco^{a,b,*}^a Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil^b Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2017

Received in revised form 6 July 2017

Accepted 15 July 2017

Available online 16 July 2017

Keywords:

LPS

Endotoxin

Fever

Corticosterone

IL-6

Heat loss index

Thermoregulation

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) is a neuromodulator involved in several central-mediated mechanisms, such as endocrine processes, behavior, and sleep. Dysfunction of the serotonergic system is mainly linked to psychiatric disorders, but emerging evidence suggests that immune system activation may also alter brain 5-HT signaling. However, whether central 5-HT modulates systemic inflammation (SI) remains unknown. For this purpose, male *Wistar* rats (280–350 g, 8–9 weeks) were submitted to the experimental protocols beginning between 9 and 10 AM with the performance of injections. The animals were housed at controlled conditions [temperature (25 ± 1 °C), light (06:00–18:00) and humidity (60–65%)]. Thus, we measured 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) in the anteroventral preoptic region [(AVPO) – the hierarchically most important region for body temperature (Tb) control] during lipopolysaccharide (LPS)-induced SI. We also combined LPS (100 µg/kg) treatment with intracerebroventricular (icv) injection of 5-HT (5, 10 and 40 µg/µL) and measured Tb (“hallmark” of SI), AVPO prostaglandin E₂ [(PGE₂) – an essential mediator of fever] and prostaglandin D₂ [(PGD₂) – a cryogenic mediator], plasma corticosterone [(CORT) – a stress marker with an endogenous anti-inflammatory effect] and interleukin-6 [(IL-6) – an immune mediator] levels. Detection limits of PGE₂, PGD₂, CORT and IL-6 assays were 39.1–2500 pg/mL, 19.5–2500 pg/mL, 0.12–2000 µg/dL, and 0.125–8 ng/mL, respectively. We also assessed tail skin temperature [used to calculate heat loss index (HLI)] to assess a key thermoeffector mechanism. As expected we observed LPS-induced increases in Tb, AVPO PGE₂ (whereas PGD₂ remained unchanged), plasma CORT and IL-6 levels, as well as a decrease in HLI. These changes were accompanied by reduced levels of AVPO 5-HT and 5-HIAA. Furthermore, we also observed a negative correlation between 5-HT and plasma CORT levels. Moreover, icv 5-HT (5, 10 and 40 µg/µL) microinjection caused a U-shaped dose-response curve in LPS fever, in which the intermediate dose reduced the febrile response. Icv 5-HT (10 µg/µL) microinjection prevented the LPS-induced increases in AVPO PGE₂ (whereas not altering PGD₂), plasma CORT and IL-6 levels, as well as preventing reduced HLI. Our data are consistent with the notion that AVPO 5-HT synthesis is down-regulated during SI, favoring AVPO PGE₂ synthesis and consequently potentiating the immune response. These results reveal a novel effect of central 5-HT as an anti-inflammatory neuromodulator that may take place during psychiatric disorder treatment with 5-HT reuptake inhibitors as well as suggesting that 5-HT modulation *per se* is a potential therapeutic approach for inflammatory diseases.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] plays a key role as a neurotransmitter controlling many functions within the central nervous system (CNS) (for review see Andrews et al., 2015; Berger et al., 2009; Lesch and Waider, 2012; Olivier, 2015). The

5-HT amount in the synaptic cleft is regulated not only by its release from the pre-synaptic cell but also by its uptake and/or degradation, yielding the metabolite 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) (Olivier, 2015; Youdim and Bakhle, 2006). Moreover, studies have indicated that central 5-HT may modulate several key aspects of the immune system function (Baganz and Blakely, 2013; Krishnadas et al., 2016; Robson et al., 2017).

A cryogenic effect of central 5-HT in mice was originally reported by Yamada et al. (1988). Furthermore, hypoxia has been shown to induce *c-fos* expression in the anterior hypothalamus

* Corresponding author at: Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café s/n, University of São Paulo, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: branco@forp.usp.br (L.G.S. Branco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.010>

0889-1591/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

(Berquin et al., 2000) and to drive a drop in body temperature (Tb) by activating serotonergic receptors in the hypothalamus anteroventral preoptic region (AVPO) (Gargaglioni et al., 2005). The hypothalamus receives direct projections from the raphe nucleus (Nakamura, 2011), a major source of 5-HT in the CNS (Hornung, 2003; Nieuwenhuis, 1985). The AVPO is an important integrative site in the CNS (Elmquist et al., 1996; Heller et al., 1978) that is partially composed of thermoregulatory neurons (Nakayama, 1985) which mediate fever when activated by prostaglandin E₂ (PGE₂) (Oka et al., 1997; Scammell et al., 1996, 1998). PGE₂ signaling in the AVPO is essential to the genesis of fever in response to lipopolysaccharide (LPS) that is a component of the cell wall of Gram-negative bacteria (Nakamura, 2011; Oka, 2004). Moreover, PGE₂ is augmented in the AVPO (Kwiatkoski et al., 2013; Sehic et al., 1996) in response to the cytokines produced by the immune system recruitment during LPS-induced systemic inflammation (SI) (Evans et al., 2015; Roth and Blatteis, 2014). Furthermore, other mediators have the potential to be cryogenic such as prostaglandin D₂ (PGD₂) (Kandasamy and Hunt, 1990; Krall et al., 2010; Ueno et al., 1982).

Considering the relevance of the neuro-immune interactions for homeostasis, and the absence of sufficient knowledge about the mechanisms involving 5-HT, we hypothesized that central 5-HT levels are down-modulated during SI allowing increased AVPO PGE₂ production during SI. For this purpose we measured (A) AVPO 5-HT and 5-HIAA levels; (B) investigated the putative correlations between AVPO 5-HT and 5-HIAA levels with Tb and plasma corticosterone [(CORT), a hormone that plays key anti-inflammatory actions (Ochalski et al., 1993; Krakauer and Buckley, 2006)]; and (C) assessed the effects of central 5-HT microinjection on Tb, AVPO PGE₂ and PGD₂, plasma CORT and plasma interleukin-6 [(IL-6), a febrigenic signaling molecule (Blatteis and Sehic, 1998; LeMay et al., 1990)] and heat loss index [(HLI) a thermoeffector mechanism (Romanovsky et al., 2002)] in saline- (control) and LPS-treated rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male *Wistar* rats (280–350 g, 8–9 weeks) were obtained from the Central Animal Facility at the University of São Paulo Campus in Ribeirão Preto, and were housed four per cage under controlled conditions [temperature (25 ± 1 °C), light (06:00–18:00) and humidity (60–65%)], with water and food *ad libitum*. The experimental procedures began between 9 and 10 AM with the performance of injections at an ambient temperature of 29 °C, a thermoneutral temperature for rats (Almeida et al., 2004; Gordon, 1990; Romanovsky et al., 2002). Experimental procedures were approved by the Local Ethical Committee for Animal Use (protocol number #2015.1.1107.58.1) and are in agreement with the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals.

2.2. Drugs

Escherichia coli LPS (0111: B4, Sigma-aldrich, USA) and 5-hydroxytryptamine hydrochloride [(5-HT) H9523, Sigma-aldrich, USA] were diluted in sterile saline and in a sterile saline solution of 0.01 % ascorbic acid, respectively.

2.3. Tb recording

The animals were deeply anesthetized (xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg) in order to insert a temperature datalogger

(SubCue, AB, Canada) into the abdominal cavity of the rat through a median laparotomy. While the animals remained under deep anesthesia, a guide cannula was inserted into the brain (further details in the Section 2.4). Tb was recorded from one hour before the experiment until decapitation, at 5 min intervals.

2.4. Intracerebroventricular cannula implantation and injections performance

Under deep anesthesia (xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg), the animals were fixed in the stereotaxic apparatus in order to implant a guide cannula (22 G and 16 mm in length) in the 3rd ventricle, using the following coordinates: incisor bar: –3.3 mm, anteroposterior: –0.4 mm and dorsoventral: –4.5 mm from the bregma (Paxinos and Watson, 2007). After surgery the animals were housed individually for recovery for one week. Intracerebroventricular (icv) injections were performed in freely moving rats using a Hamilton syringe of 5 µL connected to a 20 mm-length needle through an extension of polyethylene tube (PE 10, USA). The animals received an icv injection of vehicle (adjusted to pH 7.4, 1 µL) or 5-HT (5, 10 or 40 µg/1 µL). Thirty minutes after injection, saline (1 mL/kg) or LPS (100 µg/kg) were intraperitoneally (ip) injected. At the end of the surgical procedures (ip and icv) the animals received veterinary pentabiotics (1200000 UI; Zoetis, Brazil) and an analgesic/anti-inflammatory therapy (flunixin at the dose 2.5 mg/kg; Schering-Plough, USA).

2.5. Measurement of the tail skin temperature and HLI

The skin temperature (Tsk) for the middle third of the tail length was measured using an infrared camera (FLIR ONE for iOS P/N: 435-002-02-00, USA) before and 120 and 300 min after ip injection. It is worth to mention that both infrared photos (*i.e.*, Tsk measurement) and Tb recording were obtained simultaneously, as previously reported (Almeida et al., 2006; Romanovsky et al., 2002). The Tsk indicates the levels of peripheral blood flow in rats and is required to infer the HLI. The HLI ranges from 0 to 1 (maximum vasoconstriction and maximum vasodilatation) and was calculated as previously described by Romanovsky et al. (2002): $HLI = (Tsk - Ta) / (Tb - Ta)$, considering Ta as the ambient temperature.

2.6. AVPO and plasma samples collection

After decapitation, trunk blood samples were collected in EDTA-coated tubes and centrifuged (3500 rpm for 20 min at 4 °C). Plasma samples were then aliquoted and stored at –80 °C until CORT extraction and IL-6 assay. Brains were rapidly collected after decapitation, frozen in dry-ice cold isopentane and stored at –80 °C until sample collection. AVPO samples were collected from 500 µm thick slices using a punch needle (0.9 mm diameter) to obtain tissue samples from the right and the left sides separately, that were combined for processing. Thus our samples embraced bilateral AVPO samples. The dissection was performed approximately in the following the coordinates: anteroposterior: –0.4 mm and dorsoventral: –8.5 mm from the bregma (Paxinos and Watson, 2007), and on the basis of the following anatomic landmarks. Ventral: optic chiasm. Dorsal: anterior commissure. Median: 3rd ventricle. Afterwards, samples were homogenized with the specific buffer for each assay (see description in Sections 2.7 and 2.8).

2.7. 5-HT and 5-HIAA assay by high performance liquid chromatography coupled to an electrochemical detector (HPLC-ED)

AVPO samples were individually homogenized by ultrasound with 50 µL of a perchlorate acid solution (0.15 M) with

ethylenediaminetetraacetic acid [(EDTA), 0.1 mM] and isoproterenol (60 pg/ μ L) as internal standard. The homogenates were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatants obtained were filtrated through a 0.22 μ m-thick membrane (Durapore, Millipore) and hydrolyzed by heat for 5 min at 94 °C before auto-injection (SIL-10 Advp; Shimadzu, Kyoto, Japan) in the HPLC system. The separation was performed at 35 °C in a reverse phase column (RP-18e 250 \times 4.6 mm, Kinetex 5 μ m EVO C18 100 A PN - 00G-4633-E0), filled with a 2 μ m pre-column length and internal diameter of 4.6 mm (Kinetex EVO C18 - PN - AJO-9296). The mobile phase was constituted by sodium phosphate monobasic salt (75 mM), sodium chloride salt (10 mM), EDTA (25 μ M), octanesulfonic acid sodium salt (1.7 mM), and acetonitrile (4%), at 32 °C and pH 3.0 adjusted with phosphoric acid solution. The pump flow rate (LC-10Advp; Shimadzu, Kyoto, Japan) was set at 0.4 mL/min and the detector potential was 0.75 V (Decade, Antec, Leyden, Netherlands). Each sample generated a chromatogram which was registered and analyzed by Class-VP software (Shimadzu, Kyoto, Japan). 5-HT and 5-HIAA were detected by their peak retention time and quantified by the internal standard. All the samples were processed in the same analysis to avoid inter-assay error. Protein concentrations in tissue homogenates were determined by the Bio-Rad protein assay based on the Bradford assay (#5000205, Bio-Rad Laboratories, USA) (Bradford, 1976) and utilized to normalize the results.

2.8. PGE₂ and PGD₂ ELISA assay

AVPO samples were individually homogenized by ultrasound with a buffer provided by the manufacturer and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was collected and subjected to Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for PGE₂ (#ab133021, Abcam, Cambridge, MA, USA) and PGD₂ (#512031, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) and were performed according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations in tissue homogenates were determined as described in Section 2.7 and utilized to normalize the results. Detection limits of PGE₂ and PGD₂ assays ranged from 39.1 to 2500 pg/mL, and from 19.5 to 2500 pg/mL, respectively.

2.9. CORT radioimmunoassay

CORT was extracted from 25 μ L of plasma by adding 1 mL of ethanol, and measured by radioimmunoassay (RIA) as described in Vecsei (1979) using an anti-CORT antibody (#C8784, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Detection limits of RIA ranged from 0.12 to 2000 μ g/dL.

2.10. IL-6 ELISA assay

Plasma samples were subjected to an ELISA kit for IL-6 (#DY506, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) which was performed according to the manufacturer's instructions. This assay is able to measure natural and recombinant rat IL-6 at the detection limits that range from 0.125 to 8 ng/mL.

2.11. Experimental procedures

Experiment 1: The animals received an ip injection of saline or LPS and were decapitated (saline-treated group: 300 min, LPS-treated groups: 45 or 300 min after injection) for brain and plasma sample collection. Subsequently, AVPO samples were collected and analyzed by HPLC-ED for 5-HT and 5-HIAA levels detection. Plasma samples were analyzed by RIA for CORT dosage.

Experiment 2: This experiment was aimed at evaluating whether icv injection of vehicle or 5-HT (5, 10 or 40 μ g/1 μ L) mod-

ulate Tb in control and LPS-treated rats. The doses of serotonin (Xu et al., 2013) and the time period elapsed between 5-HT microinjection and LPS administration, i.e. 30 min, (Bhattacharya and Das, 1985; Castro et al., 2001; Maleki et al., 2005; Sharma et al., 2007) were chosen based on previous studies besides when these experimental protocols were tested, the thermoregulatory responses to the used doses and the time period of 30 min were the most consistent and repeatable. The role of 5-HT during SI was further investigated in the subsequent experiments by using 5-HT 10 (μ g/ μ L), because this dose prevented the rise in Tb.

Experiment 3: We further investigated whether icv injection of vehicle or 5-HT modulate febrigenic signaling in control and LPS-treated rats. Tb was assessed one hour before (to obtain baseline values) and during the experiment until decapitation. Tsk was assessed before, 120 and 300 min after ip injection. Groups of rats were decapitated 120 or 300 min after LPS for brain and plasma sample collection since the febrigenic signaling is thought to be increased at ~120 min (Blatteis and Sehic, 1998) and ~300 min (Romanovsky et al., 1998), we measured central and peripheral mediators after 120 and 300 min after LPS administration. Control rats were decapitated only 300 min after saline administration to minimize the use of animals. The levels of AVPO PGE₂ and PGD₂, plasma CORT and plasma IL-6 were utilized as indexes of febrigenic signaling.

2.12. Statistical analysis

Thermal index (TI) values were calculated [a usual way to measure the amplitude of the febrile response (Steiner et al., 1999; Steiner and Branco, 2000)] from the area under the curve (AUC) from 120 to 300 min. We arbitrarily set 37.5 °C as baseline. TI values were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post test to analyze more than 2 groups or the unpaired *t* test for 2-group analysis. 5-HT, 5-HIAA, PGE₂, PGD₂, CORT, and IL-6 data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Pearson's correlation test was used to determine correlation between variables considering -1 maximal negative and +1 maximal positive correlation. Tsk and HLI were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test; *p* < 0.05 values were considered significant.

3. Results

3.1. Endogenous 5-HT and 5-HIAA concentrations in the AVPO were reduced during SI

Administration of saline caused no significant changes in Tb of the rats. Conversely, ip injection of LPS caused the typical febrile response (Fig. 1A). The TIs of control and febrile rats (AUC indicated by the horizontal bar in the Fig. 1A) were calculated to clarify the changes in Tb (Fig. 1B). After this model validation, we measured 5-HT and 5-HIAA concentrations in the AVPO and CORT of control and LPS-injected groups.

Thereafter, we observed a reduction in 5-HT and 5-HIAA concentrations 300 min after LPS administration (Fig. 1C and D) and enhanced CORT concentrations 45 and 300 min after LPS administration (Fig. 1E). Pairwise correlation analysis revealed that 5-HT and CORT levels are negatively correlated (*r* = -0.41, *p* = 0.04) (Fig. 1F).

3.2. Icv injection of 5-HT blunted LPS-induced fever

All groups injected with 5-HT icv and saline ip (euthermic), as expected, showed no febrile response (Fig. 2A and B). 5-HT icv

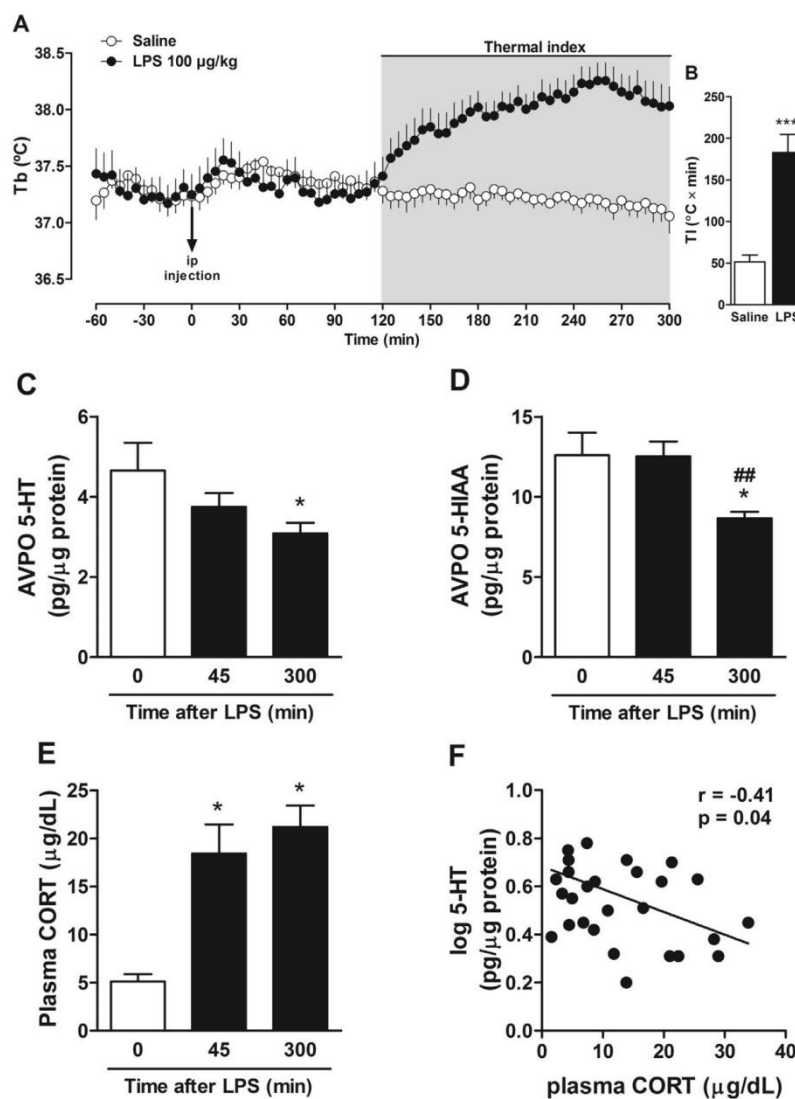


Fig. 1. (A) Time course of the body temperature (Tb; °C) of rats injected ip with saline (control group) or LPS 100 µg/kg at time zero (0). (B) Thermal index, TI (°C × min) of the control group or the LPS-treated group clarify the data shown by the horizontal bars in panel A. TI is the AUC of the fever phase and indicates the magnitude of fever. (C) 5-HT and (D) 5-HIAA concentrations in the AVPO (pg/µg protein) and (E) Plasma CORT (µg/dL) of the control or LPS-treated groups decapitated after 45 or 300 min after LPS administration. Data are presented as means ± SEM. (F) Log of 5-HT levels in the AVPO (pg/µg protein) were correlated (Pearson's) to plasma CORT levels (µg/dL) of the groups described in C, D and E. (n = 9–14/group). *p < 0.05 vs. the control group, **p < 0.01 vs. the group decapitated 45 min after LPS.

injections in the doses of 5, 10 and 40 µg/µL in LPS-injected groups (febrile) showed a U-shaped dose-response curve, where 10 µg/µL was the only effective dose compared to vehicle (Fig. 2C and D). Thus, the following results demonstrate the effects of the 5-HT in a dose of 10 µg/µL in AVPO PGE₂, plasma CORT, and plasma IL-6 concentrations.

3.3. Icv injection of 5-HT prevented LPS-induced AVPO PGE₂ release, whereas PGD₂ concentration was observed to be kept constant regardless of the treatments

AVPO PGE₂ levels of rats decapitated 300 min after LPS (but not 120 min after LPS) administration were found to be increased in

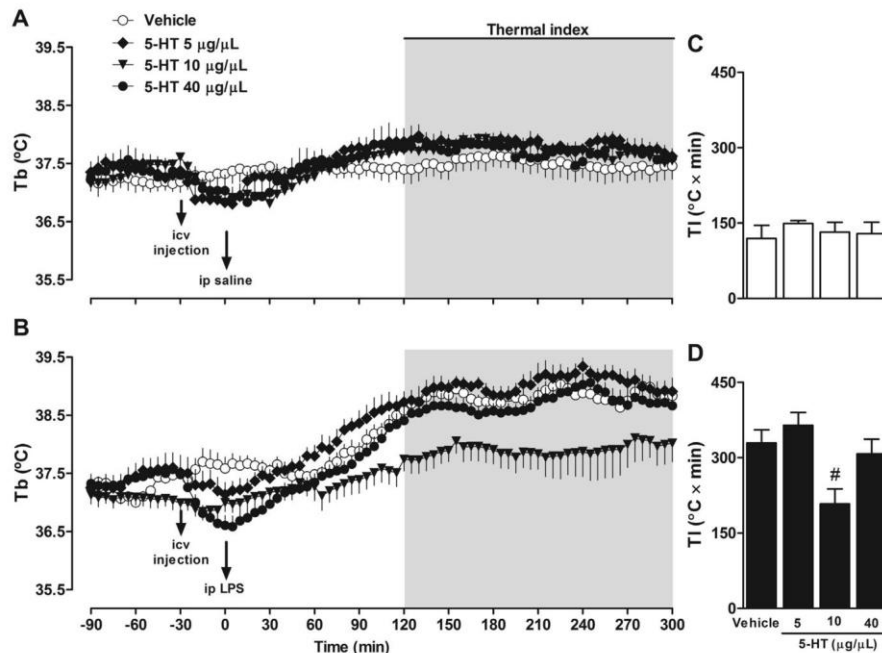


Fig. 2. (A) Time courses of the body temperature (Tb; °C) of rats microinjected icv with vehicle or 5-HT (5 µg, 10 µg, or 40 µg/1 µL) and injected ip with saline (control group) or (B) LPS 100 µg/kg at time zero (0). (C) TI (°C × min) of saline- or (D) LPS-treated groups. (n = 7–9/group). * p < 0.05 vs. the vehicle-treated group.

comparison with control rats. This effect was partially blocked by 5-HT (icv) (Fig. 3A). Moreover, we found a positive correlation (Pearson's) between AVPO PGE₂ levels with Tb ($r = 0.44$, $p = 0.04$) (Fig. 3D). As to AVPO PGD₂, no significant change was observed in all groups (Fig. 3B).

3.4. Icv injection of 5-HT reduced LPS-induced plasma CORT and plasma IL-6 release

Plasma CORT levels were increased in rats decapitated 120 and 300 min after LPS administration. Surprisingly, 5-HT (icv) reduced the LPS-induced increase of plasma CORT levels (Fig. 3C). Considering the effect of 5-HT on AVPO PGE₂ concentration, we measured plasma IL-6 levels which were increased after LPS administration. This increase was reduced by 5-HT icv administration (Fig. 3E).

3.5. Icv injection of 5-HT prevented the LPS-induced drop in HLI

LPS caused a reduced Tsk and HLI at 120 and 300 min. This effect was reduced when LPS treatment was combined with 5-HT (icv) administration. Representative thermal images of each experimental group are illustrated in Fig. 4.

4. Discussion

The present study provides evidence showing that during SI a marked decrease in both AVPO 5-HT and 5-HIAA levels takes place (Fig. 1C and D). This reduced serotonergic signaling observed during SI causes increases in LPS-induced AVPO PGE₂ production

(Fig. 3A) potentiating the increases in plasma IL-6 (Fig. 3E), plasma CORT levels (Fig. 3C) and Tb (Fig. 2B and D) and decreased HLI (Fig. 4B). Further corroborating these findings, 5-HT administered intracerebroventricularly inhibited all these LPS-induced inflammatory parameters, i.e., AVPO PGE₂ (Fig. 3A), plasma CORT (Fig. 3C), plasma IL-6 (Fig. 3E), HLI (Fig. 4B) and Tb (Fig. 2B and D).

The AVPO is an important integrative site in the hypothalamus (Morrison, 2016; Scammell et al., 1996), besides being the hierarchically most important region for Tb control (Elmqvist et al., 1996; Heller et al., 1978). Since the AVPO plays a key role during SI, and 5-HT is a neurotransmitter in this region, we investigated AVPO 5-HT and 5-HIAA levels during LPS-induced SI and observed reduced AVPO serotonergic signaling (Fig. 1C and D), which was accompanied by an elevated Tb (Fig. 1A). These findings are in agreement with those by Nakagawa et al. (2016) who demonstrated reduced 5-HT concentrations in the preoptic area and increased Tb in rats after acute and chronic exposure to heat (32 °C). Furthermore, Couch et al. (2013) demonstrated that LPS-induced SI decreases brain 5-HT activity as assessed by pharmacological magnetic resonance imaging in the dorsal raphe nucleus (needless to say the raphe is the most important source of brain 5-HT). This pattern is also observed during hypothermia induced by illicit drugs mephedrone and 4-methylamphetamine, which depend on central 5-HT signaling (Baumann et al., 2012; Rubio et al., 2015; Shortall et al., 2016). However, there is room for controversies when it comes to the serotonergic modulation of Tb. Several studies have found divergent results regarding 5-HT concentrations in various regions of the brain. Koulichitsky et al. (2000) demonstrated increased 5-HT concentrations in the

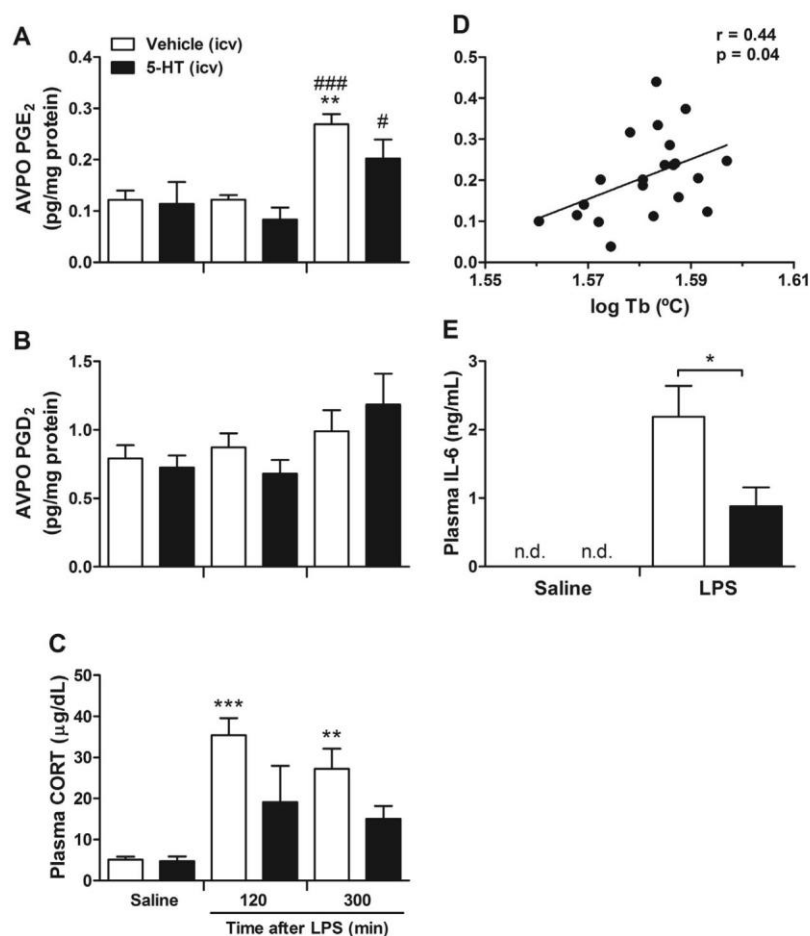


Fig. 3. (A) AVPO PGE₂ levels (pg/mg). (B) AVPO PGD₂ levels (pg/mg) and (C) Plasma CORT levels (μg/dL) of rats microinjected icv with vehicle (1 μL) or 5-HT (10 μg/μL) and injected ip with saline (control group) or LPS 100 μg/kg. Rats were decapitated 120 or 300 min after LPS administration. (D) AVPO PGE₂ levels were correlated (Pearson's) to the log of Tb of the groups previously described. (E) Plasma IL-6 levels (ng/mL) of rats microinjected icv with vehicle (1 μL) or 5-HT (10 μg/μL) and injected ip with saline (control group) or LPS 100 μg/kg and decapitated 300 min after LPS administration. (n = 5–6/group). *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 vs. the control group, *p < 0.05 and ***p < 0.001 vs. the group microinjected with 5-HT and decapitated 120 min after LPS.

midbrain, striatum, rostradorsomedial medulla and cerebellum during LPS-induced SI (Koulchitsky et al., 2000). Other studies demonstrated that central depletion of 5-HT attenuates or prevents the rise in Tb induced by LPS (Ford and Klugman, 1980; Matuszek and Ishikawa, 1981). These differences may be at least partly explained by the fact that 5-HT depletion alters the physiology of the whole organism (Blazevic et al., 2017; Murray et al., 2015; Pratelli et al., 2017), being a potential source of bias. However, other studies showed no change in 5-HT concentrations in the hypothalamus of rats 6 h after LPS administration (Sens et al., 2017) or in 5-HT and 5-HIAA concentrations in the AVPO of rats submitted to cold (5 °C) or heat (35 °C) (Ishiwata et al., 2004). In summary, the differences between our and other results are probably due to methodological differences such as dose and route of

LPS administration as well as the regions of the brain analyzed. Nevertheless, it is clear cut that LPS disturbs 5-HT homeostasis.

Based on the reduced AVPO 5-HT and 5-HIAA levels during SI (Fig. 1C and D), we performed icv microinjections of the very agonist, i.e., 5-HT instead of 5-HT receptor antagonists, in an attempt to revert the observed changes caused by LPS, to eventually shed light on the neurochemical mechanisms that take place in the AVPO during SI. Interestingly, 5-HT treatment resulted in a U-shaped dose-response curve in LPS fever, in which 10 μg/μL was the only effective dose to blunt the febrile response (Fig. 2B and D).

It is well established that peripheral LPS activates toll-like receptors 4 (TLR4) in the membrane of immune cells (Evans et al., 2015) and leads to cytokines release that activates brain circuitries to modulate SI by interacting with the blood-brain barrier

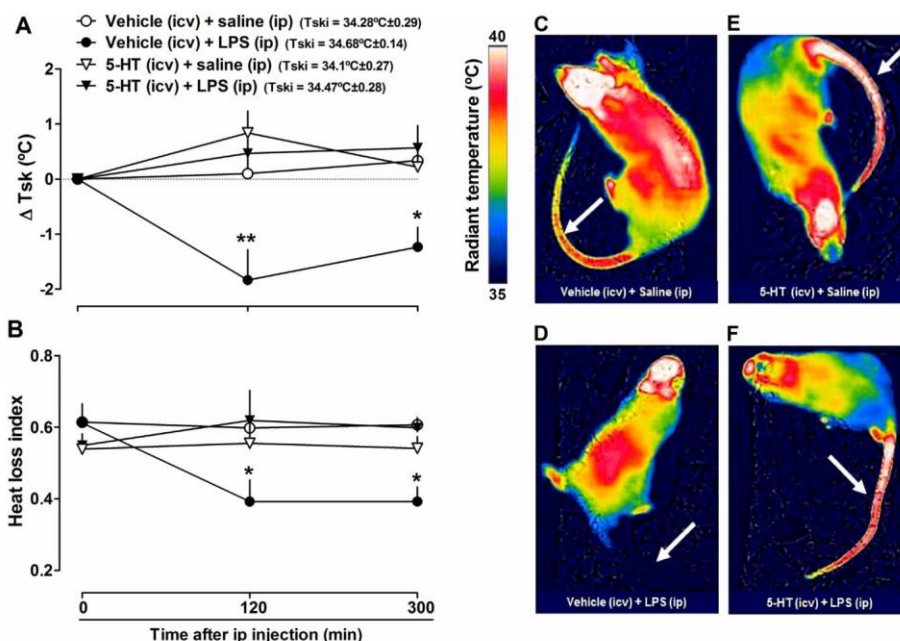


Fig. 4. (A) Temporal course of the tail skin temperature (Tsk, °C) and the (B) Heat loss index of rats microinjected icv with vehicle (1 μ L) or 5-HT (10 μ g/ μ L) and injected ip with saline (control group) or LPS 100 μ g/kg. (n = 5–6/group) Tsk: basal values of tail skin temperature. *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. the control group. Thermographic images of representative rats that received (C) vehicle (icv) and saline (ip), (D) vehicle (icv) and LPS (ip), (E) 5-HT (icv) and saline (ip), and (F) 5-HT (icv) and LPS (ip). Arrows indicate the site of Tsk assessment.

(Schneiders et al., 2015; Varatharaj and Galea, 2017), before inducing AVPO PGE₂ (an essential mediator of fever) production, which leads to fever (Cao et al., 1997; Li et al., 1999; Nakamura, 2011; Sehic et al., 1996; Steiner et al., 2005; Zhang et al., 2003). Our results are in agreement with this basic scenario by showing enhanced plasma IL-6 (Fig. 3E) and AVPO PGE₂ levels, besides fever in LPS-treated rats (Fig. 3A). The present study adds central 5-HT as a key neurotransmitter that modulates SI. This assertion is mainly based on data obtained after 5-HT icv administration (Fig. 3A and E) since virtually all the LPS-induced changes were reverted. Thus, we suggest that central 5-HT plays an important anti-inflammatory role by down-modulating AVPO PGE₂ levels and eventually the SI. We speculate that such effect of 5-HT during SI is not merely dependent on PGE₂ inhibition, but rather affects systemic signaling directly, at least when it comes to plasma CORT levels (Fig. 3C) and even to Tb (Fig. 2B and D). These findings are in agreement with Stamper et al. (2017) who demonstrated that the activation of serotonergic receptors in the hypothalamus inhibits hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in rats. It is interesting to note that 5-HT did not alter the HPA axis (Fig. 3C) during eutherma but attenuated the immune activation of the HPA axis. Plasma CORT levels are known to affect Tb (Coelho et al., 1992), however, plasma CORT is also important as an indicator of stress (Inoue et al., 2015). As expected, we observed that LPS treatment caused a clear increase in plasma CORT levels, and that this effect was reduced by exogenous 5-HT administration, indicating that 5-HT may be effective in reducing LPS-stress. It is interesting to note that chronic physical exercise failed to cause a similar effect on the HPA axis (Nogueira et al., 2017). Therefore, these observations indicate that the eventual use of 5-HT as a therapeutic

tool is indeed promising, perhaps alleviating LPS-induced sickness syndrome (Saper et al., 2012). We speculate that these effects are modulated by the brain circuitry in reducing HPA axis activity (Pavlov et al., 2003) and by vagal cholinergic anti-inflammatory pathways (Pavlov and Tracey, 2012; Tracey, 2002) in reducing IL-6 levels. These assumptions are based on data reported in the last decades, based on several studies that have demonstrated that the vagus nerve plays a key role in limiting the inflammatory response (a way termed as 'cholinergic anti-inflammatory pathway') (Tracey, 2002). The cholinergic anti-inflammatory pathway is thought to be mediated by the spleen, modulated by specific nicotinic receptors [α 7 subunit of nAChR (α 7nAChR)] expressed in immune cells (Borovikova et al., 2000). Moreover, the use of α 7nAChR selective agonists (Giebelen et al., 2007; Huang et al., 2008; Kitagawa et al., 2003; The et al., 2007; van Maanen et al., 2009a; van Westerloo et al., 2006; Waldburger et al., 2008) or vagus nerve stimulation causes reductions of both pro-inflammatory cytokines (including IL-6) and corticosterone levels during inflammation (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2002). Thus, the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway has been suggested as a therapeutic alternative to ameliorate several conditions as endotoxemia, sepsis, ischemia-reperfusion injury, hemorrhagic shock, peritonitis, pancreatitis, dextran-sodium-sulfate-induced colitis, carrageenan-induced paw inflammation, rheumatoid arthritis, obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus [for review see Pavlov and Tracey (2012), Tracey (2007) and van Maanen et al. (2009b)]. Additionally, one may also speculate that serotonergic pathways modulate brain-controlled illness responses and vice versa, i.e., SI also affects the central serotonergic system, and since SI was reduced by exogenous 5-HT

microinjection a decreased HPA axis activation would take place since the HPA axis is also regulated by serotonin-mediated modulation (Pavlov et al., 2003). Anyways, further studies specifically linking the serotonergic brain signaling to peripheral effects by the vagus nerve are still needed.

At least two hypothesis may explain the reduction of AVPO PGE₂ and plasma IL-6 induced by 5-HT during systemic inflammation. First, 5-HT signaling in the brain may result in reduction of AVPO PGE₂ levels, with consequent decrease in IL-6, modulated by efferent vagal pathways. Second, 5-HT signaling in the brain firstly activates efferent vagal pathways that reduce circulating IL-6 levels, resulting in decreased production of PGE₂ in the brain, since circulating IL-6 is known to stimulate PGE₂ production not only in brain endothelial cells (Eskilsson et al., 2014; Rummel et al., 2006) but also in the hypothalamus (Dallaporta et al., 2007; Eskilsson et al., 2017). Eventually, IL-6 may be neither upstream nor downstream of PGE₂ signaling during fever (Nilsberth et al., 2009) or downstream of the prostaglandin cascade (Kagiwada et al., 2004). Reconciling the available data, we may conclude that these interactions are fairly complex, and far from completely understood despite being of key importance in our current understanding of the neuro-immune interaction.

Fever (the "hallmark" of SI) (Evans et al., 2015) implies both the elevated production of heat and the inhibition of heat loss (Morrison and Nakamura, 2011). In rats, the tail is one important thermoeffector (Fusco et al., 1961; Romanovsky, 2014) that allows the dissipation of heat when the tail sympathetic vasoconstrictor tone is reduced (Gordon, 1990; O'Leary et al., 1985) and is utilized to infer the HLI (Romanovsky et al., 2002). In agreement with previous studies (Almeida et al., 2004; Fraga et al., 2009; Romanovsky et al., 2002), we observed that the febrile response to LPS was brought, at least in part, by skin vasoconstriction (Fig. 4A and C-F), and consequently reduced HLI (Fig. 4B). Moreover, icv administration of 5-HT prevented LPS-induced decreases in Tsk and in HLI (Fig. 4A and B).

PGD₂ is a major prostaglandin expressed in the rat brain (Shimizu et al., 1979) and plays a cryogenic role during LPS-induced SI (Ueno et al., 1982). This finding has been confirmed by other studies using other experimental models (Kandasamy and Hunt, 1990; Krall et al., 2010). In our experimental setup, we did not observe significant changes in AVPO PGD₂ levels in any of the experimental groups (Fig. 3B). Thus, the anti-inflammatory role of central 5-HT seems to be independent of PGD₂ signaling.

5. Conclusion

In summary, the present study reinforces that integrative circuitry coordinates the signs that come from the periphery while concomitantly modulates SI. In this scenario, we suggest serotonergic signaling is an essential modulator of SI, being a powerful central endogenous antipyretic molecule that may act through suppression of PGE₂ synthesis and/or reducing peripheral cytokine production, stress, and eventually affecting thermoeffector function.

Acknowledgments

The authors thank Mauro F. Silva and Maria Valci A. S. Silva for the excellent technical support. We also thank John Carpenter, Ribeirão Preto, SP, Brazil, for the English revision.

Funding

This work was supported by Grant No. #16/17681-9 São Paulo Research Foundation (FAPESP) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. C. M. D. Mota and

R.A.R. Fernández are recipients of graduate scholarships by the CNPq.

Financial disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Coimbra, N.C., Branco, L.G., 2004. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. *J. Physiol.* 558 (Pt 1), 283–294.
- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G., Romanovsky, A.A., 2006. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 23 (12), 3359–3367.
- Andrews, P.W., Bharwani, A., Lee, K.R., Fox, M., Thomson Jr., J.A., 2015. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51, 164–188.
- Baganz, N.L., Blakely, R.D., 2013. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* 4 (1), 48–63.
- Baumann, M.H., Ayesas, M.A., Partilla, J.S., Sink, J.R., Shulgin, A.T., Daley, P.F., Brandt, S.D., Rothman, R.B., Ruoho, A.E., Cozzi, N.V., 2012. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylene, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 37, 1192–1203.
- Berger, M., Gray, J.A., Roth, B.L., 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60, 355–366.
- Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., Larnicol, N., 2000. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.* 857 (1–2), 30–40.
- Bhattacharya, S.K., Das, N., 1985. Central serotonergic modulation of carrageenan-induced pedal inflammation in rats. *Pharm. Res.* 85, 315–318.
- Blatteis, C.M., Sehic, E., 1998. Cytokines and fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 608–618.
- Blazevic, S., Merkle, M., Persic, D., Hrnilovic, D., 2017. Chronic postnatal monoamine oxidase inhibition affects affiliative behavior in rat pups. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 153, 60–68.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405 (6785), 458–462.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7 (2), 248–254.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., Watanabe, Y., 1997. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272, R1712–R1725.
- Castro, L., Varjão, B., Silva, I., Duque, B., Batista, A., Santana, R., Luz, P., Rocha Junior, M.A., Fregoneze, J.B., De Castro-e-Silva, E., 2001. Effect of the intracerebroventricular administration of GR 113808, a selective 5-HT₄ antagonist, on water intake during hyperosmolarity and hypovolemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (6), 791–796.
- Coelho, M.M., Souza, G.E., Pela, I.R., 1992. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am. J. Physiol.* 263 (2 Pt 2), R423–R427.
- Couch, Y., Martin, C.J., Howarth, C., Raley, J., Kharapitchev, A.A., Stratford, M., Sharp, T., Sibson, N.R., Anthony, D.C., 2013. Systemic inflammation alters central 5-HT function as determined by pharmacological MRI. *Neuroimage* 75, 177–186.
- Dallaporta, M., Pecchi, E., Jacques, C., Berenbaum, F., Jean, A., Thirion, S., Traadec, J.D., 2007. C-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1). *Brain Behav. Immun.* 21 (8), 1109–1121.
- Elmqvist, J.K., Scammell, T.E., Jacobson, C.D., Saper, C.B., 1996. Distribution of FOS-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide. *J. Comp. Neurol.* 371, 85–103.
- Eskilsson, A., Mirrasekhian, E., Dufour, S., Schwaninger, M., Engblom, D., Blomqvist, A., 2014. Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. *J. Neurosci.* 34 (48), 15957–15961.
- Eskilsson, A., Matsuwaki, T., Shionoya, K., Mirrasekhian, E., Zaidel, J., Schwaninger, M., Engblom, D., Blomqvist, A., 2017. Immune-induced fever is dependent on local but not generalized prostaglandin E₂ synthesis in the brain. *J. Neurosci.* 37 (19), 5035–5044.
- Evans, S.S., Repasky, E.A., Fisher, D.T., 2015. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (6), 335–349.
- Ford, D.M., Klugman, K.P., 1980. Contrasting roles of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in fever in rats. *J. Physiol.* 304, 51–57.
- Fraga, D., Zanon, C.I., Rae, G.A., Parada, C.A., Souza, G.E., 2009. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 157 (8), 1494–1501.
- Fusco, M.M., Hardy, J.D., Hammel, H.T., 1961. Interaction of central and peripheral factors in physiological temperature regulation. *Am. J. Physiol.* 200, 572–580.

- Gargaglioni, L.H., Steiner, A.A., Branco, L.G., 2005. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Res.* 1044 (1), 16–24.
- Giebelen, I.A., van Westerloo, D.J., Larosa, G.J., de Vos, A.F., van der Poll, T., 2007. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF- α release in the mouse lung. *Shock* 28 (6), 700–703.
- Gordon, C.J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963–991.
- Heller, H.C., Crawshaw, L.L., Hammel, H.T., 1978. The thermostat of vertebrate animals. *Sci. Am.* 239 (102–110), 112–113.
- Hornung, J.P., 2003. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 331–343.
- Huang, X., Zheng, F., Stokes, C., Papke, R.L., Zhan, C.G., 2008. Modeling binding modes of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with ligands: the roles of Gln117 and other residues of the receptor in agonist binding. *J. Med. Chem.* 51 (20), 6293–6302.
- Inoue, K., Okamoto, M., Shibato, J., Lee, M.C., Matsui, T., Rakwal, R., Soya, H., 2015. Long-term mild, rather than intense, exercise enhances adult hippocampal neurogenesis and greatly changes the transcriptomic profile of the hippocampus. *PLoS ONE* 10, 1–25.
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Otokawa, M., Aihara, Y., 2004. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci.* 75 (22), 2665–2675.
- Kagiyawa, K., Chida, D., Sakatani, T., Asano, M., Nambu, A., Kakuta, S., Iwakura, Y., 2004. Interleukin (IL)-6, but not IL-1, induction in the brain downstream of cyclooxygenase-2 is essential for the induction of febrile response against peripheral IL-1 α . *Endocrinology* 145, 5044–5048.
- Kandasamy, S.B., Hunt, W.A., 1990. Involvement of prostaglandins and histamine in radiation-induced temperature responses in rats. *Radiat. Res.* 121, 84–90.
- Kitagawa, H., Takenouchi, T., Azuma, R., Wesnes, K.A., Kramer, W.G., Clody, D.E., Burnett, A.L., 2003. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of Gts-21 in healthy, male volunteers. *Neuropsychopharmacology* 28 (3), 542–551.
- Kulchitsky, S.V., Tropnikova, G.K., Mironova, G.P., Pesotskaya, Y.A., German, A.N., Kulchitsky, V.A., 2000. Central pool of serotonin and tail-flick latency during two phases of biphasic fever in rats. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B* 24 (3), 123–128.
- Krakauer, T., Buckley, M., 2006. Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hyperthermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 391–395.
- Krall, C.M., Yao, X., Hass, M.A., Feleder, C., Steiner, A.A., 2010. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D₂. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298 (6), R1512–R1521.
- Krishnasdas, R., Nicol, A., Sassarini, J., Puri, N., Burden, A.D., Leman, J., Combet, E., Pimlott, S., Hadley, D., McInnes, I.B., Cavanagh, J., 2016. Circulating tumour necrosis factor is highly correlated with brainstem serotonin transporter availability in humans. *Brain Behav. Immun.* 51, 29–38.
- Kwiatkowski, M., Soriano, R.N., Araujo, R.M., Azevedo, L.U., Batalhao, M.E., Francescato, H.D., Coimbra, T.M., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2013. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E₂ production during endotoxemia. *Exp. Neurol.* 240, 88–95.
- LeMay, L.G., Vander, A.J., Kluger, M.J., 1990. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am. J. Physiol.* 258 (3 Pt 2), R798–R7803.
- Lesch, K.P., Waider, J., 2012. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 76 (1), 175–191.
- Li, S., Wang, Y., Matsumura, K., Ballou, L.R., Morham, S.G., Blatteis, C.M., 1999. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2^{-/-}, but not in cyclooxygenase-1^{-/-} mice. *Brain Res.* 825, 86–94.
- Maleki, N., Nayebi, A.M., Garjani, A., 2005. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. *Int. Immunopharmacol.* 5 (12), 1723–1730.
- Matuszek, M., Ishikawa, Y., 1981. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine and 6-hydroxydopamine on fever response in conscious rats. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 33 (3), 305–312.
- Morrison, S.F., 2016. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. *Auton. Neurosci.* 196, 14–24.
- Morrison, S.F., Nakamura, K., 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *Front. Biosci.* 16, 74–104.
- Murray, N.M., Buchanan, G.F., Richerson, G.B., 2015. Insomnia caused by serotonin depletion is due to hypothermia. *Sleep* 38 (12), 1985–1993.
- Nakagawa, H., Matsumura, T., Suzuki, K., Ninomiya, C., Ishiwata, T., 2016. Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J. Therm. Biol.* 58, 15–22.
- Nakamura, K., 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301 (5), R1207–28.
- Nakayama, T., 1985. Thermosensitive neurons in the brain. *Jpn. J. Physiol.* 35 (3), 375–389.
- Nieuwenhuis, R., 1985. Monoamines: Chemoarchitecture of the Brain. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 33–41.
- Nilsberth, C., Elander, L., Hamzic, N., Norell, M., Lönn, J., Engström, L., Blomqvist, A., 2009. The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced fever by mechanisms independent of prostaglandin E₂. *Endocrinology* 150 (4), 1850–1860.
- Nogueira, J.E., Soriano, R.N., Fernandez, R.A.R., Francescato, H.D.C., Saia, R.S., Coimbra, T.M., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G.S., 2017. Effect of physical exercise on the febrigenic signaling is modulated by preoptic hydrogen sulfide production. *PLoS One* 12 (1), e0170468.
- O'Leary, D.S., Johnson, J.M., Taylor, W.F., 1985. Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. *J. Appl. Physiol.* 59, 1533–1538.
- Ochalski, S.J., Hartman, D.A., Belfast, M.T., Walter, T.L., Glaser, K.B., Carlson, R.P., 1993. Inhibition of endotoxin-induced hypothermia and serum TNF- α levels in CD-1 mice by various pharmacological agents. *Agents Actions* 39, C52–C54.
- Oka, T., 2004. Prostaglandin E₂ as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front. Biosci.* 9, 3046–3057.
- Oka, K., Oka, T., Hori, T., 1997. Prostaglandin E₂ may induce hyperthermia through EP1 receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. *Brain Res.* 767, 92–99.
- Olivier, B., 2015. Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* 753, 2–18.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2012. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8 (12), 743–754.
- Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2003. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol. Med.* 9 (5–8), 125–134.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pratelli, M., Migliarini, S., Pelosi, B., Napolitano, F., Ussiello, A., Pasqualetti, M., 2017. Perturbation of serotonin homeostasis during adulthood affects serotonergic neuronal circuitry. *eNeuro* 4 (2), pii: ENEURO.0376-16.2017.
- Robson, M.J., Quinlan, M.A., Blakely, R.D., 2017. Immune system activation and depression: roles of serotonin in the central nervous system and periphery. *ACS Chem. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00412> [Epub ahead of print].
- Romanovsky, A.A., 2014. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol. (Oxf)* 210 (3), 498–507.
- Romanovsky, A.A., Kulchitsky, V.A., Simons, C.T., Sugimoto, N., 1998. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? *Am. J. Physiol.* 275 (1 Pt 2), R332–R338.
- Romanovsky, A.A., Ivanov, A.I., Shimansky, Y.P., 2002. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J. Appl. Physiol.* 92, 2667–2679.
- Roth, J., Blatteis, C.M., 2014. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr. Physiol.* 4 (4), 1563–1604.
- Rubio, M., López-Arnau, R., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J., 2015. Serotonin is involved in the psychostimulant and hypothermic effect of 4-methylamphetamine in rats. *Neurosci. Lett.* 590, 68–73.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S., Luheshi, G.N., 2006. Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291 (5), R1316–R1326.
- Saper, C.B., Romanovsky, A.A., Scammell, T.E., 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neurosci.* 15 (8), 1088–1095.
- Scammell, T.E., Elmquist, J.K., Griffin, J.D., Saper, C.B., 1996. Ventromedial preoptic prostaglandin E₂ activates fever-producing autonomic pathways. *J. Neurosci.* 16, 6246–6254.
- Scammell, T.E., Griffin, J.D., Elmquist, J.K., Saper, C.B., 1998. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. *Am. J. Physiol.* 274, R783–R789.
- Schneiders, J., Fuchs, F., Damm, J., Herden, C., Gerstberger, R., Soares, D.M., Roth, J., Rummel, C., 2015. The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. *Brain Behav. Immun.* 48, 147–164.
- Sehic, E., Székely, M., Ungar, A.L., Oladehin, A., Blatteis, C.M., 1996. Hypothalamic prostaglandin E₂ during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* 39 (6), 391–399.
- Sens, J., Schneider, E., Mauch, J., Schaffstein, A., Mohamed, S., Fasoli, K., Saurine, J., Britzolaki, A., Thelen, C., Pitychoutis, P.M., 2017. Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 153, 168–181.
- Sharma, H.S., Patnaik, R., Patnaik, S., Mohanty, S., Sharma, S., Vannemreddy, P., 2007. Antibodies to serotonin attenuate closed head injury induced blood brain barrier disruption and brain pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1122, 295–312.
- Shimizu, T., Yamamoto, S., Hayaishi, O., 1979. Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 254, 5222–5228.
- Shortall, S.E., Spicer, C.H., Ebling, F.J., Green, A.R., Fone, K.C., King, M.V., 2016. Contribution of serotonin and dopamine to changes in core body temperature and locomotor activity in rats following repeated administration of mephedrone. *Addict. Biol.* 21 (6), 1127–1139.
- Stamper, C.E., Hassell Jr., J.E., Kapitz, A.J., Renner, K.J., Orchinik, M., Lowry, C.A., 2017. Activation of 5-HT1A receptors in the rat dorsomedial hypothalamus inhibits stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 20 (2), 223–230.
- Steiner, A.A., Branco, L.G., 2000. Central CO-heme oxygenase pathway raises body temperature by a prostaglandin-independent way. *J. Appl. Physiol.* (1985) 88 (5), 1607–1613.
- Steiner, A.A., Colombari, E., Branco, L.G., 1999. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. *Am. J. Physiol.* 277 (2 Pt 2), R499–R507.

- Steiner, A.A., Rudaya, A.Y., Robbins, J.R., Dragic, A.S., Langenbach, R., Romanovsky, A. A., 2005. Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1253–R1257.
- The, F.O., Boeckxstaens, G.E., Snoek, S.A., Cash, J.L., Bennink, R., Larosa, G.J., van den Wijngaard, R.M., Greaves, D.R., de Jonge, W.J., 2007. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 133 (4), 1219–1228.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420 (6917), 853–859.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117 (2), 289–296.
- Ueno, R., Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakayama, T., Ishikawa, Y., Hayaishi, O., 1982. Role of prostaglandin D₂ in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6093–6097.
- van Maanen, M.A., Lebre, M.C., van der Poll, T., LaRosa, G.J., Elbaum, D., Vervoordeldonk, M.J., Tak, P.P., 2009a. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 60 (1), 114–122.
- van Maanen, M.A., Vervoordeldonk, M.J., Tak, P.P., 2009b. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5 (4), 229–232.
- van Westerloo, D.J., Giebelen, I.A., Florquin, S., Bruno, M.J., Larosa, G.J., Ulloa, L., Tracey, K.J., van der Poll, T., 2006. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130 (6), 1822–1830.
- Varatharaj, A., Galea, I., 2017. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav. Immun.* 60, 1–12.
- Vecsei, P., 1979. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. In: JAFFE, M. (Ed.), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Acad. Press., pp. 767–792.
- Waldburger, J.M., Boyle, D.L., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., Firestein, G.S., 2008. Acetylcholine regulation of synovial cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. *Arthritis Rheum.* 58 (11), 3439–3449.
- Xu, W.J., Zhao, Y., Huo, F.Q., Du, J.Q., Tang, J.S., 2013. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1–7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. *Neuroscience* 238, 252–257.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., Wakita, H., Horisaka, K., 1988. The involvement of serotonergic and dopaminergic systems in hypothermia induced in mice by intracerebroventricular injection of serotonin. *Jpn. J. Pharmacol.* 48 (1), 145–148.
- Youdim, M.B., Bakke, Y.S., 2006. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.* 147 (Suppl. 1), S287–S296.
- Zhang, Y.H., Lu, J., Elmquist, J.K., Saper, C.B., 2003. Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 463, 3–12.

Brain, Behavior, and Immunity 80 (2019) 255–265



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Full-length Article

Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation

Clarissa M.D. Mota^a, Gabriela S. Borges^a, Mateus R. Amorim^b, Ruither O.G. Carolino^b, Marcelo E. Batalhão^c, Janete A. Anselmo-Franci^{a,b}, Evelin C. Carnio^c, Luiz G.S. Branco^{a,b,*}

^a Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Nursing School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Thermoregulation
Spleen
Hypothalamus
Nitric oxide
Cytokines

ABSTRACT

An exceptionally high mortality rate is observed in sepsis and septic shock. Systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) has been used as an experimental model for sepsis resulting in an exacerbated immune response, brain neurochemistry adjustments, hypotension, and hypothermia followed by fever. Central serotonergic pathways not only modulate systemic inflammation (SI) but also are affected by SI, including in the anteroventral region of the hypothalamus (AVPO), which is the hierarchically most important region for body temperature (Tb) control. In this study, we sought to determine if central serotonin (5-HT) plays a role in SI induced by intravenous administration of LPS (1.5 mg/kg) in male *Wistar* rats (280–350 g) by assessing 5-HT levels in the AVPO, mean arterial pressure, heart rate, and Tb up to 300 min after LPS administration, as well as assessing plasma and spleen cytokine levels, nitric oxide (NO) plasma levels, and prostaglandin (PG) E₂ levels in the AVPO at 75 min and 300 min after LPS administration. We observed reduced AVPO 5-HT levels, hypotension, tachycardia, hypothermia followed by fever, as well as observing increased plasma NO, plasma and spleen cytokines and AVPO PGE₂ levels in SI. Intracerebroventricular (icv) administration of 5-HT 30 min before LPS administration prevented hypotension and hypothermia, which were accompanied by reduced plasma NO, as well as plasma TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 and spleen TNF- α and IL-10 levels. We suggest that SI reduced 5-HT levels in the AVPO favor an increased pro-inflammatory status both centrally and peripherally that converge to hypotension and hypothermia. Moreover, our results are consistent with the notion that exogenous 5-HT given icv prevents hypotension and hypothermia probably activating the splenic anti-inflammatory pathway.

1. Introduction

The communication between the immune system and the nervous system provides a fine control of homeostasis. Systemic inflammation (SI) induces an immune response leading to increased blood cytokines (Blatteis and Sehic, 1998) and nitric oxide (NO) levels (Kilbourn et al., 1990). In this scenario both hypothermia and fever (Romanovsky et al., 2005) are observed together with hypotension, and tachycardia (Ohlsson et al., 1990), and important changes in the brain monoaminergic systems (Miller et al., 2013; Barua et al., 2018; Mota et al., 2017). Bacterial endotoxin, for instance lipopolysaccharide (LPS) administration induces SI and is a widely accepted model of sepsis when given at relatively high doses (Buras et al., 2005). Moreover, endotoxins are released during sepsis which worsen sepsis prognosis (Lepper et al.,

2002). Hypothermia and hypotension could be related since both of them take place simultaneously and seem to be associated (Al-Saffar et al., 2013). However, there may be mechanistic differences between hypothermia and hypotension in SI, involving the neuronal pathways responsible for each response, since lesion of the preoptic area of the hypothalamus reduces LPS-induced hypotension (Yilmaz et al., 2008) but does not have any effect on LPS-induced hypothermia (Almeida et al., 2006).

As to hypothermia itself, even though inflammation-induced hypothermia has been considered very important and with substantial clinical significance (Clemmer et al., 1992), relatively little is known about the mechanisms responsible for this response in relation to the febrile response. About 20 years ago, hypothermia was considered a failure in thermoregulation during SI. This idea was re-evaluated in the

* Corresponding author at: Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café s/n, University of São Paulo, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: branco@forp.usp.br (L.G.S. Branco).

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.03.017>

Received 1 November 2018; Received in revised form 12 March 2019; Accepted 14 March 2019

Available online 15 March 2019

0889-1591/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo D – Artigo publicado na revista *The Journal of Physiology*, no formato de *Journal Club*



Journal Club

A new role of serotonin: 5-HT₃ receptor on bladder afferent hypersensitivity

Clarissa M. D. Mota ✉

First published: 12 November 2019 | <https://doi.org/10.1113/JP279094>

Edited by: David Wyllie & Ruth Murrell-Lagnado

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as <https://doi.org/10.1113/JP279094>

Anexo E – Comentário publicado na revista *Brain, Behavior, and Immunity* sobre os artigos publicados por Mota et al. no mesmo periódico

Brain, Behavior, and Immunity 81 (2019) 10–11



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi



Does hypothalamic serotonin govern septic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory reflex?



Christoph Rummel*

Center for Mind, Brain and Behavior – CMBB; Philipps-University Marburg and Justus Liebig University Giessen at the Research Campus Central Hessen (FCMH), Germany

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.023>

Received 16 June 2019; Accepted 16 June 2019

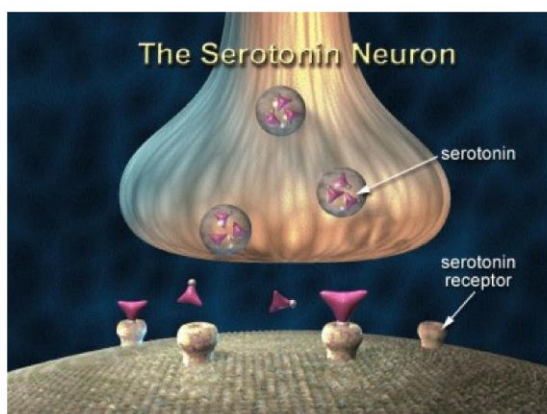
0889-1591/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo F – Matéria publicada pela Agência FAPESP

Matéria jornalística contendo entrevista concedida por Clarissa Maria Dias Mota e Luiz Guilherme de Siqueira Branco sobre os trabalhos publicados no periódico *Brain, Behavior, and Immunity* à Agência FAPESP. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/serotonina-inibe-inflamacao-sistematica-severa-como-a-que-ocorre-na-sepse/31720/>

11/28/2019

Agência FAPESP | Serotonina inibe inflamação sistêmica severa como a que ocorre na sepse



Serotonina inibe inflamação sistêmica severa como a que ocorre na sepse

21 de outubro de 2019

Maria Fernanda Ziegler | Agência

FAPESP – Conhecida como o “hormônio do bem-estar”, por ser relacionada à regulação do humor, a serotonina também é capaz de modular a inflamação sistêmica severa, como a

que ocorre durante a sepse. Artigo publicado na revista *Brain, Behavior, and Immunity* descreve esse neurotransmissor, pela primeira vez, como um possível mediador da interação neuroimune, capaz de amenizar a inflamação não só no sistema nervoso central como em todo o organismo.

O estudo, conduzido por pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP-USP) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), mostrou que a administração da substância no sistema nervoso central de ratos teve efeitos anti-inflamatórios, diminuindo os níveis de moléculas sinalizadoras do sistema imune (citocinas pró-inflamatórias) no plasma sanguíneo e no baço dos animais. A serotonina preveniu ainda a hipotermia e a queda da pressão arterial. O trabalho é resultado de um [Projeto Temático](#) apoiado pela FAPESP.

“Não se tinha conhecimento até então de que a serotonina poderia inibir a inflamação sistêmica. Concluímos isso em dois estudos, um publicado em 2017, sobre inflamação sistêmica leve – como a que ocorre durante uma gripe ou infecção urinária – e agora este, sobre a inflamação sistêmica severa, que nos surpreendeu ainda mais por termos observado um efeito tão positivo em um quadro muito mais grave, que corresponde à sepse”, disse [Luiz Guilherme Branco](#), professor do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP-USP e autor do artigo.

Doença letal

Durante a sepse, observa-se uma resposta inflamatória desregulada do organismo na presença de um agente infeccioso, ou seja, o sistema de defesa passa a combater o patógeno de forma

11/28/2019

Agência FAPESP | Serotonina inibe inflamação sistêmica severa como a que ocorre na sepse

exagerada. O quadro inclui aumento ou redução da temperatura corporal, queda da pressão arterial e consequente redução da irrigação sanguínea, levando à disfunção de vários órgãos.

Nesses casos, a falência dos órgãos é agravada pela queda acentuada e repentina da pressão arterial, o estágio mais grave da doença, conhecido como choque séptico. A gravidade da sepse também está nas estatísticas: trata-se da doença que mais mata em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) no Brasil (*leia mais em: <http://agencia.fapesp.br/26621>*).

Para investigar o papel da serotonina na interação neuroimune, os pesquisadores realizaram dois tipos de experimento. No primeiro, com modelos de inflamação sistêmica leve, a substância foi injetada dentro do sistema nervoso central dos ratos. Meia hora depois da injeção intracraniana, os animais receberam também uma quantidade baixa (100 µg/kg) de lipopolissacarídeo – toxina encontrada na membrana de algumas bactérias.

Na comparação entre os animais com serotonina e o grupo controle (que recebeu apenas as toxinas), observou-se que o neurotransmissor apresentou efeitos anti-inflamatórios tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, sendo capaz de reduzir a febre causada pela inflamação sistêmica leve.

No artigo publicado este ano, os pesquisadores relatam o mesmo experimento, porém com a administração de uma dose 15 vezes maior da toxina (1,5 mg/kg), o que conferiu aos animais um quadro de inflamação sistêmica severa semelhante ao da sepse. Nesse experimento, além de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, o neurotransmissor foi capaz de prevenir a hipotermia e a hipotensão causadas pela inflamação sistêmica severa.

“Acreditamos que o efeito da serotonina se dá pela ativação de um reflexo anti-inflamatório que ocorre durante a inflamação sistêmica. Esse reflexo consiste na noção de que a atividade neuronal modula a imunidade, atuando por meio de conexões neurais do cérebro para outros órgãos, sobretudo o baço, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias”, disse [Clarissa Mota](#), primeira autora do artigo e pós-doutoranda na FMRP-USP, com bolsa da FAPESP.

De acordo com a pesquisadora, o objetivo para os próximos estudos é investigar, de modo mais aprofundado, os mecanismos relacionados às regiões cerebrais que produzem serotonina ou que comprometam a inflamação sistêmica.

“A descoberta de que a serotonina também atua na modulação da inflamação abre caminho para estudos referentes ao desenvolvimento de novas terapias contra a sepse e outras desordens inflamatórias. Estamos juntando as peças de um quebra-cabeça para o melhor entendimento da fisiopatologia da inflamação e das funções terapêuticas da serotonina. Há décadas, os sistemas

11/28/2019

Agência FAPESP | Serotonina inibe inflamação sistêmica severa como a que ocorre na sepse

eram estudados em separado. Hoje, sabemos que o organismo é como uma rede conectada, com todos os sistemas trabalhando em conjunto”, disse Mota.

Dessa forma, a serotonina, um produto do metabolismo do triptofano, atua nessa rede conectada, desempenhando uma série de funções dentro do cérebro e de outros órgãos. Por ser um neurotransmissor, a serotonina opera como um mensageiro nas sinapses – a conexão entre os neurônios –, modulando a comunicação. A atuação vai, portanto, desde a regulação de comportamentos fisiológicos, como função do sono, respiração e humor, até a coagulação de plaquetas, função gastrointestinal e, como foi comprovado pelos pesquisadores da USP de Ribeirão Preto, modulação do sistema imunológico.

Mota explica que por se tratar de um estudo inicial para a investigação de mecanismos neurais da inflamação e de terapêuticas – ambos pautados na serotonina – optou-se por fazer um teste de pré-tratamento.

“Experimentalmente, partimos da investigação dos efeitos do pré-tratamento para a identificação do potencial da serotonina em modular a inflamação. Agora que nossos estudos mostraram que a serotonina é capaz de prevenir muitos efeitos da inflamação sistêmica, os nossos próximos estudos devem ser pautados pela busca de um tratamento curativo, em vez de um pré-tratamento [preventivo] para o melhor entendimento de como a serotonina pode modular a inflamação”, disse Mota.

Antidepressivos e ansiolíticos

O potencial translacional do estudo foi destacado em editorial assinado por [Christoph Rummel](#), pesquisador da Universidade de Giessen (Alemanha) que tem contribuído para o entendimento dos mecanismos mediadores de vias de comunicação neuroimune durante a inflamação. “Há potencial aplicação translacional para o uso de inibidores da recaptação de serotonina [presente em medicamentos] para tratar os principais distúrbios depressivos, bem como a sepse. Isso representa novas e emocionantes possibilidades, que precisam ser investigadas”, escreveu Rummel no editorial.

Como explicaram os autores, ao injetar serotonina no sistema nervoso central dos roedores, o experimento mimetizou a ação de medicamentos antidepressivos e ansiolíticos que aumentam a disponibilidade desse neurotransmissor no cérebro de pacientes.

“Inibidores de recaptação de serotonina têm sido usados pela indústria farmacêutica para o tratamento de distúrbios psiquiátricos, como ansiedade e depressão. São medicamentos que aumentam a biodisponibilidade de serotonina na fenda sináptica do sistema nervoso central. O que

11/28/2019

Agência FAPESP | Serotonina inibe inflamação sistêmica severa como a que ocorre na sepse

observamos no estudo foi que durante a inflamação sistêmica há uma queda da produção de serotonina [endógena] pelo organismo. No estudo, a administração de serotonina exógena reverteu parte desses sintomas da inflamação sistêmica”, disse Branco.

O artigo *Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation* (doi: 10.1016/j.bbi.2019.03.017), de Clarissa M.D. Mota, Gabriela S. Borges, Mateus R. Amorim, Ruither O.G. Carolino, Marcelo E. Batalhão, Janete A. Anselmo-Franci, Evelin C. Carnio, Luiz G.S. Branco, pode ser lido em www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118307700?via%3Dihub.

O artigo *Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation* (doi: 10.1016/j.bbi.2017.07.010), de Clarissa M.D. Mota, Caroline Rodrigues-Santos, Rodrigo A.R. Fernández, Ruither O.G. Carolino, José Antunes-Rodrigues, Janete A. Anselmo-Franci, Luiz G.S. Branco, pode ser lido em www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117302179?via%3Dihub.

Anexo G – Entrevista publicada pela TV Bandeirantes

Entrevista concedida por Clarissa Maria Dias Mota e Luiz Guilherme de Siqueira Branco sobre os trabalhos publicados no periódico *Brain, Behavior, and Immunity* à TV Clube, afiliada da Emissora de TV Bandeirantes. Link para acesso:

<https://www.youtube.com/watch?v=NFWQ9w2drLQ&t=6s>