ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW

PAPEL DA LEPTINA NA HIPOTERMIA ASSOCIADA AO CHOQUE ENDOTÓXICO

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW

PAPEL DA LEPTINA NA HIPOTERMIA ASSOCIADA AO CHOQUE ENDOTÓXICO

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Alarcon Steiner

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Flatow, Elizabeth Alexandra

Papel da leptina na hipotermia associada ao
choque endotóxico / Elizabeth Alexandra Flatow;
orientador Alexandre Alarcon Steiner. -- São Paulo,
2016.

81 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptina. 2. Inflamação sistêmica. 3.
Hipotermia. 4. TNF-alfa. I. Steiner, Alexandre
Alarcon, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Elizabeth Alexandra Flatow

Título da Dissertação: Papel da leptina na hipotermia associada ao choque endotóxico

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Alarcon Steiner

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado (a)

() Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
--	--

Decl. CEUA.051/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 154/12/CEUA, datado de 31.10.12, e por solicitação do Prof. Dr. Alexandre A. Steiner, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de Elizabeth Alexandra Flatow ao Projeto de Pesquisa " *Elo entre balanço energético e inflamação sistêmica: Papel da leptina*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 10 de julho de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

***Ao meu esposo e aos meus pais, com amor e
gratidão, pelo apoio e compreensão sempre.***

AGRADECIMENTOS

À minha família: meu esposo Herbert e minha filha de quatro patas Olivia, por todo amor e paciência, meus pais Ênio e Cecília, meus irmãos Bia e Paulinho e minha avó Lurdinha, meus apoiadores mesmo de longe. Aos meus sogros Herbert e Jandira, minhas cunhadas, co-cunhados e sobrinhos: Danielle e Paolo, Tatiane e Fábio, Fabiane e Ronaldo, Junior e Rafael.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Steiner, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Às amigas e companheiras de laboratório: Evilin, Monique e Camila, por compartilharmos conhecimento, tristezas e alegrias.

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. José Alexandre Barbuto, Prof. Dr. William Festuccia e Prof. Dr. Newton Canteras.

À pós-doutoranda do nosso laboratório, Evilin Komegae, pela colaboração com os experimentos de macrófagos *in vitro*.

Ao Prof. Dr. José Antunes (FMRP-USP) pela colaboração nos ensaios de corticosterona.

Ao Prof. Marcel Musteata (Albany College of Pharmacy and Health Sciences, Albany, EUA) pela colaboração com as dosagens de prostaglandinas.

Aos secretários do departamento de Imunologia Eni e João, sempre dispostos a tirar dúvidas.

Aos professores e demais funcionários do departamento.

Aos amigos que conquistei nesses anos de treinamento técnico e mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Treinamento Técnico e financiamento no laboratório.

A todos vocês meu MUITO OBRIGADA!

***“A Estrada em frente vai seguindo
Deixando a porta onde começa.
Agora longe já vai indo,
Devo seguir, nada me impeça. ”***

J. R. R. Tolkien

RESUMO

Flatow EA. Papel da leptina na hipotermia associada o choque endotóxico. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

A inflamação sistêmica em resposta a uma infecção (seps) é uma das principais causas de morte em indivíduos hospitalizados. A febre é a uma das principais manifestações clínicas. No entanto, entre 9-21% dos pacientes sépticos desenvolvem hipotermia. Em modelos experimentais essa hipotermia mostra-se regulada e associada aos casos mais graves. Tanto a febre quanto a hipotermia podem ter valor adaptativo devido aos seus efeitos sobre o balanço energético. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo e está envolvida com o balanço energético, além de ser descrita como pró-inflamatória. Neste trabalho, avaliamos se a leptina regula os sinais inflamatórios durante hipotermia decorrente da endotoxemia. Para isso, ratos jovens foram submetidos à cirurgia de implante de cateter intravenoso e sensor telemétrico de temperatura, atividade e pressão arterial. Para avaliar os efeitos da leptina durante a inflamação sistêmica, dois dias antes dos experimentos os animais receberam bomba de infusão osmótica subcutânea contendo salina ou leptina nas seguintes doses: 1,5; 5 ou 20 $\mu\text{g/kg/h}$. As respostas termorregulatórias e cardiovasculares nos animais foram monitoradas em temperaturas ambientes capazes de permitir o desenvolvimento de hipotermia (22 °C), ou que impedem a hipotermia prevalecendo o componente febril (30 °C). A leptina exógena na dose 20 $\mu\text{g/kg/h}$ elevou a concentração plasmática da mesma à $5,8 \pm 0,75 \text{ ng/mL}$ nos animais que desenvolveram hipotermia. Esse valor compreende a faixa observada em sujeitos não obesos. Coincidentemente, essa foi a menor dose capaz de reduzir a ingestão alimentar. Notou-se que a leptina administrada sistemicamente atenuou a hipotermia e a hipotensão induzidas por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 500 $\mu\text{g/kg}$ i.v. e não alterou a febre. Amostras coletadas 100 minutos após injeção de LPS mostraram que a leptina causou diminuição nos níveis de TNF- α mas não alterou os níveis de IL-1 β , IL-10, prostaglandinas e corticosterona. Quando infundida no sistema nervoso central na dose de 1 $\mu\text{g/kg/h}$, a leptina reduziu a ingestão alimentar mas não alterou nenhum dos parâmetros avaliados durante a inflamação sistêmica. Observamos também que, *in vitro*, a leptina (em doses até 100 ng/mL) não alterou a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em macrófagos peritoneais e alveolares estimulados com LPS 500 ng/mL. A literatura questiona o papel da leptina em diferentes modelos durante a resposta inflamatória. Nossos resultados mostraram que a leptina em concentrações fisiológicas exerceu um papel anti-inflamatório na redução de TNF- α durante ao mesmo tempo que atenuou a hipotermia e hipotensão em ratos induzidos ao choque endotóxico. Esse efeito imunomodulatório não ocorre diretamente via mecanismos centrais nem requer a participação de macrófagos peritoneais e alveolares.

Palavras-chave: Leptina. Inflamação sistêmica. Hipotermia. TNF- α

ABSTRACT

Flatow EA. The role of leptin on hypothermia during endotoxic shock. [dissertation (Masters thesis in Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

The systemic inflammation in response to infection (sepsis) is the major cause of death in hospitalized individuals. Fever is one of the clinical manifestations. However, between 9-21% of septic patients develop hypothermia. In experimental models this hypothermia appears regulated and associated to most severe cases. Both fever as hypothermia may have adaptive value due to their effects on the energy balance. Leptin is a hormone produced by fat tissue and involved in energy balance. Leptin also described as proinflammatory. In this work, we aim to investigate whether leptin can exert effects on inflammatory signs during hypothermia due to endotoxemia. To this end, young rats underwent surgery to implant intravenous catheter and telemetric temperature, activity and blood pressure sensor. To evaluate the effects of leptin during systemic inflammation, two days before the experiments the animals received subcutaneous osmotic pumps containing saline or leptin in the following doses: 1.5; 5 or 20 $\mu\text{g/kg/h}$. The thermoregulatory and cardiovascular responses in animals were monitored at ambient temperature able to development hypothermia (22 °C) or fever (30 °C). The exogenous leptin at dose 20 $\mu\text{g/kg/h}$ increased the plasma concentration to 5.8 ± 0.75 ng/ml in hypothermic animals, within the range observed in non-obese subjects. Coincidentally, this was the lowest dose able to reduce food intake. It was noted that leptin systemically administered attenuated hypothermia and hypotension induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) 500 $\mu\text{g/kg}$ i.v. and did not altered febrile response. Samples taken 100 minutes after LPS injection showed that leptin caused a decrease in TNF- α levels but did not affect the IL-1 β , IL-10, prostaglandins and corticosterone levels. When infused into the central nervous system in a dose of 1 $\mu\text{g/kg/h}$, leptin reduced food intake but did not change any of the parameters evaluated during systemic inflammation. We also observed that, *in vitro*, leptin (at doses up to 100 ng/ml) did not affect TNF- α , IL-1 β and IL-10 production in peritoneal and alveolar macrophages stimulated with LPS 500 ng/ml. The literature discusses the role of leptin in different models during the inflammatory response. Our results show that leptin at physiological concentrations exerted an anti-inflammatory effect in TNF- α reduction while an attenuation occurs in hypothermia and hypotension in rats induced by endotoxic shock. This immunomodulatory role occurs not via central mechanisms or requires the participation of peritoneal and alveolar macrophages.

Keywords: Leptin. Systemic inflammation. Hypothermia. TNF- α

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reconhecimento de LPS na membrana das células do sistema imune pelo TLR4.....	22
Figura 2 – Representação da sinalização via receptor de leptina (LepR) presente em neurônios no sistema nervoso central.....	28
Figura 3 – Representação esquemática do cronograma do experimento para avaliação dos efeitos da leptina s.c. sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em animais submetidos ao modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS.....	34
Figura 4 – Representação do modelo experimental onde o animal recebendo salina ou leptina s.c. é desafiado com LPS i.v. de maneira não estressante a uma temperatura ambiente controlada.....	38
Figura 5 – Representação do modelo experimental onde o animal recebendo salina ou leptina i.c.v. é desafiado com LPS i.v. de maneira não estressante a uma temperatura ambiente controlada.....	38
Figura 6 - Efeitos da leptina 1,5 µg/kg/h s.c. sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em animais injetados com LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	44
Figura 7 - Efeitos da leptina 5 µg/kg/h s.c. sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em animais injetados com LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	45
Figura 8 - Efeitos da leptina 20 µg/kg/h s.c. sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em animais injetados com LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	46
Figura 9 - Concentração plasmática de leptina 48 h após o início da infusão s.c. de leptina nas doses indicadas ou salina em animais desafiados ao choque endotóxico (LPS 500 µg/kg i.v.) ou não e mantidos em condições que favorecem a hipotermia (22 °C).....	49
Figura 10 - Efeitos da leptina 1,5; 5 ou 20 µg/kg/h s.c. sobre as respostas termorregulatórias em animais injetados com LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 30 °C.....	51

Figura 11 - Concentração plasmática de leptina 48 h após o início da infusão s.c. de leptina nas doses indicadas ou salina em animais desafiados ao choque endotóxico (LPS 500 µg/kg i.v.) ou não e mantidos em condições que favorecem a febre (30 °C).....	52
Figura 12 - Ingestão alimentar durante a noite (overnight) em ratos infundidos s.c. com salina ou leptina (5 ou 20 µg/kg/h).....	53
Figura 13 - Concentrações plasmáticas de TNF-α e IL-10 100 minutos após injeção de LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	55
Figura 14 - Concentrações plasmáticas de Corticosterona 100 minutos após injeção de salina ou LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	56
Figura 15 - Concentrações plasmáticas de TNF-α e IL-10 100 minutos após injeção de LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C.....	58
Figura 16 - Ingestão alimentar de ratos infundidos com salina ou leptina 1 µg/kg/h i.c.v.....	59
Figura 17 - Efeitos da leptina nas concentrações 0, 1, 10, 25 e 100 ng/mL sobre macrófagos peritoneais em cultura estimulados ou não com LPS 500 ng/mL.....	61
Figura 18 - Efeitos da leptina nas concentrações 0, 1, 10, 25 e 100 ng/mL sobre macrófagos alveolares em cultura estimulados ou não com LPS 500 ng/mL.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico.....	18
Tabela 2 – Efeitos dos sinais febrigênicos e criogênicos sobre efetores termorregulatórios e Tc.....	24
Tabela 3 – Efeitos da leptina 20 µg/kg/h s.c. sobre a produção de mediadores inflamatórios 100 minutos após a injeção de LPS 500 µg/kg i.v. em ratos na temperatura ambiente de 22 °C.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD – 7-aminoactomicina D

α -MSH – hormônio estimulante de α -melanócitos

Ac – anticorpo

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AgRP – neuropeptídeo relacionado a Agouti

AP-1 – fator de transcrição ativador de proteína 1

BHT – butil hidroxitolueno

BSA – albumina sérica bovina

CART – fator de transcrição regulado por anfetaminas e cocaína

CD68 – marcador de macrófagos

COX – ciclooxigenase

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

db/db – deficiência genética associada ao receptor de leptina

ELISA – *enzyme linked immuno sorbent assay*

EP – receptor de prostaglandina

ERK – *extracellular signal-regulated kinases*

HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal

HRP – *horseradish peroxidase*

i.c.v. – intracerebroventricular

i.v. – intravenoso

IL – interleucina

INF – interferon

IRAK – *interleukin receptor-associated kinase*

IRF – fator regulador de interferon

JAK – *janus kinase*

JNK – *Jun amino-terminal kinase*

LPS – lipopolissacarídeo

LR – receptor de leptina

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

MCR – receptor de melanocortina

MD2 – proteína que interage com TLR4

MPA – área pré-óptica medial

MyD88 – *myeloid differentiation primary response gene 88*

NFκB – fator nuclear κB

NPY – neuropeptídeo Y

ob/ob – deficiência genética associada a produção de leptina

p38 – *p38 mitogen-activated protein kinase*

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – *phosphate-buffered saline*

PBST – *phosphate-buffered saline Tween*

PG – prostaglandinas

POMC – pró-ópiomelanocortina

s.c. - subcutâneo

SFB – soro fetal bovino

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC – Sistema nervosa central

SOCS – supressor de sinal de citocinas

STAT – sinal ativador e transdutor de transcrição

Ta – temperatura ambiente

Tc – temperatura corporal

TIR – domínio do receptor toll/interleucina

TIRAP – molécula adaptadora associada a receptores do tipo toll

TLR – receptores do tipo toll

TNF-α – fator de necrose tumoral α

TRAF – fator associado ao receptor de TNF

TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*

UCP – *uncoupling protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
1.1 Inflamação sistêmica	17
1.2 Regulação da temperatura corporal.....	19
1.3 Febre na inflamação sistêmica.....	21
1.4 Hipotermia na inflamação sistêmica.....	23
1.5 Leptina e balanço energético.....	26
1.6 Leptina na inflamação sistêmica.....	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais.....	33
3.2 Preparações cirúrgicas.....	33
3.2.1 <i>Inserção de cateter venoso e sensor para temperatura, pressão arterial e atividade em ratos.....</i>	<i>33</i>
3.2.2 <i>Inserção de cânula intracerebroventricular.....</i>	<i>35</i>
3.3 Cuidados pós-cirúrgicos.....	35
3.4 Implantação de bomba osmótica subcutânea, controle de ingestão alimentar e privação alimentar.....	35
3.5 Sistema experimental – Indução da inflamação sistêmica.....	36
3.6 Cultura de macrófagos peritoneais e alveolares.....	39
3.7 Dosagens de citocinas e leptina plasmática.....	40
3.8 Extração e dosagem de corticosterona.....	41
3.9 Dosagem de prostaglandinas.....	41
3.10 Análise estatística.....	41
RESULTADOS.....	43
4.1 Efeito da leptina em doses fisiológicas na hipotermia e hipotensão induzidos por LPS.....	43
4.2 Variação da concentração plasmática de leptina em animais privados de alimentos e injetados com LPS na Ta de 22 °C.....	48
4.3 Efeito da leptina em doses fisiológicas sobre a resposta febrigênica durante o choque endotóxico.....	49

4.4 Variação da concentração plasmática de leptina em animais privados de alimento e injetados com LPS na Ta de 30 °C.....	50
4.5 Efeito da leptina em concentrações fisiológicas sobre a ingestão alimentar.....	52
4.6 Efeito da leptina em doses fisiológicas sobre a produção de mediadores inflamatórios durante a hipotermia.....	54
4.7 Atividade da leptina diretamente sobre o SNC.....	57
4.8 Efeito da leptina sobre a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos peritoneais e alveolares.....	58
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Inflamação sistêmica

A inflamação sistêmica decorrente de infecção (sepse) é uma das principais causas de morte em pacientes hospitalizados [1-2]. A sepse tem sido cada vez mais estudada, tanto na pesquisa básica como na clínica por ser uma doença altamente complexa, pela elevada incidência e pela ausência de tratamento adequado. Atualmente nos Estados Unidos, a incidência de sepse excede 750.000 casos anuais, na qual a mortalidade é de aproximadamente 30% [3]. Nos últimos anos observou-se um aumento no número de pacientes sépticos hospitalizados [4], estimando-se 2% das hospitalizações anuais, as quais poderão alcançar 1 milhão de casos por ano até 2020 [5]. No Brasil, a sepse é um dos maiores problemas de saúde pública, com taxa de mortalidade de 34,7% [6].

Em 1992, o conceito de sepse como uma resposta inflamatória sistêmica foi criado pelo *American College of Chest Physicians* e *Society of Critical Care Medicine* (**Tabela 1**). A descrição de sepse grave e choque séptico incluem a progressão da sepse associada à falência de órgãos ou hipotensão e aumento na mortalidade [7]. Clinicamente, os critérios para diagnóstico de pacientes sépticos incluem o desenvolvimento de febre ou hipotermia, elevada frequência cardíaca, hipotensão arterial e hiperglicemia.

A patogênese desta síndrome envolve uma ativação aguda de macrófagos e neutrófilos através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície dos agentes infecciosos. As células do sistema imune agem produzindo e respondendo à citocinas, quimiocinas e outros mediadores. Cerca de 60% dos casos identificaram bactérias gram-negativas como os principais agentes causadores da sepse, embora bactérias gram-positivas, vírus e fungos também sejam descritos [3, 8]. Neste sentido, os *Toll-like receptors* (TLR), os quais representam uma família variada de receptores especializados em reconhecimento de distintos PAMPs evolutivamente conservados [9], se destacam, principalmente, via TLR4 que reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas. Interações dos TLRs (domínio extracelular C-terminal rico em leucinas repetidas) com seus ligantes específicos conduzem ao recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, tais como MyD88,

TIRAP, TRIF e TRAM. Este processo resulta no recrutamento de proteínas da família IRAK e TRAF para o complexo receptor, gerando a ativação de MAPKs e JUN N-terminal (JNKs), p38 e ERKs quinases e fatores como *interferon regulatory factor* (IRF3, IRF5 e IRF7) e a ativação de NF- κ B e AP-1 que são essenciais para a indução de resposta imune inata e adaptativa [10-11]. A transcrição destes fatores leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL) 1 β e IL-6 e interferon (INF) do tipo I.

TNF- α e IL-1 β são as principais citocinas que medeiam muitas das características da inflamação induzida por LPS. Estas são secretadas nos primeiros 30-90 minutos após a exposição ao LPS [12] e ativam um segundo nível de mediadores inflamatórios incluindo outras citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio, bem como regulam a expressão de moléculas de adesão que dão início ao recrutamento de outras células do sistema imune para os tecidos.

Tabela 1 - Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico

Síndrome	Definição
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)	Inflamação sistêmica com mais de 2 manifestações clínicas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Temperatura > 38 °C ou < 36 °C ▪ Frequência cardíaca > 90 bpm ▪ Leucócitos > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³ ou > 10% de formas imaturas ▪ Hiperglicemia
Sepse	SIRS associada à infecção
Sepse grave	Sepse associada com disfunção de órgãos, hipoperfusão ou algum episódio de hipotensão
Choque séptico	Sepse com hipotensão

Fonte: Adaptado de O'Brien et al. (2007)

Os macrófagos constituem a população de células que mais expressam TLR4 em sua membrana e rapidamente se ativam na presença do LPS; neutrófilos

expressam baixos níveis de TLR4 e, portanto, a resposta ao LPS parece secundária [13]. Além disso, os macrófagos produzem prostaglandina (PG) E₂ em decorrência da ligação LPS-TLR4, que, juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, agem no sistema nervoso central (SNC) e periféricamente culminando em alterações na fisiologia da temperatura corpórea (Tc), pressão arterial e frequência cardíaca e taxa metabólica.

A regulação mediada pelo sistema nervoso central na imunidade ocorre por diferentes vias [14]. Os sistemas nervosos simpático e parassimpático geralmente inibem a inflamação através da inervação de órgãos do sistema imune. A resposta neuroendócrina controla a inflamação via eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) para o controle da mesma por meio da ação de glicorticoides.

1.2 Regulação da temperatura corporal

A capacidade do organismo em regular a temperatura corporal é essencial para homeostase. A estabilidade da Tc se dá pelo equilíbrio entre os mecanismos efetores de produção e perda de calor, cujas as alterações nos tecidos em defesa da mudança de temperatura resultam em proteção de órgãos críticos [15]. Alterações na Tc são indícios de presença de infecção e, assim, não é surpreendente que este parâmetro seja o primeiro a ser avaliado quando há suspeita de sepse.

Os mecanismos de regulação da Tc podem ser autonômicos (involuntários) e comportamentais (voluntários). Os mamíferos, por serem animais endotérmicos, são capazes de utilizar de ambos os mecanismos para termorregular, enquanto que animais ectodérmicos dispõem apenas de comportamentais. Embora os mecanismos autonômicos de controle da Tc sejam vitais, os comportamentais são essenciais para a adequada manutenção da Tc e, inclusive, são recrutados antes dos autonômicos, frente a um ambiente adverso, por serem eficientes e econômicos a longo prazo [16-17]. Os mecanismos comportamentais incluem o uso de vestimentas, manipulação do fogo e utilização da eletricidade para fornecimento de calor e primitivos envolvem principalmente a escolha de uma Ta adequada para a termorregulação.

A Tc da maioria dos mamíferos é geralmente estável em uma variação de Ta [18]. Há uma faixa de Ta denominada zona termoneutra, onde a taxa metabólica é igual ou próxima a níveis basais. Nesta faixa de temperatura a termorregulação é

alcançada pelo controle da perda de calor sem mudanças na taxa metabólica ou perda evaporativa [19-20]. Quando a T_a diminui abaixo da zona termoneutra, há diminuição do fluxo sanguíneo sob a pele resultante de uma vasoconstrição periférica, e a produção de calor é aumentada por termogênese com e sem tremor. Na medida em que a T_a ultrapassa a zona termoneutra, o fluxo sanguíneo cresce e a temperatura cutânea também. Desse modo, a taxa metabólica aumenta e mecanismos evaporativos de perda de calor para o ambiente são ativados [20].

Os mecanismos autonômicos termorregulatórios incluem aqueles destinados a produzir/conservar calor e os que promovem a perda de calor. Os mecanismos efetores para produção de calor incluem vasoconstrição cutânea, termogênese por tremor nos músculos esqueléticos e termogênese sem tremor no tecido adiposo marrom [15]. O tremor é uma fonte de calor em animais homeotérmicos expostos ao frio resultante no aumento do metabolismo basal onde o resfriamento do corpo induz atividade dos músculos esqueléticos em repouso. Já a termogênese sem tremor tem o objetivo de produzir calor sem atividade muscular através da ativação simpática do tecido adiposo marrom. Este tecido está presente na região interescapular de mamíferos de pequeno porte e em humanos neonatos e, em humanos adultos, encontra-se espalhado na forma de depósitos localizados nas regiões cervical, clavicular e para-espinhal [21-22]. O tecido adiposo marrom caracteriza-se pelo número alto de mitocôndrias que atuam gerando calor através da proteína desacopladora de prótons (UCP)-1 ou termogenina, presente na sua membrana [23]. O gene da UCP é expresso pelo tecido adiposo marrom e pertence à família de proteínas transportadoras de membrana interna mitocondrial. A produção de calor na mitocôndria sem gasto energético ocorre quando os prótons bombeados para fora da matriz mitocondrial entram novamente na matriz e dissipam essa energia em forma de calor [24]. A termogênese no tecido adiposo marrom é controlada pelo sistema nervoso simpático via receptores adrenérgicos nos adipócitos. Para ativação da produção de calor, a norepinefrina se liga aos receptores β_3 -adrenérgicos e leva a uma cascata de eventos resultante na liberação de ácidos graxos para oxidação na mitocôndria. Em seguida, a oxidação resulta na produção de um gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial. A UCP tem como função dissipar o gradiente de prótons e permitir produção de calor; este mecanismo gera um aumento no gasto energético [25].

Dentro do hipotálamo, a área pré-óptica (POA) atua coordenando as mudanças na temperatura no organismo. Essa área contém neurônios termossensíveis que controlam a produção e perda de calor de maneira independente. Dois núcleos na POA identificados estão envolvidos na termogênese do tecido adiposo marrom: núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e núcleo pré-óptico medial (MPA). Neuroanatomicamente, neurônios da POA modulam a termogênese do tecido adiposo marrom e a temperatura corporal através do hipotálamo dorsomedial (DMH) e *raphe pallidus* rostral. A exposição ao frio causa ativação neuronal nessa área para promover a atividade simpática do tecido adiposo marrom [24]. Assim, quando a T_a diminui abaixo da zona termoneutra, a termogênese é ativada para manutenção da temperatura.

Por outro lado, a perda de calor depende de mecanismos não evaporativos e evaporativos. As respostas fisiológicas ao calor incluem a vasodilatação cutânea que permite a transferência de calor para superfície corporal e as respostas ao frio incluem vasoconstrição cutânea para evitar perda de calor para o ambiente através da superfície corporal [26-27]. Essas respostas vasomotoras são controladas pelo sistema nervoso autônomo de acordo com a variação da temperatura corporal interna. Quando a temperatura da superfície cutânea é menor que a do ambiente, a perda de calor pode ocorrer por meios não evaporativos e, em ambientes, quentes a perda se dá por mecanismos evaporativos. Estes incluem a sudorese em humanos [28], espalhamento de saliva em ratos e camundongos [16] e ofegação em cães [29]. Em termos comportamentais, a seleção de ambiente térmico e uso de vestimentas também são mecanismos termorregulatórios, que antecedem os mecanismos autonômicos [16, 30].

1.3 Febre na inflamação sistêmica

A febre é a elevação regulada da T_c durante a resposta inflamatória [31], e o aumento da temperatura é essencial para inúmeras funções relacionadas a resposta imune. Após a ligação de PAMPs aos seus receptores, como por exemplo LPS ao TLR4, há ativação das células do sistema imune inato e produção de IL-1 β e IL-6 e TNF- α . Estas citocinas atraem outras células para o local de inflamação e atuam em outros tecidos para a produção de mais mediadores inflamatórios; dentre estes estão

as prostaglandinas (PG), derivadas do ácido araquidônico pelas enzimas cicloxigenases (COX). Há duas formas de COX expressas: COX-1, constitutivamente ativa em muitos tecidos, e COX-2, expressa principalmente em neurônios e ativada por citocinas pró-inflamatórias [32-33]. Derivada principalmente de células de Kupfer e macrófagos alveolares [34], a PGE₂ secretada cai na corrente sanguínea e é transportada até ao hipotálamo [35]. Em seguida, a PGE₂ age em receptores EP expressos em diferentes partes do sistema nervoso central (SNC). Mais especificamente, a PGE₂ age no hipotálamo, de onde este mediador interfere com os mecanismos autonômicos de produção e perda de calor [26, 36] e por induzir mais a síntese de PGE₂ pela COX-2. A PGE₂ induz o sistema nervoso simpático a liberar norepinefrina que aumenta a termogênese e vasoconstrição, e acetilcolina que estimula a termogênese sem tremor pelos músculos esqueléticos (**Figura 1**) aumentando a taxa metabólica e elevando a Tc [33]. Nas fases mais tardias da febre, aproximadamente 1 hora após injeção de LPS, a PGE₂ febrigênica origina-se das células da própria barreira hemato-encefálica, tais como células endoteliais ou macrófagos perivasculars. Estas células são ativadas por IL-1 β e IL-6 [37-38].

Figura 1 - O reconhecimento de LPS na membrana das células do sistema imune pelo TLR4. Uma cascata de sinalização culmina com a produção de citocinas inflamatórias que agem no SNC na regulação da Tc. Adaptado de Evans et al. (2015).

A febre potencializa diversas funções do sistema imunológico: aumento da infiltração de neutrófilos, fagocitose dos patógenos, apresentação de antígenos e proliferação de linfócitos [33], além de contribuir para que as temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos patogênicos não sejam favorecidas [39-40]. Por outro lado, quando prolongada a febre pode ser prejudicial à saúde do hospedeiro. Por exemplo, elevadas Tc podem produzir desidratação, sobrecarga cardiorrespiratória e balanço nutritivo negativo. Além disso, há um alto custo

energético, devido à elevação na taxa metabólica que pode representar uma sobrecarga para o organismo em pacientes debilitados [41]. Embora a febre seja a manifestação mais comum da sepse [42], a qual é entendida como uma estratégia de defesa do organismo em resposta a infecção, a queda da pressão arterial e a virada de febre para hipotermia caracterizam os casos mais graves de sepse [43].

1.4 Hipotermia na inflamação sistêmica

Estudos clínicos reportaram que entre 9-21% de pacientes sépticos, apresentam hipotermia. Entretanto, essa porcentagem se referia à observação dos pacientes no momento da admissão. Um estudo recente do nosso laboratório [44] relatou que 31,2% de pacientes apresentam algum episódio de hipotermia não somente no tempo de diagnóstico da sepse, mas durante toda a internação. Tendo em vista o papel imunológico da febre na sepse, inicialmente achava-se que a febre seria uma resposta benéfica e que a hipotermia seria uma resposta prejudicial. Contudo, em modelos experimentais, hoje sabe-se que essa hipotermia regulada, também conhecida como anapirexia, é uma estratégia de conservação de energia e parece ser mais vantajosa nas formas mais graves de inflamação sistêmica [45] quando o custo energético da febre se torna uma ameaça ao hospedeiro. No entanto, a virada de febre para hipotermia observada nesses casos ainda é um fenômeno pouco elucidado.

A resposta termorregulatória de ratos e camundongos mostra-se dependente da gravidade da inflamação sistêmica, isto é, doses de endotoxina, e da temperatura ambiente (T_a) [46-47]. A uma T_a neutra ou supraneutra, a resposta predominante é a febre, independente da dose de LPS [48]. Neste caso, a T_c depende dos efetores de perda de calor, os quais são influenciados somente por sinais febrigênicos, ou seja, os mecanismos de perda de calor são ativados e os de produção de calor são inibidos. Por outro lado, quando em T_a levemente fria, baixas doses de LPS provocam febre, uma virada de febre para hipotermia ocorre em doses moderadas a altas de LPS onde os mecanismos de produção/conservação de calor são ativados e a perda de calor é inibida. Com isso, demonstrou-se que através do uso da T_a é possível dissecar os componentes febrigênicos e criogênicos das respostas termorregulatórias de ratos frente a diferentes doses LPS [45]. Isto ocorre porque, em ambientes frios, o

organismo precisa produzir calor e esta produção é influenciada tanto por sinais febrígenos quanto por sinais criogênicos, porém os sinais criogênicos prevalecem em relação aos febrígenos quando a inflamação sistêmica é grave [49] (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Efeitos dos sinais febrígenos e criogênicos sobre os efetores termorregulatórios e T_c

Tipo do sinal/ mediador	Efetor termorregulatório		Efeito resultante sobre a T_c	
	Produção de calor (mantém a T_c em ambiente frio)	Perda de calor (mantém a T_c em ambientes quentes)	Quando o ambiente é frio	Quando o ambiente é quente
Febrígeno	↑	↓	↑	↑
Criogênico	↓	~	↓	~

↑, aumenta; ↓, reduz/inibe; ~, não altera; T_c , temperatura corporal.

Usando um gradiente térmico que permitisse os ratos selecionarem a T_a de sua preferência, Almeida et al. (2006) [43] demonstraram que animais injetados com doses baixas de LPS selecionaram um ambiente quente e desenvolveram febre; enquanto que ratos injetados com doses altas de LPS selecionaram um ambiente frio e desenvolveram hipotermia. Esse foi o primeiro trabalho que demonstrou que em T_a controlada, os animais escolhem sua T_a de preferência e que a hipotermia pode ser uma resposta natural e uma possível estratégia do organismo em conservar energia nos casos mais graves de inflamação sistêmica [43]. Em 2012, Liu et al. (2012) [45] verificaram que, quando a T_a é controlada, em ambiente moderadamente frio, o desenvolvimento de hipotermia ao invés de febre ocorre naturalmente e está associado a uma redução na taxa de mortalidade além de atenuar a inflamação reduzindo a endotoxemia. Neste trabalho foi observado, igualmente, que ratos expostos a altas doses de LPS ou *E. coli* também apresentaram uma queda na pressão arterial. Neste caso, a hipotensão pode refletir diretamente a influência da T_c sobre o sistema cardiovascular, pois ainda foi observado que a frequência cardíaca nesses animais esteve diminuída em resposta ao choque endotóxico [45].

Os mecanismos imune-neurais para o desenvolvimento de hipotermia (sinais criogênicos) são pouco estabelecidos. Sabe-se que em modelos de inflamação sistêmica, doses baixas de TNF- α causam febre, enquanto que doses intermediárias a altas causam hipotermia [50]. Ademais, a neutralização de TNF- α atenua a resposta hipotérmica induzida pelo LPS [51-52]. Outro mediador possivelmente envolvido na hipotermia é a PGD₂. Quando injetada intracerebroventricular ou na área pré-óptica em animais a uma Ta subneutra, a PGD₂ causa hipotermia [53]. Krall et al. (2010) [54] mostraram que há um aumento de PGD₂ durante a amplificação da resposta hipotérmica em ratos privados de alimento. Ainda, estudos usando inibidores de COX-1, revelaram uma supressão da hipotermia e hipotensão, sugerindo o envolvimento dessa enzima no desenvolvimento da hipotermia induzida por LPS [55-56].

A queda na Tc eventualmente está associada a hipotensão em modelos de inflamação sistêmica [45, 57-58] e casos clínicos de sepse [59-61]. Estudos avaliando citocinas durante a sepse constataram uma relação entre essas respostas fisiológicas, refletindo a influência do TNF- α [52, 62] como mediador envolvido no choque circulatório e hipotermia. Assim como no choque séptico, o choque endotóxico é caracterizado por uma queda na pressão arterial que, em algumas situações, esteve relacionado à diminuição do débito cardíaco e hipóxia [63-65]. Nestes casos, esse estado de hipoperfusão, poderia promover uma diminuição na Tc. Um dos mecanismos pelo qual isso acontece é que, para manter o metabolismo, os tecidos precisam receber quantidade mínima de oxigênio; com uma redução na demanda, uma falha no metabolismo induzido pela hipóxia, prejudicaria a capacidade termogênica e, assim, levaria a hipotermia [66]. Recentemente, nosso laboratório investigou se o desenvolvimento da hipotermia ao invés de febre durante o choque endotóxico seria consequência da hipóxia [67]. Em uma Ta de 22 °C, ratos injetados com LPS receberam um agonista β 3-adrenérgico para avaliar se a capacidade termogênica poderia estar prejudicada devido à queda na oferta de oxigênio durante a inflamação sistêmica. Os resultados mostraram que a capacidade termogênica não esteve alterada durante a hipotermia e ainda houve uma queda na pressão arterial. Além disso, através de uma abordagem conhecida por promover elevações na pressão arterial e aliviar a hipóxia em modelos animais, bem como em pacientes [68-69], usou-se um expansor de volume plasmático. Os resultados mostraram que, com a expansão do volume circulatório, a hipotermia e a hipotensão foram atenuadas; e que o hipometabolismo e a hipotensão em decorrência do choque endotóxico ocorrem

de maneira independente da hipóxia. Além disso, o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α induzido por LPS não foi significativamente reduzido pelo protocolo de expansão do volume circulante; é possível que a produção de TNF- α tenha sido aumentada, considerando que a concentração plasmática permaneceu inalterada apesar da queda na concentração total de proteína [67].

Em vista do exposto acima, trabalhamos com a hipótese de que tanto febre quanto hipotermia são respostas reguladas e representam estratégias adaptativas frente à infecção, sendo benéficas sob condições diferenciadas. A hipotermia, no entanto, parece a melhor resposta natural nas formas mais graves de inflamação sistêmica, como uma maneira do organismo de lidar com as demandas competitivas que surgem quando a febre se torna prejudicial.

1.5 Leptina e balanço energético

O tecido adiposo desempenha um papel essencial na regulação de ácidos graxos e armazenamento de lipídios [70]. Além disso, ele age na produção e secreção de hormônios que afetam o estado energético e o sistema imune [71-72]. No entanto, o papel do tecido adiposo como fonte de energia perdurou por várias décadas até que Kennedy (1953) [73] descreveu a presença de sinais secretados por esse tecido atuando centralmente para alterar o gasto energético e o consumo alimentar. Nas décadas seguintes, estudos envolvendo camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*) e diabéticos (*db/db*) confirmaram a presença de um “fator” [74]. Apenas em 1994 Zhang et al. [75] identificaram e sequenciaram o gene *ob* e o seu produto: a leptina. Do grego *leptos* (significa “magro”), a leptina é uma proteína de peso molecular 16 kD [75] e seus níveis circulantes estão relacionados com a quantidade de tecido adiposo presente no organismo. Em níveis mais baixos, a leptina também pode ser secretada pelo estômago, músculo esquelético e placenta [76]. Inicialmente, esse hormônio foi identificado como um fator envolvido com inibição da ingestão alimentar e peso corporal pela sinalização de estoque de energia para o cérebro através da quantidade de adipócitos [77] e estimulação do gasto energético pelo aumento da termogênese [78].

A estrutura da leptina é similar a algumas citocinas e seu receptor pertence à família de receptores de citocinas de classe I [79]. Seis formas do receptor de leptina

(LRA, LRB, LRC, LRD, LRE, LRF) são conhecidas; elas diferem entre si pelo tamanho da cauda citoplasmática e a capacidade de ativação da sinalização intracelular [77]. A forma secretada (LRE) contém apenas domínios extracelulares capazes de se ligarem à leptina circulante, limitando sua ação [80]. A forma curta LRA é expressa em regiões do cérebro relacionados com transporte de leptina pela barreira hematoencefálica [79]. LRB, o receptor de forma longa, é altamente expresso em grupos nucleares específicos nos cérebros de ratos e humanos: no hipotálamo, principalmente nos núcleos arcuado, hipotálamo dorsomedial, hipotálamo ventromedial, núcleo hipotalâmico lateral e paraventricular. Essas regiões são importantes na regulação do peso corporal e ingestão alimentar [77, 81]. Trabalhos usando RT-PCR detectaram níveis baixos de mRNA de LRB em outros tecidos; estes incluem pulmões, rins, fígado, adrenais, linfonodos, além do tecido adiposo e músculo esquelético [82-85].

A ação da leptina foi investigada também em células derivadas dos tecidos periféricos. Os relatos mostraram efeitos da leptina na sinalização intracelular e no metabolismo de células derivadas do sangue, por exemplo, e outras observadas [86-88]. Em um estudo com linhagem de macrófagos [87], a presença de mRNA de LRB foi demonstrada e isto sugere que, mesmo em baixa expressão, o receptor de leptina está presente em outros sistemas.

O receptor LRB contém um domínio extracelular de ligação, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático de sinalização [79]. A ligação de leptina ao seu receptor LRB resulta na autofosforilação de *janus activating kinase 2* (JAK2), fosforilação de resíduos de tirosina da cauda citoplasmática (Y985, Y1077 e Y1138) e ativação de fator de transcrição STAT3. O LRB tem três resíduos de tirosina no domínio intracelular e cada uma das fosforilações induz um sinal distinto de ação da leptina [89-90]. A fosforilação de Y1138 recruta STAT3 a LRB/Jak2 e leva à transcrição de genes envolvidos com a homeostase energética [89-90]. Dentre os genes regulados por STAT3 está o *supressor of cytokine signaling 3* (SOCS3).

A leptina atua no SNC através da ligação ao LRB em populações neuronais conhecidas por seus efeitos opostos na ingestão alimentar (**Figura 2**). Uma dessas populações é capaz de sintetizar os peptídeos orexígenos neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene *agouti* (AgRP). Peptídeos orexígenos estimulam o apetite e são aumentados em condições de deficiência de leptina ou jejum. Enquanto isso, neurônios expressando pró-opiomelanocortina (POMC) e transcritos

relacionados à anfetamina e cocaína (CART) têm papel anorexígeno. O produto do POMC, α -MSH (hormônio estimulante de α -melanócito), atua como agonista de receptores de melanocortina (MCR) no núcleo paraventricular [91] e outras regiões do hipotálamo. A diminuição nos níveis de leptina leva ao estímulo de apetite pela supressão de peptídeos anorexígenos (POMC/CART) e aumento da expressão de peptídeos orexígenos (NPY/AgRP) [89, 92-95].

Figura 2 - Representação da sinalização via receptor de leptina (LepR) presente em neurônios no sistema nervoso central. A quantidade de leptina disponível no organismo determina a sinalização orexígena ou anorexígenas desses neurônios que controlam a ingestão alimentar. Adaptado de Walley et al. (2009).

A quantidade de leptina plasmática está relacionada à produção da mesma pelos adipócitos no organismo. Os níveis de leptina plasmáticas encontram-se entre 1-20 ng/mL em animais magros e em humanos, no entanto esses níveis podem ultrapassar 100 ng/mL em obesos [96]. Mudanças a curto prazo nos níveis de leptina circulante ocorrem de maneira independente do tecido adiposo presente. A concentração de leptina diminui rapidamente no começo da privação alimentar e a

administração de leptina exógena reduz as mudanças fisiológicas que ocorrem durante o jejum [92]. Em animais magros, a redução plasmática de leptina (geralmente abaixo de 4 ng/mL) durante o jejum ou outras condições desfavoráveis ao balanço energético (como dieta de restrição calórica, por exemplo) é associada com a diminuição da taxa metabólica e estimulação do apetite [96]. A diminuição da ingestão alimentar é observada quando, em animais em privação alimentar, a leptina exógena é administrada sistemicamente em doses capazes de elevar a concentração da mesma a níveis encontrados em animais alimentados (5-20 ng/mL) [97-98]. Estas mesmas doses de leptina não induzem ou pouco influenciam o efeito similar em indivíduos alimentados [99]. Apenas quando injetados em doses capazes de produzir níveis suprafisiológicos, a leptina causa efeito anoxérico em sujeitos alimentados.

1.6 Leptina na inflamação sistêmica

A leptina é geralmente descrita como uma citocina pró-inflamatória. Em modelos *in vitro*, macrófagos peritoneais de animais deficientes na produção de leptina tratados com leptina (500 ng/mL) aumentaram a produção de TNF- α e IL-6 em resposta ao LPS (1 μ g/mL) [100]. A maioria dos estudos *in vivo* demonstra que a leptina é capaz de aumentar a febre e, no entanto, tais estudos envolvem a neutralização da leptina com o uso de anticorpo anti-leptina [101-103]. Por exemplo, ratos desenvolveram febre em resposta ao LPS (100 μ g/kg i.p) e ao receberem o anticorpo anti-leptina diminuíram a febre prolongada. A principal limitação do anticorpo é que, em vista da natureza policlonal, a febre pode ter sido alterada por razões diferentes da neutralização da leptina. Além disso, muitos desses trabalhos empregam doses variáveis de LPS. Sabemos que há relação das doses de LPS empregadas e as vias de administração estressantes com o aumento da Tc, bem como a dependência da Ta para isolar a resposta febril. O uso de animais geneticamente modificados também se faz presente nesses estudos [104-106]. Frequentemente observamos experimentos envolvendo a injeção de leptina em animais deficientes na sua produção ou com alterações na produção ou função de seu receptor. Animais mutantes apresentam patologias secundárias, por exemplo obesidade, as quais podem interferir no aumento da Tc. Outra limitação observada é a concentração plasmática de leptina; os trabalhos citados utilizam doses de leptina nas quais elevam

as concentrações acima daquelas observadas em sujeitos não obesos (1-20 ng/mL) [97, 107]; ou mesmo naqueles usando anticorpo anti-leptina, os níveis plasmáticos da leptina nesses animais já estão altos e a neutralização da mesma não reduz a níveis fisiológicos [108].

Relatos ainda sugerem o envolvimento da leptina na secreção de citocinas pró-inflamatórias. Luheshi et al. (1999) [99] utilizaram duas vias de administração de leptina (i.c.v. e i.p.) em concentrações distintas para reportar que a leptina aumenta a febre de maneira dose-dependente de IL-1 β nesses animais, onde a leptina em altas concentrações elevou a secreção desta citocina. Outra limitação envolvendo trabalhos em que manipulam a resposta associada à leptina, encontra-se na duração da privação alimentar. Sabemos que o jejum prolongado causa hipotermia. Foi mostrado que animais privados de alimento por 48 h recebendo leptina reverteram esse quadro hipotérmico [109]. Após a administração de LPS (100 μ g/kg) os animais privados recebendo leptina apresentaram febre prolongada comparados ao grupo controle.

Por outro lado, Faggioni et al. (2000) [110] reportaram que a leptina pode ser protetora durante o choque endotóxico. A reposição de leptina diminuiu os níveis séricos de TNF- α e aumentou níveis de corticosterona em modelo de camundongos privados de alimento por 48 horas e induzidos com doses muito altas de LPS, comparados ao que não receberam leptina [110]. Entretanto, a leptina foi administrada em duas vezes ao dia na dose de 1 μ g/g de peso corpóreo do animal, não sendo relatado ao final que níveis plasmáticos dessa leptina atingiu após uma privação alimentar prolongada. Em modelo de sepse, a reposição de leptina em camundongos deficientes na produção da mesma (*ob/ob*) aumentou a sobrevivência e revelou um papel imunomodulatório da leptina [111]. Steiner et al. (2004) [107] demonstraram que animais deficientes no receptor de leptina desenvolveram hipotermia prolongada em resposta a doses altas de LPS em ambiente frio acompanhada pelos aumentos da expressão de NF- κ B no hipotálamo e de TNF- α no plasma. Nas mesmas condições, ratos magros desenvolveram hipotermia seguida de febre e exibiram uma ativação do HPA com elevação nos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona. Nesse modelo de endotoxemia, a leptina exerceu um papel inibitório por controlar os níveis de TNF- α e evitar a virada de febre para hipotermia. Mesmo relatando um possível papel regulador da leptina, esses modelos também têm limitações observadas, como a administração de doses suprafisiológicas de leptina e uso de animais obesos. Outro estudo avaliou o efeito de injeções agudas de leptina

em diferentes doses (100, 250, 1000 e 3500 µg/kg) em ratos privados de alimento por 24 horas em Ta controlada [107]. Os resultados demonstraram que a Tc não aumentou até níveis febris, nem a leptina alterou a produção de TNF-α e IL-6 mesmo em doses altas e que os animais só desenvolveram febre quando IL-1β foi administrada.

Em vista do acima exposto, nossa estratégia baseou-se em investigar o papel da leptina em níveis fisiológicos em animais jovens durante a inflamação sistêmica. Para revelar os efeitos da leptina, utilizamos a temperatura ambiente para dissecar os componentes febrigênicos e criogênicos das respostas termorregulatórias e cardiovasculares de ratos ao LPS. Nos propomos, também, a identificar quais mediadores inflamatórios envolvidos durante essa resposta poderiam estar influenciados pela ação da leptina.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O foco deste trabalho foi investigar de que maneira a leptina em doses fisiológicas influencia a inflamação sistêmica aguda.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar se a suplementação com leptina em doses fisiológicas, encontradas em indivíduos não obesos, atenua a hipotermia e hipotensão que se manifestam no modelo de inflamação sistêmica em ratos desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano.
- ✓ Avaliar como essa leptina atua sobre a produção dos mediadores inflamatórios envolvidos com a hipotermia.
- ✓ Testar se a leptina agindo diretamente no sistema nervoso central é capaz de inibir os sinais inflamatórios que reduzem a temperatura corporal (sinais criogênicos) sem influenciar os sinais inflamatórios que elevam a temperatura corporal (sinais febrigênicos).
- ✓ Investigar se a leptina altera a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos peritoneais e alveolares e peritoneais através da ação direta da mesma em seus receptores presentes nestas células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (peso médio 250 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo Comitê de Ética 154, folha 136, livro 02) para a realização dos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas com maravalha (2 ou 3 animais/caixa) com água e ração disponível em sala com temperatura média de 26 °C e ciclo de claro/escuro (12:12 h). Após o procedimento cirúrgico e até o final do experimento, cada rato ficou em caixa individual. Todos os animais foram manuseados diariamente.

3.2 Preparações cirúrgicas

3.2.1 *Inserção de cateter venoso e sensor para temperatura, pressão arterial e atividade em ratos*

Nove dias antes do experimento (**Figura 3**), os ratos receberam implante de um cateter intravenoso para administração de LPS. Os animais foram anestesiados por sistema a gás contendo 5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio e mantidos em mesa cirúrgica com temperatura controlada e anestésico (2-2,5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio). No início da cirurgia receberam o antibiótico Enrofloxacina (5 mg/kg s.c.) e o anti-inflamatório analgésico Cetoprofeno (5 mg/kg s.c.) ao final do procedimento. Uma incisão longitudinal foi feita na região ventral esquerda do pescoço. A veia jugular foi exposta para implantação de cateter de poliuretano (BPU-T30, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA) até a veia cava superior. O cateter foi fixado por meio de suturas à veia jugular e exteriorizado pela nuca e preenchido por solução de glicerol heparinizado 500 U/mL (*lock solution*) para evitar coagulação sanguínea e entupimento.

No mesmo procedimento, foi inserido um sensor de telemetria necessário para o monitoramento de temperatura corporal (T_c) e atividade locomotora (modelo TA10TA-F40, Data Sciences International, St. Paul, MN, EUA) ou pressão arterial, T_c e atividade locomotora (modelo TL11M2C50-PT, Data Sciences International, St.

Paul, MN, EUA). Para isso, uma laparotomia foi realizada e os músculos da cavidade abdominal separados. O modelo TA10TA-F40 requer apenas que o sensor fique acomodado na cavidade abdominal. Para o modelo TL11M2C50-PT a parte abdominal da artéria aorta foi exposta, e o fluxo sanguíneo foi interrompido por aproximadamente 2 minutos para implantação do cateter do sensor. Após implantação, utilizamos adesivo tissular (Histoacryl, B Braun Surgical, Rubí, Espanha) para selar a artéria. O fluxo sanguíneo foi, então, restabelecido. A cápsula do sensor foi suturada à porção ventral da cavidade abdominal e o abdome fechado por sutura em camadas (músculo e pele).

Os animais ficaram em câmara com temperatura ajustada para 27 °C para recuperação da cirurgia por 24 horas.

3.2.2 Inserção de cânula intracerebroventricular

Para investigar a ação da leptina diretamente no SNC, os ratos foram submetidos a uma preparação cirúrgica para inserção de uma cânula intracerebral.

Os animais foram anestesiados com xilazina-ketamina (80:5 mg/kg i.p.) e receberam o antibiótico Enrofloxacin (5 mg/kg s.c.) no início da cirurgia e o anti-inflamatório analgésico Cetoprofeno (5 mg/kg s.c.) ao final do procedimento. A cabeça do animal foi fixada no estereotáxico (Kopf, Tujunga, CA) com a barra de incisão a -3,3 mm. Uma incisão sagital foi feita na pele para exposição do crânio. Microparafusos (Plastics One, Roanoke, VA) foram implantados no crânio e uma cânula de aço foi inserida no ventrículo direito usando as coordenadas estereotáxicas (-0,5 mm do Bregma; -1,5 mm da linha média; 4 mm da superfície do crânio). A cânula implantada foi fixada aos parafusos de suporte com cimento acrílico. No mesmo procedimento, os animais foram implantados com cateter venoso, sensor de telemetria para temperatura e atividade (**seção 3.2.1**).

3.3 Cuidados pós-cirúrgicos

Os animais receberam o antibiótico Enrofloxacin (5 mg/kg s.c.) e o anti-inflamatório analgésico Cetoprofeno (5 mg/kg s.c.) no primeiro dia pós-cirurgia. O cateter de poliuretano foi lavado com solução salina 0,9% e preenchido novamente com solução de glicerol heparinizado 500 U/mL nos primeiro e sexto dias pós-cirurgia.

3.4 Implantação de bomba osmótica subcutânea, controle de ingestão alimentar e privação alimentar

No sétimo dia pós-cirurgia (**Figura 3**), cada rato recebeu uma bomba osmótica subcutaneamente (modelo 1003D, Alzet Technical Support, Durect Corporation, Cupertino, CA, EUA) contendo salina ou leptina (Recombinant Rat Leptin, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) nas concentrações 1,5, 5 ou 20 µg/µL para cada kg de animal. A taxa de liberação da bomba osmótica é de 1 µL/h. Sendo assim, as doses utilizadas foram 1,5, 5 ou 20 µg/kg/h.

Para isso, uma pequena incisão foi feita na pele, entre as escápulas. Usando uma pinça hemostática, uma pequena bolsa foi formada no dorso sob a pele. A bomba foi inserida com o regulador de fluxo apontado para longe da incisão e a incisão fechada com sutura.

Tendo em vista os efeitos da leptina sobre a ingestão alimentar, a quantidade de ração disponibilizada para cada animal recebendo salina ou leptina foi mensurada diariamente após implantação da bomba osmótica.

A fim de diminuir os níveis de leptina circulantes, vinte e quatro horas antes do experimento a ração foi removida (**Figura 3**). Os ratos foram transferidos para caixas individuais com grade elevada de metal para prevenir coprofagia. Todos os animais tiveram água disponível e ficaram na câmara climática para adaptação à temperatura de 22 °C.

3.5 Sistema experimental – Indução da inflamação sistêmica

Às 7 horas do dia do experimento, aos cateteres intravenosos dos animais saindo pela nuca foram conectados a extensões de polietileno (BPE-T50, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA) preenchidas de solução salina 0,9% e conectadas a uma seringa de 1 mL. Em cada animal foi vestido uma jaqueta contendo uma mola de metal (CIH105 Covance Infusion Harness, Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA) para proteger o cateter de mordidas. A extensão menor do cateter saindo pela mola foi conectada à parte inferior do swivel (Instech Solomon, Plymouth, PA, EUA) preso a um braço móvel conectado às cubas experimentais. A extensão maior saiu da parte superior do *swivel* para o exterior da câmara. Cada cuba experimental contendo um animal foi colocada sobre um receptor de sinal de frequência de rádio dentro da câmara climática (Environmental Growth Chambers, Chagrin Falls, OH, EUA). A Ta foi ajustada para 22 °C ou 30 °C.

Para indução da inflamação sistêmica utilizamos lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* cepa O127:B8 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). O LPS foi diluído em salina estéril numa concentração de 5 mg/mL e congelado a -80 °C dias antes do experimento. No dia do experimento, foi descongelado, ressuspenso em salina estéril até a concentração de 500 µg/mL. Em seguida a solução de LPS foi sonicada por 30 minutos em banho-maria e mantido a temperatura ambiente até o momento de

injeção. A dose final utilizada foi de 500 µg/Kg, sendo administrada pelas extensões dos cateteres “*in bolus*” seguida de 0,6 mL de solução salina 0,9%.

A determinação da dose de LPS utilizada baseou-se em experimentos iniciais onde avaliamos a dose resposta de animais recebendo LPS nas doses 250 µg/kg, 500 µg/kg, 1 mg/kg e 2,5 mg/kg em uma Ta de 22 °C. A melhor dose que revelou a dinâmica da resposta hipotérmica sem levar os animais a óbito foi adotada (dados não mostrados).

A Tc, atividade locomotora e pressão arterial foram monitoradas telemetricamente através do sinal emitido pelo sensor implantado na cavidade abdominal e recebido pelo receptor de sinal sob as cubas experimentais ligados ao *software* de aquisição da Data Sciences International (**Figura 4**). Os dados da telemetria foram coletados desde o início do experimento até o tempo de interesse de resposta pós-injeção de LPS.

Nos experimentos envolvendo avaliação da atividade da leptina no SNC, os animais previamente privados de alimento foram infundidos i.c.v. com a dose de leptina 1µg/kg/h ou salina, e em seguida, induzidos à endotoxemia por LPS 500 µg/kg i.v. para avaliação dos parâmetros fisiológicos (**Figura 5**). A partir da análise dos parâmetros fisiológicos entre grupos, o tempo de coleta escolhido baseou-se no início do tempo da atenuação das respostas fisiológicas mediados pela leptina.

Ao final dos experimentos, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico 100 mg/kg i.v e o sangue foi coletado pela veia cava inferior em microtubos contendo heparina 500 UI/mL. Os tubos foram centrifugados (10 minutos, 12000 rpm, 4 °C) e o plasma congelado a -80 °C.

Figura 4 - Representação do modelo experimental onde o animal recebendo salina ou leptina s.c. é desafiado com LPS i.v. de maneira não estressante a uma temperatura ambiente controlada. As cubas experimentais ficam sobre um receptor de sinal telemétrico.

Figura 5 - Representação do modelo experimental onde o animal recebendo salina ou leptina i.c.v. é desafiado com LPS i.v. de maneira não estressante a uma temperatura ambiente controlada. As cubas experimentais ficam sobre um receptor de sinal telemétrico.

3.6 Cultura de macrófagos peritoneais e alveolares

Para determinar o efeito da leptina sobre a produção de mediadores inflamatórios em células do sistema imunológico que contêm LepR, usamos macrófagos provenientes de animais não estimulados para cultura celular. A coleta de macrófagos foi feita em animais eutanasiados com tiopental sódico (100 mg/kg i.p.). Os macrófagos peritoneais foram coletados através da injeção de 60 mL de PBS estéril a 4 °C no peritônio, seguidos de massagem da cavidade abdominal e aspiração do conteúdo peritoneal através de seringa acoplada em agulha 18G. Os macrófagos alveolares foram coletados através de lavagem brônquio-alveolar. Para isto, o pulmão foi removido da caixa torácica do animal e cuidadosamente acoplado em um o “conector T” com 2 seringas de 60 mL: uma contendo de PBS a 4 °C estéril para injetar na cavidade pulmonar e a outra vazia para coletar o conteúdo lavado. Ambos os conteúdos lavados foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL e centrifugados a 500 g, 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi incubado com tampão de lise (ACK Lyses Buffer – Gibco) para a lisar as hemácias. Após centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura RPMI para contagem dos macrófagos viáveis em Trypan *blue* na câmara de Neubauer. As células (2×10^6 células/ poço) foram plaqueadas em 2 mL de meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico em placas de 6 poços. Após 2 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, as células não aderidas foram descartadas e os poços foram lavados com PBS gelado. Foi adicionado novo meio RPMI suplementado com 10% SFB às células aderentes. Após incubação de 24 horas, as células que não aderiram foram descartadas e os poços lavados com PBS gelado para a adição de um novo meio de cultura e prosseguimento dos experimentos com os macrófagos. A leptina nas doses 1, 10, 25 ou 100 ng/mL foram adicionadas à cultura de macrófagos estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) e mantidas por 24 horas. Ao final do experimento, os sobrenadantes das culturas foram coletado para posterior análise de citocinas por ELISA.

. A confirmação da pureza dos macrófagos foi feita por Citometria de Fluxo através do uso de anticorpo CD68 específico para macrófagos de rato. A viabilidade também foi confirmada pela baixa incorporação de 7-AAD.

Estes experimentos foram conduzidos com a colaboração da pós-doutoranda do nosso laboratório, Dra. Evilin Naname Komegae.

3.7 Dosagens de citocinas e leptina plasmática

Cem minutos após injeção de LPS 500 µg/kg i.v., os animais foram anestesiados com tiopental sódico 100 mg/kg i.v e o sangue foi coletado pela veia cava inferior em tubos contendo heparina sódica 30 UI de sangue, indometacina 50 µM e BHT 0,005% em etanol/mL de sangue. Os tubos foram centrifugados (10 minutos, 4000 rpm, 4 °C) e o plasma congelado a -80 °C.

Posteriormente, o plasma foi descongelado a 4 °C e utilizado para a detecção das citocinas e leptina através de ensaio imunoenzimático (ELISA *sandwich*) padronizado.

Para dosagem de TNF-α, IL1-β e IL-10, o anticorpo de captura (1º Ac) foi diluído em PBS, plaqueado 100 µL/poço e incubado overnight à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi removido através de lavagem com PBS *Tween* (PBST) 3 vezes. O bloqueio foi feito com PBS 1% BSA (300 µL/poço) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras (plasma ou sobrenadante das culturas celulares) ou a curva padrão diluída em série (100 µL/poço) foi adicionada após lavagens com PBST e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção (2º Ac) foi adicionado e após 2 horas de incubação e lavagens com PBST a Streptoavidina-HRP foi adicionada por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A adição da solução substrato permite uma reação colorimétrica capaz de ser detectada em espectrofotômetro a 450 nm.

A concentração de leptina no plasma coletado dos animais ao final dos experimentos foi determinada por ensaio imunoenzimático (Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Imunoassay, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Sangue dos animais foi coletado pela veia cava inferior em tubos contendo heparina sódica 30 UI de sangue, indometacina 50 µM e BHT 0,005% em etanol/mL de sangue. Os tubos foram centrifugados (10 minutos, 4000 rpm, 4 °C) e o plasma congelado a -80 °C.

O plasma foi descongelado a 4 °C e diluído 1:10 de acordo com as instruções do kit. As amostras e a curva de calibração foram adicionadas à placa previamente marcadas com anticorpo de captura. Após incubação o excesso de anticorpo foi removido através de lavagem com tampão de lavagem por 5 vezes. Em seguida, o anticorpo de detecção (*Leptin conjugate antibody*) foi adicionado e a placa incubada por 2 horas. Novas lavagens com tampão de lavagem foram feitas para remoção do

excesso de anticorpo. Uma solução substrato foi adicionada e incubada por mais 30 minutos. A reação colorimétrica foi detectada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.8 Extração e dosagem de corticosterona

Para extração de corticosterona, 25 µL do plasma foram transferidos para microtubos e adicionado 1 mL de etanol gelado. Os tubos foram agitados no vórtex por 15 segundos e centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e estes, então, foram centrifugados por 45 minutos concentrador a vácuo para remoção do solvente (SpeedVac – Thermo Scientific).

A dosagem de corticosterona foi feita por radioimunoensaio em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

3.9 Dosagem de prostaglandinas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo solução de metanol 50 µM indometacina e 0,005% BHT. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. O plasma foi removido e congelado a -80 °C. As concentrações de PGE₂, PGD₂, e PGF_{2α} e 6-keto- PGF_{1α} no plasma foram determinadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS) em colaboração com o Prof. Marcel Musteata, Albany College of Pharmacy and Health Sciences (Albany, NY, USA).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do programa Statistica Advanced 8.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). ANOVA para medidas repetidas de um ou mais parâmetros foi empregada para comparar medidas consecutivas da Tc, da pressão arterial,

frequência cardíaca. A ANOVA foi acompanhada pelo teste post-hoc de tipo *Fisher Least Significant Difference*. Para as medidas da concentração de leptina plasmática, mediadores inflamatórios, corticosterona e medidas de ingestão alimentar utilizamos teste *t*. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e considerando-se diferenças significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da leptina em doses fisiológicas na hipotermia e hipotensão induzidos por LPS

Neste trabalho investigamos inicialmente como a leptina altera as respostas termorregulatórias associadas ao choque endotóxico. Os ratos foram implantados com um cateter intravenoso e sensor telemétrico para monitorar a Tc e a pressão arterial média (PAM). Avaliamos os efeitos de doses fisiológicas de leptina sobre as alterações nessas respostas nos animais privados de alimento, mantidos a Ta de 22 °C e injetados com LPS 500 µg/kg i.v.

A temperatura inicial (Tci) dos animais recebendo salina (Tci = 37,18 ± 0,12 °C) ou leptina nas doses 1,5 µg/kg/h (Tci = 37,19 ± 0,18 °C), 5 µg/kg/h s.c. (Tci = 37,54 ± 0,14 °C) e 20 µg/kg/h s.c. (Tci = 37,08 ± 0,05 °C) variou entre 37,03 °C e 37,68 °C. Na Ta 22 °C a hipotermia prevaleceu em resposta ao LPS. A resposta hipotérmica dos animais pré-tratados com salina iniciou-se aproximadamente 30 minutos após a injeção de LPS atingindo queda máxima em torno de 90 minutos, quando a Tc reduziu 1,95 ± 0,24 °C (**Figura 6-8**). O mesmo padrão de tempo na resposta ao LPS foi observado quando esses ratos receberam a dose de 1,5 (**Figura 6**) e 5 µg/kg/h s.c. (**Figura 7**), com uma magnitude na queda da Tc de -1,60 ± 0,35 °C e -2,00 ± 0,33 °C respectivamente. A curva de resposta da Tc nesses animais, assim como os aqueles que receberam salina, nos mostra que a prevalência da hipotermia, ou seja, o momento inicial da queda até o retorno da Tc aos níveis basais, durou até aproximadamente 150 minutos pós-LPS. Contudo, a resposta hipotérmica dos animais pré-tratados com leptina 20 µg/kg/h s.c. apresentou menor magnitude, reduzindo a Tc dos animais em 1,27 ± 0,39 °C com duração dessa resposta de aproximadamente 70 minutos (**Figura 8**). Com isso, pudemos notar que, a leptina na maior dose utilizada, atenuou a hipotermia 100 minutos após a injeção de LPS, onde a recuperação da Tc aos níveis iniciais foi mais rápida comparada aos animais recebendo salina (P < 0,05) e essa atenuação na resposta persistiu até cerca de 160 minutos pós-LPS.

Figura 6 - Efeitos da leptina 1,5 µg/kg/h s.c. sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em animais injetados com LPS 500 µg/kg i.v. na temperatura ambiente de 22 °C. O número de animais em cada grupo é mostrado entre parênteses.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, nosso sistema de medição através de telemetria pôde nos mostrar a variação da pressão arterial média e frequência cardíaca (FC) associadas ao choque endotóxico nos mesmos animais mantidos à Ta de 22°.

A pressão arterial média inicial (PAMi) dos animais tratados com salina (PAMi = $121,0 \pm 3,21$ mmHg) ou leptina nas doses 1,5 µg/kg/h (PAMi = $117,32 \pm 2,68$ mmHg), 5 µg/kg/h s.c. (PAMi = $117,47 \pm 2,09$ mmHg) e 20 µg/kg/h s.c. (PAMi = $108,95 \pm 5,38$ mmHg) variou entre 103,57 mmHg e 124,21 mmHg. Observamos uma hipotensão inicial de pequena magnitude com rápido retorno no momento de injeção de LPS em todos os grupos testados (**Figuras 6-8**). Acreditamos que essa interferência na PAM deveu-se apenas ao momento da injeção intravenosa. A queda na pressão arterial média com amplitude de $-28,76 \pm 4,34$ mmHg nos animais recebendo salina deu-se em aproximadamente 90 minutos pós-LPS. A resposta hipotensiva durou até 150 minutos pós-LPS quando notamos uma estabilização da PAM mas sem retornar aos valores iniciais (**Figura 6**). Nos ratos que receberam leptina nas doses 1,5 (**Figura 6**); 5 (**Figura 7**) e 20 µg/kg/h s.c. (**Figura 8**) a resposta hipotensiva iniciou-se no mesmo tempo de 30 minutos com queda máxima em 75 minutos após a injeção de LPS e magnitude $-23,85 \pm 5,93$ mmHg para os que receberam leptina 1,5 µg/kg/h. Os animais recebendo leptina 5 µg/kg/h tiveram apresentaram uma Tc mínima em 80 minutos atingindo $-26,54 \pm 5,53$ mmHg. Aqueles ratos que foram infundidos com leptina 20 µg/kg/h reduziram a PAM em $-29,23 \pm 5,87$ mmHg aos 78 minutos. No entanto, somente a maior dose testada apresentou uma atenuação na duração da hipotensão em resposta ao choque endotóxico, com seu período de retorno aos níveis basais em 100 minutos pós-LPS (**Figura 8**). Assim como nos animais recebendo salina, os ratos infundidos com leptina 1,5 e 5 µg/kg/h não retornaram aos seus valores basais de PAM. Podemos verificar então que, como visto durante a hipotermia, apenas a leptina na dose 20 µg/kg/h atenuou a hipotensão 100 minutos após a injeção de LPS ($P < 0,05$).

Uma vez que a resposta hipotérmica tem sido associada à outras variações no sistema cardiovascular durante o choque endotóxico, avaliamos também o efeito da leptina sobre a variação na frequência cardíaca. O valor basal da frequência cardíaca (FCi) foi entre 371 e 464 bpm nos grupos salina (FCi = 418 ± 19 bpm), leptina 1,5 µg/kg/h (FCi 385 ± 14 bpm), leptina 5 µg/kg/h (FCi 405 ± 18 bpm) e leptina 20 µg/kg/h (446 ± 18 bpm). A frequência cardíaca caiu em todos os grupos avaliados

aproximadamente 25 minutos após a injeção de LPS (**Figura 6-8**). A amplitude de queda em relação aos níveis iniciais foi semelhante em todos as doses de leptina e salina, cerca de 20 bpm, bem como a duração da redução na frequência cardíaca, até 120 minutos pós-LPS. Após o tempo de retorno da hipotermia e da hipotensão, observamos que a frequência cardíaca dos ratos recebendo salina, leptina 1,5 µg/kg/h e leptina 5 µg/kg/h aumentou cerca de 60 bpm e os animais recebendo leptina 20 µg/kg/h elevaram à 70 bpm em relação aos níveis basais. Em nenhum dos grupos houve diferença significativa na variação da frequência cardíaca em resposta ao LPS tratados ou não com leptina.

Além disso, nossos dados mostram que a leptina nas doses testadas não foi capaz de alterar as respostas termorregulatórias e cardiovasculares antes da injeção de LPS (-60 a 0 minutos) nesses animais a Ta de 22 °C.

4.2 Variação da concentração plasmática de leptina em animais privados de alimento e injetados com LPS na Ta de 22 °C

Diante dos resultados obtidos sobre as respostas fisiológicas dos animais privados de alimento desafiados com LPS, investigamos se no nosso modelo de privação alimentar, as doses de leptina previamente infundidas elevariam as concentrações da mesma aos níveis plasmáticos encontrados em indivíduos não obesos [96].

Amostras de sangue foram coletadas e nossos resultados apontaram que a privação alimentar por 24 horas foi suficiente para reduzir os níveis de leptina (**Figura 9**). Nos animais recebendo salina sem injeção de LPS houve redução da leptina plasmática para $0,57 \pm 0,10$ ng/mL. Em ratos induzidos ao choque endotóxico e recebendo salina s.c., essa redução atingiu a concentração de $0,50 \pm 0,14$ ng/mL, o que nos mostra que nessa Ta, o LPS sozinho não alterou os níveis de leptina. Quando infundidos com leptina 1,5 µg/kg/h os ratos injetados com LPS elevaram sua leptina plasmática a $0,95 \pm 0,11$ ng/mL. Porém, a leptina nas doses de 5 e 20 µg/kg/h aumentou a leptina plasmática dos animais hipotérmicos a $3,50 \pm 0,43$ ng/mL e $5,86 \pm 0,76$ ng/mL respectivamente. Essas doses mostraram-se aumentadas até 12 vezes em relação ao grupo salina ($P < 0,05$) e são doses observadas em sujeitos não obesos.

4.3 Efeito da leptina em doses fisiológicas sobre a resposta febrigênica durante o choque endotóxico

Com o objetivo de avaliar o efeito da leptina sobre o componente febril, investigamos as respostas termorregulatórias de ratos privados de alimento e infundidos com salina ou leptina nas doses de 1,5; 5 e 20 µg/kg/h injetados com LPS a uma Ta de 30 °C.

A temperatura inicial (Tci) dos animais recebendo salina ($T_{ci} = 37,58 \pm 0,11$ °C) ou leptina nas doses 1,5 µg/kg/h ($T_{ci} = 37,64 \pm 0,29$ °C), 5 µg/kg/h s.c. ($T_{ci} = 37,64 \pm 0,12$ °C) e 20 µg/kg/h s.c. ($T_{ci} = 37,70 \pm 0,17$ °C) esteve entre 37,47 °C e 37,93 °C. Quando acondicionados a uma Ta de 30 °C a febre prevaleceu em decorrência do choque induzido por LPS. Os animais recebendo salina, leptina 1,5 µg/kg/h ou leptina 5 µg/kg/h apresentaram uma queda de -0,3 °C em relação à temperatura média basal (**Figura 10**). O grupo recebendo leptina 20 µg/kg/h teve sua temperatura reduzida em

0,2 °C. Essa redução persistiu até 90 minutos pós-LPS onde iniciou-se uma resposta febril (acima de 1 °C em relação a Tci) que prevaleceu até o final do experimento.

Sabendo-se que na literatura a leptina é descrita como causadora de febre podemos verificar que nessas concentrações, a leptina não causou alteração na resposta termorregulatória iniciais desses animais antes mesmo da indução do choque endotóxico. Esses resultados podem ser observados na **Figura 10** nos tempos de -60 a 0 minutos.

4.4 Variação da concentração plasmática de leptina em animais privados de alimento e injetados com LPS na Ta de 30 °C

Diante do acima exposto, verificamos também se a leptina nas doses infundidas causou alteração na leptina plasmática de animais privados de alimento no modelo de febre (Ta 30 °C). Assim como a resposta hipotérmica, nossos resultados constataram que a privação alimentar por 24 horas foi suficiente para reduzir os níveis de leptina até cerca de $0,13 \pm 0,04$ ng/mL nos animais recebendo salina sem injeção de LPS e $0,77 \pm 0,16$ ng/mL naqueles induzidos ao choque endotóxico (**Figura 11**). Pudemos notar também que, nessa Ta, os ratos recebendo leptina 1,5 µg/kg/h e injetados com LPS elevaram sua leptina plasmática a $1,22 \pm 0,34$ ng/mL. Contudo, a leptina nas doses de 5 e 20 µg/kg/h aumentou a leptina plasmática dos animais febris para $4,09 \pm 1,04$ ng/mL e $9,13 \pm 0,74$ ng/mL respectivamente. Estas doses mostraram-se elevadas entre 8 e 18 vezes em relação ao grupo salina ($P < 0,05$). A leptina plasmática encontrada nesses grupos também está relacionada àquela encontrada em indivíduos não obesos. Com isso, observamos também que a leptina infundida nos animais acondicionados a Ta de 30 °C esteve em maior concentração nos níveis plasmáticos do mesmo. Não sabemos, porém, se a Ta pode causar um aumento na produção de leptina.

4.5 Efeito da leptina em concentrações fisiológicas sobre a ingestão alimentar

Sabemos que a principal atividade da leptina já descrita é seu efeito sobre a saciedade alimentar [77]. Para verificarmos se a leptina infundida nas doses de 5 µg/kg/h e 20 µg/kg/h, aquelas que elevaram suas concentrações plasmáticas a níveis fisiológicos, estavam biologicamente ativas, nós investigamos a sua ação sobre a ingestão de ração nos ratos antes dos experimentos de indução de inflamação sistêmica.

Após a implantação da bomba osmótica contendo salina ou leptina, mensuramos o consumo de alimento no período conhecido de maior atividade dos ratos, ou seja, durante a noite. Nossos dados mostraram que os animais recebendo salina consumiram $19,51 \pm 0,98$ g da ração disponível (**Figura 12**). Aqueles ratos sob infusão de leptina na dose de 5 µg/kg/h ingeriram $21,37 \pm 1,05$ g da dieta alimentar. Os animais infundidos com leptina 20 µg/kg/h consumiram menos ração quando

comparados aos demais grupos, $15,59 \pm 1,20$ g ($P < 0,05$). Portanto, pudemos perceber que apenas a maior dose testada teve seu efeito sobre a redução na ingestão alimentar.

A partir deste momento, optamos por utilizar somente a concentração de leptina 20 µg/kg/h tendo em vista que esta dose aumentou a níveis fisiológicos a leptina plasmática dos animais e foi a única capaz de exercer efeito sobre o comportamento de consumo de alimento. Além disso, em relação ao grupo salina, a leptina 20 µg/kg/h foi também a única dose que atenuou a resposta termorregulatória e cardiovascular nos animais submetidos ao modelo de inflamação sistêmica na Ta de 22 °C.

4.6 Efeito da leptina em doses fisiológicas sobre a produção de mediadores inflamatórios durante a hipotermia

Nós avaliamos se a leptina em concentração fisiológica alterou a secreção de citocinas conhecidas durante a resposta inflamatória. Amostras de sangue dos animais submetidos ao modelo de endotoxemia foram coletadas 100 minutos após LPS. Este tempo escolhido deveu-se ao início da recuperação da hipotermia e hipotensão associados ao choque endotóxico.

Dentre as citocinas, investigamos as pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , e também IL-10, conhecida principalmente por seu efeito anti-inflamatório. As citocinas mensuradas não foram detectadas em animais recebendo salina sem injeção de LPS. Podemos observar que a leptina 20 $\mu\text{g/kg/h}$ diminuiu a produção *in vivo* de TNF- α de $6,81 \pm 1,93 \text{ ng/mL}$ para $2,79 \pm 0,68 \text{ ng/mL}$ nos animais injetados com LPS quando comparados ao grupo pré-tratado com salina na mesma condição de inflamação (**Figura 13**). Quando medimos IL-10, não houve diferença na alteração da secreção desta nos animais recebendo leptina ($0,26 \pm 0,08 \text{ ng/mL}$) em relação aos animais recebendo salina ($0,21 \pm 0,04 \text{ ng/mL}$). A IL-1 β não foi detectada no tempo escolhido para este modelo (dados não mostrados).

Além disso, mensuramos a secreção de mediadores lipídicos da via das prostaglandinas, PGE₂, PGD₂ e PGF_{2 α} , e 6-keto-PGF_{1 α} , metabólito da PGI₂. Não encontramos diferenças na produção desses mediadores, no tempo de resposta escolhido, que estivessem envolvidos com a atenuação da hipotermia e hipotensão (**Tabela 3**).

O experimento seguinte visou relacionar a capacidade da leptina em modular a síntese de hormônios produzidos pelo eixo HPA e que influenciam a regulação da resposta imune. Com isso, avaliamos se os níveis de corticosterona plasmáticos, o hormônio final do eixo HPA, estavam alterados nos ratos recebendo salina, injetados ou não com LPS, e os que receberam leptina 20 $\mu\text{g/kg/h}$ injetados com LPS. Demostramos na **Figura 14** que os animais que não receberam LPS tiveram seus níveis de corticosterona plasmáticos $15,85 \pm 1,35 \text{ } \mu\text{g/dL}$. Como esperado, a inflamação induzida por LPS aumentou os níveis plasmáticos dos animais pré-tratados com salina para $28,90 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{g/dL}$. Contudo, a leptina na dose de 20 $\mu\text{g/kg/h}$ não exerceu nenhum efeito sobre a produção deste hormônio frente a inflamação

sistêmica, não alterando os níveis de corticosterona comparados ao grupo recebendo salina e injetados com LPS ($29,6 \pm 2,0 \mu\text{g/dL}$).

Nossos resultados mostraram que a leptina na dose 20 $\mu\text{g/kg/h}$ infundida sistemicamente exerceu efeito apenas na secreção de TNF- α , e que este é o mediador comum envolvido na resposta hipotérmica e hipotensiva dos ratos durante o choque endotóxico.

Surge, então, o questionamento de como a leptina em concentrações fisiológicas poderia modular o perfil de citocinas, mais especificamente TNF- α durante a inflamação sistêmica.

Tabela 3 - Efeitos da leptina 20 µg/kg/h s.c. sobre a produção de mediadores inflamatórios 100 minutos após injeção de LPS 500 µg/kg i.v. em ratos na temperatura ambiente de 22 °C. O número de animais em cada grupo é mostrado entre parênteses.

Prostaglandinas (ng/mL)	Pré-tratamento	
	Salina s.c. (n=8)	Leptina 20 µg/kg/h s.c. (n=7)
PGE₂	1,17 ± 0,27	2,02 ± 0,96
PGD₂	1,52 ± 0,34	1,88 ± 0,78
PGF_{2α}	0,92 ± 0,20	0,87 ± 0,33
6-keto-PGF_{1α}	1,53 ± 0,25	1,36 ± 0,38

4.7 Atividade da leptina diretamente sobre o SNC

Um mecanismo pelo qual a leptina poderia exercer efeitos anti-inflamatórios seria por vias neurais diretas através de seus receptores no SNC. Sendo assim, conduzimos nossos experimentos a fim de investigar se, quando infundida diretamente no SNC, a leptina diminuiria a secreção de TNF- α como observado quando a mesma é liberada sistemicamente.

Ratos implantados com cateter intravenoso e cânula intracerebroventricular (i.c.v.) receberam salina ou leptina na dose de 1 $\mu\text{g/kg/h}$ e foram injetados com LPS 500 $\mu\text{g/kg}$ i.v. na Ta de 22 °C. A dose de leptina escolhida baseou-se em estudos anteriores que demonstraram que, nessas concentrações, a leptina exerce efeito sobre a ingestão alimentar e peso corpóreo em ratos [112]. Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de privação alimentar por 24 horas para redução de níveis plasmáticos de leptina antes da inflamação sistêmica. No nosso delineamento experimental, optamos por avaliar a produção de mediadores inflamatórios com a finalidade de demonstrar se a leptina i.c.v. exerceria o mesmo efeito sobre a produção de TNF- α . O tempo escolhido para coleta de plasma baseou-se no tempo de retorno da hipotermia e hipotensão observados nos experimentos anteriores de infusão de leptina e choque endotóxico. Neste experimento, optamos por não mensurar IL-1 β visto que a mesma não foi detectável anteriormente. Os resultados mostraram que, quando administrada i.c.v., a dose testada de leptina não alterou a produção de TNF- α e IL-10 no tempo de 100 minutos após a injeção de LPS (**Figura 15**).

Nos questionamos, então, se a leptina na dose de 1 $\mu\text{g/kg/h}$ i.c.v. seria uma dose mínima capaz de agir sobre os seus receptores no SNC e regular a saciedade. Os ratos recebendo salina ou leptina foram privados de alimento por 24 horas e no dia seguinte submetidos ao teste de ingestão alimentar por 1 hora. Nossos dados indicaram que os animais privados de alimento recebendo salina i.c.v. ingeriram $13,12 \pm 1,60$ g de ração. Todavia, a leptina i.c.v. reduziu o consumo alimentar dos animais que a receberam para $3,21 \pm 0,77$ g. Portanto, pudemos confirmar que a dose infundida de leptina estava biologicamente ativa pois exerceu efeito sobre a ingestão alimentar. No entanto, esse papel da leptina só pôde ser observado após a privação alimentar, o que nos indica que, para revelarmos o efeito fisiológico da leptina

diretamente sobre o SNC, é necessário que seus níveis plasmáticos estejam reduzidos nesses animais.

4.8 Efeito da leptina sobre a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos peritoneais e alveolares

Nossos resultados anteriores nos mostraram que a leptina em doses fisiológicas exerceu efeito sobre a hipotermia e a hipotensão decorrentes do choque endotóxico, e que a mesma diminuiu a secreção de TNF-α quando administrada sistemicamente mas não alterou a produção dessa citocina quando a leptina agiu diretamente no SNC. Diante disso e sabendo que o receptor de leptina também é expresso em células do sistema imunológico, avaliamos se a leptina em várias concentrações altera a produção das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 em macrófagos peritoneais e alveolares.

Figura 16 - Ingestão alimentar de ratos infundidos com salina ou leptina 1 µg/kg/h i.c.v. O número de animais em cada grupo é mostrado entre parênteses. *P < 0,05

Os macrófagos peritoneais e alveolares foram isolados de ratos *naïve* e expostos a diversas doses de leptina (0; 1; 10; 25 e 100 ng/mL) por 24 horas na ausência ou presença de LPS 500 ng/mL. A pureza das células foi determinada por citometria de fluxo através da marcação de CD68 e obtivemos 90% de células (**Figura 17**) positivas para os macrófagos peritoneais e 98% para os macrófagos alveolares (**Figura 18**).

Nos macrófagos peritoneais vimos que na ausência de LPS, a leptina nas diferentes doses não modificou a produção de TNF-α por essas células. Observamos também um aumento em aproximadamente 80 vezes na expressão de TNF-α em resposta ao LPS nas células não incubadas com leptina (7362, 32 ± 1771, 34 pg/mL). Entretanto, quando adicionada à cultura, as doses de leptina não exerceram efeito na modulação dessa citocina. Quando avaliamos a expressão de IL-1β por esses macrófagos peritoneais, notamos que na ausência de LPS, houve uma produção de

IL-1 β de $954,56 \pm 350,32$ pg/mL naqueles sem leptina, sem variar a expressão de IL-1 β independente da dose de leptina colocada na cultura. Em contato com LPS, a secreção de IL-1 β esteve aumentada cerca de 2 vezes, atingindo os níveis de $2030,22 \pm 514,11$ pg/mL mas ainda assim a exposição à leptina em diferentes doses não modulou a secreção dessa citocina. Ao investigarmos a produção de IL-10 nessa mesma cultura, identificamos que o LPS aumentou a secreção dessa citocina de perfil anti-inflamatório em aproximadamente 5 vezes, indo de $100,62 \pm 26,19$ pg/mL nos macrófagos sem leptina e sem LPS a $448,36 \pm 117,36$ pg/mL sem leptina e com LPS. Verificamos também que as doses leptina não alteraram a produção de IL-10 na ausência ou presença de LPS.

Ao avaliarmos o mesmo perfil de citocinas nos macrófagos alveolares. Notamos que na ausência de LPS, a leptina nas diferentes doses não foi capaz de modificar a produção de TNF- α por essas células (**Figura 18**). Quando adicionado à cultura, o LPS elevou a produção de TNF- α de $27,53 \pm 5,14$ pg/mL para $6934,41 \pm 923,16$ pg/mL na ausência de leptina. Contudo, quando adicionada à cultura, as doses de leptina não alteraram a expressão de TNF- α . A expressão de IL-1 β pelos macrófagos alveolares na ausência de LPS esteve diminuída quando comparado aos macrófagos peritoneais, atingindo os níveis de $131,56 \pm 76,89$ pg/mL. Em cultura, o LPS elevou a produção de IL-1 β a $5124,11 \pm 5260,61$ pg/mL. A leptina incubada em diferentes doses, aumentou esses níveis em relação aos não estimulados com LPS a níveis que variaram entre $3712,82 \pm 4062,81$ pg/mL (leptina 1 ng/mL) e $4835,84 \pm 4610,15$ pg/mL (leptina 100 ng/mL), mas sem diferenças significativas entre os grupos testados. Observamos ainda a secreção de IL-10 na ausência ou presença do estímulo inflamatório. Nossos dados apontaram que as concentrações de leptina incubadas na ausência de LPS houve uma produção de IL-10 de $25,87 \pm 4,56$ pg/mL e que na presença de LPS esses níveis variaram entre $33,58 \pm 4,63$ pg/mL e $37,91 \pm 4,49$ pg/mL independente da dose de leptina.

Nossos resultados nos conduzem a descrever um papel anti-inflamatório da leptina em concentrações fisiológicas que envolve a diminuição na produção de TNF- α , modulando a resposta hipotérmica e hipotensiva em modelo de endotoxemia. Entretanto, ao avaliarmos dois possíveis mecanismos, através da ação direta da leptina nos receptores no SNC e nos macrófagos peritoneais e alveolares *in vitro*, não conseguimos revelar de que maneira esse hormônio regula a expressão dessa citocina durante a resposta inflamatória.

Figura 18 - Efeitos da leptina nas concentrações 0, 1, 10, 25 e 100 ng/mL sobre macrófagos alveolares em cultura estimulados ou não com LPS 500 ng/mL. As concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no sobrenadante da cultura foi determinado por ELISA. A pureza dos macrófagos foi determinada pela porcentagem de células CD68⁺ por citometria de fluxo.

5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho é pioneiro em verificar a resposta de animais não obesos induzidos ao choque endotóxico frente à infusão de leptina em doses fisiológicas, e também um dos poucos a verificar uma atividade anti-inflamatória da leptina nos casos de inflamação sistêmica grave.

A sepse é uma das principais causas de morte em pacientes hospitalizados [1]. Uma das maneiras de diagnosticar um quadro séptico consiste no aparecimento de febre ou hipotermia, sendo esta última associada aos casos mais graves [43]. Essa hipotermia regulada pode estar associada a uma estratégia do organismo em conservar energia, visto que os mecanismos envolvidos na febre afetam o balanço energético [41, 45].

O tecido adiposo desempenha um papel importante no balanço energético em mamíferos. Este tecido é especializado em armazenar lipídeos e liberar energia quando necessário. Além disso, o tecido adiposo é um órgão endócrino, capaz de liberar hormônios, peptídeos e citocinas que afetam o estado energético e a resposta imunológica [71-72, 78]. Um dos hormônios mais importantes liberados por este tecido é a leptina. Mais do que um sinal de saciedade, a leptina em baixas concentrações plasmáticas leva à mudanças neurais e comportamentais a fim de preservar energia para funções vitais importantes [92]. Outro fator importante é que uma má nutrição e redução nos níveis de leptina induz o organismo a um estado de imunodeficiência e pré-disposição a morte por infecções [113]. A leptina parece influenciar as mudanças na Tc, entretanto a magnitude desse efeito e o mecanismo pelo qual isso ocorre parece não esclarecido. O que se tem descrito é que a leptina pode ser modulada por citocinas e também pode modular a secreção de citocinas durante a inflamação.

Os modelos experimentais de inflamação sistêmica frequentemente envolvem a administração de LPS, que é reconhecido pelo TLR4 na membrana celular e desencadeia uma resposta que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 por macrófagos e neutrófilos [114]. Uma virada de febre para hipotermia parece uma reação dos animais em modelo de choque endotóxico quando a gravidade da inflamação é aumentada [43] e, além disso, a hipotensão também pode ser observada em animais injetados com doses de moderadas a altas de LPS [45, 48]. Utilizando-se do modelo onde a Ta é capaz de dissecar os componentes febris e hipotérmicos da resposta inflamatória [43], nós avaliamos o

efeito da leptina em diferentes doses sobre o desenvolvimento da hipotermia e da febre.

Inicialmente avaliamos o efeito da infusão da leptina em concentrações fisiológicas em ratos privados de alimento recebendo LPS e acondicionados em Ta de 22 °C. Demonstramos que apenas a maior dose de leptina testada (20 µg/kg/h) foi capaz de reduzir a queda na Tc desses animais, além de recuperar mais rapidamente a Tc aos níveis basais em relação ao grupo recebendo apenas salina. Essa dose também modificou a resposta hipotensiva associada ao choque endotóxico nos mesmos tempos de observação da atenuação da hipotermia. Acreditava-se que a hipotensão durante o choque endotóxico era consequência da Tc no sistema cardiovascular. O desenvolvimento de hipotensão e diminuição na frequência cardíaca estavam relacionados com as funções autonômicas da Tc sobre as células [45]. Ao reduzir exageradamente a pressão arterial (diminuindo a perfusão), a hipotermia pode exacerbar a queda na perfusão tecidual durante a sepse. Se esta exacerbação não é completamente compensada pela inibição metabólica que acompanha a hipotermia, a gravidade da hipóxia tecidual será aumentada. Se a perfusão tecidual cai menos que a taxa metabólica durante a hipóxia tecidual, a hipotermia será atenuada [41, 115]. Nosso laboratório recentemente investigou se a inibição da termogênese vista durante o choque endotóxico é uma resposta regulada [67]. O estudo revelou que um agonista adrenérgico β_3 (CL316,243), conhecido por ativar a produção metabólica de calor, foi efetivo em aumentar a utilização de oxigênio em ratos desafiados com LPS (500 µg/kg i.v.), bem como nos animais saudáveis, assim indicando que nem a oferta de oxigênio nem a função mitocondrial foram prejudicadas a ponto de comprometer diretamente o metabolismo aeróbico. Isso nos mostra que a capacidade termogênica é mantida e a termogênese é regulada durante a endotoxemia. No mesmo estudo também foi constatado que a hipotermia não é consequência da hipóxia, mas pode ser resultado de propriedades intrínsecas do sistema imune-neural.

A leptina é comumente descrita na literatura como uma citocina pró-inflamatória e indutora de febre [102, 107, 116]. Por exemplo, experimentos usando animais obesos induzidos pela dieta e, portanto, com níveis suprafisiológicos de leptina, Pohl et al. [102] concluíram que, durante a inflamação sistêmica induzida por uma baixa dose de LPS, a leptina neutralizada por anticorpo reduz a febre e atenua os níveis de IL-6. Nossos dados mostraram, todavia, que, quando colocados em ambiente com Ta

30 °C, ou seja, quando os animais desenvolveram febre, nenhuma das doses de leptina avaliadas tiveram efeito sobre o aumento da Tc, nem mesmo antes da indução do choque endotóxico. Já foi verificado que ratos recebendo anticorpo neutralizante da leptina circulante não desenvolveram febre ou esta esteve atenuada após a injeção de LPS [101, 117]. Alguns trabalhos sugerem que a leptina atua junto com a IL-1 β na indução de febre. Sachot et al (2004) [117] mostraram que a neutralização da leptina em camundongos desafiados com LPS não só atenuou a febre mas também diminuiu a expressão de mRNA de IL-1 β no hipotálamo. Anteriormente, o tratamento de ratos com leptina i.c.v. ou i.p. de maneira dose-dependente resultou na elevação da Tc que esteve diminuída nesses animais quando utilizaram um antagonista para o receptor de IL-1 β [99]. Outro modelo usando anticorpo neutralizante de leptina foi proposto por Koenig et al. (2014) [116]. Neste trabalho, a Ta foi controlada para 28 °C e capaz de revelar a febre em resposta ao LPS 100 μ g/kg em ratos. A neutralização dos níveis de leptina atenuou a febre prolongada. Na maioria dos trabalhos supracitados, os níveis fisiológicos de leptina, quando mensurados, ultrapassam 30 ng/mL, chegando algumas vezes ainda acima de 10 ng/mL naqueles que usam anticorpo neutralizante. No entanto, outros resultados sugerem que a leptina está pouco envolvida durante a resposta febril. Por exemplo, ratos Zucker obesos (*fa/fa*), que têm receptor de leptina não funcional, apresentaram diferenças na resposta febril frente ao LPS quando comparados aos animais magros [104]. Com isso, nossos resultados indicam que o efeito febril da leptina pode estar associado aos altos níveis de leptina administrado nesses estudos supracitados, bem como a utilização de animais deficientes tanto na produção de leptina (*ob/ob*) ou na expressão de seu receptor. Além disso, não temos informação sobre o controle de temperatura em todos esses experimentos e, ainda, muitos desses modelos utilizam injeções sistêmicas de leptina de maneira que o próprio estresse causado pelo manuseio do animal é capaz de elevar a Tc.

Durante o jejum, os níveis de leptina caem e os sinais endócrinos são enviados ao cérebro para iniciar uma resposta adaptativa a esse novo estado energético [118]. Avaliamos doses de leptina capazes de elevar as concentrações plasmáticas da mesma a níveis fisiológicos em animais privados de alimento. No nosso trabalho, a privação alimentar por 24 horas foi suficiente para reduzir os níveis de leptina sem afetar a resposta hipotérmica. Duas das três doses infundidas s.c. elevaram a leptina à concentração plasmática aplicável a indivíduos não obesos [97-98]. Pudemos ver que antes da injeção de LPS, a Tc dos animais privados estava diminuída em até 0,5

°C. Trabalhos anteriores utilizaram-se da privação alimentar para mostrar que a redução da leptina circulante é responsável pela atenuação da febre e diminuição da produção de PGE₂ em ratos [119]. Usando ratos privados de alimento por 48 horas Inoue e Luheshi (2010) [109] mostraram que quando LPS foi injetado em dose baixa (100 µg/kg) ou alta (1000 µg/kg) a febre era atenuada em comparação aos ratos alimentados. Nesse mesmo estudo a reposição de leptina em várias doses intraperitonealmente restaurou a febre durante a inflamação sistêmica e reverteu a hipotermia [109]. Claramente vemos que a maioria desses animais ficaram sem disponibilidade de ração por 48 horas e a hipotermia vista estaria associada ao jejum prolongado. Steiner et al. (2009) [107] usando ratos privados de alimento por 24 horas em Ta controlada infundidos com doses altas de leptina i.v. (100, 250, 1000 e 3500 µg/kg) verificaram que a leptina não aumentou a Tc e nem alterou os níveis de TNF-α e IL-6. A febre nesse modelo só foi observada quando os animais receberam IL-1β. Já Faggioni et al. [110] concluíram que a reposição de leptina em camundongos privados de alimento por 48 horas diminui a produção de TNF-α, e ,assim, a leptina estaria atuando como anti-inflamatória nesses animais.

Nosso modelo mostrou, também, que a concentração de leptina plasmática dos animais que não receberam leptina subcutânea não aumentou em resposta ao LPS durante a hipotermia. Ainda, ratos que receberam LPS em uma Ta 30 °C, a leptina esteve aumentada em relação aos mesmos grupos que desenvolveram hipotermia. Estes animais também tiveram suas doses elevadas às concentrações fisiológicas contrariando, dessa forma, estudos que mostram que a administração de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-1β resultam em crescimento na produção de leptina através da expressão de mRNA e níveis plasmáticos; ou a injeção de LPS em altas doses aumentam a secreção de leptina acima de 100 ng/mL [108, 120].

Um dos efeitos mais conhecidos da leptina está na regulação do apetite [77]. Nas doses testadas que elevaram os níveis de leptina, vimos que apenas a maior dose administrada s.c. foi capaz de reduzir o consumo de ração pelos animais. Além de elevar os níveis de leptina às concentrações plasmáticas, essa foi a única dose capaz de atenuar a hipotermia e a hipotensão durante a inflamação sistêmica.

Nossos resultados indicam que a leptina em níveis fisiológicos pode mudar o perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório na diminuição da expressão de TNF-α e de recuperar a hipotermia e a hipotensão, parâmetros estes que são relacionados com os casos mais graves na sepse [121-122]. Para entender os mecanismos pelos quais

a leptina atenuou a hipotermia e a hipotensão nos nossos experimentos, avaliamos os mediadores solúveis no plasma envolvidos com essas respostas durante a resposta inflamatória. A leptina em concentrações fisiológicas diminuiu a produção *in vivo* de TNF- α após a injeção de LPS. Sabe-se que TNF- α é uma citocina essencial na resposta hipotérmica e hipotensiva. Estudos em ratos usando doses subletais de TNF- α i.v. mostraram que em baixas doses (abaixo de 10 $\mu\text{g/kg}$) após a injeção de LPS, o TNF- α causava febre; quando injetado em doses acima de 200 $\mu\text{g/kg}$ os animais desenvolveram hipotermia de amplitude -1,1 °C [50]. Utilizando anticorpo para neutralizar o TNF- α circulante, Kozak et al. (1995) [51] mostraram que em camundongos que receberam LPS 2,5 mg/kg e anti-TNF- α , a fase hipotérmica da inflamação foi bloqueada sendo substituída por febre. Töllner et al. (2000) [52] injetaram uma dose alta de LPS em animais que desenvolveram uma hipotermia de magnitude -1,5 °C e duração de 5 horas. Essa dose ainda levou à alta secreção de TNF- α no plasma e na cavidade peritoneal. Ao bloquearem TNF- α , houve uma rápida recuperação da hipotermia induzida pelo LPS e os ratos desenvolveram febre. Esse mecanismo da influência do TNF- α sobre a febre foi demonstrado quando Klir et al. (1995) [123] injetando 0,20 μg de TNF- α recombinante i.c.v. ou 1 $\mu\text{g/kg/h}$ i.p. viram que a febre induzida por LPS modificou somente quando o TNF- α era administrado sistemicamente. Podemos concluir, então, que o TNF- α medeia a alteração observada na hipotermia e hipotensão em decorrência da administração sistêmica de leptina de maneira independentes.

Há outros estudos que relatam a leptina como anti-inflamatória. Por exemplo, a deficiência de leptina leva a uma alta taxa de mortalidade em camundongos deficientes na produção da mesma durante a sepse. Mostrou-se que a reposição de leptina periféricamente diminuiu a mortalidade desses animais. A deficiência na leptina ainda diminui a eficiência na eliminação do patógeno e o recrutamento de neutrófilos e a administração diretamente no sistema nervoso central aumenta a taxa de sobrevivência em camundongos *ob/ob* [111]. Ratos deficientes no receptor de leptina submetidos ao modelo de choque endotóxico com T_a controlada desenvolveram uma resposta hipotérmica prolongada assim como o aumento no plasma na produção de TNF- α [106]. Desse modo, o receptor de leptina pareceu essencial no retorno da hipotermia; esses resultados incluíram ainda a ativação do eixo HPA e inibição da produção do TNF e supressão de NF- κB [106]. O efeito anti-inflamatório da leptina já foi demonstrado em modelo experimental de pancreatite quando foi observado uma

diminuição na produção de IL1- β e TNF- α [124-125] e redução de TNF- α e IL1- β em primatas tratados com endotoxina [126]. Contudo, todos esses estudos utilizaram modelos envolvendo animais geneticamente modificados ou anticorpo neutralizante de leptina ou mesmo leptina em doses suprafisiológicas.

Testamos a hipótese de que a leptina agiria diretamente sobre mecanismos centrais capazes de promover a síntese de mediadores e regular a temperatura corporal. Mais especificamente, de que a leptina poderia exercer uma ação permissiva sobre a ativação imune do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que por sua vez, suprimem a síntese de TNF- α que está relacionado com a hipotermia e gravidade da doença. O eixo HPA desempenha um papel regulador durante a inflamação sistêmica. Os mediadores inflamatórios produzidos pelas células do sistema imunológico estimulam a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelas células do núcleo paraventricular do hipotálamo. Isso aumenta a expressão de ACTH pela hipófise que estimula a síntese e liberação de glicocorticoides pelas adrenais [127]. Glicocorticoides têm efeito imunomodulatórios em várias células, causando mudança no padrão de produção de citocinas [128]. Nas células do sistema imune inato, os glicocorticoides promovem a inibição da transcrição de genes como NF- κ B, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . No nosso modelo, a leptina em concentrações fisiológicas nos animais submetidos ao modelo de choque endotóxico não alterou a produção de corticosterona.

Avaliamos, ainda, o efeito direto da leptina em uma dose baixa [112] sobre o SNC em ratos Wistar. É possível que a ação da leptina sobre a atenuação da hipotermia, quando esta é administrada em doses fisiológicas durante o choque endotóxico induzido em ratos, resulte de um mecanismo ao nível do sistema nervoso central, provavelmente nos núcleos hipotalâmicos ricos em receptores de leptina, interferindo na produção *in vivo* de mediadores inflamatórios ou na responsividade de vias termorregulatórias às ações desses mediadores. Nossos resultados não esclarecem o efeito direto da leptina sobre a atenuação da hipotermia. De acordo com os experimentos de infusão periférica, essa ação prevalece após 100 minutos da injeção de LPS. No nosso delineamento experimental, optamos por avaliar a produção de mediadores inflamatórios nesse tempo, com a finalidade de investigar se a leptina 1 μ g/kg/h modularia a produção de TNF- α . No entanto, nenhuma alteração foi observada sobre a secreção de TNF- α e IL-10. Para esclarecer se a dose de leptina 1 μ g/kg/h infundida diretamente no SNC seria uma dose mínima capaz de exercer seu

efeito de saciedade e, portanto, estaria biologicamente ativa, fizemos testes de ingestão alimentar nos ratos privados de alimento. Observamos que a dose administrada diminuiu o consumo de alimento por esses animais. Contudo, esse efeito só pôde ser melhor observado após a privação alimentar, pois para revelarmos o efeito fisiológico da leptina no SNC foi necessário reduzi-la no plasma a níveis basais nesses animais.

A deficiência da leptina está associada com a mudança na produção de citocinas que regulam o sistema imune inato [113]. Isso se deve ao fato da presença de receptores LRB na membrana de leucócitos. Assim como os membros da família da IL-6, a leptina atua em seus receptores através da cascata de sinalização via JAK/STAT que regula a produção de citocinas e a resposta imune inata [129-130]. Diante disso, nosso trabalho também avaliou o efeito da leptina em diferentes concentrações (1, 10, 25 e 100 ng/mL) durante a produção de citocinas em macrófagos peritoneais e alveolares em cultura com LPS. Observamos que houve um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β por essas células exclusivamente pela ação do LPS e, quando adicionada à cultura, a leptina não alterou a produção desses mediadores. Verificamos ainda que as concentrações fisiológicas de leptina utilizadas não modularam a síntese de TNF- α , IL-1 β e IL-10 nos macrófagos não estimulados. Estudos em roedores com deficiência na produção de leptina (*ob/ob*) ou na expressão de seu receptor (*db/db*) revelaram alterações nas funções dos macrófagos e na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, avaliando a capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos *ob/ob*, Mancuso et al. (2002) [131] observaram que os macrófagos desses animais reduzem a capacidade de eliminar a bactéria e esta atividade foi recuperada quando adicionaram leptina 500 ng/mL na cultura. Além disso, esses animais morrem mais rápido em comparação àqueles que produzem leptina. Loffreda et al. (1998) [100] mostraram que a leptina na dose de 500 ng/mL aumentou a secreção de TNF- α e IL-6 de macrófagos em cultura com LPS 1 μ g/mL. Nesse mesmo estudo, camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) produziram menos TNF- α e IL-6 após injeção de LPS quando comparados ao grupo selvagem. Nossos resultados sugeriram, então, que a ação da leptina em doses fisiológicas e até mesmo suprafisiológicas na modulação da sinalização criogênica não ocorreria via mecanismos periféricos por efeito direto sobre macrófagos peritoneais e alveolares. Sabendo-se que outras células do sistema imune também sofre a ação da leptina via seu receptor, mesmo em menor quantidade,

faz-se necessário então investigar os mecanismos pelos quais a leptina regula a produção de TNF- α periféricamente.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados, até o momento, demonstraram que a leptina em concentrações fisiológicas não modula o componente febrigênico, mas é capaz de conter o desenvolvimento da hipotermia e hipotensão, que são relacionados aos casos mais graves de inflamação sistêmica. Esse efeito foi visto pela regulação da produção de TNF- α . De fato, essa modulação anti-inflamatória exercida pela leptina não ocorre diretamente via mecanismos centrais, e possivelmente via mecanismos periféricos. No entanto, podemos sugerir que outras células na periferia que contêm receptores de leptina, e não as células do sistema imune aqui avaliadas (macrófagos peritoneais e alveolares), estão envolvidas nesta regulação.

REFERÊNCIAS*

1. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. JAMA. 1995;274(12):968-74.
2. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 2001;345(19):1368-77.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001;29(7):1303-10.
4. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. Crit Care Med. 2008;36(3):754-61.
5. O'Brien JM, Jr., Ali NA, Abernethy SK, Abraham E. Sepsis. Am J Med. 2007;120(12):1012-22.
6. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care. 2004;8(4):R251-60.
7. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. Crit Care Med. 1995;23(10):1638-52.
8. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med. 2002;28(2):108-21.
9. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 2001;2(8):675-80.
10. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2005;6(5):373-84.
11. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783-801.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

12. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
13. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*. 2002;168(9):4701-10.
14. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):318-28.
15. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*.16:74-104.
16. Roberts WW. Differential thermosensor control of thermoregulatory grooming, locomotion, and relaxed postural extension. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;525:363-74.
17. Fuller A, Dawson T, Helmuth B, Hetem RS, Mitchell D, Maloney SK. Physiological mechanisms in coping with climate change. *Physiol Biochem Zool*. 2010;83(5):713-20.
18. Gordon CJ. Response of the thermoregulatory system to toxic insults. *Front Biosci (Elite Ed)*.2:293-311.
19. Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(1):R37-46.
20. 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.
21. 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.
22. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-52.
23. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
24. Zhang W, Bi S. Hypothalamic Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Homeostasis. *Front Endocrinol*.6:136.
25. Morrison SF, Madden CJ. Central nervous system regulation of brown adipose tissue. *Compr Physiol*.4(4):1677-713.
26. 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.

27. 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.
28. Shibasaki M, Crandall CG. Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:685-96.
29. Robertshaw D. Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(2):664-8.
30. Fuller A, Dawson T, Helmuth B, Hetem RS, Mitchell D, Maloney SK. Physiological mechanisms in coping with climate change. *Physiol Biochem Zool*. 83(5):713-20.
31. Romanovsky AA, Simons CT, Kulchitsky VA. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol*. 1998;275(1 Pt 2):R323-31.
32. Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci*. 15(8):1088-95.
33. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol*. 15(6):335-49.
34. Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, et al. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol*. 2006;4(9):e284.
35. Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci*. 2004;9:1977-93.
36. 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.
37. Cao C, Matsumura K, Shirakawa N, Maeda M, Jikihara I, Kobayashi S, et al. Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. *Eur J Neurosci*. 2001;13(9):1781-90.
38. Rummel C, Matsumura K, Luheshi GN. Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Res Bull*. 86(5-6):319-25.
39. Kluger MJ, Kozak W, Conn CA, Leon LR, Soszynski D. Role of fever in disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;856:224-33.
40. Small PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Sande MA. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun*. 1986;52(2):484-7.
41. Romanovsky AA, Szekely M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses*. 1998;50(3):219-26.

42. Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.* 1991;71(1):93-127.
43. Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J Neurosci.* 2006;23(12):3359-67.
44. Fonseca MT, Rodrigues AC, Cezar LC, Fujita A, Soriano FG, Steiner AA. Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting and non-terminal response. *Journal of applied physiology.* 2016:jap 00004 2016.
45. Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, et al. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 302(12):R1372-83.
46. 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.
47. 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.
48. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Akulich NV, Koulchitsky SV, Simons CT, Sessler DI, et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 2):R244-53.
49. Romanovsky AA. Do fever and anapyrexia exist? Analysis of set point-based definitions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R992-5.
50. Bibby DC, Grimble RF. Temperature and metabolic changes in rats after various doses of tumour necrosis factor alpha. *J Physiol.* 1989;410:367-80.
51. 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.
52. 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. *Pflügers Arch.* 2000;440(6):925-32.
53. 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.
54. 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.* 298(6):R1512-21.

55. Dogan MD, Ataoglu H, Akarsu ES. Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. *Brain Res Bull.* 2002;57(2):179-85.
56. 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.
57. 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.* 28:188-95.
58. Romanovsky AA, Shido O, Sakurada S, Sugimoto N, Nagasaka T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 2):R693-703.
59. Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Crit Care Med.* 1999;27(4):699-707.
60. Clemmer TP, Fisher CJ, Jr., Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. *Crit Care Med.* 1992;20(10):1395-401.
61. Peres Bota D, Lopes Ferreira F, Melot C, Vincent JL. Body temperature alterations in the critically ill. *Intensive Care Med.* 2004;30(5):811-6.
62. Ruetten H, Thiernemann 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.
63. Levy B, Mansart A, Bollaert PE, Franck P, Mallie JP. Effects of epinephrine and norepinephrine on hemodynamics, oxidative metabolism, and organ energetics in endotoxemic rats. *Intensive Care Med.* 2003;29(2):292-300.
64. Miura K, Yamanaka S, Ebara T, Okumura M, Imanishi M, Kim S, et al. Effects of nitric oxide scavenger, carboxy-PTIO on endotoxin-induced alterations in systemic hemodynamics in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2000;82(3):261-4.
65. Brackett DJ, Lerner MR, Lacquement MA, He R, Pereira HA. A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on the neutrophil-derived protein CAP37 prevents endotoxin-induced responses in conscious rats. *Infect Immun.* 1997;65(7):2803-11.
66. Romanovsky AA, Shido O, Sakurada S, Sugimoto N, Nagasaka T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. *Am J Physiol.* 1996;270(4):R693-R703.
67. Corrigan JJ, Fonseca MT, Flatow EA, Lewis K, Steiner AA. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. *The Journal of physiology.* 2014;592(Pt 17):3901-16

68. Marx G, Cobas Meyer M, Schuerholz T, Vangerow B, Gratz KF, Hecker H, et al. Hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin maintain plasma volume in a porcine model of septic shock with capillary leakage. *Intensive Care Med.* 2002;28(5):629-35.
69. Holbeck S, Grande PO. Hypovolemia is a main factor behind disturbed perfusion and metabolism in the intestine during endotoxemia in cat. *Shock.* 2002;18(4):367-73.
70. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316(2):129-39.
71. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci.* 2009;54(9):1847-56.
72. Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010;568343.
73. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1953;140(901):578-96.
74. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973;9(4):294-8.
75. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.
76. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
77. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763-70.
78. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):371-9.
79. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;83(7):1263-71.
80. Ge H, Huang L, Pourbahrami T, Li C. Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2002;277(48):45898-903.
81. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):7001-5.
82. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6231-5.

83. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(2):383-7.
84. Kielar D, Clark JS, Ciechanowicz A, Kurzawski G, Sulikowski T, Naruszewicz M. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism*. 1998;47(7):844-7.
85. Chen SC, Kochan JP, Campfield LA, Burn P, Smeyne RJ. Splice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999;19(1-4):245-66.
86. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*. 1996;2(5):585-9.
87. O'Rourke L, Yeaman SJ, Shepherd PR. Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes*. 2001;50(5):955-61.
88. Briscoe CP, Hanif S, Arch JR, Tadayyon M. Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. *Cytokine*. 2001;14(4):225-9.
89. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:537-56.
90. Flak JN, Myers MG, Jr. Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action. *Mol Endocrinol*. 30(1):3-12.
91. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, et al. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2000;423(2):261-81.
92. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382(6588):250-2.
93. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999;22(2):221-32.
94. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
95. Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet*. 2009;10(7):431-42.
96. Steiner AA, Romanovsky AA. Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Prog Lipid Res*. 2007;46(2):89-107.

97. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11):1155-61.
98. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-5.
99. Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS, Rothwell NJ. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):7047-52.
100. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;12(1):57-65.
101. Harden LM, du Plessis I, Poole S, Laburn HP. Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Physiol Behav*. 2006;89(2):146-55.
102. Pohl J, Woodside B, Luheshi GN. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. *Brain Behav Immun*. 2007;22(1):41-7.
103. Koenig S, Luheshi GN, Wenz T, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun*. 2007;22(1):128-38.
104. Ivanov AI, Romanovsky AA. Fever responses of Zucker rats with and without fatty mutation of the leptin receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(1):R311-6.
105. Rosenthal M, Roth J, Storr B, Zeisberger E. Fever response in lean (*Fa/-*) and obese (*fa/fa*) Zucker rats and its lack to repeated injections of LPS. *Physiol Behav*. 1996;59(4-5):787-93.
106. Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, et al. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *FASEB J*. 2004;18(15):1949-51.
107. Steiner AA, Krall CM, Liu E. A reappraisal on the ability of leptin to induce fever. *Physiol Behav*. 2009;97(3-4):430-6.
108. Shapiro NI, Khankin EV, Van Meurs M, Shih SC, Lu S, Yano M, et al. Leptin exacerbates sepsis-mediated morbidity and mortality. *J Immunol*. 2010;185(1):517-24.
109. Inoue W, Luheshi GN. Acute starvation alters lipopolysaccharide-induced fever in leptin-dependent and -independent mechanisms in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(6):R1709-19.
110. Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1781-7.

111. Tschop J, Nogueiras R, Haas-Lockie S, Kasten KR, Castaneda TR, Huber N, et al. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. *J Neurosci.* 2000;20(17):6036-47.
112. Soos S, Balasko M, Jech-Mihalfy A, Szekely M, Petervari E. Anorexic vs. metabolic effects of central leptin infusion in rats of various ages and nutritional states. *J Mol Neurosci.* 2010;41(1):97-104.
113. Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.* 2001;15(14):2565-71.
114. Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 2002;25(3):154-9.
115. Steiner AA, Branco LG. Hypoxia-induced anapnoea: implications and putative mediators. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:263-88.
116. Koenig S, Luheshi GN, Wenz T, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun.* 2014;36:128-38.
117. Sachot C, Poole S, Luheshi GN. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *J Physiol.* 2004;561(Pt 1):263-72.
118. Matarese G. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(1):7-14.
119. Inoue W, Somay G, Poole S, Luheshi GN. Immune-to-brain signaling and central prostaglandin E2 synthesis in fasted rats with altered lipopolysaccharide-induced fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(1):R133-43.
120. Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol.* 1998;274(1 Pt 2):R204-8.
121. Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Ibuprofen in Sepsis Study Group. Crit Care Med.* 1999;27(4):699-707.
122. 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.
123. Klir JJ, McClellan JL, Kozak W, Szelenyi Z, Wong GH, Kluger MJ. Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol.* 1995;268(2 Pt 2):R480-6.
124. Jaworek J, Bonior J, Pierzchalski P, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, et al. Leptin protects the pancreas from damage induced by caerulein overstimulation by modulating cytokine production. *Pancreatol.* 2002;2(2):89-99.

125. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Jaworek J, Konturek PC, Dembinski M, et al. Influence of leptin administration on the course of acute ischemic pancreatitis. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53(4 Pt 2):775-90.
126. Xiao E, Xia-Zhang L, Vulliemoz NR, Ferin M, Wardlaw SL. Leptin modulates inflammatory cytokine and neuroendocrine responses to endotoxin in the primate. *Endocrinology*. 2003;144(10):4350-3.
127. John CD, Buckingham JC. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(1):78-84.
128. Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol*. 2001;169(3):429-35.
129. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6093-6.
130. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(16):8374-8.
131. Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol*. 2002;168(8):4018-24.