

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA LUNA SOARES DE SOUSA

**EFEITOS DA LIRAGLUTIDA, UM ANÁLOGO DE GLP-1, NA RESPOSTA FEBRIL:
MODULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DEPENDENTE DO SEXO**

BRASÍLIA

2026

GABRIELA LUNA SOARES DE SOUSA

EFEITOS DA LIRAGLUTIDA, UM ANÁLOGO DE GLP-1, NA RESPOSTA FEBRIL:
MODULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DEPENDENTE DO SEXO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza.

Brasília

2026

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

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica

Gabriela Luna Soares de Sousa

EFEITOS DA LIRAGLUTIDA, UM ANÁLOGO DE GLP-1, NA RESPOSTA FEBRIL:
MODULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DEPENDENTE DO SEXO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 22 de Janeiro de 2026

Banca Examinadora

Orientador (a) Prof.^a. Dr.^a. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza - Universidade de Brasília/FCTS
(presidente)

Prof.^a. Dr.^a. Haissa Oliveira Brito - Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof.^a. Dr.^a. Dielly Catrina Favacho Lopes Rêgo - Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof.^a. Dr.^a. Djane Braz Duarte- Faculdade de Ciências da Saúde - FS/UnB

Prof.^a. Dr.^a. Maria de Fátima Borin - Faculdade de Ciências da Saúde - FS/UnB

À minha filha Alice,

que me acompanhou desde o ventre em cada passo desta jornada.

Você foi minha força nos dias difíceis, minha luz nas madrugadas de estudo

e o motivo de cada conquista.

Este doutorado é, antes de tudo, por você e para você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem ele nada disso teria acontecido.

À minha filha Alice, que esteve comigo desde de o início, no meu ventre e nunca foi um impeditivo nessa jornada, pelo contrário, é a razão de tudo isso. Obrigada por me inspirar e me dar forças diariamente, por renovar meu ânimo e me lembrar do verdadeiro sentido dessa caminhada. Desejo ser para você cada dia mais um exemplo e um motivo de orgulho.

À minha mãe, Neide, por todo amor, incentivo e força destinados a mim, não apenas nesta etapa, mas em todas as fases da minha vida. Obrigada por ser meu porto seguro e por acreditar em mim sempre.

Ao meu pai, Edson, exemplo de força e perseverança, obrigada por todo apoio e por me ensinar o valor da dedicação e da constância.

Ao meu irmão, Eduardo, por se orgulhar de mim, por estar sempre disposto a ajudar.

Ao meu padrinho Antônio, por todas as conversas, pelo interesse no meu trabalho e por servir também como exemplo de sabedoria e generosidade.

À minha prima Isabela, por todo apoio, conselhos e por demonstrar orgulho em cada conquista.

À minha amiga Érica, por estar presente nos momentos difíceis, oferecendo apoio emocional e me incentivando a seguir firme.

Ao meu noivo, Guilherme, por todo o carinho, amor e orgulho que demonstra diariamente em cada palavra e gesto, pelo interesse genuíno e entusiasmo em acompanhar cada conquista desta jornada, por todos os dias, inclusive aos finais de semana, em que estudamos juntos e tornamos essa caminhada mais leve e especial. Obrigada por dividir comigo essa trajetória, pelo apoio constante, pelas palavras de incentivo e pelo cuidado com a Alice. Sua presença tornou tudo mais leve e possível. Eu não poderia ter escolhido alguém melhor para compartilhar a vida.

Aos meus amigos Susana e Danillo, por compartilharem a rotina intensa de pós-graduação e consultoria no Ministério da Saúde, compreendendo como poucos os desafios dessa dupla jornada.

Às minhas amigas Lúdia, Fernanda, Cássia e Mayara por todo apoio durante esses anos.

Às minhas amigas farmacêuticas Luiza, Tayane, Carla e Patrícia, pela amizade de tantos anos, por nunca se afastarem e por celebrarem comigo cada conquista desde a graduação.

À minha orientadora, professora Fabiane, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte do grupo de febre há oito anos. Agradeço pela confiança, paciência e por sempre me orientar com respeito e carinho. Sua dedicação e exemplo profissional foram fundamentais para minha formação.

Aos amigos dessa jornada acadêmica, Ester, Ana, Sara, Bruna, Débora, Anna, Luana, Vanessa, Larissa e Kelvin, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e pelo apoio constante.

Aos meus chefes, Bruno, Juliana e Antônio, por todo apoio durante o doutorado, pela compreensão e pela redução da carga horária, que foi essencial para a conclusão desta etapa.

A toda a minha família, tias e primos, pela torcida, apoio e entusiasmo ao longo desse processo.

Ao Felipe, por toda ajuda e apoio, especialmente com a Alice.

Aos professores Carine, Aleksander e Paulo, pela colaboração e suporte nos experimentos.

À CAPES, pela bolsa concedida, sem a qual esta conquista não seria possível.

E à Universidade de Brasília, por ter sido minha casa acadêmica nos últimos dez anos, me proporcionando aprendizado, crescimento e convivência com profissionais inspiradores.

“Nada muda se nada mudar. Fazer diferente é acreditar que tudo pode dar certo.”

RESUMO

SOUSA, Gabriela Luna Soares de Sousa. **Efeitos da liraglutida, um análogo de GLP-1, na resposta febril: modulação neuroinflamatória dependente do sexo.** Brasília, 2026. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2026.

A regulação da temperatura corporal (Tc) é mediada por circuitos neurais integrados, nos quais a área pré-óptica do hipotálamo atua como centro de convergência entre sinais térmicos periféricos e respostas autonômicas. Embora a febre desempenhe papel adaptativo na defesa imune, alterações excessivas da temperatura podem comprometer a homeostase. Evidências indicam que a sinalização mediada pelo receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) participa da modulação da Tc em contextos inflamatórios. Diante disso, o presente estudo investigou o efeito da liraglutida (LIRA) sobre a regulação da Tc e a resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas. Para tanto, ratos Wistar machos e fêmeas receberam LPS (50 µg/kg), por via intraperitoneal (i.p.) para indução da febre e, após 60 min, foram tratados com LIRA (0,1; 0,3 e 1.0 mg/kg, i.p.). A Tc foi monitorada por quatro ou seis horas por meio de registradores de temperatura implantados na cavidade peritoneal. A administração de LIRA promoveu redução da Tc tanto em condições basais quanto febris em ambos os sexos, porém os mediadores associados a esse efeito diferiram entre machos e fêmeas. Nos machos, o efeito antipirético da LIRA esteve associado à redução das concentrações hipotalâmicas de prostaglandina E₂ (PGE₂) e à maior ativação da via da JNK após o estímulo inflamatório, acompanhadas por diminuição das concentrações de serotonina (5-HT) após a administração de LPS, tendência que também foi observada em condições basais após o tratamento com LIRA. Nas fêmeas, em contraste, a ação da LIRA foi associada à redução das concentrações plasmáticas de interleucina-6 (IL-6), ao aumento dos níveis hipotalâmicos de 5-HT após a administração de LPS e à diminuição da fosforilação da JNK. Em conjunto, esses resultados demonstram que a LIRA exerce ação antipirética por meio de mecanismos neuroimunes sexo-dependentes, envolvendo a modulação diferencial de prostaglandinas, IL-6, sistema serotoninérgico e da via da JNK. Esses achados evidenciam que machos e fêmeas utilizam estratégias neuroimunes distintas para a integração dos efeitos do GLP-1 na regulação da Tc, reforçando a importância de considerar o sexo biológico na interpretação de respostas neuroinflamatórias e febris e na avaliação farmacológica de agonistas do receptor de GLP-1.

Palavras-chave: Regulação térmica; Febre;; receptor de GLP-1; dimorfismo sexual; serotonina; JNK.

ABSTRACT

SOUSA, Gabriela Luna Soares de Sousa. **Effects of liraglutide, a GLP-1 analog, on the febrile response: sex-dependent neuroinflammatory modulation.** Brasília, 2026. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2026.

Body temperature (T_c) regulation is mediated by integrated neural circuits, in which the preoptic area of the hypothalamus acts as a convergence center for peripheral thermal signals and autonomic responses. Although fever plays an adaptive role in immune defense, excessive alterations in body temperature may compromise homeostasis. Evidence indicates that signaling mediated by the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor participates in the modulation of T_c under inflammatory conditions. Therefore, the present study investigated the effect of liraglutide (LIRA) on T_c regulation and the febrile response induced by LPS in male and female rats. For this purpose, male and female Wistar rats received lipopolysaccharide (LPS, 50 µg/kg, intraperitoneally) to induce fever and, after 60 min, were treated with LIRA (0.1, 0.3, or 1.0 mg/kg, intraperitoneally). T_c was monitored for four or six hours using temperature data loggers implanted into the peritoneal cavity. LIRA administration reduced T_c under both basal and febrile conditions in both sexes; however, the mediators associated with this effect differed between males and females. In males, the antipyretic effect of LIRA was associated with reduced hypothalamic prostaglandin E₂ (PGE₂) levels and increased activation of the JNK pathway following inflammatory stimulation, accompanied by decreased hypothalamic serotonin (5-HT) concentrations after LPS administration, a pattern also observed under basal conditions after LIRA treatment. In females, by contrast, LIRA action was associated with reduced serum interleukin-6 (IL-6) concentrations, increased hypothalamic 5-HT levels after LPS administration, and decreased JNK phosphorylation. Taken together, these results demonstrate that LIRA exerts antipyretic effects through sex-dependent neuroimmune mechanisms involving differential modulation of prostaglandins, IL-6, the serotonergic system, and the JNK signaling pathway. These findings indicate that males and females employ distinct neuroimmune strategies to integrate GLP-1 signaling in T_c regulation, highlighting the importance of considering biological sex in the interpretation of neuroinflammatory and febrile responses and in the pharmacological evaluation of GLP-1 receptor agonists.

Keywords: Thermoregulation; Fever; GLP-1 receptor; sexual dimorphism; serotonin; JNK.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mecanismo neuroimune da indução da febre durante a infecção.....	26
Figura 2: Efeitos do GLP-1 no organismo.....	29
Figura 3: Estrutura da liraglutida comparada ao GLP-1 nativo.....	30
Figura 4: Efeito antipirético da LIRA sobre a febre induzida por LPS em ratos Wistar (estudo piloto).....	43
Figura 5: A LIRA reduz a resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas.....	44
Figura 6: Efeito do pós-tratamento com LIRA no tempo de 4h e a variação da Tc (ΔT).....	46
Figura 7: LIRA atenua o aumento de PGE ₂ hipotalâmica induzido por LPS em ratos machos.....	47
Figura 8: Concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA.....	48
Figura 9: Concentrações de CM• e HbNO periférico após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA.....	49
Figura 10: Níveis hipotalâmicos de serotonina (5-HT) e de seu metabólito 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) após administração de LPS em ratos tratados ou não com liraglutida(LIRA).....	50
Figura 11: Níveis hipotalâmicos de dopamina (DA) e de seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) após administração de LPS em ratos tratados ou não com liraglutida (LIRA).....	51
Figura 12: Concentrações de NA e de seu metabólito di-hidroxifenilglicol (DHPG) no hipotálamo após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA.....	52

Figura 13: Efeitos específicos por sexo da LIRA na fosforilação de JNK hipotalâmica em ratos machos e fêmeas após inflamação sistêmica induzida por LPS.....53

Figura 14: Esquema integrativo dos principais mecanismos centrais envolvidos na atenuação da febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS) após tratamento com liraglutida.....64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético
- 5-HT – Serotonina
- AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
- APO/HA – Área pré-óptica do hipotálamo anterior
- ASC – Área sob a curva
- AVPO – Região pré-óptica anteroventral
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CM• – 3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil
- CMH – 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
- COX-2 – Ciclooxigenase-2
- CP• – 3-carboxi-proxil nitroxila
- DA – Dopamina
- DHPG – Di-hidroxifenilglicol (metabólito da noradrenalina)
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- EP3 – Receptor de prostaglandina E2 tipo 3
- EPM – Erro padrão da média
- ERK – Quinase regulada por sinal extracelular
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ESA – Detector eletroquímico (Coulchem III)
- GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon 1
- GLP-1R – Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1
- HbNO – Hemoglobina nitrosilada
- HPLC-ECD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica
- HVA – Ácido homovanílico
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-6 – Interleucina-6
- IL-10 – Interleucina-10
- i.p. – Intraperitoneal
- JNK – Quinase N-terminal de c-Jun
- KHB – Tampão Krebs-HEPES
- kg – Quilograma

LIRA – Liraglutida

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – Miligrama

mL – Mililitro

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

PGE2 – Prostaglandina E2

POA – Área pré-óptica

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RIPA – Tampão de lise RIPA

RPE – Ressonância paramagnética eletrônica

RPMI – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SAL – Solução salina

SDS/PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TBS-T – Solução Tris-salina tamponada com Tween 20

Tc – Temperatura corporal

TGF β 1 – Fator de crescimento transformador beta 1

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

α – Alfa

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Termorregulação.....	20
2.2. Febre e mediadores relacionados à febre.....	21
2.3. GLP-1 e Liraglutida: aspectos fisiológicos e farmacológicos	28
2.4. Neurotransmissores monoaminérgicos: serotonina, dopamina e noradrenalina e seus metabólitos.....	31
2.5. Vias de Sinalização Inflamatória com ênfase na ativação de JNK.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Geral.....	36
4.2. Específicos.....	36
5. METODOLOGIA.....	37
5.1. Animais.....	37
5.2. Fármacos.....	37
5.3. Implante dos registradores de temperatura e aferição da temperatura corporal.....	37
5.4. Desenho experimental.....	38
5.5. Quantificação de PGE ₂ hipotalâmica por ELISA	38
5.6. Dosagem de IL-6 e IL-10 no soro.....	38
5.7. Quantificação de ERO e HbNO por espectroscopia de RPE.....	39
5.8. Dosagem de neurotransmissores.....	40
5.9. Western blotting para detecção de JNK e fosfo-JNK.....	40
5.10. Análise estatística.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1. LIRA promove redução da Tc tanto em condições basais quanto durante a febre.....	42
6.2. Efeito do tratamento com LIRA sobre a produção hipotalâmica de PGE ₂	46
6.3. Efeito do pós-tratamento com LIRA sobre os níveis circulantes de IL-6 e IL-10.....	47
6.4. Efeito da LIRA na Produção de ERO e HbNO.....	48
6.5. Alterações nos níveis de neurotransmissores.....	49

6.6. Modulação específica por sexo da sinalização de JNK hipotalâmica pela LIRA.....	53
7. DISCUSSÃO.....	55
8. CONCLUSÃO.....	65
9. REFERÊNCIAS.....	64
10. ANEXOS.....	72
10.1 Anexo 1: Aprovação da comissão de ética no uso animal.....	72
10.2 Anexo 2: Artigo publicado.....	73

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da temperatura corporal (T_c) exige um sistema neural altamente especializado, no qual a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA) desempenha papel central como integradora dos sinais térmicos provenientes da periferia e coordenadora das respostas autonômicas que ajustam a produção e a perda de calor (Morrison e Nakamura, 2011). Esse controle preciso sustenta a homeostase térmica e é fundamental para a sobrevivência dos organismos. Dentro desse contexto, a febre emerge como uma reorganização dos limiares termorregulatórios, na qual estímulos infecciosos ou inflamatórios elevam seletivamente os limiares para respostas de resfriamento (vasodilatação, sudorese) enquanto reduzem os limiares para respostas de aquecimento (vasoconstrição, termogênese), deslocando o ponto de equilíbrio para T_c mais elevada (Dinarello, Cannon e Wolff, 1988; Romanovsky, 2007). Embora contribua para o funcionamento eficiente do sistema imunológico, favorecendo a migração celular e a atividade fagocítica, a elevação exagerada da T_c também representa um custo metabólico significativo e pode desencadear danos celulares decorrentes do aumento do consumo energético e da desnaturação de proteínas (Evans, Repasky e Fisher, 2015; Tansey e Johnson, 2015).

A geração da febre resulta da interação entre mediadores periféricos e circuitos hipotalâmicos. Quando administrado sistemicamente, o lipopolissacarídeo (LPS) ativa receptores tipo Toll (TLR4) em células hematopoiéticas desencadeando a liberação de citocinas pirogênicas, notadamente IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Evans, Repasky e Fisher, 2015). O TNF- α atua como mediador pirogênico precoce, sendo rapidamente liberado após a ativação imune periférica e contribuindo para a ativação endotelial, o aumento da permeabilidade vascular e a amplificação da produção subsequente de IL-1 β e IL-6, configurando um papel hierárquico na cascata inflamatória associada à febre (Bradley, 2008; Dinarello, 2004).

Essas citocinas podem atingir o endotélio cerebral na região pré-óptica do hipotálamo e induzir a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2). Esse processo culmina na produção de prostaglandina E_2 (PGE $_2$), a qual se liga ao receptor de PGE $_2$ tipo 3 (EP3) expresso em neurônios termorregulatórios da região pré-óptica anteroventral (AVPO), reorganizando os limiares de ativação independentes de múltiplos circuitos efetores: eleva-se o limiar para respostas de dissipação térmica (vasodilatação cutânea, sudorese), enquanto reduz-se o limiar para respostas de conservação e produção de calor (vasoconstrição periférica, termogênese em tecido adiposo marrom, tremor muscular). Esta modulação diferencial desloca o ponto de

equilíbrio termorregulatório para T_c mais elevada. Paralelamente, mecanismos anti-inflamatórios, entre eles a ação da interleucina-10 (IL-10), modulam essas vias ao inibir sinais pró-inflamatórios e ajustar a produção de prostaglandinas, garantindo que a resposta febril não ultrapasse limites fisiológicos (Blomqvist e Engblom, 2018; Morrison e Nakamura, 2011).

A influência do sexo biológico sobre esses mecanismos tem ganhado destaque. Observações em humanos e modelos animais revelam diferenças sistemáticas no controle térmico entre machos e fêmeas, as quais se manifestam tanto em condições basais quanto em respostas febris (Cai et al., 2016; Yanovich, Ketko e Charkoudian, 2020). Nas fêmeas, hormônios ovarianos modulam diretamente a dinâmica térmica, refletindo-se nas variações cíclicas da T_c (Coelho et al., 2021; Baker, Sibozza e Fuller, 2020). Em modelos experimentais, fêmeas com ciclo estral aleatório exibem respostas febris atenuadas em comparação aos machos, sugerindo que os esteroides ovarianos interferem em vias inflamatórias e termorregulatórias (Brito et al., 2016). Diferenças adicionais são observadas em vias específicas, como a modulação da PGE_2 após o bloqueio da vasopressina, que ocorre seletivamente em machos, indicando que redes neuroimunes envolvidas na febre operam de modo distinto entre os sexos (Pittman et al., 1998).

O peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1) é uma incretina endógena produzida predominantemente pelas células L do intestino em resposta à ingestão de nutrientes, além de ser sintetizado por neurônios do núcleo do trato solitário no tronco encefálico. Para além de seus efeitos clássicos na homeostase glicêmica, o GLP-1 atua no sistema nervoso central modulando circuitos autonômicos, metabólicos e comportamentais, com projeções para regiões hipotalâmicas envolvidas no controle da ingestão alimentar, do gasto energético e potencialmente da termorregulação (Larsen et al., 1997; Holt et al., 2019).

Nas últimas décadas, o uso clínico de agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1R), como a liraglutida (LIRA), expandiu-se significativamente, especialmente no tratamento de diabetes tipo 2 e obesidade. A crescente exposição de pacientes a esses fármacos torna essencial compreender seus efeitos para além do controle metabólico tradicional. Há evidências de que a LIRA exerça ações anti-inflamatórias e neuroprotetoras em diferentes condições patológicas, como osteoartrite e lesões hepáticas por isquemia e reperfusão (Meurot et al., 2022; Li et al., 2022). Contudo, a relação entre a via de sinalização do GLP-1R e a regulação da temperatura ainda não foi esclarecida. Estudos

iniciais indicam que o bloqueio central do GLP-1R intensifica a febre induzida por LPS, sugerindo que essa via pode participar do controle térmico (Rinaman e Comer, 2000).

Apesar desses indícios, pouco se sabe sobre como a LIRA atua diretamente durante a inflamação sistêmica e se suas ações antipiréticas diferem entre machos e fêmeas. Neste estudo, buscou-se esclarecer essas questões, avaliando os efeitos da LIRA sobre a Tc em ratos de ambos os sexos submetidos à febre induzida por LPS. Além disso, investigamos se o fármaco interfere na produção de mediadores inflamatórios e oxidativos, tanto em nível sistêmico quanto hipotalâmico e avaliamos suas ações sobre neurotransmissores relevantes à modulação térmica, como serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA), além de seus metabólitos. Por fim, examinamos a fosforilação de quinase N-terminal de c-Jun (JNK) no hipotálamo, com o objetivo de identificar possíveis bases moleculares sexo-dependentes associadas à sinalização do GLP-1 durante a resposta febril.

Os achados deste trabalho originaram um manuscrito científico elaborado pela autora e colaboradores, referenciado como Sousa et al. (2025).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERMOREGULAÇÃO

Do ponto de vista fisiológico, a regulação da temperatura corporal baseia-se no conceito de “ponto de equilíbrio” termorregulatório, definido como o valor de referência da Tc defendido ativamente pelo sistema nervoso central. Alterações nesse ponto determinam respostas autonômicas e comportamentais que visam restaurar a Tc para o valor considerado adequado pelo organismo (Romanovsky, 2007; Morrison e Nakamura, 2019).

A APO/HA desempenha papel crucial na regulação da Tc, monitorando-a constantemente e iniciando respostas para mantê-la dentro de uma faixa normal. Isso ocorre porque a APO é um centro integrador, recebendo informações de termorreceptores localizados em todo o corpo, incluindo a pele, órgãos internos e órgãos centrais, que monitoram a temperatura ambiente e interna. Se a temperatura estiver fora da faixa considerada normal, a APO inicia respostas efetoras fisiológicas para restaurar o equilíbrio térmico (Fernández-Peña et al, 2023).

Quando a Tc aumenta, os neurônios sensíveis ao calor presentes na região pré-óptica anteroventral (AVPO), detectam esse aumento e desencadeiam mecanismos para resfriar o corpo. Isso inclui a ativação do sistema de sudorese para a produção de suor, que ajuda na dissipação do calor por meio da evaporação. Além disso, ocorre vasodilatação periférica, aumentando o fluxo sanguíneo para a superfície da pele e promovendo a perda de calor.

Por outro lado, se a Tc diminui, a APO desencadeia respostas para aumentar a produção de calor. Isso pode envolver a contração dos vasos sanguíneos periféricos para reduzir a perda de calor pela pele, bem como o aumento na produção de calor mediado ou não por tremores.

As vias eferentes que irão controlar os termoefetores se dividem em três categorias: termogênica, vasomotora e perda de calor por evaporação. Essas vias são sobrepostas e envolvem uma saída inibitória da APO que atinge os neurônios hipotalâmicos. Os neurônios promotores da termogênese do hipotálamo dorso medial ativam neurônios pré-motores na área da rafe que enviam impulsos excitatórios descendentes para os neurônios espinhais (Madden e Morrison, 2019).

Diferenças sexuais na Tc são documentadas tanto em humanos quanto em modelos animais. Em fêmeas, a Tc exibe flutuações características ao longo do ciclo ovariano, evidenciando que hormônios sexuais modulam ativamente a homeostase térmica (Yang et al, 2007; Baker, Sibozza e Fuller, 2020; Fernández-Peña et al, 2023).

Entre os hormônios gonadais, a progesterona exerce papel importante na elevação da Tc. Os hormônios sexuais influenciam a termorregulação através de ação direta sobre neurônios da área pré-óptica (POA) hipotalâmica, onde receptores para progesterona, estrogênio e testosterona são amplamente expressos (Baker, Sibioza e Fuller, 2020; Fernández-Peña et al, 2023).

A progesterona atua centralmente, deslocando o ponto de equilíbrio termorregulatório no hipotálamo e resultando em elevação da Tc defendida, fenômeno responsável pela fase hipertérmica característica da fase lútea do ciclo menstrual. Já os estrogênios e a testosterona participam predominantemente da regulação periférica das respostas termorregulatórias, modulando a sensibilidade e magnitude das respostas efetoras frente a variações da temperatura ambiente (Sanches-Alavez, Alboni e Conti, 2011; Fernández-Peña et al, 2023).

2.2 FEBRE E MEDIADORES RELACIONADOS À FEBRE

A febre é uma resposta fisiológica frequente em condições infecciosas e inflamatórias. O termo deriva do latim *febris*, que significa "calor", enquanto piroxia tem origem no grego e remete a "fogo" ou "febre". Embora alguns autores utilizem essas denominações como sinônimos, outros estabelecem distinção conceitual: febre refere-se especificamente ao aumento da Tc resultante da ação de pirogênios que deslocam o ponto de equilíbrio termorregulatório no hipotálamo (Zimmerman e Hanania, 2005; Romanovsky, 2006).

Tradicionalmente, a febre é definida com base em limites numéricos arbitrários de temperatura. No entanto, sob perspectiva fisiológica, caracteriza-se mais precisamente como elevação da Tc secundária ao deslocamento do ponto de equilíbrio termorregulatório central, no qual o organismo passa a defender ativamente uma Tc mais elevada (Liddle et al., 2023). Esse deslocamento do ponto de equilíbrio é acompanhado pela ativação coordenada de mecanismos efetores autonômicos e comportamentais, que incluem vasoconstrição periférica, termogênese no tecido adiposo marrom, tremor muscular e mudanças comportamentais de busca por calor.

Conceitualmente, é importante distinguir febre de hipertermia. Enquanto a febre decorre do deslocamento ativo do ponto de equilíbrio termorregulatório hipotalâmico mediado por pirogênios endógenos, a hipertermia resulta da incapacidade dos mecanismos de dissipação de calor em lidar com uma carga térmica excessiva, sem alteração do ponto de equilíbrio central (Romanovsky, 2006; Tansey e Johnson, 2015).

De forma complementar, a hipotermia corresponde à redução da Tc central abaixo da faixa fisiológica, podendo resultar tanto de exposição ambiental ao frio quanto de respostas reguladas do sistema nervoso central em contextos patológicos, como sepse grave, choque e

trauma, nas quais ocorre um deslocamento do ponto de equilíbrio termorregulatório para valores mais baixos (Romanovsky et al., 2005; Sessler, 2001).

Estudos indicam que um aumento de 1 a 4°C na Tc durante a febre pode estar associado à melhoria da sobrevivência e à resolução de infecções. Durante a febre, há um aumento nos mecanismos de proteção imunológica e na defesa contra patógenos. As citocinas pirogênicas produzidas durante a febre não só desencadeiam a elevação da temperatura, mas também operam localmente para orquestrar a imunidade nos tecidos infectados. Esse aumento controlado na Tc parece potencializar a resposta imunológica, contribuindo para a eficácia do combate contra agentes infecciosos. Dessa forma, em determinados contextos, a febre pode desempenhar um papel crucial na promoção da defesa do organismo contra infecções (Evans, Repasky e Fisher, 2015; Earn, Andrews e Bolker, 2014).

Entretanto, a febre, principalmente quando prolongada, e em temperaturas extremas pode causar riscos à saúde, inclusive, podendo afetar o metabolismo cerebral causando aumento no consumo de oxigênio, acidose e maior liberação de óxido nítrico (NO), um mediador do dano oxidativo (Zawadzka, Szmuda, e Mazurkiewicz-Bełdzińska, 2017). Além disso, temperaturas acima de 42°C podem ocasionar citotoxicidade com desnaturação de proteínas e síntese prejudicada de DNA, levando a comprometimento neuronal e falência de órgãos (Tansey e Johnson, 2015).

Apesar desses riscos potenciais, a febre persiste como resposta evolutivamente conservada, o que sugere benefícios adaptativos significativos. A indução e a manutenção da febre envolvem a interação entre o sistema imunológico inato e os circuitos neuronais dos sistemas nervoso central e periférico (Evans, Repasky e Fisher, 2015). Esse processo caracteriza um exemplo de comunicação neuroimune, no qual sinais inflamatórios periféricos são traduzidos em respostas neurais centrais, configurando um componente de neuroinflamação funcional associado ao controle da Tc.

A inflamação pode ser definida como uma resposta biológica coordenada do organismo frente a agentes infecciosos ou lesão tecidual, envolvendo mediadores celulares e humorais. No contexto da resposta febril, destaca-se a interseção entre inflamação sistêmica periférica e neuroinflamação, na qual sinais imunológicos periféricos são traduzidos em respostas neurais no sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo (Dinarello, 2004; Evans, Repasky e Fisher, 2015).

O sistema imunológico detecta as infecções por meio da ligação de padrões moleculares associados a patógenos a receptores de reconhecimento de patógenos como os receptores Toll-like (TLR) que são expressos em células imunes inatas (Evans, Repasky e

Fisher, 2015). A ativação de TLRs, particularmente do TLR4 pelo LPS, desencadeia cascatas de sinalização intracelulares dependentes dos adaptadores MyD88 e TRIF, culminando na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- κ B e AP-1.

A indução experimental da febre é frequentemente realizada pela administração sistêmica de LPS, componente da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. Sabe-se que a administração de LPS desencadeia uma resposta inflamatória aguda, simulando o que aconteceria durante uma infecção bacteriana. O LPS ativa os TLRs expressos em macrófagos, células dendríticas e outras células do sistema imunológico inato, levando à liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas pirogênicas, sendo as principais o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6 (Dinarello, 2004; Evans, Repasky e Fisher, 2015).

O aumento da produção dessas citocinas inicia uma cascata de eventos que culmina na ativação de circuitos neuronais termorregulatórios no hipotálamo. Conforme descrito anteriormente, essas citocinas induzem a expressão de COX-2 no endotélio cerebral, resultando na produção de PGE₂ (Saper, Romanovsky e Scammell, 2012; Blomqvist e Engblom, 2018). A PGE₂, ao ligar-se a receptores EP3 em neurônios da AVPO, desloca o ponto de equilíbrio termorregulatório (Romanovsky, 2006; Evans, Repasky e Fisher, 2015). Os neurônios hipotalâmicos então acionam mecanismos efetores autonômicos para elevar a T_c: vasoconstrição periférica reduz a perda de calor, enquanto a termogênese no tecido adiposo marrom e o tremor muscular promovem a produção ativa de calor (Morrison e Nakamura, 2011; Evans, Repasky e Fisher, 2015). O modelo de febre induzida por LPS constitui, assim, ferramenta experimental fundamental para investigar os mecanismos moleculares e celulares da resposta febril, permitindo estudar as vias de indução e regulação da febre e identificar potenciais alvos terapêuticos para modulação da resposta febril em condições patológicas (Romanovsky, 2006; Saper, Romanovsky e Scammell, 2012).

A manutenção da febre ao longo do tempo depende da persistência da sinalização COX-2/mPGES-1/PGE₂ no sistema nervoso central e da produção sustentada de citocinas pirogênicas, especialmente IL-1 β e IL-6, que prolongam a ativação dos circuitos termorregulatórios hipotalâmicos durante a fase tardia da resposta febril (Romanovsky, 2006; Saper, Romanovsky e Scammell, 2012).

A IL-6 é produzida em resposta a infecções e lesões teciduais, contribuindo para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunológicas. A síntese desregulada de IL-6 está associada a diversas doenças imunológicas, incluindo artrite reumatoide e outras condições inflamatórias crônicas (Tanaka, Narazaki e Kishimoto, 2014).

No contexto da febre, a IL-6 exerce papel central como mediador pirogênico. Diversos tipos celulares no sistema nervoso central, incluindo astrócitos, células microgliais e neurônios, são capazes de sintetizar IL-6 em resposta a estímulos inflamatórios locais (Benveniste et al., 1990). Além disso, a IL-6 atua como elo fundamental entre a resposta imune periférica e a ativação dos circuitos termorregulatórios centrais, operando por meio da via COX-2/PGE₂ para alterar o ponto de equilíbrio térmico.

Evidências experimentais confirmam o papel pirogênico da IL-6, uma vez que a administração intravenosa ou intracerebroventricular de IL-6 provoca elevação da Tc central em roedores (LeMay, Vander e Kluger, 1990). Além disso, a IL-6 apresenta efeitos citoprotetores durante o estresse térmico: camundongos pré-tratados com IL-6 antes da exposição ao calor extremo demoram mais para atingir 42,4°C, apresentam menor dano orgânico e redução na liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (Phillips et al., 2015). Esses resultados indicam que, além de sua função na indução da febre, a IL-6 está envolvida em mecanismos adaptativos que protegem o organismo contra lesão térmica excessiva.

O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que exerce efeitos pleiotrópicos em diversos tipos celulares e desempenha papel crítico na patogênese de doenças inflamatórias. A administração direta de TNF- α induz resposta febril, confirmando sua atividade pirogênica (Bradley, 2008; Evans, Repasky e Fisher, 2015).

Existe uma relação bidirecional entre Tc e produção de citocinas. Estudos experimentais demonstram que a elevação da Tc de camundongos da faixa basal (36,5-37,5°C) para a faixa febril (39,5-40°C), aumenta os níveis circulantes de TNF- α (aumento de 4,1 vezes), IL-6 (aumento de 2,7 vezes) e altera a cinética de expressão de IL-1 β em resposta ao desafio com LPS (Jiang et al., 1999).

Esses dados sugerem um mecanismo de retroalimentação positiva no qual as citocinas pirogênicas induzem febre que, por sua vez, potencializa a produção dessas mesmas citocinas. Esse circuito de amplificação pode ser vantajoso ao intensificar a resposta imune durante infecções (Jiang et al., 1999).

A IL-10, ao contrário da IL-6 e TNF- α , que são citocinas pró-inflamatórias, é reconhecida por seu potencial anti-inflamatório e desempenha papel importante na regulação da resposta imune durante a defesa do hospedeiro, em distúrbios autoimunes, doenças inflamatórias e no câncer (Wang et al, 2019).

Evidências experimentais demonstram que a temperatura febril exerce efeitos modulatórios sobre a inflamação. Em modelo murino de artrite induzida por colágeno, camundongos expostos a hipertermia na faixa febril apresentaram menor dano articular,

correlacionado com redução nos níveis séricos de TNF e aumento da produção de IL-10 nas articulações inflamadas (Lee et al., 2015). Esses achados sugerem que mudanças estratégicas na temperatura contribuem para um mecanismo bioquímico de retroalimentação negativa que protege os tecidos contra danos decorrentes da liberação excessiva de citocinas após infecção (Evans, Repasky e Fisher, 2015). Esse equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é determinante para o curso da resposta febril. Durante a fase de indução da febre, quando há predominância de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), essas atuam sobre o endotélio cerebral aumentando a síntese de COX-2, enzima responsável pela oxidação do ácido araquidônico para produção de PGE₂ (Evans, Repasky e Fisher, 2015).

A PGE₂ constitui o principal mediador pirogênico da febre. Produzida pelas células endoteliais vasculares cerebrais em resposta a citocinas, a PGE₂ integra sinais aferentes provenientes de citocinas pirogênicas geradas em resposta a estímulos patogênicos com sinais eferentes envolvendo neurotransmissores que elevam a Tc central (Evans, Repasky e Fisher, 2015). A PGE₂ é sintetizada tanto periféricamente quanto centralmente durante a resposta febril. Na periferia, a produção de PGE₂ ocorre precocemente, antes mesmo da detecção de citocinas circulantes, por células hematopoiéticas após ativação de TLR4 pelo LPS. A PGE₂ produzida periféricamente atravessa a barreira hematoencefálica, enquanto a PGE₂ produzida localmente no cérebro por células endoteliais vasculares integra os sinais pirogênicos (Evans, Repasky e Fisher, 2015).

A indução da febre por LPS depende da ligação da PGE₂ aos receptores EP3 expressos por neurônios termorreguladores na AVPO. A resposta febril em animais endotérmicos envolve múltiplos mecanismos efetores: liberação de norepinefrina que aumenta a termogênese no tecido adiposo marrom e induz vasoconstrição nas extremidades para reduzir perda passiva de calor; e sinalização através da acetilcolina que estimula a musculatura a converter energia química armazenada em energia térmica, aumentando as taxas metabólicas gerais (Evans, Repasky e Fisher, 2015).

O mecanismo de indução de febre durante a infecção é demonstrado na **Figura 1**.

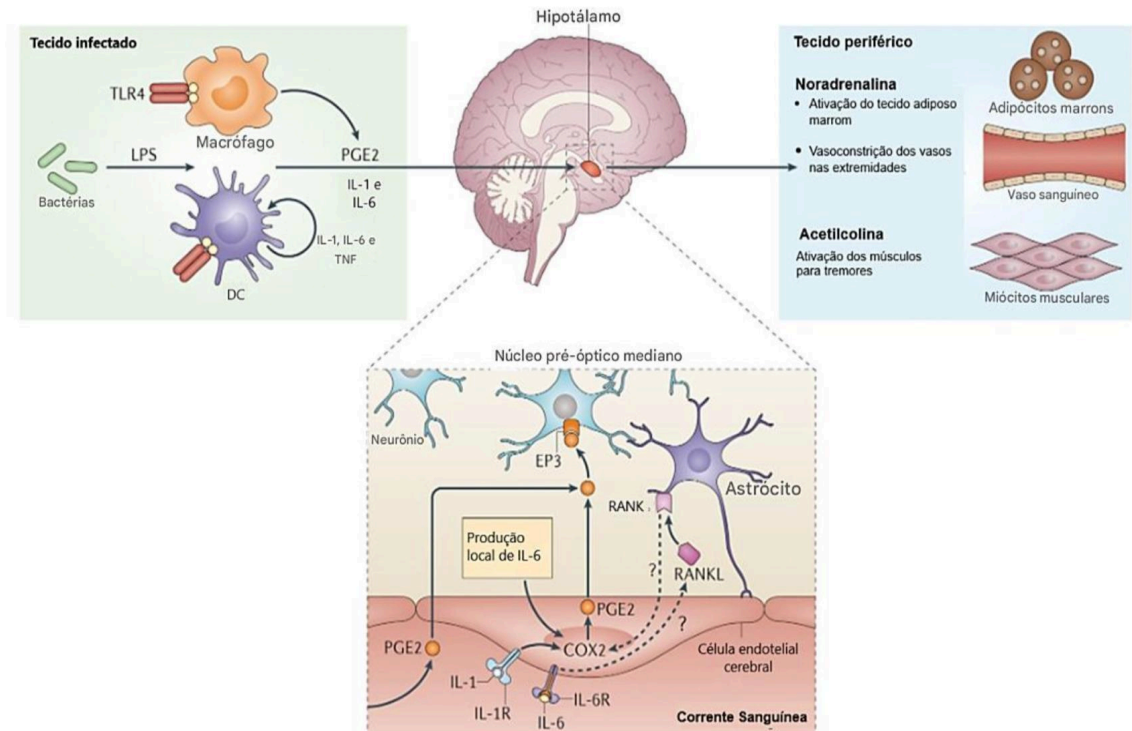


Figura 1. Mecanismo neuroimune da indução da febre durante a infecção.

Componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), ativam receptores Toll-like (TLR4) em células do sistema imune inato, promovendo a liberação de citocinas pirogênicas (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Essas citocinas atuam sobre o endotélio cerebral na região pré-óptica do hipotálamo, induzindo a expressão de COX-2 e a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂). A PGE₂ liga-se a receptores EP3 em neurônios da área pré-óptica anteroventral (AVPO), deslocando o ponto de equilíbrio termorregulatório e ativando respostas eferas autonômicas que elevam a temperatura corporal.

Fonte: Adaptado de Evans, Repasky e Fisher (2015).

Outras classes de mediadores relevantes na resposta febril são as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais desempenham papel ativo na modulação da inflamação sistêmica e central associada à febre. As ERO são moléculas altamente reativas derivadas do metabolismo do oxigênio, cuja produção é intensificada durante estados inflamatórios e infecciosos, particularmente em condições de estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração dessas espécies e a capacidade antioxidante celular (Wright et al., 1994; Valko et al., 2007; Silva e Gonçalves, 2010).

Durante a resposta inflamatória, as ERO não apenas representam subprodutos do metabolismo celular, mas também atuam como segundos mensageiros intracelulares, capazes de ativar vias de sinalização pró-inflamatórias, como NF- κ B e MAPKs, favorecendo a

expressão de citocinas pirogênicas, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como a indução da COX-2 e a consequente produção de PGE₂, principal mediador da febre no sistema nervoso central (Valko et al., 2007; Evans et al., 2015).

Nesse contexto, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a resposta febril induzida por LPS está associada a um aumento significativo na produção de ERO em tecidos periféricos e centrais, incluindo fígado, tecido adiposo marrom e hipotálamo, sugerindo um papel dessas espécies tanto na amplificação periférica da inflamação quanto na modulação central dos circuitos termorregulatórios (Gomes et al., 2018).

As espécies reativas de nitrogênio compreendem compostos que contêm nitrogênio reativo em sua estrutura, como o NO, o peroxinitrito e o óxido nitroso. O NO, sintetizado principalmente pela isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) durante processos inflamatórios, apresenta papel dual na resposta febril. Evidências experimentais indicam que a produção aumentada de NO contribui para a elevação da Tc induzida por LPS, uma vez que o bloqueio farmacológico da sua síntese atenua a resposta febril em modelos animais (Perotti et al., 1999; Wen; Ribeiro; Zhang, 2011).

Além disso, o excesso de NO pode levar ao desenvolvimento de estresse nitrosativo, caracterizado pela formação de espécies altamente reativas, como o peroxinitrito, capazes de promover oxidação e nitratação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, intensificando o dano celular durante a inflamação sistêmica (Kumar; Singh; Bhardwaj, 2017). Como mecanismo de proteção, o organismo dispõe de sistemas de tamponamento do NO circulante, destacando-se a interação do grupo heme da hemoglobina com o NO, formando a hemoglobina nitrosilada (HbNO) (Dikalov e Fink, 2005).

A quantificação de HbNO no sangue periférico por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) constitui uma ferramenta sensível para a avaliação indireta da biodisponibilidade sistêmica de NO e do grau de estresse nitrosativo associado à resposta febril, permitindo a correlação entre a produção de ERN e alterações fisiológicas da Tc (Hall e Buettner, 1996; Hogg, 2010; Gomes, 2022). Nesse contexto, a avaliação de marcadores, como a HbNO, fornece uma interface mecanística entre inflamação sistêmica, estresse nitrosativo e alterações termorregulatórias observadas durante a resposta febril.

2.3 GLP-1 E LIRAGLUTIDA: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

Os agonistas do receptor do GLP-1 pertencem à classe dos incretinomiméticos, fármacos que mimetizam os efeitos das incretinas endógenas, ampliando a secreção de insulina de forma glicose-dependente e modulando circuitos centrais envolvidos na homeostase energética. Além de suas ações metabólicas periféricas, esses fármacos exercem

efeitos diretos no sistema nervoso central, onde o GLP-1R é expresso em regiões associadas à regulação do apetite, do estresse e da termorregulação (Holt et al., 2019; Zhao et al., 2021).

O GLP-1 endógeno é um peptídeo formado por 30 aminoácidos secretado tanto periféricamente, pelas células L endócrinas na mucosa intestinal, quanto centralmente, por algumas regiões do encéfalo, como neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) e do bulbo olfatório (Larsen et al, 1997; Holt et al., 2019).

Evidências sugerem a existência de projeções diretas de células do NTS produtoras de GLP-1 para regiões hipotalâmicas, como o núcleo paraventricular (Katsurada et al., 2014). Holt et al. (2019) demonstraram que a ablação específica de neurônios produtores de GLP-1 no NTS reduziu significativamente as concentrações de GLP-1 no hipotálamo e tronco encefálico, sem alterar os níveis plasmáticos, evidenciando que essas células constituem a principal fonte de GLP-1 para o sistema nervoso central.

O GLP-1 foi inicialmente caracterizado por seus efeitos no controle glicêmico, ao estimular a secreção de insulina e suprimir a liberação de glucagon. Posteriormente, foram identificadas ações pleiotrópicas desse peptídeo em diversos sistemas orgânicos. No trato gastrointestinal, retarda o esvaziamento gástrico e inibe a secreção ácida. No sistema nervoso central, modula circuitos neurais relacionados à regulação do apetite e da saciedade. No sistema cardiovascular, aumenta a frequência cardíaca e exerce efeitos vasoprotetores. No fígado, reduz a esteatose e a gliconeogênese e no pâncreas endócrino, promove a proliferação e a sobrevivência das células beta pancreáticas (Smith et al, 2019; Zhao et al, 2021). Esses efeitos sistêmicos do GLP-1 estão esquematizados na Figura 2.

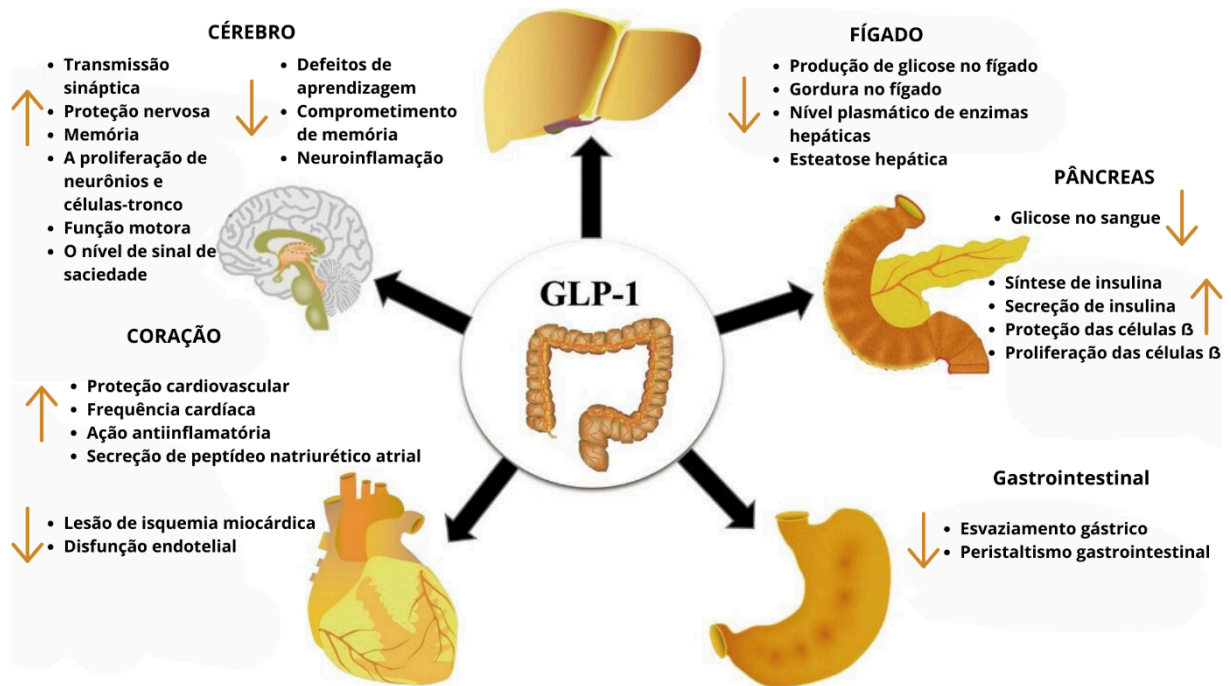


Figura 2: Efeitos do GLP-1 no organismo.

Fonte Adaptado de Zhao et al, 2021

A ativação do GLP-1R, um receptor acoplado à proteína Gs, promove aumento de AMPc e ativação de vias de sinalização como PKA e Epac, com repercussões em processos metabólicos, autonômicos e inflamatórios em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (Baggio e Drucker, 2007; Campbell e Drucker, 2013).

Os agonistas do GLP-1R constituem uma classe terapêutica originalmente desenvolvida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, atuando por meio da estimulação glicose-dependente da secreção de insulina e da inibição da liberação de glucagon. Estudos recentes investigam seu potencial terapêutico em condições além do controle glicêmico, incluindo neoplasias, aterosclerose, dor crônica e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Zhao et al., 2021). A LIRA, comercializada como Victoza® para diabetes tipo 2 e Saxenda® para obesidade, exemplifica esta classe farmacológica. Aprovada pela ANVISA em 2016 para o tratamento da obesidade, a LIRA alcançou elevado volume de vendas no Brasil devido aos seus efeitos na redução ponderal.

A LIRA apresenta 97% de homologia estrutural com o GLP-1 endógeno (Figura 3). A principal distinção farmacológica entre ambos reside na meia-vida plasmática: enquanto o GLP-1 nativo é rapidamente degradado pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), apresentando meia-vida de aproximadamente 2 minutos, a LIRA possui meia-vida de cerca de 13 horas (Jacobsen et al., 2016). O aumento da meia-vida decorre de modificações estruturais,

como a substituição de lisina por arginina na posição 34 e a acilação com ácido palmítico na posição 26 por meio de um espaçador γ -glutamato. Essas alterações conferem resistência à degradação pela DPP-4 e promovem ligação reversível à albumina, possibilitando a administração terapêutica uma vez ao dia (Knudsen e Lau, 2019).

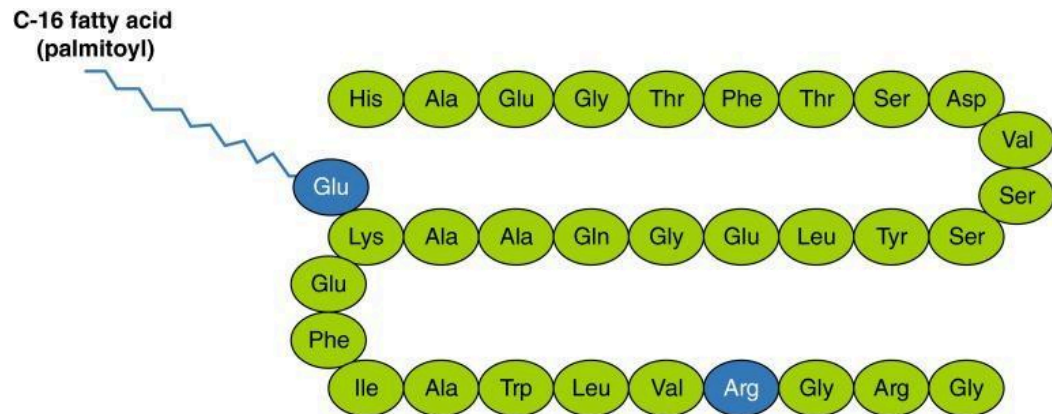


Figura 3: Estrutura da LIRA comparada ao GLP-1 nativo.

Fonte: Jacobsen et al, 2016.

Na última década, os efeitos da LIRA sobre a inflamação têm sido alvo de pesquisas. Foi demonstrado que esse medicamento inibe a via de sinalização MKK4/JNK melhorando o estresse inflamatório induzido pela hipoadiponectinemia em camundongos com doença hepática gordurosa não alcoólica (Zhang et al, 2013). Outro estudo demonstrou que a injeção intra-articular de LIRA em camundongos com osteoartrite promoveu melhora da dor, evidenciando propriedades anti-inflamatórias e analgésicas desse fármaco (Meurot et al, 2022).

Outro estudo em humanos com sobrepeso e obesidade demonstrou que o tratamento com agonista do GLP-1R reduz a adaptação metabólica (Corbin et al, 2023). Além disso, um estudo retrospectivo observacional realizado em duas clínicas de diabetes por 36 meses mostrou que a LIRA, utilizada na prática clínica, mantém sua eficácia no controle metabólico e ponderal após 3 anos. Melhorias no controle metabólico foram observadas tanto quando a LIRA foi utilizada como terapia substitutiva quanto como tratamento adjuvante do diabetes (Rondinelli et al, 2017).

Embora vários estudos tenham relatado efeitos significativos da LIRA na perda de peso corporal, existem dados limitados que avaliam especificamente os possíveis mecanismos subjacentes a esses efeitos em humanos. Nesse contexto, um estudo com indivíduos obesos sem diabetes examinou os efeitos da administração de LIRA uma vez ao dia sobre diversos parâmetros relacionados à perda de peso, incluindo esvaziamento gástrico, controle glicêmico, apetite e metabolismo energético (van Can et al., 2014).

Os resultados demonstraram que o esvaziamento gástrico após 1 hora foi significativamente retardado com a dose de 3,0 mg de LIRA. Além disso, as doses de 1,8 mg e 3,0 mg promoveram redução na ingestão energética, acompanhada por aumento nas taxas de saciedade e plenitude pós-prandial, além de diminuição nas taxas de fome. Por outro lado, todos os grupos apresentaram redução no gasto energético de 24 horas, sendo essa redução maior nos grupos tratados com LIRA em comparação ao placebo, achado atribuído pelos autores à diminuição do peso corporal (van Can et al., 2014).

2.4 NEUROTRANSMISSORES MONOAMINÉRGICOS: SEROTONINA, DOPAMINA E NORADRENALINA E SEUS METABÓLITOS

As monoaminas 5-HT, DA e NA constituem neurotransmissores fundamentais para a regulação de funções autonômicas, comportamentais e homeostáticas, incluindo a modulação da resposta termorregulatória e da febre. Alterações na disponibilidade sináptica dessas monoaminas refletem mudanças na atividade neuronal e na resposta a estímulos inflamatórios sistêmicos, sendo frequentemente estimadas por meio da quantificação de seus metabólitos nos tecidos cerebrais e no plasma, como indicadores indiretos do turnover monoaminérgico (Madden e Morrison, 2019; Evans, Repasky e Fisher, 2015).

A 5-HT é um neurotransmissor sintetizado a partir do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, presente no sistema nervoso central e periférico. Embora amplamente reconhecida por sua função na modulação neural e em processos neuropsicológicos, a maior parte da 5-HT corporal está localizada fora do sistema nervoso central. Seus quinze subtipos de receptores estão distribuídos em tecidos periféricos e cerebrais (Berger, Gray e Roth, 2009).

A 5-HT é metabolizada principalmente pela monoamina oxidase (MAO) e por enzimas aldeído-desidrogenases, originando como principal metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). A razão 5-HIAA/5-HT é amplamente utilizada como índice indireto da taxa de turnover serotoninérgico em regiões encefálicas, refletindo alterações funcionais do sistema serotoninérgico em condições fisiológicas e patológicas (Madden e Morrison, 2019).

A 5-HT regula diversos processos biológicos, incluindo a homeostase autonômica e a termorregulação (Voronova et al., 2021). O hipotálamo exerce papel central na manutenção da Tc ao integrar sinais das vias de produção e perda de calor. Nesse contexto, a 5-HT hipotalâmica contribui de forma significativa para os mecanismos de termorregulação, modulando respostas termorregulatórias em condições fisiológicas e patológicas.

Evidências experimentais demonstram que modificações no sistema serotoninérgico cerebral alteram a capacidade termorregulatória do organismo. A administração de LPS em modelos animais reduz os níveis de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA em regiões hipotalâmicas, como a área pré-óptica anteroventral (AVPO), concomitantemente ao aumento da PGE₂ nessa região e à elevação da Tc (Mota et al., 2017). A injeção intracerebroventricular de 5-HT atenua a febre induzida por LPS, reduz a concentração hipotalâmica de PGE₂ e modula a perda de calor, indicando que a 5-HT central influencia o ajuste térmico durante processos infecciosos ou inflamatórios (Mota et al., 2017). Agonistas seletivos de receptores serotoninérgicos específicos, como o 5-HT₇, também atenuam a febre induzida por LPS em ratos, sugerindo que diferentes subtipos de receptores 5-HT participam de modo distinto dos mecanismos de termorregulação (Kose et al., 2019). Além disso, observa-se dimorfismo sexual na resposta serotoninérgica hipotalâmica durante inflamação sistêmica: os níveis de 5-HT diminuem em machos e aumentam em fêmeas após administração de LPS (Costa et al., 2024).

De forma complementar, estudos têm demonstrado uma interação funcional entre o sistema serotoninérgico e os agonistas do GLP-1R. A administração de LIRA em camundongos reduziu a expressão gênica do receptor 5-HT_{2A} no hipotálamo, mesmo quando a síntese de 5-HT foi inibida, sugerindo que a ativação do GLP-1R modula o sistema serotoninérgico hipotalâmico (Nonogaki e Kaji, 2018). Em outro estudo, a ativação do GLP-1R aumentou da atividade elétrica de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe, implicando a 5-HT como mediadora de alguns efeitos metabólicos do GLP-1 (Anderberg et al., 2017).

A DA é uma catecolamina envolvida na modulação de processos motivacionais, autonômicos e neuroendócrinos, além de participar de circuitos hipotalâmicos relacionados ao controle energético e termorregulatório. A DA é metabolizada principalmente pela monoamina oxidase (MAO) e pela catecol-O-metiltransferase (COMT), resultando na formação dos metabólitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA). O DOPAC reflete predominantemente o metabolismo intraneuronal da DA, enquanto o HVA representa o produto final de seu metabolismo, sendo ambos utilizados como indicadores do turnover dopaminérgico em estudos neuroquímicos (Madden e Morrison, 2019).

Já a NA desempenha papel essencial na regulação do tônus autonômico, da resposta ao estresse e da termogênese, atuando em núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico e em projeções hipotalâmicas envolvidas no controle da Tc. O principal metabólito

intraneuronal da NA é o 3,4-diidroxifenilglicol (DHPG), formado principalmente pela ação da MAO. A quantificação de NA e DHPG permite inferir alterações no turnover noradrenérgico central em condições inflamatórias e de estresse sistêmico (Madden e Morrison, 2019).

Em modelos de inflamação sistêmica e febre induzida por LPS, alterações nos níveis de 5-HT, DA e NA, bem como de seus metabólitos (5-HIAA, DOPAC, HVA e DHPG), refletem a reorganização funcional dos circuitos monoaminérgicos centrais envolvidos na modulação da temperatura corporal. A análise integrada desses neurotransmissores e metabólitos fornece, portanto, uma leitura funcional do impacto da inflamação e de intervenções farmacológicas, como a ativação do GLP-1R, sobre os sistemas neuroquímicos que participam do controle termorregulatório.

2.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO INFLAMATÓRIA COM ÊNFASE NA ATIVAÇÃO DE JNK

A resposta inflamatória envolve sistemas de sinalização intracelular que detectam patógenos e danos teciduais, produzindo mediadores solúveis (citocinas, prostaglandinas, neuropeptídeos) capazes de alterar processos fisiológicos, incluindo a termorregulação. O hipotálamo pré-óptico integra esses sinais e que ajusta efetores térmicos para modular a T_c central (Evans, Repasky e Fisher, 2015; Dinarello, 2004).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), entre as quais se destacam p38, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e os c-Jun N-terminal kinases (JNKs), transmitem sinais de estresse e inflamação do ambiente extracelular para respostas transcricionais e pós-transcricionais. As JNKs (JNK1, JNK2, JNK3) são ativadas por fosforilação em resíduos treonina/tirosina e regulam fatores de transcrição, apoptose, autofagia e produção de mediadores inflamatórios, desempenhando papel central na modulação da inflamação (Hammouda et al., 2020; Kumar et al., 2015).

A ativação de JNK por estímulos inflamatórios é demonstrada em diversos modelos experimentais. O LPS induz rápida fosforilação/ativação de JNK em macrófagos e outras células do sistema imune, integrando sinais via TLR4/CD14 e vias dependentes de tirosina-quinase. Essa ativação leva à formação de complexos de regulação transcricional como AP-1 (c-Jun/c-Fos) e à indução de genes pró-inflamatórios (Procyk et al., 2000; Hambleton et al., 1996).

A via JNK medeia múltiplas respostas inflamatórias em diferentes tecidos. Em células epiteliais intestinais, a IL-6 ativou a via JNK, resultando na ativação do fator de transcrição AP-1 e indução do gene Claudin-2, com consequente aumento da permeabilidade das junções estreitas (Al-Sadi et al., 2014). Esses achados sugerem que a via JNK funciona como

elemento integrador entre estímulos inflamatórios extracelulares e respostas celulares efetoras.

A participação da via JNK em processos nociceptivos também apresenta dimorfismo sexual. Blanton et al. (2021) demonstraram que a ativação da via JNK contribui para a hipersensibilidade mecânica induzida pela inflamação, e a inibição farmacológica de JNK pelo composto SU3327 reduziu a dor inflamatória de maneira dependente do sexo, com machos exibindo antinocicepção em doses menores e fêmeas requerendo doses mais elevadas para apresentar efeito equivalente. A via de sinalização JNK regula múltiplos eventos celulares, incluindo o ciclo celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose e respostas inflamatórias. Patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitas ativam JNK e dependem dessa via para estabelecer infecções bem-sucedidas (Chen et al., 2021). Considerando o dimorfismo sexual na modulação de JNK e seu papel central em respostas inflamatórias, estudos que avaliem diferenças sexuais na ativação de JNK durante inflamação são essenciais para determinar se alterações em p-JNK constituem causa direta de mudanças termorregulatórias ou consequência de modulações paralelas em vias inflamatórias.

3. JUSTIFICATIVA

A febre constitui resposta fisiológica essencial na defesa contra infecções. Embora a maioria dos pacientes se recupere plenamente após um episódio febril, temperaturas corporais excessivamente elevadas e prolongadas podem causar falência de múltiplos órgãos e morte (Walter et al., 2016), tornando fundamental a compreensão dos mecanismos centrais de termorregulação para o manejo clínico. A LIRA, um agonista do GLP-1R utilizado no tratamento do diabetes tipo 2 e da obesidade, tem despertado crescente interesse científico por seus efeitos além do controle metabólico. Estudos recentes apontam potenciais ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias, sugerindo seu envolvimento em doenças como Parkinson e Alzheimer (Cao et al., 2022; Vargas-Soria et al., 2021). Contudo, estudos sobre a Tc e a febre permanecem pouco explorados, especialmente em relação aos mecanismos hipotalâmicos e às diferenças sexuais.

No âmbito da linha de pesquisa do grupo, investigações prévias têm se dedicado a compreender os mecanismos neuroimunes envolvidos na resposta febril e suas bases moleculares no hipotálamo, com ênfase na participação de mediadores inflamatórios, espécies reativas e vias de sinalização intracelular. A partir desses achados, emergiu o interesse em avaliar como fármacos com reconhecida ação central e imunomodulatória, como os agonistas do GLP-1R, poderiam interferir nos circuitos termorregulatórios durante a inflamação sistêmica. Essa trajetória científica fundamenta a presente investigação e justifica a escolha do modelo experimental de febre induzida por LPS para explorar a interface entre inflamação, termorregulação e modulação farmacológica pelo sistema GLP-1.

Considerando que respostas neuroendócrinas e inflamatórias frequentemente apresentam dimorfismo sexual, este estudo justifica-se pela necessidade de elucidar se a LIRA modula diferencialmente a resposta febril entre machos e fêmeas, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de ação desse fármaco amplamente utilizado na prática clínica.

Diante desse contexto, coloca-se a seguinte questão: a LIRA é capaz de modular a Tc durante a inflamação sistêmica por meio da interação com circuitos hipotalâmicos, mediadores inflamatórios e oxidativos, vias de sinalização intracelular e sistemas monoaminérgicos, de forma sexo-dependente?

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Investigar o efeito da LIRA sobre a regulação da Tc e a resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas, com ênfase nos mecanismos neuroimunes e moleculares subjacentes e nas diferenças dependentes do sexo.

4.2. Específicos

- Avaliar o efeito da LIRA sobre a Tc em ratos Wistar machos e fêmeas em condições basais e durante a febre induzida por LPS;
- Determinar as alterações na produção de PGE₂ no hipotálamo após o tratamento com LPS e LIRA, comparando possíveis diferenças entre os sexos;
- Quantificar as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias, incluindo IL-6 e IL-10, em resposta ao LPS e à LIRA;
- Investigar se as alterações na Tc dos animais estão associadas a modificações nos níveis de ERO e HbNO;
- Mensurar as alterações nas concentrações hipotalâmicas de 5-HT, DA, NA e seus metabólitos;
- Analisar a via de fosforilação da proteína quinase JNK no hipotálamo como possível via intracelular envolvida nos efeitos antipiréticos da LIRA.

5. METODOLOGIA

5.1. Animais

Foram utilizados 128 ratos Wistar, sendo 64 machos e 64 fêmeas, com 8–10 semanas de idade, obtidos da Universidade Evangélica de Goiás (Anápolis, Goiás, Brasil). Os animais foram mantidos em grupos de quatro por caixa, em estante ventilada (Alesco Indústria e Comércio Ltda., Monte Mor, São Paulo), sob temperatura controlada de 22 ± 1 °C e ciclo claro–escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7h. Água e ração permaneceram disponíveis ad libitum durante todo o período.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas da Universidade de Brasília (UnB) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UnB (CEUA), sob o Protocolo nº 23106.128494/2022-27 (Anexo 1).

5.2. Fármacos

A dose de cada fármaco utilizada neste estudo foi definida a partir de experimentos-piloto e de evidências previamente publicadas (Brito et al., 2016; Brito et al., 2024; Mert et al., 2022). A LIRA (LIRA; Saxenda®, Novo Nordisk, Dinamarca) foi preparada em solução salina (SAL) estéril e administrada por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg. O LPS derivado de *Escherichia coli* (sorotipo O111:B4; Sigma-Aldrich, EUA) também foi diluído em solução SAL estéril e aplicado por via ip, na dose de 50 µg/kg.

Os anestésicos cetamina, xilazina e acepromazina foram obtidos da Vetnil (Louveira, SP, Brasil). A oxitetraciclina (Terramicina®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e o meloxicam (Maxicam®, MSD, São Paulo, Brasil) foram utilizados em suas formulações comerciais.

5.3. Implante de registradores de temperatura

A anestesia dos animais foi realizada por via i.p. utilizando uma combinação de cetamina (60 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) e acepromazina (1 mg/kg). Após a indução anestésica, procedeu-se à incisão da pele e da musculatura peritoneal para permitir o implante dos registradores de temperatura (Subcue, Calgary, Canadá). Concluída a inserção do dispositivo, as camadas musculares e cutâneas foram suturadas. No período pós-operatório imediato, os animais receberam oxitetraciclina por via intramuscular (10 mg/kg) e meloxicam por via subcutânea (1 mg/kg), sendo este último administrado diariamente por mais dois dias. Ao término dos cuidados pós-cirúrgicos, os animais foram devolvidos às suas caixas e mantidos em recuperação por sete dias antes do início dos experimentos farmacológicos.

5.4. Desenho experimental

Os animais foram previamente aclimatados por, no mínimo, 12 horas em ambiente mantido na zona termoneutra para ratos (27 ± 1 °C) (Gordon, 1990). Durante todos os experimentos, a Tc foi registrada a cada 15 minutos. Para avaliar o efeito da LIRA sobre a febre, os animais receberam inicialmente uma injeção i.p. de LPS (50 µg/kg) para indução da resposta febril. Uma hora após o estímulo inflamatório, foi administrada LIRA (0,3 mg/kg, ip), e o monitoramento térmico foi mantido por seis horas após a aplicação do LPS.

Nos estudos voltados à coleta de tecido hipotalâmico e sangue, adotou-se o mesmo protocolo experimental; contudo, nesses casos, a eutanásia ocorreu quatro horas após a administração do LPS. Esse intervalo foi escolhido para avaliar a possível modulação de citocinas pró-inflamatórias, permitindo aproximadamente três horas de exposição à LIRA desde sua administração. Logo após a eutanásia, os hipotálamos foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até as análises. Amostras sanguíneas também foram coletadas para quantificação de ERO, HbNO e para obtenção de soro destinado à mensuração de IL-6 e IL-10. Todas as amostras foram mantidas a -80 °C até o processamento laboratorial.

5.5. Quantificação de PGE₂ pelo método de ELISA

A concentração de PGE₂ no hipotálamo foi quantificada de acordo com o método originalmente descrito por Figueiredo et al. (2012). Logo após a remoção do tecido, adicionaram-se 40 µL de indometacina (1 mg/mL, pH 7,4) para impedir a degradação enzimática. Em seguida, os hipotálamos foram homogeneizados em 1 mL de meio RPMI suplementado com indometacina preparada em tampão Tris-HCl. O homogenato foi acidificado com HCl até alcançar pH entre 3,5 e 4,0. Após breve incubação em gelo, as misturas foram centrifugadas a 20.000 g por 10 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes obtidos foram aplicados em cartuchos Sep-Pak C18 para extração da PGE₂. A eluição foi realizada utilizando 2 mL de etanol absoluto. Os extratos foram então submetidos à secagem a vácuo por 18 horas, e os resíduos resultantes ressuspensos em tampão EIA.

A quantificação da PGE₂ foi conduzida utilizando o kit PGE₂, ensaio imunoenzimático (ELISA) (Cayman Chemical), cujo limite de detecção é 7,8 pg/mL. As leituras de absorbância foram realizadas em placas de 96 poços de poliestireno de alta ligação, utilizando leitora de microplacas (SpectraMax® i3x, Molecular Devices, EUA), com comprimento de onda de 412 nm.

5.6. Dosagem de IL-6 e IL-10

As amostras de sangue destinadas à quantificação de IL-6 e IL-10 foram obtidas por punção cardíaca durante o processo de exsanguinação, coletadas em tubos heparinizados. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 4700 g por 10 minutos a 4 °C, e o plasma resultante foi cuidadosamente transferido para tubos limpos e armazenado a -80 °C até o momento das análises.

As concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 foram determinadas por meio de ensaios ELISA, seguindo rigorosamente as recomendações dos fabricantes (SIGMA-ALDRICH, EUA; números de catálogo RAB0311 e RAB0246, respectivamente). As amostras e padrões foram analisados em placas de 96 poços, e a leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (SpectraMax® i3x, Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 450 nm, conforme protocolo do fabricante. As curvas padrão foram preparadas utilizando os reagentes fornecidos pelos próprios kits, e as concentrações das citocinas foram calculadas com base nos valores derivados dessas curvas.

5.7. Quantificação de ERO e HbNO

A quantificação de ERO e de HbNO no sangue foram realizadas empregando espectroscopia de RPE, conforme metodologia estabelecida na literatura (Dikalov e Fink, 2005; Gomes et al., 2018). Para a detecção de ERO, utilizou-se a sonda 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) (10 mM), preparada em tampão Krebs-HEPES (KHB) recém-elaborada contendo deferoxamina (25 mM) e trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (5 mM), que atuam como quelantes de ferro e cobre, para evitar reações inespecíficas. O CMH, ao reagir majoritariamente com o ânion superóxido, gera o radical nitroxila 3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil (CM•), cuja estabilidade permite sua identificação por RPE. As amostras de sangue foram imediatamente misturadas em proporção 1:1 com solução de CMH a 400 µM acrescida de heparina (100 UI/mL) e mantidas a 37 °C por 30 minutos sob agitação suave. As curvas de calibração para quantificação foram construídas utilizando o radical 3-carboxi-proxil (CP•) em diferentes concentrações (0, 5, 10, 50 e 100 µM).

No caso da determinação de HbNO, o sangue coletado por punção ventricular direita quatro horas após a administração de LPS foi armazenado inicialmente em seringas heparinizadas. Em seguida, procedeu-se à centrifugação a 2000 × g por 5 minutos, e o material obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. As curvas padrão foram preparadas a partir de eritrócitos expostos a concentrações crescentes de nitrito (1, 10 e 100 µM) na presença de ditionito de sódio (20 mg), utilizado como agente redutor. Todas as

amostras foram acondicionadas em seringas de 1 mL e conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

As leituras de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX Plus operando na banda X (9 GHz), utilizando-se as seguintes condições: potência de micro-ondas de 10 mW, amplitude de modulação de 5 gauss, frequência de modulação de 100 kHz, tempo de varredura de 12 segundos e média de quatro varreduras em uma janela espectral de 240 gauss. Os reagentes empregados nas análises foram obtidos da Noxygen (Elzach, Alemanha).

5.8. Dosagem de neurotransmissores

As concentrações hipotalâmicas de 5-HT, DA, NA e seus metabólitos, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica (HPLC-ECD). Para o preparo das amostras, os tecidos foram sonicados em ácido perclórico 0,1 M contendo metabissulfito de sódio (0,02%) e 3,4-diidroxibenzilamina (50 ng/mL), utilizada como padrão interno. Após homogeneização, o material foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi imediatamente submetida à análise cromatográfica.

A fase móvel empregada foi preparada em solução de ácido cítrico monoidratado (20 g), sal de sódio do ácido octano-1-sulfônico (200 mg) e EDTA (40 mg) em 900 mL de água deionizada, filtrada em membranas de 0,45 μm , sendo posteriormente ajustada para 10% de metanol (v/v). A separação dos analitos foi realizada em coluna Synergi Fusion-RP C18 (150 \times 4,6 mm; 4 μm), acoplada a uma pré-coluna SecurityGuard, mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo o procedimento.

A detecção foi conduzida utilizando um Detector eletroquímico (Coulochem III) (ESA) equipado com célula analítica de duplo eletrodo (ESA 5011A). Os potenciais de oxidação aplicados foram de 100 mV e 450 mV, enquanto a célula de proteção (ESA 5020) operou a 350 mV. As concentrações finais de 5-HT e DA foram obtidas com base em curvas padrão construídas com reagentes certificados e expressas em ng/g de tecido, conforme descrito em abordagens metodológicas anteriores (Moreira et al., 2012; Costa et al., 2024).

5.9. Western blotting para detecção de JNK e fosfo-JNK

Para a análise das formas total e fosforilada de JNK, o tecido hipotalâmico foi inicialmente homogenizado em tampão RIPA suplementado com inibidores de proteases e fosfatases, incluindo Na_3VO_4 (2 mM) e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (10 mM). Após a extração, as proteínas foram quantificadas e alíquotas contendo 20 μg foram misturadas ao tampão Laemmli

acrescido de β -mercaptoetanol. As amostras foram fervidas por 5 minutos e, em seguida, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%.

A transferência das proteínas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi realizada em sistema semi-seco a 24 V por 1 h e 30 min. Concluída essa etapa, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de leite desnatado a 5% preparada em solução Tris-salina tamponada com Tween 20 (TBS-T) (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20), mantida em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 16 horas a 4 °C com os anticorpos primários Fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185, nº 9251) e Total-SAPK/JNK (nº 9252), ambos da Cell Signaling Technology (EUA). A β -actina (anticorpo monoclonal A5441, Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada como proteína de referência para controle de carregamento.

A detecção foi realizada por meio de anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Cell Signaling Technology, EUA), seguida da revelação com o substrato Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific, nº 32106). As bandas obtidas foram quantificadas utilizando o software ImageJ, e os valores de densidade óptica foram normalizados de acordo com a β -actina e com a forma total da JNK.

5.10. Análise estatística

A amplitude das respostas térmicas foi quantificada por meio do índice térmico, definido pela área sob a curva (ASC). Para esse cálculo, adotou-se 36,5 °C como temperatura basal, e a ASC foi obtida no intervalo de 2 a 6 horas após a administração de LPS. Os resultados do índice térmico são apresentados em unidades de graus Celsius multiplicados por hora (°C·h).

O índice térmico constitui uma medida integrada da resposta termorregulatória ao longo do tempo, permitindo avaliar simultaneamente a magnitude e a duração das variações da Tc induzidas pelo estímulo inflamatório e/ou farmacológico.

Tanto o índice térmico quanto os demais parâmetros experimentais, expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), foram analisados por ANOVA de dois fatores, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism v10.5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Considerou-se como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. LIRA promove redução da Tc tanto em condições basais quanto durante a febre

A definição da dose de LIRA a ser utilizada nos experimentos baseou-se em uma revisão da literatura, com ênfase em estudos que investigaram os efeitos anti-inflamatórios ou neuroprotetores desse fármaco. Os dados indicam que, quando administrada por via intraperitoneal, a LIRA é utilizada em doses que variam de 0,1 a 1 mg/kg (Zeng et al., 2020; Sato et al., 2013; Mert et al., 2022).

Em razão da ampla variação posológica observada, tornou-se necessário realizar um estudo piloto previamente aos experimentos de eficácia, com o objetivo de identificar a dose mais adequada ao modelo experimental adotado e, simultaneamente, reduzir o número total de animais utilizados. Esta abordagem justifica-se pela possibilidade de que a dose ótima de LIRA varie conforme o modelo experimental, bem como pela ausência, até o início deste estudo, de relatos na literatura que tenham investigado os efeitos da LIRA no modelo de febre experimental induzida por LPS.

Assim, para a seleção da dose, os animais de ambos os sexos receberam inicialmente LPS por via i.p. e, após 1 h, foram tratados com LIRA, pela mesma via, nas doses de 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg. A Figura 4 A apresenta a curva dose-resposta de animais machos, enquanto a Figura 4 B mostra a curva dose-resposta de animais fêmeas. Em ambos os sexos, os animais do grupo LPS/SAL apresentaram, como esperado, aumento da Tc, com início em torno de 2,5h após a administração de LPS e duração de até 6h. O pós-tratamento com LIRA, nas três doses testadas, promoveu redução da Tc, tanto em machos quanto em fêmeas. Nos animais machos, a dose de 1 mg/kg reduziu a Tc de forma mais pronunciada em comparação à dose de 0,3 mg/kg. Em contraste, nas fêmeas, as doses de 0,3 e 1 mg/kg produziram efeitos semelhantes sobre a Tc.

Com base nesses resultados, foi selecionada a dose de 0,3 mg/kg para os experimentos subsequentes. Essa dose promoveu redução da Tc sem induzir hipotermia, efeito observado com a dose de 1 mg/kg nos animais machos, além de apresentar maior eficácia na redução da Tc quando comparada à dose de 0,1 mg/kg.

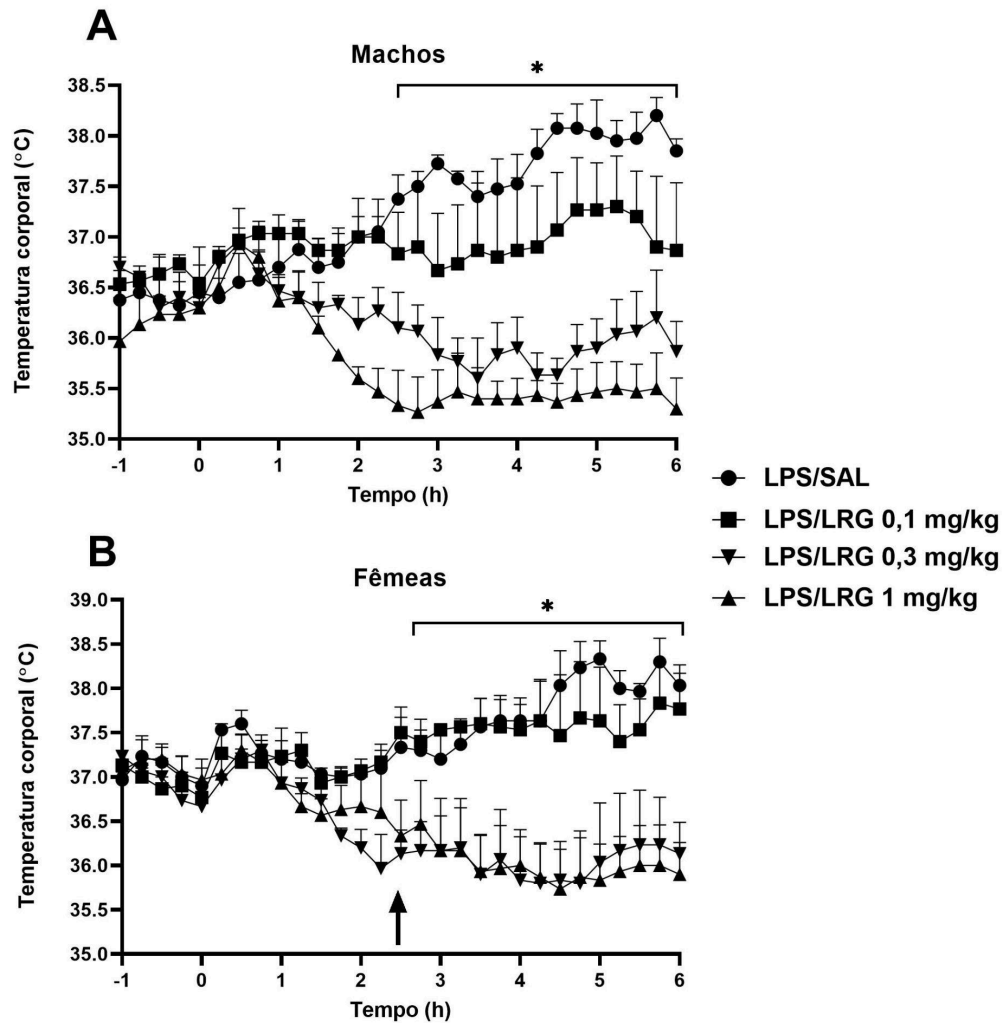


Figura 4: Efeito antipirético da LIRA sobre a febre induzida por LPS em ratos Wistar (estudo piloto). Animais receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina estéril (0,9%), seguido após 1h por LIRA (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,5 mL). Perfil temporal da temperatura corporal em machos (A) e fêmeas (B) ao longo de 6 horas. Dados expressos como média \pm EPM da temperatura corporal (°C) (n=3/grupo).

Para avaliar a eficácia da LIRA sobre a resposta febril, os animais receberam uma injeção i.p. de LPS e, após um intervalo de 1 hora, foram tratados com LIRA (0,3 mg/kg) pela mesma via. Em ambos os sexos, a administração de LPS promoveu aumento evidente da Tc quando comparado ao grupo controle tratado com SAL, cujos valores permaneceram estáveis ao longo do experimento, apresentando apenas variações discretas decorrentes da manipulação experimental (Figura 5).

O tratamento subsequente com LIRA suprimiu completamente a febre induzida pelo LPS, tanto em machos quanto em fêmeas (Figura 5A, 5C). Além do efeito antitérmico, verificou-se que a LIRA também reduziu a Tc de animais eutérmicos do grupo SAL/LIRA,

em ambos os sexos, indicando que o fármaco reduz a Tc mesmo na ausência de febre (Figura 5A, 5C).

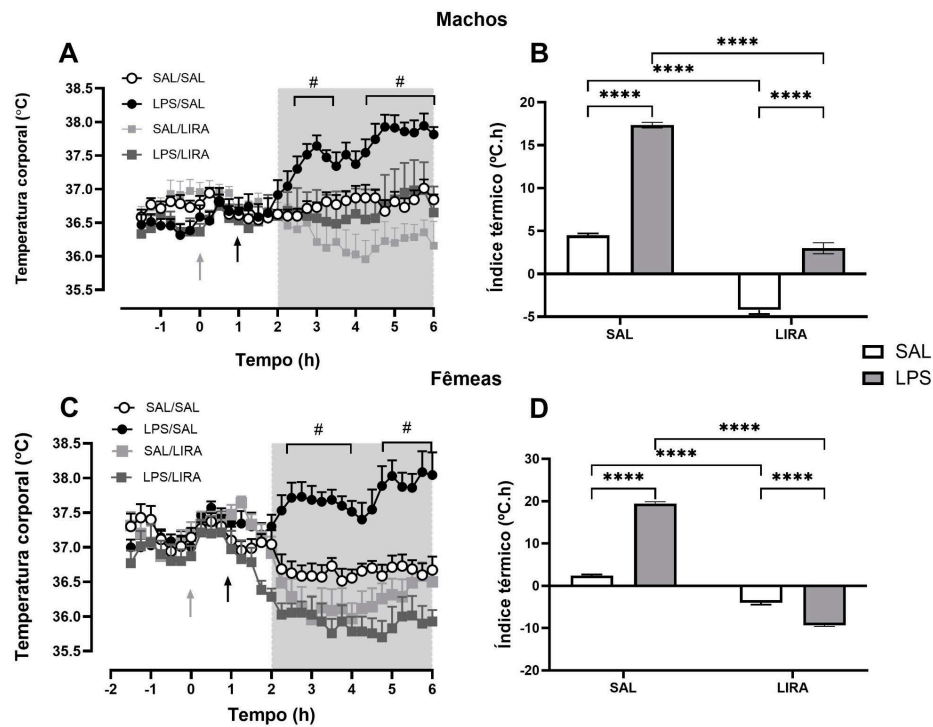


Figura 5. A LIRA reduz a resposta febril induzida por LPS em ratos machos e fêmeas. Os animais foram tratados com LIRA por injeção intraperitoneal (i.p.) na dose de 0,3 mg/kg ou com solução salina (SAL) no volume de 0,5 mL, administradas 1 hora após a injeção i.p. de LPS (50 µg/kg) ou de solução salina estéril. (A, C) Os dados estão expressos como média ± EPM da temperatura corporal (°C) de 6–7 animais. As setas cinza e preta representam, respectivamente, o momento das injeções de LPS e LIRA. (B, D) Índice térmico calculado a partir da ASC, entre 2 e 6 horas (como indicado nos painéis A e C). **** $p < 0,0001$, # $p < 0,05$ LPS/SAL comparado com SAL/SAL. Os dados foram analisados por (A, C) ANOVA de três fatores com correspondência pelo fator tempo e por (B, D) ANOVA de dois fatores, ambas seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2025)

Para avaliar de forma precisa as alterações de Tc induzidas pelos tratamentos, o índice térmico foi obtido pela ASC no intervalo correspondente à região destacada em cinza nas Figuras 5A e 5C, permitindo uma interpretação integrada da variação de Tc ao longo do tempo. A análise revelou um padrão distinto entre machos e fêmeas quanto à ação da LIRA. Nos machos (Figura 5B), os animais tratados apenas com LIRA (SAL/LIRA) apresentaram uma redução mais pronunciada no índice térmico do que aqueles que receberam LPS antes da LIRA (LPS/LIRA), indicando que a presença do processo inflamatório provocado pelo LPS diminuiu a capacidade da LIRA de reduzir a Tc. Em contraste, nas fêmeas (Figura 5D), observou-se o efeito inverso: o tratamento LPS/LIRA promoveu uma queda da Tc maior do que a observada no grupo SAL/LIRA, sugerindo que, nesse sexo, a inflamação potencializou

os efeitos redutores de Tc da LIRA. Quantitativamente, a LIRA reduziu o índice térmico dos machos desafiados com LPS em aproximadamente 83% em comparação ao grupo LPS/SAL. Nas fêmeas, o efeito foi ainda mais intenso, pois além de abolir a resposta febril, a LIRA reduziu a Tc para valores inferiores à linha basal, resultando em uma diminuição de cerca de 148% no índice térmico.

Com base nesses resultados, foi definido o tempo experimental mais adequado para os experimentos subsequentes de coleta dos tecidos, sendo selecionado o período de 4 h após a administração do LPS. Esse intervalo foi escolhido por corresponder ao momento em que a febre já se encontrava plenamente estabelecida, permitindo uma avaliação mais clara da resposta ao tratamento com LIRA, que apresentou um efeito pronunciado nesse tempo.

As Figuras 6A e 6C apresentam curvas temporais considerando o tempo de 4 h e a dose de 0,3 mg/kg de LIRA. Conforme esperado, o pós-tratamento com LIRA reduziu a febre induzida por LPS tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados aos grupos controle LPS/SAL e SAL/SAL. Adicionalmente, observou-se que o tratamento com LIRA em animais sem indução de febre, pertencentes ao grupo SAL/LIRA, também promoveu redução da Tc.

Para melhor visualização dos efeitos observados, as variações da Tc (ΔT) foram analisadas nas Figuras 6B e 6D. Esses dados evidenciam que a administração de LPS aumentou significativamente a Tc dos animais, caracterizando o desenvolvimento de febre, enquanto o tratamento com LIRA reduziu significativamente a Tc tanto nos animais febris quanto nos eutérmicos.

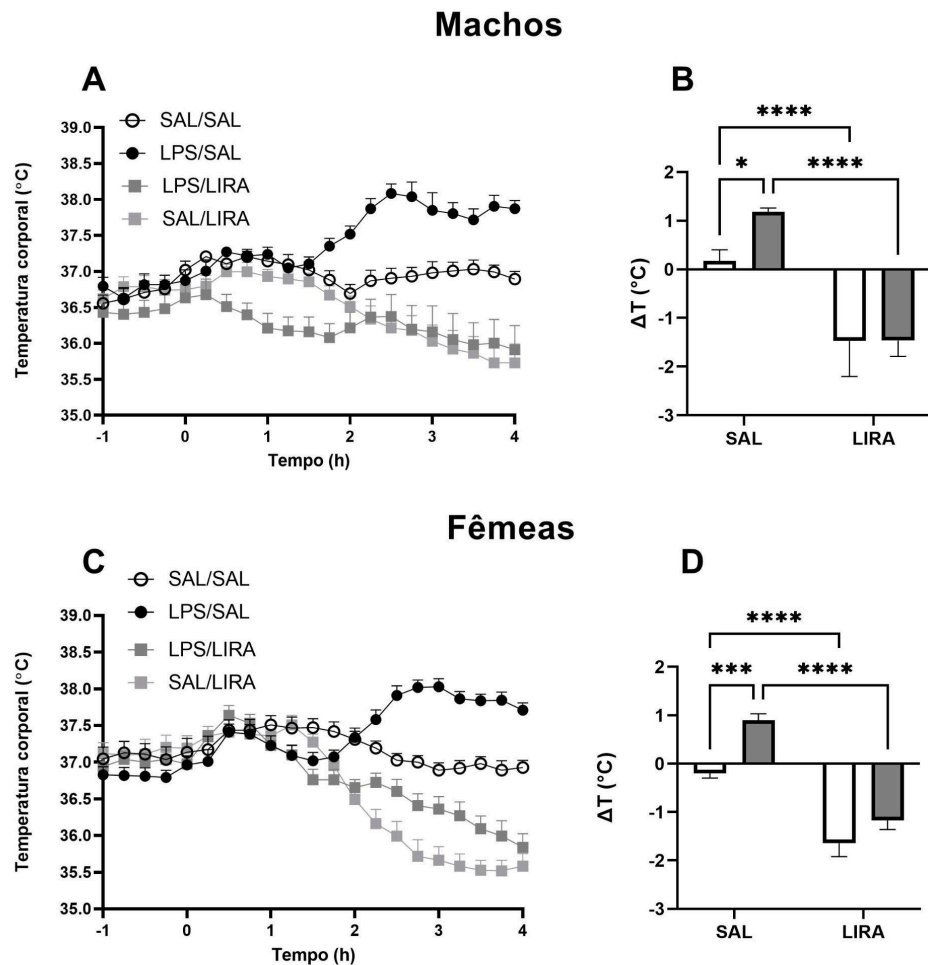


Figura 6: Efeito do pós-tratamento com LIRA no tempo de 4h e a variação da Tc (ΔT). A LIRA (0,3 mg/kg i.p.) ou o veículo (salina 0,9% 0.5 ml i.p.) foram administrados 1h depois da injeção de LPS (50 μ g/kg, i.p.) ou salina (0,9% 0.5 ml i.p.). (A) Mudanças na Tc dos ratos machos e (C) fêmeas no decorrer do tempo em horas. O tempo 0 (zero) indica a aplicação de LPS i.p. Os dados são mostrados como a média \pm SEM da Tc (°C) de 7 animais e analisado por two-way ANOVA. As figuras B e D mostram a diferença entre a temperatura na quarta hora e a temperatura basal (ΔT) em animais fêmeas e machos. * $p < 0,05$.

6.2. Efeito do tratamento com LIRA sobre a produção hipotalâmica de PGE₂

Para explorar os mecanismos envolvidos na redução da Tc induzida pela LIRA, avaliamos as concentrações hipotalâmicas de PGE₂. Como esperado, a administração i.p. de LPS elevou significativamente os níveis de PGE₂ em ambos os sexos, embora o aumento observado nos machos tenha sido aproximadamente o dobro daquele registrado nas fêmeas (Figura 7A, 7B). O tratamento subsequente com LIRA diminuiu a produção de PGE₂ nos machos desafiados com LPS em cerca de 62% ($p < 0,01$), conforme ilustrado na Figura 7A. No entanto, esse mesmo tratamento não modificou os níveis de PGE₂ nas fêmeas (Figura 7B),

indicando que o efeito antipirético da LIRA pode envolver vias moduladas de maneira distinta entre machos e fêmeas.

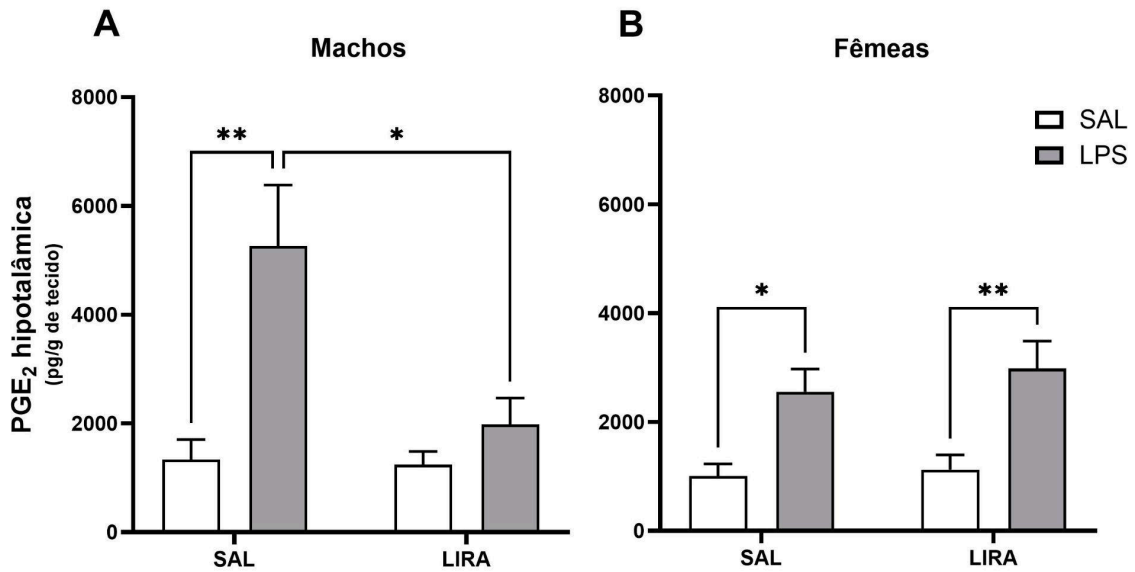


Figura 7. LIRA atenua o aumento de PGE₂ hipotalâmica induzido por LPS em ratos machos. (A) e (B) mostram a concentração de PGE₂ por grama de tecido hipotalâmico coletado 4 horas após a administração de LPS em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Os dados representam média ± EPM e foram analisados por ANOVA de dois fatores, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01. Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2025).

6.3. Efeito do pós-tratamento com LIRA sobre os níveis circulantes de IL-6 e IL-10

A fim de caracterizar a resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo LPS e verificar a influência da LIRA sobre esse processo, foram quantificados os níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória IL-6. A administração de LPS elevou significativamente a concentração de IL-6 em machos e fêmeas quando comparados aos respectivos grupos controle (Figura 8A, 8B). No entanto, o tratamento com LIRA exerceu efeito apenas no sexo feminino, reduzindo os níveis circulantes de IL-6 em aproximadamente 45% (p < 0,05).

Além disso, avaliamos as concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10 nos mesmos animais (Figura 8C, 8D). Nos machos, o LPS promoveu um aumento na concentração de IL-10 em relação ao controle, enquanto o tratamento com LIRA elevou as concentrações dessa citocina apenas nos animais que receberam SAL, sem modificar a produção de IL-10 quando administrado após o LPS (Figura 8C). As fêmeas apresentaram um perfil completamente distinto: tanto o LPS quanto a LIRA mantiveram os níveis de IL-10 inalterados, indicando diferenças marcantes entre os sexos na regulação dessa citocina (Figura 8D).

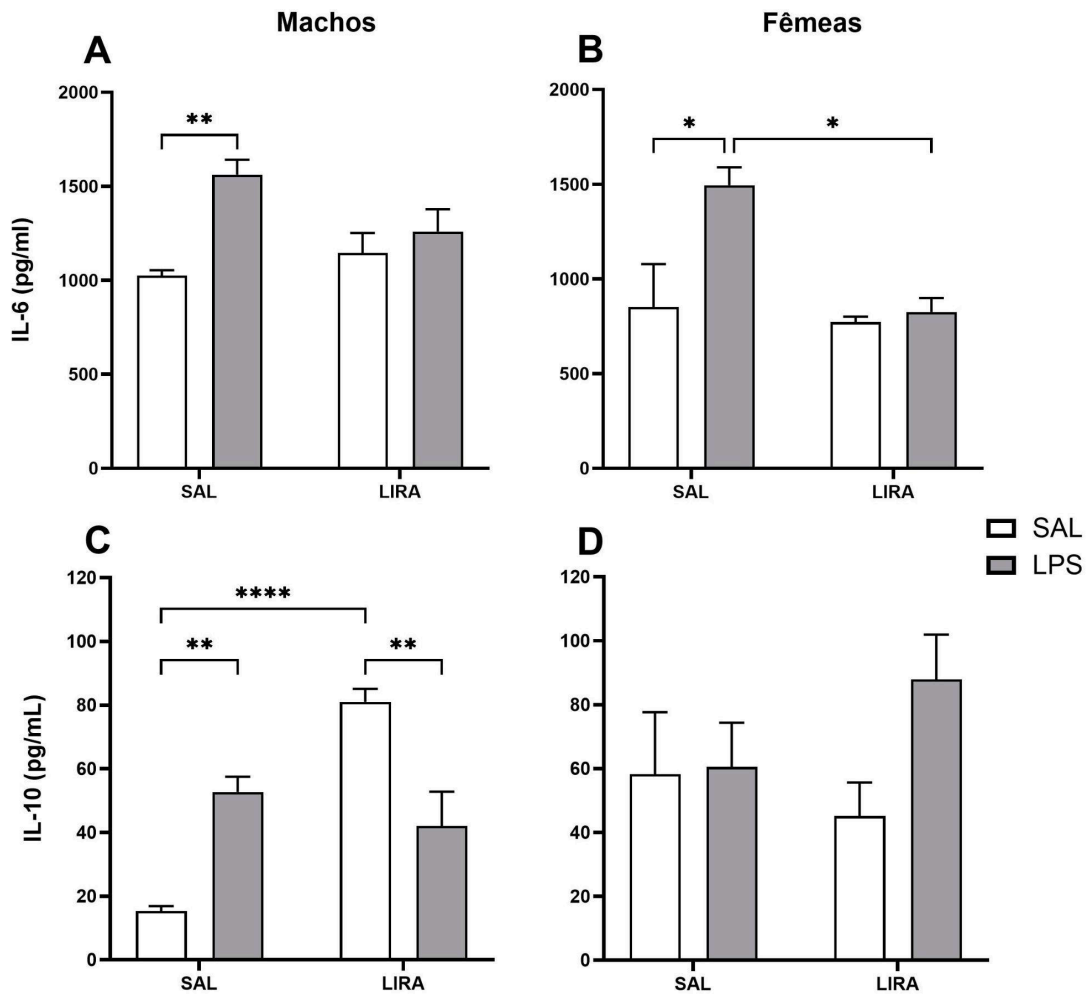


Figura 8. Concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA. Os painéis (A) e (B) mostram as concentrações de IL-6 em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Os painéis (C) e (D) apresentam as concentrações de IL-10 em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Os animais foram divididos em grupos controle (SAL) e tratados com LIRA (0,3 mg/kg, i.p.) e avaliados 4 horas após a administração de LPS (50 µg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (0,9%, 0,5 mL) (n = 5 por grupo). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas foram indicadas por *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001, conforme determinado por ANOVA de dois fatores seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2025).

6.4 Efeito da LIRA na Produção de ERO e HbNO

Para compreender se a LIRA influencia marcadores sistêmicos de estresse oxidativo e nitrosativo, avaliamos os níveis circulantes de ERO e de HbNO. A administração de LPS, na dose utilizada, não provocou aumento detectável na produção de ERO em machos ou fêmeas, e a LIRA também não alterou esse parâmetro em nenhum dos grupos avaliados (Figura 9A, 9B). Em relação ao estresse nitrosativo, observou-se que o LPS elevou de maneira significativa os níveis de HbNO em ambos os sexos. Entretanto, o tratamento com LIRA não

modificou a formação de HbNO, independentemente de os animais terem recebido SAL ou LPS (Figuras 9C, 9D).

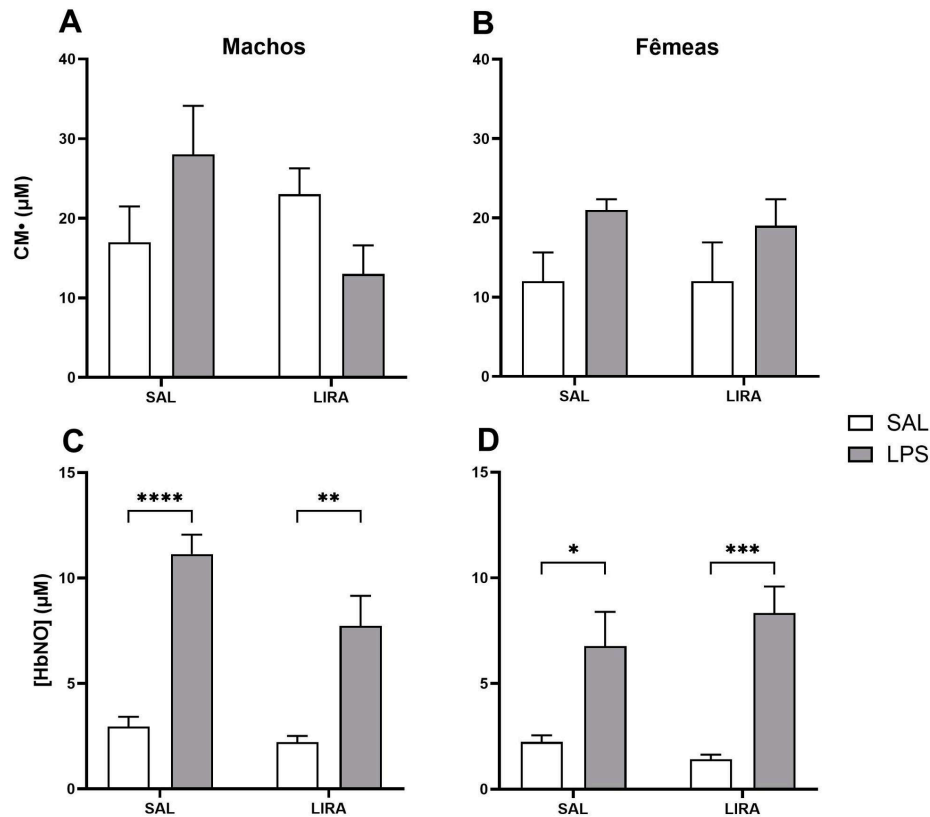


Figura 9. Níveis circulantes de CM• e HbNO após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA. Os painéis (A) e (B) mostram as concentrações de CM• em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Os painéis (C) e (D) apresentam as concentrações de HbNO periférico em machos e fêmeas, respectivamente. Os animais foram divididos em grupos controle (SAL) e tratados com LIRA (0,3 mg/kg, i.p.) e avaliados 4 horas após a administração de LPS (50 μg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (0,9%, 0,5 mL) (n = 6–7 por grupo). Os dados são apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas foram indicadas por *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001, conforme determinado por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey. Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2025).

6.5 Alterações nos níveis de neurotransmissores

Com o objetivo de verificar se a redução da Tc observada após a administração de LIRA poderia estar associada à modulação de 5-HT ou DA, quantificamos esses neurotransmissores no hipotálamo de machos e fêmeas (Figura 10 e Figura 11). Nos machos, a administração de LPS resultou em diminuição dos níveis hipotalâmicos de 5-HT (Figura 10A). Em animais tratados com SAL, a LIRA reduziu os níveis de 5-HT em aproximadamente 35% (p < 0,05); entretanto, quando administrada após o LPS, a LIRA não modificou a queda induzida pelo estímulo inflamatório (Figura 10A).

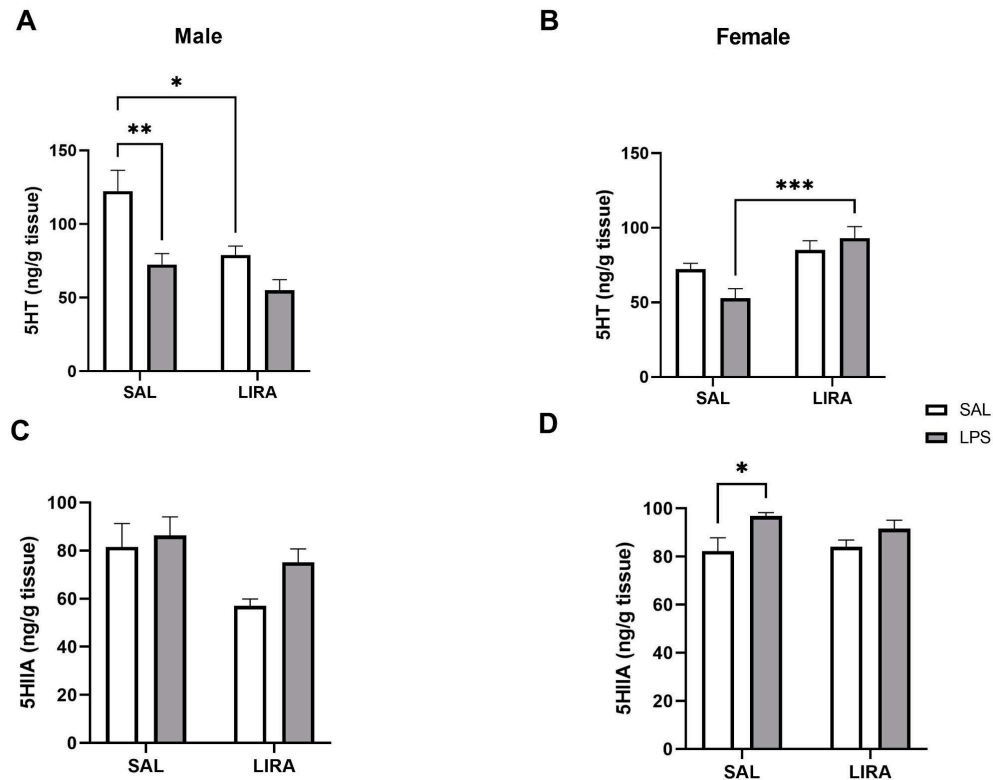


Figura 10. Níveis hipotalâmicos de serotonina (5-HT) e de seu metabólito 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) após administração de LPS em ratos tratados ou não com liraglutida (LIRA). O painel (A) mostra os níveis de 5-HT em ratos machos, o painel (B) em ratos fêmeas, o painel (C) os níveis de 5-HIAA em machos e o painel (D) em fêmeas. Os animais foram divididos em grupos controle (SAL) e tratados com LIRA (0,3 mg/kg, i.p.) e avaliados 4 horas após a administração de LPS (50 µg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (0,9%, 0,5 mL) (n = 6–7 por grupo). Os dados são apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey (*p < 0,05; **p < 0,01).

Nas fêmeas, o padrão observado foi distinto. O LPS não promoveu alterações detectáveis nos níveis de 5-HT em comparação ao grupo controle. Contudo, quando administrada após o LPS, a LIRA aumentou a concentração hipotalâmica de 5-HT em cerca de 84% (p < 0,01), revelando uma resposta sexo-específica ao tratamento (Figura 10B).

Em complemento a esses achados, a avaliação do metabólito da 5-HT, o 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), indicou que, nas fêmeas, houve aumento dos níveis em animais tratados com LPS em comparação ao grupo controle (SAL/SAL), sem modulação adicional pelo tratamento com LIRA (Figura 10D). Nos ratos machos, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de 5-HIAA entre os grupos experimentais (Figura 10C).

No que diz respeito à DA, os níveis hipotalâmicos permaneceram inalterados, uma vez que nem o desafio com LPS nem o tratamento com LIRA produziram modificações significativas em machos ou fêmeas (Figura 11A, 11B).

Quanto ao metabolismo dopaminérgico, nos ratos machos foi observada redução dos níveis do metabólito ácido homovanílico (HVA) nos animais febris tratados com LIRA em comparação ao grupo LPS/SAL (Figura 11C). Em contraste, nas fêmeas, os ratos do grupo febril (LPS/SAL) apresentaram redução dos níveis de HVA quando comparados ao grupo controle (SAL/SAL), não sendo observada modulação adicional pelo tratamento com LIRA (Figura 11D).

Em relação ao metabólito dopaminérgico ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, tanto em machos quanto em fêmeas (Figura 11E, 11F).

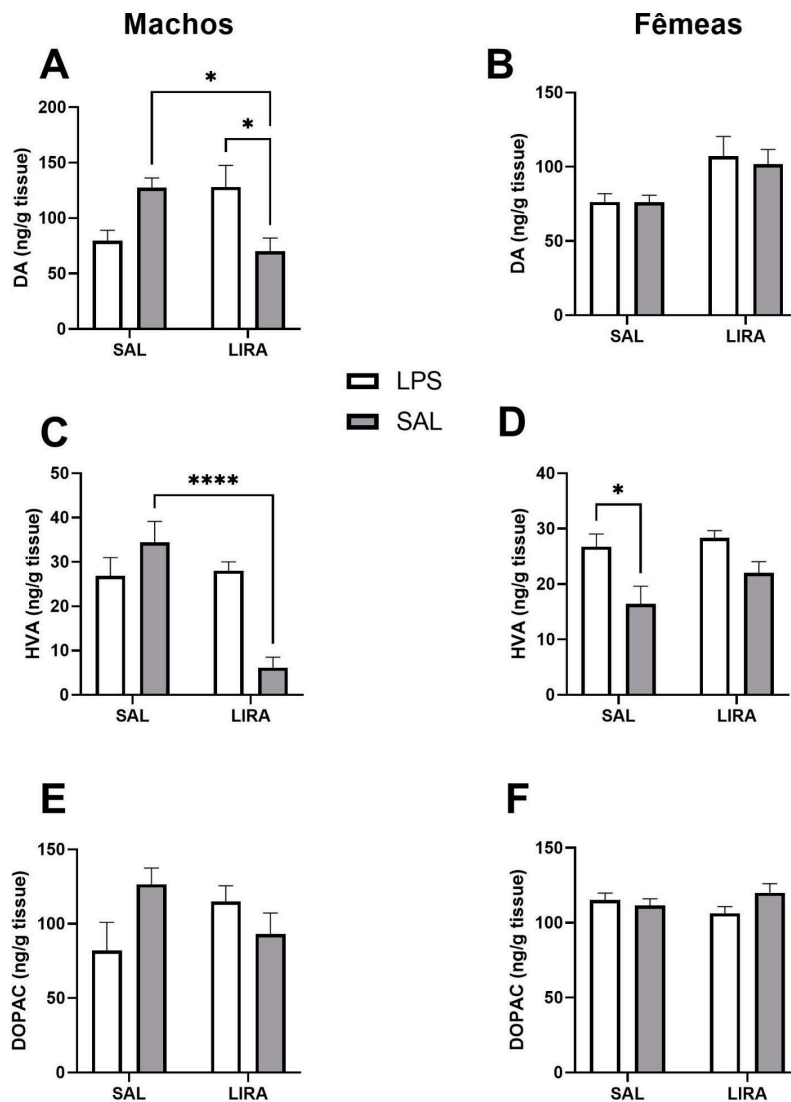


Figura 11. Níveis hipotalâmicos de dopamina (DA) e de seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) após administração de LPS em ratos tratados ou não com liraglutida (LIRA). Os painéis (A) e (B) mostram os níveis de DA em ratos machos e fêmeas, respectivamente; os painéis (C) e (D) apresentam os níveis de HVA em machos e fêmeas; e os painéis (E) e (F) correspondem aos níveis de DOPAC em machos e fêmeas. Os animais foram divididos em grupos controle (SAL) e tratados com LIRA (0,3 mg/kg,

i.p.) e avaliados 4 horas após a administração de LPS (50 µg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (0,9%, 0,5 mL) (n = 6–7 por grupo). Os dados são apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey (*p < 0,05; **p < 0,01).

A Figura 12 apresenta os níveis hipotalâmicos de NA e de seu metabólito di-hidroxiifenilglicol (DHPG) em ratos machos e fêmeas submetidos à febre induzida por LPS e tratados ou não com LIRA. Os painéis A e C mostram os níveis de NA em machos e fêmeas, respectivamente, enquanto os painéis B e D correspondem aos níveis do metabólito DHPG em machos e fêmeas.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de NA ou de DHPG entre os grupos experimentais, tanto em machos quanto em fêmeas. Esses resultados indicam que nem a febre induzida por LPS nem o tratamento com LIRA promoveram alterações detectáveis no sistema noradrenérgico hipotalâmico nas condições experimentais avaliadas.

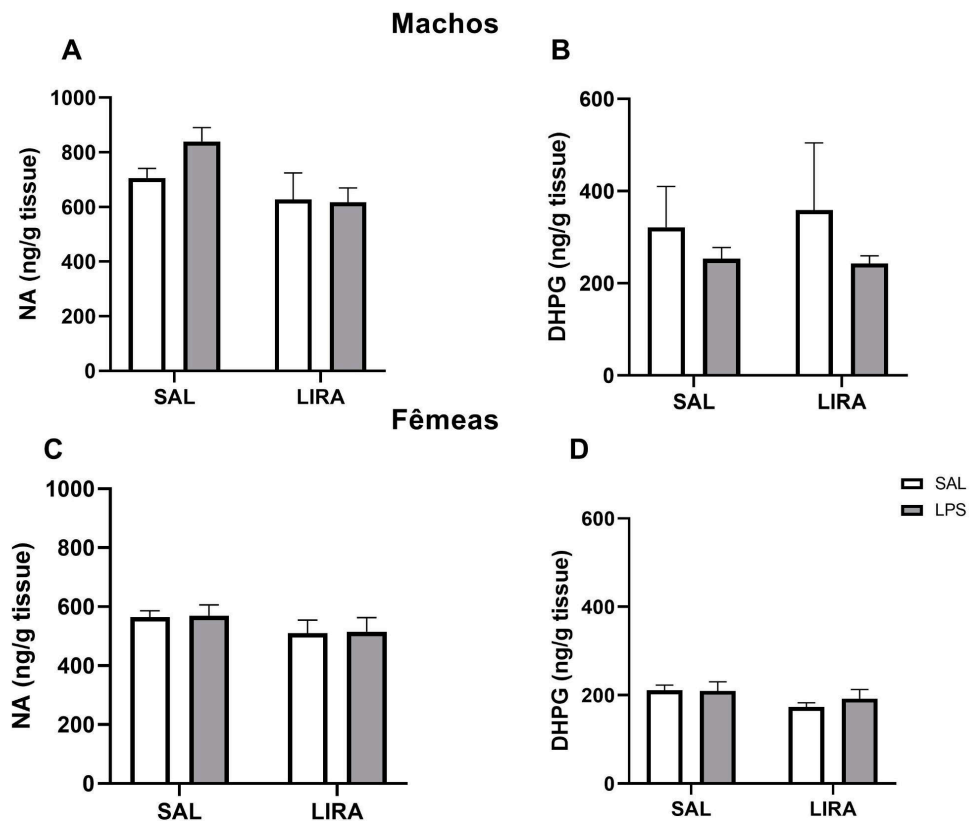


Figura 12: Concentrações de NA e de seu metabólito di-hidroxiifenilglicol (DHPG) no hipotálamo após administração de LPS em ratos tratados ou não com LIRA. Os painéis (A) e (C) mostram os níveis de noradrenalina em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Os painéis (B) e (D) apresentam os níveis do metabólito DHPG em machos e fêmeas, respectivamente. Os animais foram divididos em grupos controle (SAL) e tratados com LIRA (0,3 mg/kg, i.p.) e avaliados 4 horas após a administração de LPS (50 µg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (0,9%, 0,5 mL) (n = 6–7 por grupo). Os dados são apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey.

6.6 Modulação específica por sexo da sinalização de JNK hipotalâmica pela LIRA

Para compreender de que forma a LIRA influencia vias moleculares associadas ao seu efeito antipirético, investigamos a sinalização de JNK no hipotálamo, uma vez que essa quinase desempenha papel central na resposta inflamatória. A análise por Western blot evidenciou padrões de fosforilação distintos entre machos e fêmeas após o desafio com LPS. Nos machos, a administração de LPS isoladamente não modificou de maneira significativa a fosforilação de JNK em relação aos animais tratados com SAL. Contudo, quando a LIRA foi administrada após o LPS, observou-se um aumento significativo nos níveis de JNK fosforilada ($p < 0,05$), indicando maior ativação da enzima (Figura 13A, 13C). Além disso, a quantidade total de JNK foi reduzida no grupo LPS/LIRA em comparação ao grupo LPS/SAL ($p < 0,05$), o que pode refletir alterações no turnover ou na síntese dessa proteína (Figura 13E).

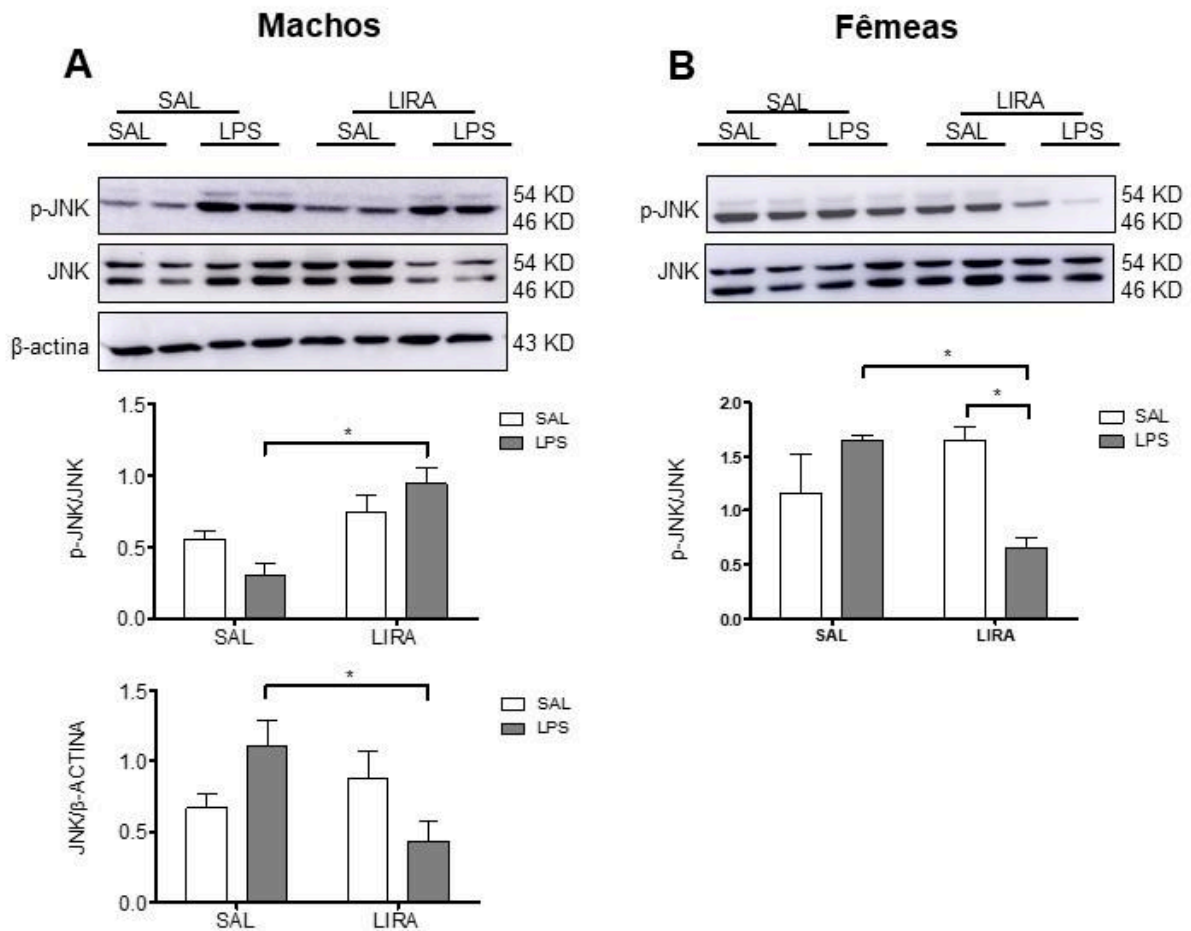


Figura 13. Efeitos específicos por sexo da LIRA na fosforilação de JNK hipotalâmica em ratos machos e fêmeas após inflamação sistêmica induzida por LPS. Imagens representativas de *Western blot* mostrando JNK

fosforilada (p-JNK), JNK total e expressão de β -actina em tecido hipotalâmico de ratos machos (A) e fêmeas (B). Os animais foram tratados com SAL ou LIRA, seguidos de SAL ou LPS (50 μ g/kg, i.p.). A análise quantitativa apresenta a razão entre p-JNK e JNK total em machos (C) e fêmeas (D), bem como JNK total normalizada pela β -actina em machos (E). Os dados são apresentados como média \pm EPM (n = 6–8 por grupo). *p < 0,05, determinado por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey. Os pesos moleculares estão indicados à direita dos *blots*. Fonte Adaptado de Sousa et al. (2025).

Nas fêmeas, o perfil de resposta foi substancialmente distinto do observado nos machos. Assim como naquele sexo, o LPS isolado não produziu um aumento significativo na fosforilação de JNK quando comparado ao grupo tratado com SAL. No entanto, a administração de LIRA após o LPS levou a uma redução acentuada nos níveis de JNK fosforilada (p < 0,05), resultando em valores inferiores aos registrados no grupo LPS/SAL (Figura 14B, 14D). Diferentemente do que ocorreu com os machos, a quantidade total de JNK permaneceu inalterada entre os grupos experimentais femininos, indicando que as alterações observadas se devem à modulação do estado de ativação da quinase, e não a modificações na expressão proteica (Figura 13B).

7. DISCUSSÃO

A febre resulta da ativação coordenada de diferentes mecanismos autonômicos, incluindo vasoconstrição cutânea, redução da perda de calor corporal, diminuição da sudorese, tremores e possível termogênese sem tremores, todos integrados pelo sistema nervoso central (Blomqvist e Engblom, 2018). Utilizamos uma dose i.p. de 50 µg/kg de LPS para induzir o estado febril em machos e fêmeas, e essa dose produziu aumento da Tc semelhante nos dois sexos. Esse resultado contrasta com estudos que descrevem febre menos intensa em fêmeas em ciclo quando comparadas aos machos ou as fêmeas ovariectomizadas (Brito et al., 2016; Costa et al., 2024). Uma explicação plausível é que o ciclo estral não foi monitorado no presente estudo, e sabe-se que flutuações hormonais, especialmente nos níveis de estrogênio ao longo do ciclo, modulam a intensidade da resposta febril (Goldman, Murr e Cooper, 2007). Dessa forma, possíveis diferenças sexuais na magnitude da febre podem ter sido atenuadas pela variabilidade hormonal intrínseca.

Após caracterizar o modelo de inflamação sistêmica, avaliamos os efeitos da LIRA sobre a termorregulação. Observamos que o fármaco reduziu a Tc tanto em animais eutérmicos quanto em estado febril, independentemente do sexo. Esses achados reforçam o envolvimento do GLP-1R na regulação da Tc, já que estudos prévios demonstraram que o bloqueio central de GLP-1R intensifica a febre induzida por LPS (Rinaman e Comer, 2000). Além disso, a LIRA apresenta ações anti-inflamatórias periféricas descritas na literatura, como a redução de edema induzido por carragenina (Mert et al., 2022), o que sugere uma atuação combinada em vias centrais e periféricas capazes de limitar a resposta febril.

Com base nesse conjunto de evidências, nossos resultados demonstram que a LIRA modula tanto a temperatura basal quanto a febre, mas os mecanismos associados a esses efeitos diferem entre machos e fêmeas. Essa divergência apareceu de forma recorrente ao longo das análises e indica que a ação antipirética e termorregulatória da LIRA envolve vias distintas entre os sexos. Essa observação é particularmente relevante, pois a maioria dos estudos sobre GLP-1R e inflamação sistêmica não aborda diferenças relacionadas ao sexo, o que reforça a importância de considerar essa variável biológica em pesquisas que investigam a farmacologia da termorregulação.

A redução da Tc observada no grupo SAL/LIRA indica que a LIRA afeta a termorregulação mesmo sem estímulo inflamatório. Esse resultado sugere que o agonismo do GLP-1R pode interferir em mecanismos centrais do controle da temperatura basal, possivelmente modulando o equilíbrio entre produção e conservação de calor por meio de circuitos hipotalâmicos que integram sinais metabólicos e autonômicos. Embora este estudo

não tenha avaliado diretamente os mecanismos efetores de termogênese, a queda da Tc em animais eutérmicos sugere um efeito farmacológico além da ação antipirética clássica.

A redução da Tc observada após o tratamento com LIRA, inclusive em animais eutérmicos, pode ser interpretada como um deslocamento transitório da Tc para valores inferiores ao basal, aproximando-se de um estado de hipotermia leve. Em modelos experimentais, a hipotermia induzida farmacologicamente tem sido associada à modulação central de circuitos hipotalâmicos envolvidos no balanço entre produção e conservação de calor, bem como à redução da atividade termogênica. Nesse sentido, os dados apresentados sugerem que a ativação do GLP-1R pode influenciar o ponto de equilíbrio térmico ou os mecanismos centrais que determinam a Tc basal, ainda que o presente estudo não tenha como objetivo caracterizar formalmente um estado de hipotermia nem seus correlatos fisiológicos periféricos.

Do ponto de vista funcional, a queda da Tc pode influenciar a interpretação dos efeitos antipiréticos da LIRA, já que o fármaco parece reduzir tanto a resposta febril quanto a Tc em condições basais. Embora esses resultados não permitam inferências diretas sobre a hipotermia em humanos, reforçam que agonistas de GLP-1R podem exercer efeitos centrais sobre a termorregulação, o que deve ser investigado em estudos futuros, incluindo a tolerância ao frio, a recuperação térmica e parâmetros de termogênese adaptativa.

Esses dados sugerem que a ativação do GLP-1R pode influenciar a percepção térmica ou a regulação central da produção de calor, o que pode explicar relatos de sensação de frio em usuários de agonistas de GLP-1 na prática clínica. No entanto, diferenças entre espécies, doses e condições ambientais limitam a extrapolação direta para humanos. Ainda assim, os achados experimentais reforçam a importância de investigar, em estudos futuros, se a LIRA altera a defesa contra o frio, a termogênese adaptativa e a integração entre sinais metabólicos e térmicos, especialmente considerando possíveis diferenças entre os sexos.

As prostaglandinas constituem mediadores cruciais no início e na manutenção da febre (Blomqvist e Engblom, 2018). Para esclarecer se o efeito antipirético da LIRA poderia envolver a modulação desses sinalizadores, investigamos as concentrações hipotalâmicas de PGE₂. O LPS aumentou substancialmente os níveis deste mediador em ambos os sexos, com valores que foram aproximadamente o dobro nos machos quando comparados às fêmeas. Essa diferença é compatível com estudos que mostram maior produção de PGE₂ em situações de depleção estrogênica, como em fêmeas ovariectomizadas, quando comparadas a fêmeas em ciclo estral (Brito et al., 2016).

O achado mais marcante, no entanto, foi que a LIRA reduziu a PGE₂ apenas nos machos febris. Isso indica que, nesse sexo, o efeito antipirético da LIRA está associado à supressão da produção central de PGE₂. Estudos prévios reforçam essa interpretação: macrófagos estimulados por LPS reduzem a produção de PGE₂ após exposição à LIRA de maneira dependente da dose (Baris et al., 2025). De forma semelhante, a exendina-4, outro agonista de GLP-1R, inibe a expressão de mediadores inflamatórios como iNOS, COX-2, NO e PGE₂ em modelos celulares expostos ao LPS (Lu et al., 2019).

Adicionalmente, um trabalho recente mostrou que, em modelos de osteoartrite, a LIRA diminuiu de modo significativo a produção de PGE₂ em condrócitos e macrófagos (Meurot et al., 2022), reforçando a hipótese de que o fármaco é capaz de modular essa via em diferentes contextos inflamatórios.

Nas fêmeas tratadas com LIRA, as concentrações hipotalâmicas de PGE₂ permaneceram inalteradas, mesmo com a queda de Tc observada nesse grupo. Esse resultado indica que, diferentemente do que ocorre nos machos, a redução térmica nas fêmeas não parece depender da modulação desse mediador. A literatura já descreve que machos e fêmeas recorrem a estratégias distintas para controlar a febre, o que pode explicar os padrões divergentes encontrados aqui. Um exemplo clássico é o estudo de Pittman e colaboradores (1998), que demonstrou que o bloqueio dos receptores de vasopressina aumenta os níveis de PGE₂ somente em machos febris, enquanto as fêmeas não exibem essa resposta. Esse tipo de evidência sugere que a relação entre inflamação, vasopressina e PGE₂ é regulada de maneira diferente entre os sexos, reforçando que a ação da LIRA sobre a Tc das fêmeas ocorre por mecanismos independentes da PGE₂.

A IL-6 desempenha papel fundamental na resposta febril induzida por LPS, o que é evidenciado pelo fato de que sua administração direta no sistema nervoso central é suficiente para provocar febre (Roth e Souza, 2001). Em contraposição, a ausência genética dessa citocina ou sua neutralização farmacológica impede o desenvolvimento da resposta febril (Evans, Repasky e Fisher, 2015; Chai et al., 1996; Kozak et al., 1998). No presente estudo, observamos que a administração de LPS aumentou os níveis séricos de IL-6 tanto em machos quanto em fêmeas, confirmando sua participação como mediador pirogênico.

Apesar disso, a redução dessa citocina após a administração de LIRA ocorreu apenas nas fêmeas. Resultados semelhantes foram relatados com outros agonistas de GLP-1R: a exendina-4, por exemplo, não alterou a produção de IL-6 induzida por LPS em machos (Wong et al., 2024), mas reduziu essa citocina em macrófagos estimulados por LPS (Lu et al., 2019). A LIRA também diminuiu a IL-6 em modelos de osteoartrite (Meurot et al., 2022) e de

isquemia-reperfusão hepática (Li et al., 2022). Contudo, é importante notar que esses estudos não avaliaram diferenças entre os sexos, o que pode ter mascarado respostas divergentes que agora se tornam evidentes.

A observação de que apenas as fêmeas responderam à LIRA com redução de IL-6 reforça a existência de modulação dependente do sexo. Essa interpretação é coerente com dados clínicos mostrando que mulheres apresentam cerca de 32% maior exposição sistêmica à LIRA em comparação aos homens (Wilding et al., 2016). Isso sugere que a dose de 0,3 mg/kg utilizada nesta investigação pode ter sido suficiente para modular a IL-6 nas fêmeas, mas não nos machos, evidenciando uma sensibilidade distinta ao tratamento entre os sexos.

Em nosso estudo, o comportamento da IL-10 revelou diferenças marcantes entre machos e fêmeas. As fêmeas apresentaram níveis basais dessa citocina muito superiores aos dos machos, aproximadamente três vezes maiores. Mesmo assim, a administração de LPS não modificou a concentração de IL-10 nesse sexo, e a LIRA também não promoveu alterações significativas. Essa ausência de resposta sugere que a modulação de IL-10 pela LIRA pode depender do sexo, o que é apoiado por evidências prévias mostrando que a LIRA aumenta a expressão de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1), no hipocampo de machos oriundos de mães com restrição alimentar, mas não em fêmeas submetidas ao mesmo protocolo experimental (Diz-Chaves et al., 2018).

Nos machos, o padrão observado foi distinto. O LPS aumentou a produção de IL-10, confirmando sua participação como componente compensatório da resposta inflamatória. A LIRA, por sua vez, apresentou efeitos dependentes do estado inflamatório: elevou a IL-10 quando administrada a animais controles tratados com SAL, mas não modificou sua produção em animais desafiados com LPS. Esse comportamento bimodal também foi descrito por Mert et al. (2022), que observaram aumento acentuado de IL-10 em áreas inflamadas de ratos tratados com LIRA, sem efeito equivalente em tecidos não inflamados. Resultados semelhantes foram relatados em modelo de enxaqueca crônica, no qual a LIRA reduziu a ativação neuronal e aumentou a expressão de IL-10 no núcleo caudal trigeminal (Jing, Zou e Pu, 2023).

Essa combinação de achados, marcada por níveis basais elevados nas fêmeas, ausência de resposta à LIRA nesse sexo, aumento induzido por LPS apenas em machos e efeitos contextuais da LIRA, reforça que a modulação dessa citocina apresenta forte componente dependente do sexo e do estado inflamatório. Isso contribui para explicar as diferenças funcionais entre machos e fêmeas observadas nas respostas imunes e neuroinflamatórias. Considerando que tais diferenças emergem no contexto de uma inflamação sistêmica

desencadeada pelo LPS, torna-se relevante integrar esses achados aos mecanismos iniciais de reconhecimento imune inato que governam essa resposta.

A resposta inflamatória desencadeada pelo LPS é iniciada primariamente pela ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4), que promove a ativação de cascatas intracelulares pró-inflamatórias no sistema nervoso central e em tecidos periféricos. Nesse contexto, os efeitos anti-inflamatórios e antipiréticos observados com a LIRA levantam a possibilidade de que a sinalização via GLP-1R interfira, direta ou indiretamente, em etapas a jusante da ativação do TLR4. Embora o presente estudo não tenha avaliado componentes da via TLR4, é plausível supor que a ativação do GLP-1R module a sensibilidade celular ao LPS ou a amplitude da resposta inflamatória subsequente, contribuindo para a atenuação da produção de mediadores pirogênicos e da resposta febril. Assim, a interação funcional entre GLP-1R e vias ativadas por TLR4 emerge como um possível eixo de regulação da neuroinflamação e da termorregulação, representando uma perspectiva relevante para investigações futuras.

Diversos estudos demonstram que a LIRA é capaz de reduzir marcadores de estresse oxidativo em diferentes modelos experimentais, particularmente em tecidos como coração e fígado, além de exercer efeitos semelhantes em células endoteliais de veia umbilical humana. Esses efeitos têm sido atribuídos, ao menos em parte, à sua ação anti-inflamatória e à modulação de vias intracelulares associadas ao estresse oxidativo (Shiraki et al., 2011; Inoue et al., 2015; Yu et al., 2023). Por esta razão, investigamos se a redução da Tc observada no presente estudo poderia estar associada à modulação sistêmica da produção de ERO. No entanto, nem a febre induzida pelo LPS nem o tratamento com LIRA promoveram alterações detectáveis nos níveis circulantes de ERO.

Esse achado é compatível com dados prévios da literatura, como os de Gomes et al. (2018), que demonstraram aumento da produção de ERO em tecidos específicos, incluindo fígado, tecido adiposo marrom e hipotálamo, durante a febre, sem alterações correspondentes no sangue periférico. Esses resultados sugerem que a geração de ERO durante a resposta febril apresenta caráter predominantemente local e compartimentalizado, não se refletindo necessariamente em alterações sistêmicas mensuráveis.

Assim, a ausência de aumento detectável de ERO circulantes sugere que, nas condições experimentais adotadas, a resposta febril não esteve associada a estresse oxidativo sistêmico significativo. Consequentemente, os efeitos antipiréticos da LIRA observados neste estudo parecem ocorrer de forma independente da modulação global da produção de ERO, indicando que mecanismos inflamatórios e neuroimunes, mais do que vias redox sistêmicas, desempenham papel central na redução da Tc promovida por esse fármaco.

Outra via potencialmente associada ao controle da Tc envolve o NO, um radical livre que pode reagir com a hemoglobina para formar HbNO, marcador importante em condições de estresse nitrosativo (Dikalov e Fink, 2005). Partindo dessa premissa, investigamos se a LIRA poderia interferir na formação de HbNO, especialmente porque o NO participa da resposta febril e apresenta propriedades antipiréticas em modelos de febre induzida por LPS (Begg et al., 2007; Soriano et al., 2010; Steiner et al., 2002). Observamos que o LPS elevou as concentrações de HbNO no sangue de machos e fêmeas, indicando aumento da disponibilidade de NO durante a febre. O tratamento com LIRA, porém, não modificou esse parâmetro, sugerindo que, no contexto estudado, o efeito de redução de temperatura não está associado a alterações na formação de HbNO.

Embora nossos achados indiquem ausência de influência da LIRA sobre NO e HbNO durante a febre, estudos realizados em outros contextos inflamatórios mostram que o fármaco é capaz de aumentar a produção de NO e reduzir a ativação de NF-kappaB em células endoteliais vasculares por mecanismos mediados parcialmente por p roteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Hattori et al., 2010). Assim, apesar de sua capacidade conhecida de interferir na sinalização de NO, esses efeitos não se manifestaram no modelo de inflamação sistêmica utilizado neste estudo.

A participação da 5-HT e da DA na regulação do humor e na resposta inflamatória motivou a investigação dos efeitos da LIRA sobre esses neurotransmissores no hipotálamo. Esse enfoque é ainda mais relevante diante de evidências recentes que sugerem que a LIRA pode atenuar sintomas depressivos por meio da modulação de sistemas neurotransmissores centrais (Gammoh et al., 2025). Além disso, a 5-HT possui ações conhecidas de redução da febre, o que levanta a possibilidade de que sua modulação contribua para o efeito antipirético observado com o tratamento.

Diversos estudos já demonstraram que existe um marcado dimorfismo sexual no sistema serotoninérgico, tanto na termorregulação quanto na inflamação. Em modelos de inflamação sistêmica, verificou-se que os níveis hipotalâmicos de 5-HT diminuem em machos e aumentam em fêmeas após o estímulo com LPS (Costa et al., 2024). Em nossa investigação, observamos que o LPS reduziu a concentração de 5-HT em machos, resultado compatível com esses achados, embora não tenhamos detectado aumento significativo desse neurotransmissor nas fêmeas desafiadas com LPS. A LIRA, contudo, produziu respostas completamente distintas entre os sexos: diminuiu a 5-HT em machos eutérmicos e não impediu a queda induzida por LPS, enquanto nas fêmeas elevou a 5-HT em 84%, mas exclusivamente no contexto inflamatório.

Essas diferenças provavelmente refletem o impacto modulador do estrogênio sobre a neurotransmissão serotoninérgica. Esse hormônio estimula a expressão e a atividade da triptofano-hidroxilase e reduz a recaptação de 5-HT por meio da regulação do seu transportador (Smith et al., 2004; Hiroi e Neumaier, 2009). Assim, em fêmeas inflamadas, a combinação de sinalização estrogênica e inflamatória pode potencializar a capacidade da LIRA de elevar a 5-HT. Em machos, por outro lado, a ausência desse componente hormonal sugere que outros mecanismos prevalecem, como maior atividade da monoamina oxidase, mudanças no turnover da 5-HT ou alterações na excitabilidade neuronal durante a inflamação. Em conjunto, esses resultados indicam que a ativação do GLP-1R interage com vias inflamatórias e hormonais de maneira dependente do sexo, resultando em perfis distintos de modulação da 5-HT.

Nas fêmeas, o aumento dos níveis hipotalâmicos de 5-HT após o tratamento com LIRA acompanha a diminuição da Tc observada nesse sexo, o que está alinhado com o papel conhecido da ativação serotoninérgica em atenuar a febre (Mota et al., 2017). Esses achados reforçam a noção de que a 5-HT participa diretamente do mecanismo antipirético da LIRA nas fêmeas. Em contraste, nos machos, a redução da febre parece ocorrer por vias que não envolvem a modulação de 5-HT, sendo mais provavelmente atribuída à queda nas concentrações de PGE₂. Essa interpretação está de acordo com estudos anteriores que mostraram diminuição da 5-HT plasmática em machos tratados com LIRA (Nonogaki e Kaji, 2024), sugerindo que, nesse sexo, a via serotoninérgica é pouco relevante para o efeito térmico do fármaco.

Quanto à DA, embora estudos anteriores tenham mostrado que esse neurotransmissor pode diminuir durante a inflamação sistêmica em ambos os sexos (Costa et al., 2024), não observamos esse padrão em nosso modelo experimental. Em nossos animais, nem o LPS nem o tratamento com LIRA alteraram os níveis hipotalâmicos de DA, indicando que esse neurotransmissor não parece contribuir para os efeitos observados nas condições avaliadas.

De forma integrada, os resultados relacionados aos metabólitos de monoaminas indicam que a febre induzida por LPS promove modulações seletivas e sexo-específicas nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, enquanto o sistema noradrenérgico hipotalâmico permaneceu inalterado nas condições avaliadas. As alterações observadas nos níveis de 5-HIAA e HVA sugerem que a febre e o tratamento com LIRA afetam preferencialmente o metabolismo de 5-HT e DA, neurotransmissores envolvidos na regulação central da Tc, do comportamento e da resposta autonômica. Em contraste, a ausência de alterações nos níveis de NA e de seu metabólito DHPG indica que esse sistema não participa de forma significativa

das respostas centrais associadas à febre ou à ação da LIRA neste modelo experimental, reforçando a especificidade neuroquímica dos efeitos observados.

A quinase JNK, amplamente reconhecida por sua participação em vias de sinalização associadas à inflamação, é ativada por diferentes estímulos pró-inflamatórios, incluindo o LPS (Bangshaab et al., 2019; Mizuno et al., 2025). Em nosso estudo, a modulação dessa via pela LIRA revelou um padrão nitidamente dependente do sexo. Nos machos desafiados com LPS, observamos aumento da fosforilação de JNK após o tratamento com LIRA, enquanto nas fêmeas ocorreu o efeito oposto, com redução da ativação dessa quinase. Essa heterogeneidade de respostas sugere que a sinalização mediada pelo GLP-1R interage com a via da JNK de formas distintas entre os sexos.

Uma possível explicação para essas diferenças está na distribuição regional dos receptores de GLP-1 no hipotálamo. Regiões como a POA, fundamental para o controle da Tc, e o núcleo arqueado, responsável pela integração de sinais metabólicos como leptina, insulina e glicose, apresentam expressão de GLP-1R (Merchenthaler, Lane e Shughrue, 1999). Assim, discrepâncias sexuais na densidade desses receptores, nas vias intracelulares subsequentes ou nas interações com hormônios esteroides podem estar na base do dimorfismo observado.

Embora a via do NF- κ B seja amplamente reconhecida como um dos principais eixos de sinalização envolvidos na resposta inflamatória induzida por LPS, a presente investigação não conseguiu explorar diretamente a modulação dessa via pela LIRA no hipotálamo. Inicialmente, o delineamento experimental previa a avaliação da razão entre a forma fosforilada/total do NF- κ B por western blotting, uma vez que a ativação desse fator de transcrição representa um ponto central na transdução de sinais pró-inflamatórios e na regulação da expressão de mediadores como COX-2, iNOS e citocinas. No entanto, apesar de múltiplas tentativas de padronização experimental, não foi possível obter detecção consistente da forma fosforilada da proteína, sendo observada apenas a fração total. Diante dessa limitação técnica, optou-se por direcionar a análise para a via da JNK, um fator de transcrição sensível à ativação por LPS e intimamente associada à sinalização inflamatória e ao estresse celular. Essa estratégia permitiu explorar, de forma alternativa, a modulação de vias intracelulares pró-inflamatórias pelo agonismo de GLP-1R, revelando, inclusive, um padrão de resposta marcadamente dependente do sexo. Assim, embora a via do NF- κ B permaneça como um alvo relevante para investigações futuras, os achados envolvendo a JNK oferecem evidências robustas de que a LIRA interfere em cascatas de sinalização inflamatória centrais de maneira complexa e sexualmente dimórfica.

Apesar da relevância dos achados apresentados, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas na interpretação dos resultados. O protocolo experimental empregou a administração aguda de LIRA, não permitindo inferências sobre os possíveis efeitos da exposição crônica ao fármaco sobre a termorregulação e os mediadores neuroimunes avaliados. Ademais, as análises moleculares e bioquímicas foram realizadas em um único ponto temporal (4 horas após a administração do LPS), o que impossibilita a avaliação da dinâmica temporal completa das respostas inflamatórias, oxidativas e de sinalização intracelular ao longo da evolução da febre. Embora tenham sido observadas alterações na fosforilação de JNK no hipotálamo, não foram empregados inibidores farmacológicos específicos dessa via, o que limita conclusões causais diretas sobre o papel funcional da JNK nos efeitos moduladores da LIRA sobre a Tc. Outro aspecto relevante refere-se à ausência do controle do ciclo estral nas fêmeas, o que pode introduzir variabilidade adicional relacionada às flutuações hormonais e influenciar a magnitude das respostas observadas. Por fim, por se tratar de um estudo conduzido em modelo experimental com roedores, a extrapolação direta dos achados para a fisiologia humana deve ser realizada com cautela, sendo necessários estudos clínicos para confirmar a relevância translacional dos mecanismos aqui propostos.

Cabe contextualizar que a presente investigação se insere em uma linha de pesquisa que emergiu a partir de evidências iniciais de que agonistas do receptor de GLP-1 exercem efeitos anti-inflamatórios em diferentes contextos experimentais. Estudo prévio demonstrou que a LIRA é capaz de reduzir a inflamação e a temperatura local em modelo experimental de edema periférico (Mert et al., 2022), evidenciando seu potencial modulador sobre processos inflamatórios teciduais. Embora a redução da temperatura local em um sítio inflamatório não se relacione diretamente aos mecanismos centrais de termorregulação, esses achados suscitaram a hipótese de que a ativação do GLP-1R poderia também interferir em vias inflamatórias centrais envolvidas na regulação da temperatura corporal e na resposta febril, uma vez que receptores de GLP-1 são expressos em regiões hipotalâmicas implicadas no controle térmico. Essa proposição orientou o delineamento dos experimentos apresentados neste estudo e se mostrou consistente com os achados obtidos, uma vez que a LIRA foi capaz de reduzir tanto a Tc basal quanto a febre induzida por LPS, por mecanismos distintos e dependentes do sexo. Os achados do presente estudo indicam que a atenuação da resposta febril induzida por LPS pela LIRA envolve mecanismos centrais distintos entre machos e fêmeas. Em machos, a modulação da febre mostrou-se predominantemente associada à redução dos níveis hipotalâmicos de prostaglandina E₂ (PGE₂), um mediador clássico da resposta febril e da sinalização pirógena no sistema nervoso central. Esse resultado sugere

que, nesse sexo, a ação da LIRA converge principalmente para vias neuroinflamatórias tradicionais envolvidas no ajuste do ponto de equilíbrio térmico. Por outro lado, em fêmeas, a atenuação da febre ocorreu por meio de vias paralelas e não necessariamente dependentes entre si, envolvendo a redução de IL-6, a diminuição da fosforilação de JNK (p-JNK) e o aumento da sinalização serotoninérgica (5-HT) em circuitos hipotalâmicos, particularmente na POA. Esses dados reforçam a existência de diferenças sexuais nos mecanismos centrais de modulação da resposta febril ao tratamento com agonistas do receptor de GLP-1, indicando que, em fêmeas, a LIRA pode atuar por múltiplos eixos neuroimunes e neuroquímicos que convergem funcionalmente para a atenuação da febre, sem que haja uma hierarquia linear obrigatória entre essas vias. A integração desses mecanismos é apresentada de forma esquemática na **Figura 14**, que sintetiza o modelo proposto a partir dos resultados obtidos no presente trabalho.

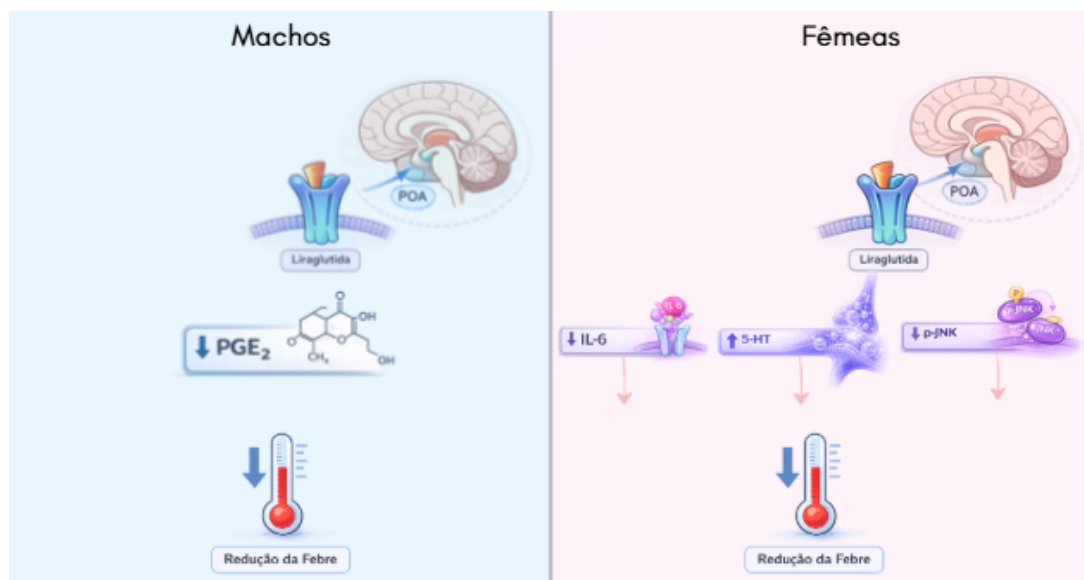


Figura 14. Esquema integrativo dos principais mecanismos centrais envolvidos na atenuação da febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS) após tratamento com liraglutida. Em machos, a redução da resposta febril associa-se predominantemente à diminuição dos níveis hipotalâmicos de prostaglandina E₂ (PGE₂). Em fêmeas, a atenuação da febre ocorre por vias paralelas e não necessariamente dependentes entre si, envolvendo a redução de IL-6, a diminuição da fosforilação de JNK (p-JNK) e o aumento da sinalização serotoninérgica (5-HT) em circuitos hipotalâmicos, particularmente na área pré-óptica (POA).

Fonte: Elaboração própria.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a LIRA interfere na resposta febril de modo dependente do sexo, indicando que machos e fêmeas recrutam vias distintas de termorregulação durante a inflamação sistêmica induzida por LPS. Esses achados sugerem que a sinalização mediada pelo GLP-1R não opera por um mecanismo único e uniforme no controle da Tc, mas envolve estratégias neuroimunes diferenciadas de acordo com o sexo biológico.

Em machos, a redução da febre ocorreu de acordo com o paradigma clássico, caracterizando-se pela atenuação da produção hipotalâmica de PGE₂. Esse padrão sugere que, nesse sexo, o efeito antipirético da LIRA permanece fundamentado em mecanismos centrais bem estabelecidos, nos quais a PGE₂ atua como mediador final da febre.

Nas fêmeas, a diminuição da Tc não foi acompanhada por alterações nas concentrações de PGE₂, o que indica o recrutamento de vias alternativas. Os dados mostram modificações paralelas em múltiplos componentes, como a redução dos níveis circulantes de IL-6, o aumento da 5-HT hipotalâmica e a diminuição da fosforilação da JNK. Embora essas alterações não possam ser interpretadas isoladamente como determinantes causais, elas apontam para um rearranjo neuroquímico distinto do observado em machos. Essas evidências sugerem que as fêmeas utilizam circuitos neuroimunes alternativos para modular a resposta febril.

Em conjunto, os resultados ampliam a compreensão atual sobre os efeitos centrais da sinalização mediada pelo GLP-1R e demonstram que esse sistema apresenta organização funcional dependente do sexo no contexto da termorregulação inflamatória. Embora os achados estabeleçam associações e não relações causais diretas, eles fornecem bases sólidas para investigações futuras voltadas à identificação dos componentes efetivamente responsáveis pelo controle da Tc.

Além disso, a ativação de vias distintas pela LIRA em machos e fêmeas reforça a importância do sexo biológico como variável central na investigação de mecanismos que integram respostas imunológicas, sinalização neuroendócrina e regulação térmica. A desconsideração dessa variável pode limitar a interpretação dos efeitos do GLP-1R e obscurecer aspectos relevantes de sua atuação no sistema nervoso central. Portanto, estudos futuros deverão aprofundar a investigação dos mecanismos específicos envolvidos em cada sexo, além de avaliar se essas diferenças se estendem a outros modelos inflamatórios e à espécie humana. A elucidação desses aspectos poderá contribuir para uma compreensão mais

refinada dos efeitos dos agonistas de GLP-1 em contextos inflamatórios e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais precisas e individualizadas.

REFERÊNCIAS

- AL-SADI, R.; YE, D.; BOIVIN, M.; GUO, S.; HASHIMI, M.; EREIFEJ, L.; MA, T. Y. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of Claudin-2 gene. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, e85345, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0085345.
- ANDERBERG, R. H. et al. Glucagon-like peptide 1 and its analogs act in the dorsal brain stem and hypothalamus to control energy metabolism. *Diabetes*, v. 66, n. 4, p. 1062–1071, 2017. doi: 10.2337/db16-0755.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, v. 132, n. 6, p. 2131–2157, 2007.
- BAKER, F. C.; SIBOZA, F.; FULLER, A. Temperature regulation in women: effects of the menstrual cycle. *Temperature*, v. 7, n. 3, p. 226–262, 2020. doi: 10.1080/23328940.2020.1735927.
- BANGSHAAB, M. et al. Different mechanisms involved in liraglutide and glucagon-like peptide-1 vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 3, p. 386–399, 2019. doi: 10.1111/bph.14534.
- BARIS, E. et al. Liraglutide modulates cyclooxygenase and $\alpha 7$ acetylcholine receptors: in vitro and in silico insights into its anti-inflammatory role in LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2025. doi: 10.1007/s00210-025-04225-5.
- BEGG, D. P. et al. Suppression of endotoxin-induced fever in near-term pregnant rats is mediated by brain nitric oxide. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, n. 6, p. R2174–R2178, 2007. doi: 10.1152/ajpregu.00032.2007.
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, v. 60, p. 355–366, 2009. doi: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
- BLANTON, H. L. et al. Sex- and dose-dependent antinociceptive effects of the JNK inhibitor SU3327. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 742599, 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.742599.

BLOMQVIST, A.; ENGBLOM, D. Neural mechanisms of inflammation-induced fever. *The Neuroscientist*, v. 24, n. 4, p. 381–399, 2018. doi: 10.1177/1073858418760481.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008. doi: 10.1002/path.2287.

BRITO, H. O. et al. Female sex hormones influence the febrile response induced by lipopolysaccharide, cytokines and prostaglandins but not by interleukin-1 β in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 28, n. 10, 2016. doi: 10.1111/jne.12414.

CAI, K. C. et al. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 58, p. 327–337, 2016. doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.002.

CAMPBELL, J. E.; DRUCKER, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metabolism*, v. 17, n. 6, p. 819–837, 2013.

CAO, B. et al. Neuroprotective effects of liraglutide against inflammation through the AMPK/NF- κ B pathway in a mouse model of Parkinson's disease. *Metabolic Brain Disease*, 2022. doi: 10.1007/s11011-021-00879-1.

CHAI, Z. et al. Interleukin-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response. *Journal of Experimental Medicine*, v. 183, p. 311–316, 1996. doi: 10.1084/jem.183.1.311.

CHEN, J. et al. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 17, p. 9640, 2021. doi: 10.3390/ijms22179640.

COELHO, L. C. M.; CRUZ, J. V.; MABA, I. K.; ZAMPRONIO, A. R. Fever induced by Zymosan A and Poly I:C in female rats: influence of sex hormones and endothelin-1. *Inflammation*, v. 44, p. 321–333, 2021. doi: 10.1007/s10753-020-01335-5.

COSTA, R. A. et al. Sexual dimorphism of hypothalamic serotonin release during systemic inflammation: role of endothelin-1. *Journal of Neuroimmunology*, v. 394, p. 578427, 2024. doi: 10.1016/j.jneuroim.2024.578427.

DE SOUSA, Gabriela L. Soares et al. The GLP-1 Analog Liraglutide Reduces Fever Through Sex-Dependent Neuroinflammatory Modulation. *Pharmaceuticals*, v. 18, n. 11, p. 1738, 2025. doi: 10.3390/ph18111738.

- DINARELLO, C. A. Infection, fever, and endogenous pyrogens. *Journal of Endotoxin Research*, v. 10, n. 4, p. 201–222, 2004. doi: 10.1179/096805104225006129.
- DIKALOV, S.; FINK, B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. *Methods in Enzymology*, v. 396, p. 597–610, 2005. doi: 10.1016/S0076-6879(05)96052-7.
- DIZ-CHAVES, Y. et al. Liraglutide prevents pro-inflammatory mediator increase in hippocampus of rat pups subjected to maternal food restriction. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, p. 337, 2018. doi: 10.1186/s12974-018-1370-7.
- EVANS, S. S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and thermal regulation of immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, p. 335–349, 2015. doi: 10.1038/nri3843.
- FERNÁNDEZ-PEÑA, C. et al. Sex differences in thermoregulation in mammals. *Frontiers in Endocrinology*, v. 14, p. 1093376, 2023. doi: 10.3389/fendo.2023.1093376.
- FIGUEIREDO, M. J. et al. Febrile response induced by CLP in rats. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 201, n. 2, p. 219–229, 2012. doi: 10.1007/s00430-011-0225-y.
- GAMMOH, O. et al. Metabolic resilience: liraglutide's potential in depressive symptoms. *Molecular Biology Reports*, v. 52, p. 550, 2025. doi: 10.1007/s11033-025-10965-7.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle. *Birth Defects Research B*, v. 80, p. 84–97, 2007. doi: 10.1002/bdrb.20106.
- GOMES, B. R. B. Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a antipirese. Tese (Doutorado) — Universidade de Brasília, 2022.
- GOMES, B. R. B. et al. Reactive oxygen species in different tissues during LPS-induced fever: an EPR study. *Free Radical Research*, v. 52, p. 351–361, 2018. doi: 10.1080/10715762.2018.1425549.
- GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiology e Behavior*, v. 47, p. 963–991, 1990. doi: 10.1016/0031-9384(90)90025-y.
- HAMBLETON, J.; WEINSTEIN, S. L.; LEM, L.; DeFRANCO, A. L. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 7, p. 2774–2778, 1996. doi: 10.1073/pnas.93.7.2774

HALL, D. M.; BUETTNER, G. R. In vivo spin trapping of nitric oxide. *Methods in Enzymology*, v. 268, p. 188–192, 1996. doi: 10.1016/s0076-6879(96)68020-3.

HATTORI, Y.; JOJIMA, T.; TOMIZAWA, A. et al. Retracted article: A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia*, v. 53, p. 2256–2263, 2010. doi: 10.1007/s00125-010-1831-8.

HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA. *Neuroscience*, v. 158, p. 456–464, 2009. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.016.

HOGG, N. Detection of nitric oxide by EPR. *Free Radical Biology e Medicine*, v. 49, p. 122–129, 2010. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.009.

INOUE, T. et al. GLP-1 analog protects against cardiac steatosis. *Atherosclerosis*, v. 240, p. 250–259, 2015. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.026.

JACOBSEN, L. V. et al. Liraglutide in type 2 diabetes: PK/PD. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 55, p. 657–672, 2016. doi: 10.1007/s40262-015-0343-6.

JIANG, Q. et al. Febrile temperature upregulates pyrogenic cytokines. *AJP–Regulatory*, v. 276, p. R1653–R1660, 1999. doi: 10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1653.

JING, F.; ZOU, Q.; PU, Y. Liraglutide attenuates pain hypersensitivity. *Neuroscience Letters*, v. 812, p. 137397, 2023. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137397.

KNUDSEN, Lotte Bjerre; LAU, Jesper. The discovery and development of liraglutide and semaglutide. *Frontiers in endocrinology*, v. 10, p. 155, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00155.

KOSE, D. et al. 5-HT₇ receptor in LPS-induced fever. *Inflammopharmacology*, v. 27, p. 49–59, 2019. doi: 10.1007/s10787-019-00617-1.

KOZAK, W. et al. IL-6 and IL-1 β in fever: cytokine-deficient mice. *Annals NY Academy of Sciences*, v. 856, p. 33–47, 1998. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08310.x.

- KUMAR, A.; SINGH, U. K.; KINI, S. G. et al. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic target for various biological diseases. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 15, p. 2065–2086, 2015. doi: 10.4155/fmc.15.132.
- KUMAR, S.; SINGH, R. K.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic role of nitric oxide. *Biomedicine e Pharmacotherapy*, v. 85, p. 182–201, 2017. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.
- LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin-6 in fever in rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 258, n. 3, p. R798–R803, 1990. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.3.R798
- LIDDLE, L. J. et al. Role of fever after ICH. *Translational Stroke Research*, v. 14, p. 123–136, 2023. doi: 10.1007/s12975-022-01010-x.
- LI, S. L. et al. Liraglutide attenuates hepatic ischemia–reperfusion injury by modulating macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.869050.
- LU, C. et al. Exendin-4 mitigates LPS-induced inflammation. *International Immunopharmacology*, v. 77, p. 105969, 2019. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105969.
- MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. CNS circuits that control temperature. *Neuroscience Letters*, v. 696, p. 225–232, 2019. doi: 10.1016/j.neulet.2018.11.027.
- MERCHENTHALER, I.; LANE, M.; SHUGHRUE, P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, v. 403, n. 2, p. 261–280, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990111)403:2<261::AID-CNE8>3.0.CO;2-5
- MERT, I. et al. Anti-inflammatory potential of liraglutide. *Inflammopharmacology*, v. 30, p. 1093–1105, 2022. doi: 10.1007/s10787-022-00978-0.
- MIZUNO, S. et al. Phosphatidylcholine suppresses LPS-induced microglial inflammation. *PLOS ONE*, v. 20, n. 7, 2025. doi: 10.1371/journal.pone.0328206.
- MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central mechanisms for thermoregulation. *Annual Review of Physiology*, v. 81, p. 285–308, 2019. doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114546.

MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 66, p. 372–381, 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2017.07.010.

NONOGAKI, K.; KAJI, T. Liraglutide reduces appetite independently of serotonin. *Journal of Diabetes Research*, 2018. doi: 10.1155/2018/6482958.

NONOGAKI, K.; KAJI, T. Liraglutide decreases bile acids and serotonin in colon. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 14, p. 7784, 2024. doi: 10.3390/ijms25147784.

PEROTTI, C. A. A. et al. nNOS inhibitor on LPS-induced fever. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 1381–1387, 1999. doi: 10.1590/s0100-879x1999001100008.

PHILLIPS, N. A. et al. Protection of intestinal injury during heat stroke in mice by interleukin-6 pretreatment. *Journal of Physiology*, v. 593, n. 3, p. 739-752, 2015. doi: 10.1113/jphysiol.2014.283416.

PITTMAN, Q. J. et al. Vasopressin-induced antipyresis. *Annals NY Academy of Sciences*, v. 856, p. 53–61, 1998. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08312.x.

PROCYK, K. J. et al. Lipopolysaccharide induces jun N-terminal kinase activation in macrophages by a novel Cdc42/Rac-independent pathway involving sequential activation of protein kinase C zeta and phosphatidylcholine-dependent phospholipase C. *Blood*, v. 96, n. 7, p. 2592–2598, 1 out. 2000. doi: 10.1182/blood.V96.7.2592.

RINAMAN, L.; COMER, J. GLP-1 receptor antagonism enhances LPS fever. *Autonomic Neuroscience*, v. 85, p. 98–101, 2000. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00227-7.

ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; GARCIA, E. A.; STEINER, A. A.; NORMAN, M. H.; MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K.; SANKARANARAYANAN, S.; MATEUS, A. R.; BUNN, S. J. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Frontiers in Bioscience*, Boca Raton, v. 10, p. 2193–2216, 2005.

ROMANOVSKY, Andrej A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *American journal of Physiology-Regulatory, integrative and comparative Physiology*, v. 292, n. 1, p. R37-R46, 2007. doi:10.1152/ajpregu.00668.2006

ROTH, J.; DE SOUZA, G. E. P. Fever induction pathways. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 301–314, 2001. doi: 10.1590/s0100-879x2001000300003.

SÉLLEY, E.; MOLNÁR, G. A.; KUN, S. et al. Complex vasoactivity of liraglutide: contribution of three gasotransmitters. *Artery Research*, v. 11, p. 1–9, 2015. doi: 10.1016/j.artres.2015.04.001.

SESSLER, D. I. Complications and treatment of mild hypothermia. *Anesthesiology, Philadelphia*, v. 95, n. 2, p. 531–543, 2001.

SHIRAKI, A. et al. Liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress. *Atherosclerosis*, v. 221, p. 375–382, 2012. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.039.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas de oxigênio em doenças respiratórias. *Ciência Rural*, v. 40, p. 994–1002, 2010.

SMITH, L. J.; HENDERSON, J. A.; ABELL, C. W. et al. Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 2035–2045, 2004. doi: 10.1038/sj.npp.1300510.

SORIANO, R. N. et al. Locus coeruleus NO pathway and fever. *Experimental Physiology*, v. 95, p. 669–677, 2010. doi: 10.1113/expphysiol.2009.051490.

STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Research*, v. 944, n. 1-2, p. 135-145, 19 jul. 2002. doi: 10.1016/S0006-8993(02)02738-5.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, p. a016295, 2014. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

TANSEY, E. A.; JOHNSON, C. D. Recent advances in thermoregulation. *Advances in Physiology Education*, v. 39, p. 139–148, 2015. doi: 10.1152/advan.00126.2014.


VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants. *International Journal of Biochemistry e Cell Biology*, v. 39, p. 44–84, 2007. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VARGAS-SORIA, M. et al. Role of liraglutide in Alzheimer's pathology. *Alzheimer's Research e Therapy*, v. 13, p. 1–5, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00853-0>

- VORONOVA, I. P. 5-HT receptors and temperature homeostasis. *Biomolecules*, v. 11, n. 12, art. 1914, 2021. DOI: 10.3390/biom11121914.
- WALTER, E. J. et al. Pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical Care*, v. 20, p. 1–10, 2016. doi: 10.1186/s13054-016-1375-5.
- WANG, X. et al. Targeting IL-10 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 11, p. a028548, 2019. doi: 10.1101/cshperspect.a028548.
- WEN, J.; RIBEIRO, R.; ZHANG, Y. PKC isoforms regulate iNOS induction. *Journal of Neuroinflammation*, v. 8, p. 38, 2011. doi: 10.1186/1742-2094-8-38.
- WRIGHT, D. T. et al. Oxygen radicals and airway epithelium. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, p. 85–90, 1994. doi: 10.1289/ehp.94102s1085.
- WONG, C. K. et al. GLP-1R activation inhibits TLR-induced inflammation. *Cell Metabolism*, v. 36, p. 130–143.e5, 2024. doi: 10.1016/j.cmet.2023.11.009.
- WILDING, J. P. H. et al. Exposure–response analyses of liraglutide 3.0 mg. *Diabetes, Obesity, and Metabolism*, v. 18, p. 491–499, 2016. doi: 10.1111/dom.12639.
- YANG, J.-N. et al. Sex differences in mouse temperature regulation. *Acta Physiologica*, v. 190, p. 63–75, 2007. doi: 10.1111/j.1365-201X.2007.01690.
- YU, J. et al. Liraglutide attenuates hepatic oxidative stress in diabetic mice. *Mediators of Inflammation*, v. 2023, artigo 8974960, 2023. doi: 10.1155/2023/8974960.
- ZAWADZKA, M.; SZMUDA, M.; MAZURKIEWICZ-BEŁDZIŃSKA, M. Thermoregulation disorders of central origin. *Anaesthesiology Intensive Therapy*, v. 49, p. 217–226, 2017. doi: 10.5603/AIT.2017.0042.
- ZHANG, L. et al. GLP-1 analogue prevents NAFLD in ApoE KO mice. *Liver International*, v. 33, p. 794–804, 2013. doi: 10.1111/liv.12120.
- ZHAO, X. et al. GLP-1 receptor agonists: beyond their pancreatic effects. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 1040, 2021. doi: 10.3389/fendo.2021.721135.
- ZIMMERMAN, J. L.; HANANIA, N. A. e Hyperthermia. In: *Principles of Critical Care*, 3. ed. McGraw Hill, 2005.

ANEXOS

Anexo 1: Aprovação da comissão de ética no uso animal




Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de março de 2023.


CERTIFICADO


Certificamos que o projeto intitulado “**EFETOS DA LIRAGLUTIDA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**”, SEI n. 23106.128494/2022-27, sob responsabilidade da pesquisadora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 189ª reunião ordinária, em 08/03/2023. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* (64 machos e 64 fêmeas), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 08/03/2023 a 31/12/2025.



Dra. Carina da Costa Krewer
Coordenadora da CEUA – UnB





*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



Article

The GLP-1 Analog Liraglutide Reduces Fever Through Sex-Dependent Neuroinflammatory Modulation

Gabriela L. Soares de Sousa ¹, Ester K. Martins da Cruz ¹, Sara C. Rojas de Aguiar ¹, Ana P. Lima do Nascimento ¹, Bruna R. Bezerra Gomes ², Anna B. Rodrigues Londe ¹, Luana J. Faria Gonçalves ¹, Carine Royer ³, Regina Azevedo Costa ⁴, Aleksander Roberto Zampronio ⁴, Paulo Eduardo Narcizo de Souza ⁵ and Fabiane H. Veiga-Souza ^{1,2,*}

- ¹ Laboratory of Experimental Biomodels, Faculty of Health Sciences and Technology, University of Brasília, Brasília 72220-275, DF, Brazil; gabrielalunaa@hotmail.com (G.L.S.d.S.); esterkaroline2014@gmail.com (E.K.M.d.C.); crhistina_sara@hotmail.com (S.C.R.d.A.); anagomesfarmaceutica@gmail.com (A.P.L.d.N.); beatrizrodrigueslonde@hotmail.com (A.B.R.L.); luanajuliafg@gmail.com (L.J.F.G.)
- ² Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; brunarbgomes@gmail.com
- ³ Laboratory of Molecular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; cariroyer@unb.br
- ⁴ Department of Pharmacology, Biological Sciences Section, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, PR, Brazil; reginaazcosta@hotmail.com (R.A.C.); aleksander@ufpr.br (A.R.Z.)
- ⁵ Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; psouza@unb.br
- * Correspondence: fhveiga@unb.br

Abstract

Background/Objectives: Thermoregulation is essential for survival, with the hypothalamic preoptic area integrating peripheral signals to maintain core body temperature. While fever enhances immune responses, excessive hyperthermia causes cellular damage. Previous work has shown that central glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor antagonism intensifies lipopolysaccharide (LPS)-induced fever, suggesting a role for GLP-1 signaling in temperature regulation. However, the direct effects of GLP-1 receptor agonists on fever remained unexplored. This study investigated the effects of liraglutide (LIRA), a GLP-1 analog used to treat diabetes and obesity, on temperature regulation and fever in rats, with a focus on sex-dependent mechanisms. **Methods:** Male and female Wistar rats received lipopolysaccharide (LPS, i.p.) to induce fever, followed by LIRA treatment (0.3 mg/kg, i.p.) one hour later. Body temperature was monitored for up to six hours post-LPS injection. **Results:** LIRA reduced body temperature in both euthermic and febrile rats of both sexes. LPS increased PGE₂ concentration in both sexes, with males showing a twofold increase compared to females. LIRA treatment reduced PGE₂ levels in LPS-challenged males (62%, $p < 0.01$) but not in female rats. LPS elevated interleukin (IL)-6 levels in both sexes, while LIRA treatment decreased IL-6 only in females (45%, $p < 0.05$). In males, LPS reduced hypothalamic serotonin (5-HT) levels, and LIRA further decreased 5-HT in saline-treated animals. In females, LIRA increased 5-HT levels (84%, $p < 0.01$) in LPS-challenged animals. Additionally, LIRA exhibited sex-specific effects on hypothalamic JNK phosphorylation, increasing activation in LPS-treated males and reducing it in LPS-treated females. **Conclusions:** LIRA demonstrates antipyretic properties through distinct, sex-specific mechanisms. In males, temperature reduction correlates with decreased hypothalamic PGE₂, whereas in females, antipyretic effects are associated with reduced IL-6, decreased JNK phosphorylation, and increased 5-HT. These findings reveal sexually dimorphic GLP-1R-mediated thermoregulatory pathways during inflammation. However, the



Academic Editor: Réjean Couture

Received: 2 October 2025

Revised: 21 October 2025

Accepted: 23 October 2025

Published: 15 November 2025

Citation: de Sousa, G.L.S.; da Cruz, E.K.M.; de Aguiar, S.C.R.; Nascimento, A.P.L.d.; Gomes, B.R.B.; Londe, A.B.R.; Gonçalves, L.J.F.; Royer, C.; Costa, R.A.; Zampronio, A.R.; et al. The GLP-1 Analog Liraglutide Reduces Fever Through Sex-Dependent Neuroinflammatory Modulation. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 1738. <https://doi.org/10.3390/ph18111738>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

causal relationships between these molecular changes and temperature regulation require further investigation, particularly regarding whether observed biochemical alterations represent primary mechanisms or secondary consequences of temperature modulation. Future studies should investigate the functional significance of the apparent contradiction in serotonergic responses between sexes.

Keywords: prostaglandin E₂; interleukin-6; serotonin; hypothalamus; lipopolysaccharide; antipyretic

1. Introduction

Fever represents a centrally regulated elevation in body temperature that constitutes a fundamental component of the acute-phase response to infectious and inflammatory stimuli [1]. Thermoregulation is critical for organism survival, with the preoptic area of the anterior hypothalamus integrating peripheral signals to maintain core body temperature through activation of heat conservation and dissipation mechanisms [2]. While fever enhances immune responses by promoting leukocyte migration, phagocytosis, and antibody production, excessive hyperthermia imposes substantial metabolic demands, increases oxygen consumption, and can result in protein denaturation and cellular damage [3,4].

The hypothalamic control of fever involves complex neuroinflammatory cascades. Lipopolysaccharide (LPS) administration triggers the release of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, which stimulates cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in cerebral endothelial cells, leading to prostaglandin (PG) E₂ synthesis. PGE₂ subsequently activates EP3 receptors on thermosensitive neurons within the preoptic area, initiating the febrile response. Anti-inflammatory mediators, particularly IL-10, provide regulatory control by inhibiting pro-inflammatory signaling pathways and modulating PG synthesis [2,5].

Sex differences in thermoregulation have been consistently observed in both animals and humans [6,7]. Body temperature patterns fluctuate throughout the ovarian cycle in females, indicating a regulatory role of sex hormones in maintaining thermal homeostasis [8,9]. Evidence shows that randomly cycling female rats exhibit diminished febrile responses compared to males, which stems from the modulatory effects of female gonadal hormones on thermoregulatory and inflammatory pathways [10]. Furthermore, vasopressin antagonism has been found to increase hypothalamic PGE₂ levels in febrile male rats but not in females, highlighting sex-specific mechanisms involved in fever regulation [11].

Liraglutide (LIRA), a glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonist, is currently employed in the treatment of type 2 diabetes mellitus and obesity. The growing use of GLP-1 analogs underscores the need to comprehend their effects beyond mere metabolic regulation, particularly as many patients are now exposed to these medications daily. Recent studies have revealed that LIRA possesses anti-inflammatory and neuroprotective properties in various clinical conditions, including osteoarthritis and hepatic ischemia-reperfusion injury [12,13]. The relationship between GLP-1R signaling and the regulation of thermoregulation and fever remains largely uncharted. However, prior research has indicated that blocking central GLP-1R can intensify fever induced by LPS, suggesting a potential involvement of GLP-1 in temperature regulation [14]. Given the prevalent use of GLP-1 analogs and their possible effects on central nervous system function, understanding their influence on body temperature regulation and fever response holds significant clinical importance.

Despite these observations suggesting GLP-1 involvement in temperature regulation, the direct antipyretic effects of LIRA during systemic inflammation remain uncharacterized,

and the sex-specific mechanisms underlying potential thermoregulatory responses have not been investigated. This study addressed these gaps by examining LIRA's effects on body temperature in male and female rats during LPS-induced fever, its influence on hypothalamic and systemic inflammatory and oxidative markers, and the role of neurotransmitters such as serotonin (5-HT) and dopamine (DA). We also investigated sex-specific effects of LIRA on hypothalamic JNK phosphorylation to clarify the molecular mechanisms underlying GLP-1 receptor-mediated modulation of fever.

2. Results

2.1. LIRA Reduces Body Temperature in Both Euthermic and Febrile Rats

To investigate the effect of LIRA on fever, we first injected LPS intraperitoneally, and after 1 h, we administered the treatment with LIRA (0.3 mg/kg) by the same route to animals of both sexes. As expected, LPS administration evoked a significant increase in body temperature compared with the saline-treated group, which maintained a relatively stable temperature, with minor fluctuations likely due to animal handling. LIRA administration completely abolished LPS-induced fever (Figure 1A,C). Interestingly, the temperature of euthermic animals (SAL/LIRA group) was also reduced by LIRA treatment in both male and female rats (Figure 1A,C).

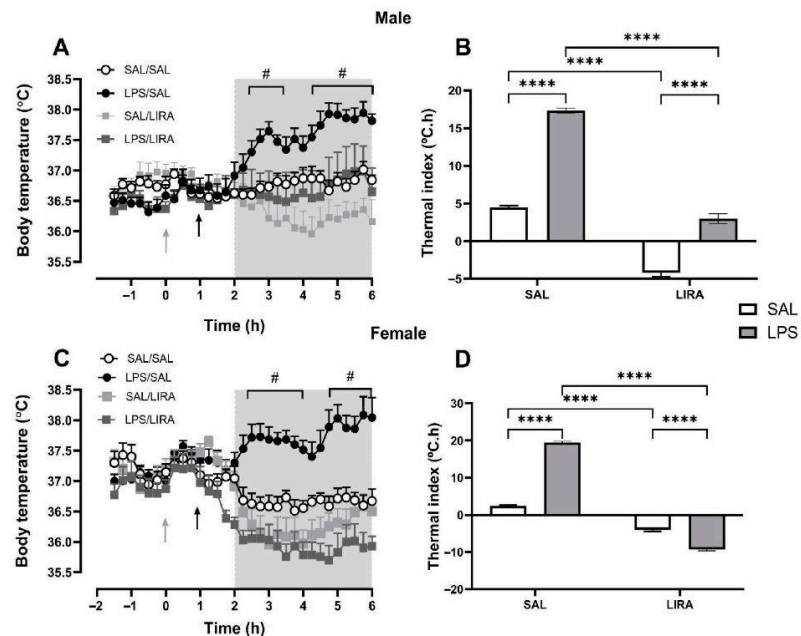


Figure 1. LIRA reduces the febrile response induced by LPS in male and female rats. Rats were treated with LIRA via intraperitoneal injection (i.p.) at a dose of 0.3 mg/kg, or with saline (SAL) at a volume of 0.5 mL, administered 1 h after an i.p. injection of LPS (50 µg/kg) or sterile saline. (A,C) The data are expressed as mean \pm SEM of body temperature (°C) in 6–7 animals. The gray and black arrows represent the time of LPS and LIRA injections, respectively. (B,D) Thermal index calculated from the area under the curve, from 2 to 6 h (as indicated in panels A,C). **** $p < 0.0001$, # $p < 0.05$ LPS/SAL compared with SAL/SAL. Data were analyzed by (A,C) three-way ANOVA matching by factor time and (B,D) two-way ANOVA, both followed by Tukey's multiple comparison test.

To quantify these effects, thermal index values were calculated from the area under the curve during the gray-shaded period, providing clearer quantification of the time-course results shown in Figure 1A,C. It was observed sex-specific differences in LIRA's effects. In males (Figure 1B), the SAL/LIRA group demonstrated a greater reduction in thermal index compared to the LPS/LIRA group, indicating that LIRA's hypothermic effect was attenuated in the presence of LPS-induced inflammation. Conversely, in females (Figure 1D), the LPS/LIRA group exhibited a more pronounced reduction in thermal index than the SAL/LIRA group, suggesting that LIRA's temperature-lowering effects were enhanced during the inflammatory state. LIRA reduced thermal index by approximately 83% in LPS-challenged males (LPS/LIRA vs. LPS/SAL). In females, LIRA not only abolished fever but induced hypothermia, lowering the thermal index by 148% and reducing body temperature below baseline.

2.2. Effect of Post-Treatment with LIRA on Hypothalamic PGE₂ Production

To investigate the mechanism by which LIRA reduces the body temperature of these animals, we measured the hypothalamic concentration of PGE₂. Intraperitoneal administration of LPS increased PGE₂ concentration in both male and female rats, with the concentration being twice as high in males as in females (Figure 2A,B). LIRA treatment reduced PGE₂ concentration in male rats challenged with LPS by 62% ($p < 0.01$) (Figure 2A). In contrast to males, LIRA treatment did not alter PGE₂ concentration in female rats (Figure 2B), suggesting sex-specific mechanisms underlying LIRA's antipyretic effect.

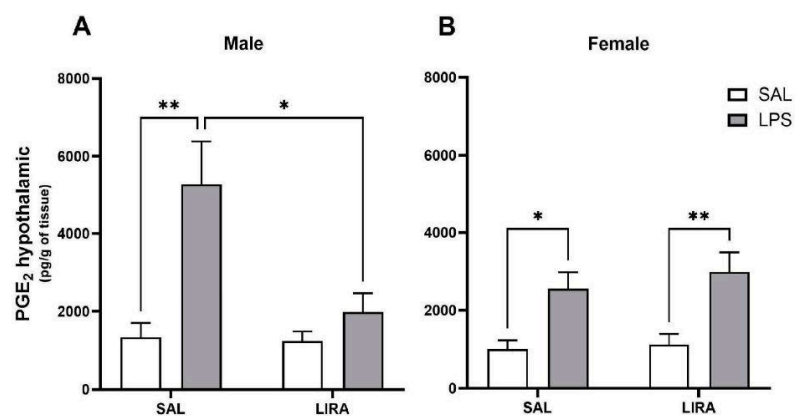


Figure 2. LIRA attenuates LPS-induced elevation of hypothalamic PGE₂ in male rats. (A,B) show the concentration of PGE₂ per gram of hypothalamic tissue collected 4 h after LPS administration in male and female rats, respectively. Data represent mean \pm SEM and were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.3. Effect of Post-Treatment with LIRA on Circulating IL-6 and IL-10 Levels

The proinflammatory cytokine IL-6 was measured in serum to assess the inflammatory response to LPS and the effect of LIRA administration. LPS triggered an increase in circulating IL-6 levels compared to the control group in both male and female rats (Figure 3A,B). LIRA treatment affected only female rats, reducing serum IL-6 levels by 45% ($p < 0.05$). We also measured the concentration of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, in these animal sera (Figure 3C,D). LPS caused an increase in the concentration of IL-10 compared to the control group only in male rats. Interestingly, treatment with LIRA promoted an increase in IL-10 levels in saline-treated animals, while it did not change IL-10 levels in LPS-treated animals (Figure 3C). Unlike males, female rats exhibited a markedly different pattern. In

female rats, neither LPS administration nor LIRA treatment altered the serum concentration of IL-10 (Figure 3D).

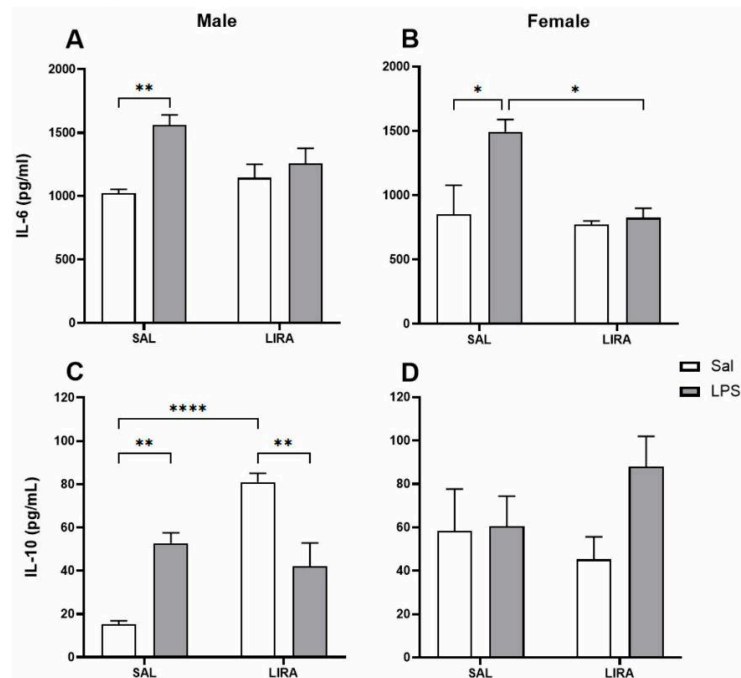


Figure 3. Serum concentrations of IL-6 and IL-10 after LPS administration in rats treated with or without LIRA. Panels (A,B) show IL-6 concentrations in male and female rats, respectively. Panels (C,D) show IL-10 concentrations in male and female rats, respectively. Animals were divided into control (SAL) and LIRA-treated groups (0.3 mg/kg, i.p.) and evaluated 4 h after administration of LPS (50 µg/kg, i.p.) or sterile saline (0.9%, 0.5 mL) ($n = 5$ per group). Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences were indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, as determined by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

2.4. Effect of LIRA on ROS and HbNO Production

We investigated the effects of LIRA on blood markers of oxidative stress, i.e., reactive oxygen species (ROS), and nitrosative stress, such as nitrosylated hemoglobin (HbNO). No significant increases in ROS were observed after this dose of LPS in either male or female rats, and LIRA treatment did not alter ROS formation in either sex (Figure 4A,B).

HbNO formation increased significantly after LPS challenge in both male and female rats. However, LIRA treatment did not alter HbNO levels in animals of either sex (Figure 4C,D).

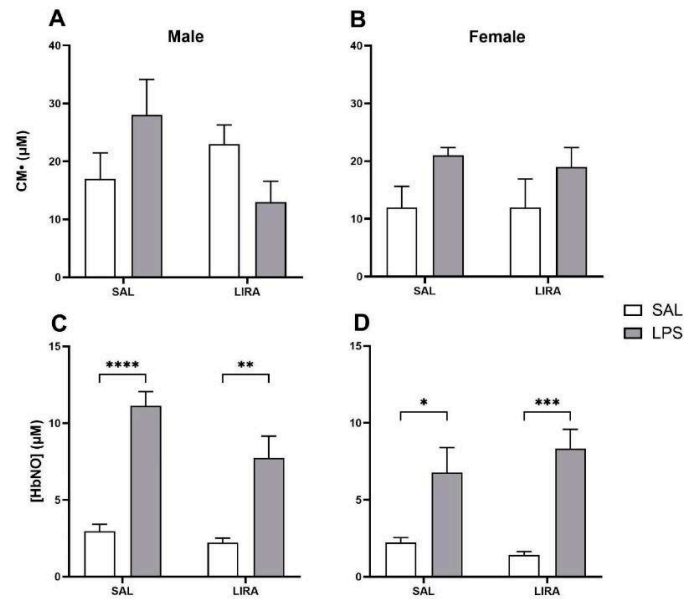


Figure 4. CM• and peripheral HbNO concentrations after LPS administration in rats treated with or without LIRA. Panels (A,B) show CM• concentrations in male and female rats, respectively. Panels (C,D) show peripheral HbNO concentrations in males and females, respectively. Animals were divided into control (SAL) and LIRA-treated groups (0.3 mg/kg, i.p.) and evaluated 4 h after administration of LPS (50 μg/kg, i.p.) or sterile saline (0.9%, 0.5 mL) ($n = 6-7$ per group). Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences were indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, as determined by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

2.5. Changes in 5-HT and DA Levels in the Hypothalamus by LIRA

To investigate whether the body temperature reduction induced by LIRA occurs through a mechanism involving 5-HT or DA, we quantified the levels of these neurotransmitters in the hypothalamus of male and female rats (Figure 5). In male rats, a reduction in 5-HT levels was observed after administration of LPS (Figure 5A). Regarding the treatment, LIRA caused a significant decrease in 5-HT levels by 35% ($p < 0.05$) in saline-treated animals, but did not change the reduction promoted by LPS (Figure 5A). In female rats, LPS administration did not induce changes in 5-HT levels compared to the control group. Interestingly, treatment with LIRA increased 5-HT levels by 84% ($p < 0.01$) in LPS-challenged animals (Figure 5B).

Regarding DA levels, no significant changes were observed after LPS administration or LIRA treatment, either in male or female rats (Figure 5C,D).

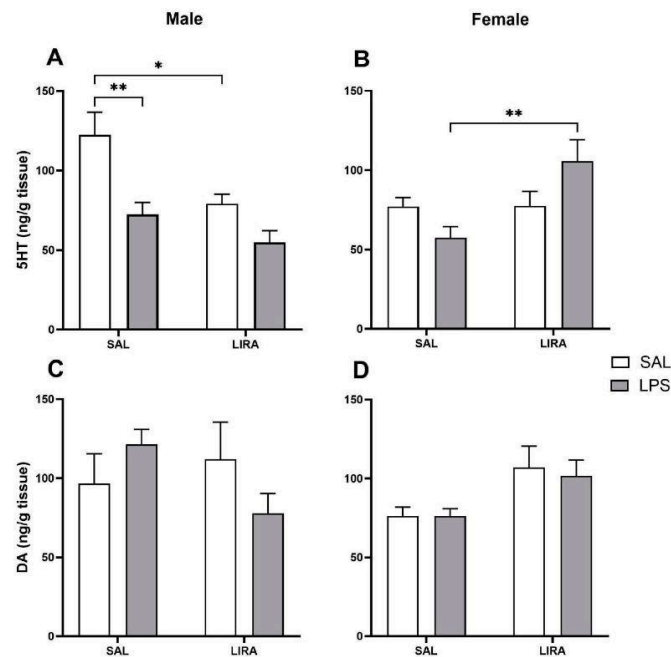


Figure 5. Levels of 5-HT and DA in the hypothalamus after LPS administration in rats treated with or without LIRA. Panels (A,B) show levels of 5-HT in male and female rats, respectively. Panels (C,D) show levels of DA in males and females, respectively. Animals were divided into control (SAL) and LIRA-treated groups (0.3 mg/kg, i.p.) and evaluated 4 h after administration of LPS (50 µg/kg, i.p.) or sterile saline (0.9%, 0.5 mL) ($n = 6-7$ per group). Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences were indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as determined by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

2.6. Sex-Specific Modulation of Hypothalamic JNK Signaling by LIRA

We then examined the molecular pathways involved in the antipyretic effect of LIRA. Given the central role of JNK signaling in inflammatory responses, we investigated the impact of LIRA on hypothalamic JNK phosphorylation in both male and female rats after LPS administration. Western blot analysis revealed sex-dependent differences in JNK activation patterns. In male rats, LPS administration alone did not significantly alter JNK phosphorylation compared to saline controls. However, LIRA treatment in LPS-challenged males resulted in a significant increase in phosphorylated JNK levels ($p < 0.05$), suggesting enhanced kinase activation (Figure 6A,C). Total JNK protein expression showed a corresponding decrease in the LPS/LIRA group compared to LPS/SAL ($p < 0.05$), indicating altered protein turnover or synthesis (Figure 6E).

In contrast, female rats exhibited a markedly different response pattern. Although LPS administration alone did not significantly increase JNK phosphorylation compared to saline controls, LIRA treatment in LPS-challenged females dramatically reduced phosphorylated JNK levels compared to the LPS/SAL group ($p < 0.05$) (Figure 6B,D). Total JNK protein levels remained stable across all female treatment groups, indicating that the observed changes reflect altered kinase activation rather than modifications in protein expression (Figure 6B).

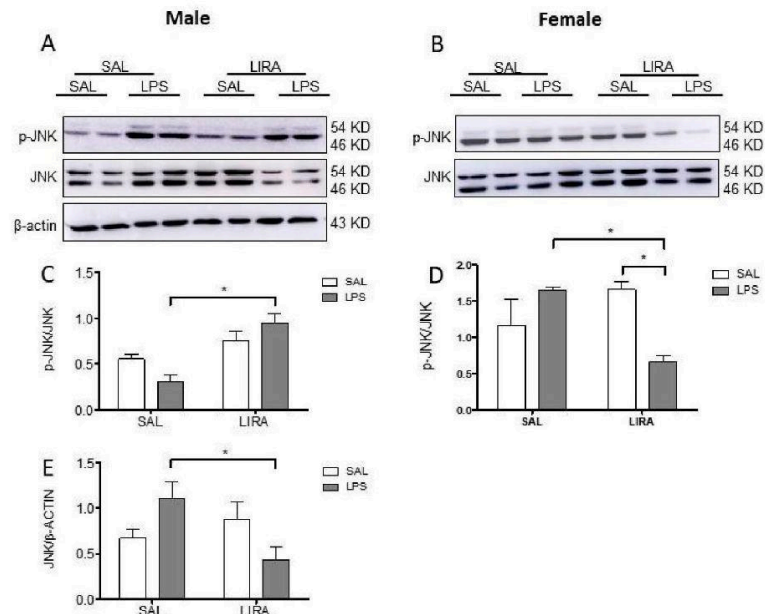


Figure 6. Sex-specific effects of LIRA on hypothalamic JNK phosphorylation in male and female rats following LPS-induced systemic inflammation. Representative Western blot images showing phosphorylated JNK (p-JNK), total JNK, and β -actin protein expression in hypothalamic tissue from male (A) and female (B) rats. Animals were treated with SAL or LIRA followed by SAL or LPS (50 μ g/kg, i.p.). Quantitative analysis shows the ratio of p-JNK to total JNK in males (C) and females (D), as well as total JNK normalized to β -actin in males (E). Data are presented as mean \pm SEM ($n = 6$ –8 per group). * $p < 0.05$ as determined by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Molecular weights are indicated on the right side of the blots.

3. Discussion

In this study, we investigated the effects of LIRA on central thermoregulatory mechanisms and fever responses induced by systemic inflammation triggered by LPS. We demonstrated that LIRA reduces body temperature in both euthermic and febrile animals of both sexes; however, the mechanisms involved in LIRA's antipyretic effects are sex-specific.

Fever is generated by the action of several autonomic responses, including peripheral vasoconstriction, decreased sweating, reduced heat loss, shivering, and possibly also non-shivering thermogenesis [5]. In this study, we used a dose of 50 μ g/kg intraperitoneally to induce fever in male and female animals. This dose caused a fever of similar magnitude in animals of both sexes, which differs from some studies that demonstrate that cycling females exhibit a fever of lesser magnitude than ovariectomized females or males [10,15]. It is known that estrogen reduces the LPS-induced febrile response [10] and that the production of this hormone varies according to the estrous cycle in female rats [16]. Thus, this discrepancy may be explained by the lack of estrous cycle monitoring in females, which may have masked sex-dependent differences in fever magnitude.

Our findings demonstrate that LIRA reduced body temperature in both euthermic and febrile conditions across male and female animals. These results align with previous research by [14], who demonstrated that central antagonism of GLP-1R increased LPS-induced fever in their experimental model. Additionally, a prior study showed that LIRA attenuates peripheral inflammatory responses, specifically reducing carrageenan-induced

paw edema and local temperature in rats [17]. Given that LIRA functions as a GLP-1R agonist, the antipyretic effect observed in our study represents the expected pharmacological response, likely mediated through both central thermoregulatory mechanisms and peripheral anti-inflammatory actions, which suggests the role of GLP-1 signaling in controlling both inflammatory responses and thermoregulation.

The hypothermic effect of LIRA in euthermic animals warrants consideration of both central and peripheral mechanisms. While LIRA can cross the blood–brain barrier and activate central GLP-1 receptors in thermoregulatory centers, peripheral vasodilation via GLP-1R activation in endothelial cells may also contribute to this effect [18,19]. Future experiments, using central versus peripheral administration or vascular imaging techniques, could help dissect these relative contributions.

PGs are considered the final mediators of the febrile response [5]. To elucidate the mechanism by which LIRA reduces fever, we quantified the concentration of PGE₂ in the hypothalamus of these animals. The results showed that LPS induced an increase in PGE₂ concentrations in both male and female rats, with the concentration in males being twice that observed in females. In agreement with our data, Brito et al. ref. demonstrated that PGE₂ production in ovariectomized rats is greater than in cycling female rats after LPS challenge [10]. Interestingly, LIRA treatment reduced the concentration of this mediator only in male animals. These results suggest that the mechanism by which LIRA reduces body temperature in febrile male animals involves a reduction in PGE₂ concentrations in the hypothalamus. In agreement with our data, previous studies have demonstrated that LIRA can reduce PGE₂ production after LPS stimulation. A study evaluated the anti-inflammatory effects of LIRA on LPS-activated macrophages, showing that LIRA dose-dependently reduces PGE₂ production [20]. Another group demonstrated that exendin-4, a GLP-1R agonist with a mechanism of action similar to LIRA, inhibits the expression of the inflammatory mediators iNOS, COX-2, PGE₂, and NO, as well as pro-inflammatory cytokines in an *in vitro* model of LPS-induced inflammation in macrophages [21]. Indeed, a recent study published in 2022 demonstrated that, in an osteoarthritis model, LIRA treatment significantly reduced PGE₂ secretion *in vitro* in chondrocytes and macrophages [12].

Regarding female animals, we observed no significant difference in PGE₂ production after LIRA treatment, despite a reduction in body temperature. Indeed, a study demonstrated that female rats may use different strategies to control fever compared to male rats. For example, they observed that a vasopressin antagonist elevates PGE₂ in febrile male rats, but not in females, showing that PGE₂ levels in fever may differ between the sexes, which is in agreement with our results [11].

It is well known that LPS administration induces the release of IL-6, a key pyrogenic cytokine involved in the regulation of fever. Its critical role is demonstrated by the fact that direct administration of IL-6 into the brain elicits fever [22]. In contrast, neutralization of this cytokine or its genetic absence prevents the development of the febrile response [3,23,24]. In the present study, LPS increased serum IL-6 levels in both sexes; however, LIRA significantly reduced this cytokine only in females. In agreement, a study in male mice showed that another GLP-1 analogue, exendin-4, did not alter LPS-induced plasma IL-6 production [25]. Conversely, GLP-1 analogs reduced IL-6 in other contexts: exendin-4 in LPS-stimulated macrophages [21], LIRA in osteoarthritis [12], and hepatic ischemia–reperfusion in male mice [13]. Notably, these studies lacked sex-stratified analyses. The female-specific IL-6 reduction observed here, contrasting with male-only studies [13,23], provides strong evidence for sex-dependent responses. This aligns with clinical data showing 32% higher liraglutide exposure in women [26], suggesting our 0.3 mg/kg dose was sufficient to modulate IL-6 in females but not males.

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine essential for regulating the immune response, acting to suppress the production of pro-inflammatory cytokines. In our study, we identified increased IL-10 production only in male rats after LPS challenge. Interestingly, LIRA treatment exhibited two distinct effects on IL-10 production depending on the inflammatory context. In control animals from the saline group, LIRA increased IL-10 production, whereas in LPS-treated animals, LIRA did not alter IL-10 production. Indeed, one study demonstrated that in rats with acute inflammation treated with LIRA, IL-10 levels increased dramatically in inflamed paw tissue compared to non-inflamed paws [17]. Another study demonstrated that LIRA alleviated hyperalgesia associated with chronic migraine by inhibiting the levels of CGRP, phosphorylated ERK (p-ERK), and c-fos in the trigeminal nucleus caudalis, while simultaneously increasing IL-10 release [27].

In female rats, we observed basal levels of IL-10 at least 3 times higher than those observed in male rats. However, no significant changes in IL-10 levels were observed in females after LPS administration, which may indicate a sexually dependent response to LIRA. In agreement, one study showed that LIRA promoted increased expression of the anti-inflammatory mediators IL-10 and TGF β 1 in the hippocampi of males, but not in females, of food-restricted mothers [28].

Several studies demonstrate that LIRA attenuates oxidative stress in tissues, such as the liver and heart, as well as in human umbilical vein endothelial cells, possibly through its anti-inflammatory effects [29–31]. In this investigation, we hypothesized that the reduction in body temperature caused by LIRA could be associated with a decrease in the production of reactive oxygen species (ROS). As a result, we did not observe a significant increase in ROS in the blood of animals with fever. Treatment with LIRA did not change blood ROS levels. These data are consistent with a previous study, which demonstrated a significant increase in ROS formation in the liver, brown adipose tissue, and hypothalamus, but not blood during the febrile response [32].

Nitric oxide (NO) is a crucial radical involved in various physiological and pathological processes. When there is an increase in NO availability in the blood, nitrosated hemoglobin HbNO is formed, and the reaction of hemoglobin with NO is a protective mechanism for the body during oxidative stress [33]. Therefore, we decided to test the hypothesis that treatment with LIRA would also modulate HbNO concentrations, given that previous studies have shown that NO is involved in the febrile response and acts as an antipyretic molecule during LPS-induced fever [34–36]. In our study, animals of both sexes with fever showed an increase in HbNO concentrations in the blood 4 h after LPS injection, indicating that NO availability in the blood increases during fever. However, LIRA treatment did not alter HbNO concentration during fever, demonstrating that the temperature reduction caused by LIRA is not associated with changes in HbNO. In contrast, Helmstädter et al. (2021) concluded that LIRA exerts an anti-inflammatory effect on vascular endothelial cells, through decreased expression of iNOS, IL-6, and 3-nitrotyrosine [37].

Recent evidence suggests that LIRA has the potential to reduce depressive symptoms, and this effect may be partially due to the modulation of central neurotransmitter systems [38]. Given the well-established roles of 5-HT and DA in mood regulation and the alterations in these neurotransmitters observed during systemic inflammation, we investigated the effects of LIRA on hypothalamic levels of 5-HT and DA. This investigation is particularly relevant since 5-HT exhibits antipyretic properties, suggesting that LIRA's fever-reducing effects may be mediated, at least in part, through increased 5-HT concentrations in thermoregulatory centers.

Sexual dimorphism in the serotonergic system is well established in thermoregulation and inflammatory responses. Previous research found that hypothalamic 5-HT decreases in male rats and increases in female rats during LPS-induced systemic inflammation [15]. In

our study, LPS reduced hypothalamic 5-HT in males by 40%, consistent with these findings. However, we did not observe a significant increase in 5-HT in LPS-challenged females. Notably, LIRA treatment produced distinct sex-specific effects: in males, LIRA decreased 5-HT by 36% in euthermic animals and did not further affect the LPS-induced reduction; in females, LIRA increased 5-HT by 84% only in LPS-challenged animals. These results suggest that GLP-1R activation interacts with inflammatory signaling in a sex-dependent manner.

These differing serotonergic responses likely result from estrogen-mediated modulation of serotonergic neurotransmission. Estrogen increases tryptophan hydroxylase expression and activity and reduces 5-HT reuptake through serotonin transporter modulation [39,40]. This regulation may explain why LIRA increased hypothalamic 5-HT only in inflamed females, where inflammatory and estrogenic signals combine to amplify serotonergic responses. In males, where both LPS and LIRA decreased 5-HT, the lack of estrogenic modulation suggests that other mechanisms, such as increased monoamine oxidase activity, enhanced 5-HT turnover and release during inflammation, or altered neuronal firing, may predominate.

The increase in 5-HT in LIRA-treated females corresponds with the observed antipyretic effect, as serotonergic activation reduces fever [41]. This supports a mechanistic role for 5-HT in LIRA's temperature-lowering effects in females. In males, the antipyretic effect appears independent of 5-HT modulation and is likely due to PGE₂ reduction. Consistent with our results, a previous study reported decreased plasma 5-HT in male mice after LIRA administration [42].

Regarding DA, a previous study demonstrated a decrease in this neurotransmitter during systemic inflammation in both male and female rats [15]. However, in our study, no changes were observed after the administration of LPS, nor after treatment with LIRA.

Stress-activated protein kinase (JNK) plays a crucial role in inflammatory signaling cascades, being activated by pro-inflammatory stimuli, including LPS [19,43]. LIRA exhibited sex-specific effects on hypothalamic JNK phosphorylation, increasing activation in LPS-treated males while reducing it in LPS-treated females. These opposing responses suggest different molecular mechanisms underlying GLP-1 receptor-mediated neuroimmune modulation, likely arising from regional heterogeneity in GLP-1R signaling across hypothalamic nuclei. Both the preoptic area, which regulates thermoregulation, and the arcuate nucleus, which integrates metabolic signals including leptin, insulin, and glucose, express GLP-1R [44]. Sex differences in receptor density, downstream signaling pathways, or interactions with steroid hormone receptors in these anatomically and functionally distinct regions may account for the observed dimorphism.

Figure 7 summarizes these sex-specific mechanisms, illustrating how LIRA produces divergent antipyretic pathways in males versus female rats.

While our findings demonstrate significant associations between LIRA treatment and changes in hypothalamic mediators, further experiments are needed to establish causality. Pharmacological blockade using the selective GLP-1R antagonist exendin(9-39) would confirm whether the observed antipyretic and neuroinflammatory effects are mediated by GLP-1R activation. Additionally, immunohistochemical localization of GLP-1R in specific thermoregulatory nuclei would help identify the anatomical basis for these sex-specific responses and clarify the differing signaling patterns between males and females.

Another consideration in interpreting our findings is the single time point (4 h post-LPS) used for molecular analyses. While this captures sustained fever and allows adequate LIRA exposure, it precludes detailed temporal resolution of the cascade linking drug administration to molecular changes and temperature modulation. Future studies employing multiple time points would better establish whether the observed biochemical changes

precede, coincide with, or follow temperature reduction, thereby helping to distinguish primary mechanisms from secondary consequences.

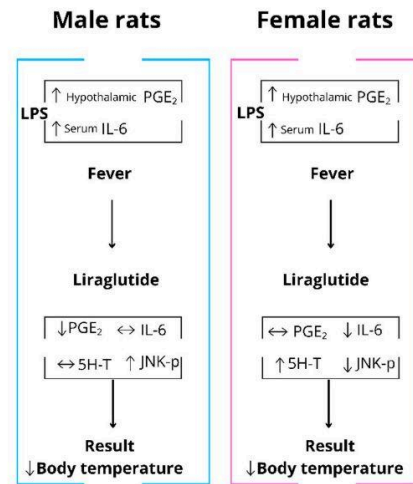


Figure 7. Sex-specific mechanisms underlying LIRA's antipyretic effects during LPS-induced systemic inflammation. In male rats (left panel), LPS administration increases both hypothalamic PGE₂ and serum IL-6, inducing fever. Liraglutide treatment reduces body temperature primarily through decreased hypothalamic PGE₂, while increasing JNK phosphorylation and showing no effect on serotonin (5-HT) or IL-6 levels. In female rats (right panel), LPS similarly elevates hypothalamic PGE₂ and serum IL-6, producing fever of comparable magnitude. However, liraglutide's antipyretic effect operates through distinct pathways: reduced serum IL-6, increased hypothalamic 5-HT, and decreased JNK phosphorylation, with no significant change in PGE₂. Arrows indicate direction of change: ↑ increase, ↓ decrease, ↔ no significant change. 5-HT, serotonin; IL-6, interleukin-6; JNK-p, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; PGE₂, prostaglandin E₂.

These findings have potential clinical implications given the widespread use of GLP-1 analogues in treating type 2 diabetes and obesity, conditions frequently associated with chronic low-grade inflammation. The demonstration that LIRA exerts antipyretic effects through sex-specific mechanisms suggests these medications could influence thermoregulation in clinical populations, warranting systematic investigation. Patients undergoing GLP-1 therapy may experience altered fever responses during infections or inflammatory episodes, and the sex-dependent mechanisms we identified could contribute to documented sex differences in GLP-1 analogue efficacy and tolerability [26]. Prospective clinical studies that monitor body temperature during GLP-1 therapy, with stratification by biological sex, are needed to determine whether these antipyretic mechanisms translate to clinically significant thermoregulatory changes. Clarifying these effects is particularly important for diabetic patients with concurrent systemic inflammation, in whom both metabolic and thermoregulatory homeostasis are compromised.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

This study was conducted at the Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry of the University of Brasilia (UnB) and was approved by the UnB Ethics Committee for the use of Animals (CEUA) (Protocol No. 23106.128494/2022-27). Male and female Wistar rats (8–9 weeks) were obtained from the Evangelical University of Goiás (Anápolis, Goiás,

Brazil). The animals were housed four per cage in a ventilated rack (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Monte Mor, São Paulo, Brazil) in a temperature-controlled room at 22 ± 1 °C and subjected to a 12 h light–dark cycle (lights on at 7 a.m.), with water and food available ad libitum.

4.2. Drugs

LPS from *Escherichia coli* (0111: B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in sterile saline and administered i.p. at a dose of 50 µg/kg. LIRA (Saxenda[®], Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark) was diluted in sterile saline and administered i.p. at a dose of 0.3 mg/kg. The doses of LPS and LIRA were selected based on pilot experiments and previous studies [10,17,45]. Ketamine, xylazine, and acepromazine were purchased from Vetnil (Louveira, SP, Brazil). Oxytetracycline (Terramicina[®], Zoetis, SP, Brazil) and meloxicam (Maxicam[®], MSD, SP, Brazil) were of commercial grade.

4.3. Temperature Datalogger Implantation and Core Temperature Measurements

Animals were anesthetized with a mixture of xylazine at 10 mg/kg, ketamine hydrochloride at 60 mg/kg, and acepromazine at 1 mg/kg, administered intraperitoneally. Incisions were made in the skin and peritoneal muscle to implant temperature dataloggers (Subcue, Calgary, AB, Canada), followed by suturing of the muscle and skin. Post-surgery, animals received an intramuscular injection of oxytetracycline at 10 mg/kg and a subcutaneous injection of meloxicam at 1 mg/kg. Meloxicam administration was repeated for two additional days. Following these procedures, animals were returned to their cages for a seven-day recovery period before pharmacological experiments began.

4.4. Experimental Design

Experiments were conducted in the rats' thermoneutral zone (27 ± 1 °C) (Gordon, 1990) [46], after animals had acclimated to the environment for at least 12 h. Body temperatures were monitored at 15 min intervals throughout the experiments. To investigate LIRA's effects on fever, rats received an injection of LPS (50 µg/kg, i.p.) to induce fever, followed by post-treatment with LIRA (0.3 mg/kg) 1 h later. Animals had their body temperature monitored for 6 h following LPS administration. For experiments involving the collection of hypothalamic tissue and blood samples for analysis, the same experimental design was followed, with animals being euthanized 4 h after LPS administration. This time point was selected to capture sustained inflammatory responses while allowing 3 h of LIRA exposure, providing adequate time for the drug to exert its pharmacological effects. The animals were then euthanized, the hypothalami were immediately dissected, immersed in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis. Blood samples were also collected for the quantification of reactive oxygen species (ROS) and nitrosylated hemoglobin (HbNO), while serum was obtained for the measurement of IL-6 and IL-10 concentrations. All biological samples were stored at -80 °C until they were analyzed.

4.5. Quantification of Hypothalamic PGE₂ by ELISA

Hypothalamic PGE₂ concentrations were measured according to the protocol described by [47]. Immediately after collection, samples received 40 µL of indomethacin (1 mg/mL, pH 7.4). The hypothalami were homogenized in 1 mL of RPMI containing indomethacin in Tris-HCl, then acidified with HCl to a pH of 3.5–4.0. After ice incubation, samples were centrifuged at $20,000 \times g$ (4 °C, 10 min). Supernatants were applied to Sep-Pak C18 cartridges, and PGE₂ was eluted with 2 mL absolute ethanol. Following 18 h speed vacuum drying, pellets were resuspended in ELA buffer (supplied with the kit) and analyzed using Cayman Chemical's Prostaglandin E₂ ELISA Kit (detection limit: 7.8 pg/mL, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

4.6. Measurement of IL-6 and IL-10 Levels in Serum

For IL-6 and IL-10 quantification, blood samples were collected via cardiac puncture during exsanguination in heparinized tubes and centrifuged for 10 min at $4700\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was transferred to new tubes and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis. IL-6 and IL-10 production were evaluated by ELISA, carried out according to the manufacturer's instructions (Catalog Number RAB0311 and RAB0246, respectively, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). First, standard curves were performed using reagents provided by the kit, and the serum levels of the cytokines were determined according to this curve.

4.7. Quantification of ROS and HbNO by EPR Spectroscopy

ROS and HbNO were quantified in blood using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy following established methodology [32,33]. For ROS quantification, the spin trap CMH (10 mM) was dissolved in freshly prepared Krebs-HEPES buffer (KHB) containing deferoxamine (25 mM) and sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (5 mM) as metal chelators. CMH is oxidised, mainly by the superoxide ion, forming the EPR-detectable nitroxide radical CM^{\bullet} that has a half-life of several hours [32]. Blood samples were mixed with equal volumes of $400\text{ }\mu\text{M}$ CMH solution containing sodium heparin (100 IU/mL) and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min with constant agitation. Calibration standards used 3-carboxy-proxyl (CP^{\bullet}) at 0, 5, 10, 50, and $100\text{ }\mu\text{M}$ concentrations. For HbNO quantification, cardiac blood was collected 4 h post-LPS via right ventricular puncture using heparinized syringes. After centrifugation ($2000\times g$, 5 min), samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Calibration curves were generated using erythrocytes treated with nitrite (1, 10, $100\text{ }\mu\text{M}$) and sodium dithionite (20 mg) as reducing agent. All samples were placed in 1 mL syringes, frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. EPR analysis used an EMX Plus spectrometer (X-band, 9 GHz, Bruker, Karlsruhe, Germany) with parameters: 10 mW microwave power, 5 Gauss modulation amplitude, 100 kHz modulation frequency, 12 s scan time, and 4-scan averaging across 240 Gauss sweep width. All reagents were obtained from Noxygen (Elzach, Germany).

4.8. Neurotransmitter Measurement by HPLC

Hypothalamic 5-HT and DA concentrations were measured using HPLC with electrochemical detection. Tissue samples were sonicated in 0.1 M perchloric acid containing 0.02% sodium metabisulfite and 3,4-dihydroxybenzylamine (50 ng/mL) as internal standard. After centrifugation ($10,000\times g$, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), $20\text{ }\mu\text{L}$ of supernatant was analyzed. The mobile phase consisted of citric acid monohydrate (20 g), octane-1-sulfonic acid sodium salt (200 mg), EDTA (40 mg), and deionized water (900 mL), filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ membranes, with methanol added to 10% *v/v*. Chromatographic separation used a Synergi Fusion-IPC-18 column ($150\times 4.6\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$) with SecurityGuard pre-column at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A Coulochem III electrochemical detector (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) with dual-electrode analytical cell (ESA 5011A) was employed, with oxidation potentials of 100 mV and 450 mV. A guard cell (ESA 5020) was set at 350 mV. Concentrations were calculated from standard curves and expressed as ng/g of tissue based on previous studies [15,48].

4.9. Western Blotting for Detection of JNK and Phospho-JNK

To detect total and phosphorylated JNK, hypothalamic protein extraction was performed with RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (2 mM Na_3VO_4 and 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), followed by protein quantification. Total cellular proteins ($20\text{ }\mu\text{g/well}$) were incubated with Laemmli sample buffer containing β -mercaptoethanol and boiled for 5 min, and subjected to 10% SDS/PAGE. Proteins were transferred to

polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes using a semi-dry system at 24 V for 1 h and 30 min. After transfer, the membranes were blocked with a 5% non-fat milk in TBS-T buffer (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 2 h at room temperature. After blocking, the membranes were incubated with primary Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) rabbit polyclonal antibody (9251) and Total-SAPK/JNK rabbit polyclonal antibody (9252) provided by Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) for 16 h at 4 °C. Monoclonal anti- β -actin antibody (A5441) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) was used as a loading control. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) was used here. The immunoreactive bands were detected using Pierce ECL from Thermo Fisher Scientific (cat. number 32106). ImageJ software version 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was utilized for protein expression analysis. β -actin and the total form of JNK were used for normalization.

4.10. Statistical Analysis

Thermal index analysis was used to evaluate the amplitude of thermal responses, calculated from the area under the curve (AUC). We established 36.5 °C as the baseline temperature and calculated the AUC from 2 to 6 h post-LPS. AUC values are expressed as degrees Celsius (y -axis) \times hours (x -axis). Thermal index values and the other results (expressed as mean \pm SEM) were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. GraphPad Prism version 10.5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analyses. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

5. Conclusions

This study demonstrates that liraglutide exerts antipyretic effects through sexually specific mechanisms during systemic inflammation. In male rats, liraglutide reduces fever mainly by suppressing hypothalamic PGE₂, the classical pyrogenic mediator. Conversely, in female rats, antipyretic effects occur independently of PGE₂ modulation and instead correlate with reduced circulating IL-6, elevated hypothalamic 5-HT, and decreased JNK phosphorylation. These sex-specific responses reveal previously unrecognized sexual differences in GLP-1 receptor-mediated thermoregulatory and neuroimmune pathways. However, the correlational nature of these findings necessitates future mechanistic studies to establish causal relationships between observed biochemical alterations and temperature regulation. Given the widespread use of GLP-1 analogs for metabolic disorders, these findings suggest potential sex-dependent therapeutic effects during inflammatory conditions and highlight the importance of considering biological sex in evaluating GLP-1 analog responses. Future investigations should explore whether these sex-specific effects are also applicable to human physiology.

Author Contributions: Conceptualization, G.L.S.d.S. and F.H.V.-S.; methodology, G.L.S.d.S., E.K.M.d.C., S.C.R.d.A., A.P.L.d.N., B.R.B.G., A.B.R.L., L.J.F.G., C.R., R.A.C., A.R.Z., P.E.N.d.S. and F.H.V.-S.; formal analysis, G.L.S.d.S., F.H.V.-S. and C.R.; investigation, G.L.S.d.S., E.K.M.d.C., S.C.R.d.A., A.P.L.d.N., B.R.B.G., A.B.R.L., L.J.F.G., C.R., A.R.Z., P.E.N.d.S. and F.H.V.-S.; data curation, F.H.V.-S., C.R., A.R.Z. and P.E.N.d.S.; writing—original draft preparation, G.L.S.d.S., F.H.V.-S., E.K.M.d.C. and S.C.R.d.A.; writing—review and editing, G.L.S.d.S., E.K.M.d.C., S.C.R.d.A., A.P.L.d.N., B.R.B.G., A.B.R.L., L.J.F.G., C.R., A.R.Z., P.E.N.d.S. and F.H.V.-S.; supervision, F.H.V.-S., C.R., A.R.Z. and P.E.N.d.S.; project administration, F.H.V.-S.; funding acquisition, F.H.V.-S. and P.E.N.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF grants 00193-00001702/2024-30; 0019300000262/2023-12); Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq grant 316113/2023-9); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001). We are thankful to the DPI/BCE/UnB (Edital n° 001/2025 DPI/BCE/UnB) for contributing to these publication fees. G.L.S.d.S. was a recipient of a scholarship from CAPES (88887.511342/2020-00).

Institutional Review Board Statement: This study was carried out according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by UnB Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) (Protocol No. 23106.128494/2022-27) on 8 March 2023.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is available in an online repository. The datasets generated and analyzed during the current study are available in the Zenodo repository at <https://doi.org/10.5281/zenodo.17257376> (currently under review, will be publicly accessible upon publication).

Acknowledgments: We acknowledge the use of Claude AI (Sonnet 4.5, claude.ai) and ChatGPT-4 (www.chatgpt.com) to support English language revision and improve clarity and coherence in the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

5-HT	Serotonin
AMPK	AMP-activated protein kinase
AUC	Area Under the Curve
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CM*	3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl
CMH	1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CP*	3-carboxy-proxyl nitroxide
COX-2	Cyclooxygenase-2
DA	Dopamine
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP3	Prostaglandin E ₂ receptor 3
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESA	Electrochemical detector brand (Coulchem III)
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLP-1R	Glucagon-Like Peptide-1 receptor
HbNO	Nitrosylated Hemoglobin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
i.p.	Intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LIRA	Liraglutide
LPS	Lipopolysaccharide
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NO	Nitric Oxide
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay buffer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
ROS	Reactive Oxygen Species
SAL	Saline
SDS/PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean

TBS-T Tris-Buffered Saline with Tween 20
 TGFβ1 Transforming Growth Factor beta 1

References

- Dinarello, C.A.; Cannon, J.G.; Wolff, S.M. New Concepts on the Pathogenesis of Fever. *Clin. Infect. Dis.* **1988**, *10*, 168–189. [\[CrossRef\]](#)
- Morrison, S.F.; Nakamura, K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front. Biosci.* **2011**, *16*, 74. [\[CrossRef\]](#)
- Evans, S.S.; Repasky, E.A.; Fisher, D.T. Fever and the thermal regulation of immunity: The immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 335–349. [\[CrossRef\]](#)
- Tansey, E.A.; Johnson, C.D. Recent advances in thermoregulation. *Adv. Physiol. Educ.* **2015**, *39*, 139–148. [\[CrossRef\]](#)
- Blomqvist, A.; Engblom, D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. *Neuroscientist* **2018**, *24*, 381–399. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cai, K.C.; van Mil, S.; Murray, E.; Mallet, J.F.; Matar, C.; Ismail, N. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *58*, 327–337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yanovich, R.; Ketko, I.; Charkoudian, N. Sex Differences in Human Thermoregulation: Relevance for 2020 and Beyond. *Physiology* **2020**, *35*, 177–184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Coelho, L.C.M.; Cruz Jr Maba, I.K.; Zampronio, A.R. Fever Induced by Zymosan A and Polyinosinic-Polycytidylic Acid in Female Rats: Influence of Sex Hormones and the Participation of Endothelin-1. *Inflammation* **2021**, *44*, 321–333. [\[CrossRef\]](#)
- Baker, F.C.; Siboz, E.; Fuller, A. Temperature regulation in women: Effects of the menstrual cycle. *Temperature* **2020**, *7*, 226–262. [\[CrossRef\]](#)
- Brito, H.O.; Radulski, D.R.; Wilhelms, D.B.; Stojakovic, A.; Brito, L.M.O.; Engblom, D.; Franco, C.R.C.; Zampronio, A.R. Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1β in Rats. *J. Neuroendocrinol.* **2016**, *28*. [\[CrossRef\]](#)
- Pittman, Q.J.; Chen, X.; Mouihate, A.; Martin, S. Vasopressin-Induced Antipyresis: Sex- and Experience-Dependent Febrile Responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *856*, 53–61. [\[CrossRef\]](#)
- Meurot, C.; Martin, C.; Sudre, L.; Breton, J.; Bougault, C.; Rattenbach, R.; Bismuth, K.; Jacques, C.; Berenbaum, F. Liraglutide, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, exerts analgesic, anti-inflammatory and anti-degradative actions in osteoarthritis. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, S.L.; Wang, Z.M.; Xu, C.; Che, F.-H.; Hu, X.-F.; Cao, R.; Xie, Y.-N.; Qiu, Y.; Shi, H.-B.; Liu, B.; et al. Liraglutide Attenuates Hepatic Ischemia–Reperfusion Injury by Modulating Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 869050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rinaman, L.; Comer, J. Antagonism of central glucagon-like peptide-1 receptors enhances lipopolysaccharide-induced fever. *Auton. Neurosci.* **2000**, *85*, 98–101. [\[CrossRef\]](#)
- Costa, R.A.; Amatnecks, J.A.; de Oliveira Guaita, G.; Stern, C.A.J.; Branco, L.G.S.; Zampronio, A.R. Sexual dimorphism of hypothalamic serotonin release during systemic inflammation: Role of endothelin-1. *J. Neuroimmunol.* **2024**, *394*, 578427. [\[CrossRef\]](#)
- Goldman, J.M.; Murr, A.S.; Cooper, R.L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* **2007**, *80*, 84–97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mert, I.; Cetinkaya, A.; Gurler, M.; Gurler, M.; Turel, C.A.; Celik, H.; Torun, I.E.; Turel, I. Anti-inflammatory potential of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, in rats with peripheral acute inflammation. *Inflammopharmacology* **2022**, *30*, 1093–1105. [\[CrossRef\]](#)
- Sélley, E.; Molnár, G.A.; Kun, S.; Szijártó, I.A.; Laczy, B.; Kovács, T.; Fülöp, F.; Wittmann, I. Complex vasoactivity of liraglutide. Contribution of three gasotransmitters. *Artery Res.* **2015**, *11*, 1. [\[CrossRef\]](#)
- Bangshaab, M.; Gutierrez, A.; Huynh, K.D.; Knudsen, J.S.; Arcanjo, D.D.R.; Petersen, A.G.; Rungby, J.; Gejl, M.; Simonsen, U. Different mechanisms involved in liraglutide and glucagon-like peptide-1 vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 386–399. [\[CrossRef\]](#)
- Baris, E.; Portakal, H.S.; Aslan, A.; Firtina Karagonlar, Z.; Tosun, M. Liraglutide modulates cyclooxygenase and α7 acetylcholine receptors: In vitro and in silico insights into its anti-inflammatory role in LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2025**, *398*, 16229–16239. [\[CrossRef\]](#)
- Lu, C.; Xie, T.; Guo, X.; Wu, D.; Li, S.; Li, X.; Lu, Y.; Wang, X. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 mitigates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *77*, 105969. [\[CrossRef\]](#)
- Roth, J.; de Souza, G.E.P. Fever induction pathways: Evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 301–314. [\[CrossRef\]](#)

23. Chai, Z.; Gatti, S.; Toniatti, C.; Poli, V.; Bartfai, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: A study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 311–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kozak, W.; Kluger, M.J.; Soszynski, D.; Conn, C.A.; Rudolph, K.; Leon, L.R.; Zheng, H. IL-6 and IL-1 β in Fever: Studies Using Cytokine-Deficient (Knockout) Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *856*, 33–47. [[CrossRef](#)]
25. Wong, C.K.; McLean, B.A.; Baggio, L.L.; Koehler, J.A.; Hammoud, R.; Rittig, N.; Yabut, J.M.; Seeley, R.J.; Brown, T.J.; Drucker, D.J. Central glucagon-like peptide 1 receptor activation inhibits Toll-like receptor agonist-induced inflammation. *Cell Metab.* **2024**, *36*, 130–143.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wilding, J.P.H.; Overgaard, R.v.; Jacobsen, L.v.; Jensen, C.B.; Le Roux, C.W. Exposure–response analyses of liraglutide 3.0 mg for weight management. *Diabetes Obes. Metab.* **2016**, *18*, 491–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jing, F.; Zou, Q.; Pu, Y. GLP-1R agonist liraglutide attenuates pain hypersensitivity by stimulating IL-10 release in a nitroglycerin-induced chronic migraine mouse model. *Neurosci. Lett.* **2023**, *812*, 137397. [[CrossRef](#)]
28. Diz-Chaves, Y.; Toba, L.; Fandiño, J.; González-Matías, L.C.; García-Segura, L.M.; Mallo, F. The GLP-1 analog, liraglutide prevents the increase of proinflammatory mediators in the hippocampus of male rat pups submitted to maternal perinatal food restriction. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 337. [[CrossRef](#)]
29. Yu, J.; Zhao, Y.; Xu, L.; Li, W.; Zhang, H.; Ping, F.; Li, Y. Liraglutide Attenuates Hepatic Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Modulating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Mediat. Inflamm.* **2023**, *1–12*. [[CrossRef](#)]
30. Inoue, T.; Inoguchi, T.; Sonoda, N.; Hendarto, H.; Makimura, H.; Sasaki, S.; Yokomizo, H.; Fujimura, Y.; Miura, D.; Takayanagi, R. GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Atherosclerosis* **2015**, *240*, 250–259. [[CrossRef](#)]
31. Shiraki, A.; Oyama JIchi Komoda, H.; Komoda, H.; Asaka, M.; Komatsu, A.; Sakuma, M.; Kodama, K.; Sakamoto, Y.; Kotooka, N.; Hirase, T.; et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* **2012**, *221*, 375–382. [[CrossRef](#)]
32. Gomes, B.R.B.; Firmino, M.; Jorge, J.S.; Ferreira, M.L.O.; Rodovalho, T.M.; Weis, S.N.; Souza, G.E.P.; Morais, P.C.; Sousa, M.V.; Souza, P.E.N.; et al. Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: An electron paramagnetic resonance study. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 351–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dikalov, S.; Fink, B. ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide In Vivo and in Tissues. *Methods Enzymol.* **2005**, *396*, 597–610. [[CrossRef](#)]
34. Begg, D.P.; Kent, S.; McKinley, M.J.; Mathai, M.L. Suppression of endotoxin-induced fever in near-term pregnant rats is mediated by brain nitric oxide. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, R2174–R2178. [[CrossRef](#)]
35. Soriano, R.N.; Ravanelli, M.I.; Batalhao, M.E.; Carnio, E.C.; Branco, L.G.S. Proipyretic role of the locus coeruleus nitric oxide pathway. *Exp. Physiol.* **2010**, *95*, 669–677. [[CrossRef](#)]
36. Steiner, A.A.; Antunes-Rodrigues, J.; McCann, S.M.; Branco, L.G.S. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, *282*, R584–R593. [[CrossRef](#)]
37. Helmstädter, J.; Keppeler, K.; Aust, F.; Küster, L.; Frenis, K.; Filippou, K.; Vujacic-Mirski, K.; Tsohataridis, S.; Kalinovic, S.; Kröll-Schön, S.; et al. GLP-1 Analog Liraglutide Improves Vascular Function in Polymicrobial Sepsis by Reduction of Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1175. [[CrossRef](#)]
38. Gammoh, O.; Qnais, E.; Aljabali, A.A.A.; Hatahet, T.; Alqudah, A. Metabolic resilience: Liraglutide’s potential in alleviating depressive symptoms. *Mol. Biol. Rep.* **2025**, *52*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Smith, L.J.; Henderson, J.A.; Abell, C.W.; Bethea, C.L. Effects of Ovarian Steroids and Raloxifene on Proteins that Synthesize, Transport, and Degrade Serotonin in the Raphe Region of Macaques. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29*, 2035–2045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hiroi, R.; Neumaier, J.F. Estrogen decreases 5-HT1B autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: Inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Neuroscience* **2009**, *158*, 456–464. [[CrossRef](#)]
41. Mota, C.M.D.; Rodrigues-Santos, C.; Fernández, R.A.R.; Carolino, R.O.; Antunes-Rodrigues, J.; Anselmo-Franci, J.A.; Branco, L.G. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *66*, 372–381. [[CrossRef](#)]
42. Nonogaki, K.; Kaji, T. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Decreases Primary Bile Acids and Serotonin in the Colon Independently of Feeding in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7784. [[CrossRef](#)]
43. Mizuno, S.; Kurobe-Takashima, Y.; Kuriki, D.; Susaki, K.; Otsuka, K.; Tsuchihashi, T.; Abe, K.; Kobayashi, S. Phosphatidylcholine suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated MG6 microglial cells by inhibiting NF- κ B/JNK/p38 MAPK signaling. *PLoS ONE* **2025**, *20*, e0328206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Merchenthaler, I.; Lane, M.; Shughrue, P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **1999**, *403*, 261–280. [[CrossRef](#)]

45. Brito, H.O.; Reis, R.C.; Bini, I.; Wilhelms, D.; Engblom, D.; Gil da Costa, R.M.; Brito, L.O.; Nascimento, M.D.D.S.; de Andrade, M.S.; Zamprônio, A.R.; et al. NK1 receptor mediates cerebral cellular and extracellular morphological changes during the LPS-induced febrile response. *Brain Res.* **2024**, *1842*, 149107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gordon, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* **1990**, *47*, 963–991. [[CrossRef](#)]
47. Figueiredo, M.J.; de Melo Soares, D.; Martins, J.M.; Machado, R.d.R.; Sorgi, C.A.; Faccioli, L.H.; de Melo, M.C.C.; Malvar, D.D.C.; Souza, G.E.P. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: Involvement of prostaglandin E2 and cytokines. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 219–229. [[CrossRef](#)]
48. Moreira, C.G.; Barbiero, J.K.; Ariza, D.; Dombrowski, P.A.; Sabioni, P.; Bortolanza, M.; Da Cunha, C.; Vital, M.A.B.F.; Lima, M.M.S. Behavioral, Neurochemical and Histological Alterations Promoted by Bilateral Intranigral Rotenone Administration: A New Approach for an Old Neurotoxin. *Neurotox. Res.* **2012**, *21*, 291–301. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.