

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Resposta febril induzida pela injeção de
***Staphylococcus aureus*: efeito de drogas com**
atividade antipirética

Daniela Tagliari Longhi

Ribeirão Preto

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Daniela Tagliari Longhi

**Resposta febril induzida pela injeção de
Staphylococcus aureus: efeito de drogas com atividade
antipirética**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glória Emília Petto de Souza.

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tagliari, Daniela Longhi

Resposta febril induzida pela injeção de *Staphylococcus aureus*: efeito de drogas com atividade antipirética/Daniela Tagliari Longhi; orientador Glória Emília Petto de Souza.

Ribeirão Preto, 2006.

97 f. : fig.

Dissertação (Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de Concentração: Farmacologia).

1. Febre. 2. *S. aureus*. 3. Ratos. 4. Prostaglandinas. 5. Endotelinas

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais, Antonio e Solange, aos meus irmãos, Luciano e Adriano, à
minha avó Amábile, pelo amor, apoio e incentivo;*

Ao meu noivo Alvadi (Kiko) pelo amor, carinho, compreensão.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por me dar força, luz, coragem e perseverança ao longo deste período.

À Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza, pela orientação, apoio, amizade e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

À toda a minha família por torcer e sempre acreditar em mim. Em especial meus pais, pelo esforço e exemplo de vida. Agradeço não só aos meus pais, mas também aos meus irmãos, minha avó e meu noivo, pelos conselhos, incentivos e principalmente por me escutarem nos momentos difíceis.

Ao meu noivo Kiko, pela confiança, por toda a força e apoio ao longo deste período.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Darini, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, que gentilmente cedeu a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923).

À Profa. Dra. Izabel Yoko Yto, do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, pelo apoio e pelos ensinamentos que enriqueceram meu conhecimento em microbiologia.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP por disponibilizar seu laboratório para a obtenção do liofilizado bem como para a quantificação do número de bactérias. E principalmente ao seu aluno de doutorado, José Carlos Farias Alves Filho (Zeca), que dispôs do seu tempo para me auxiliar e ensinar as técnicas empregadas para o cultivo e quantificação de bactérias e pelas proveitosas discussões científicas.

À Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira e à Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela amizade, apoio e pelas conversas enriquecedoras.

À Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, pelas discussões, sugestões apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia da resposta febril da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP: Andréa Carla Pessini, Bruno Batista, Daniel Fraga, Daniela Camargo, Denis de Melo Soares, Juliano Manvailer Martins, Lívia Harumi Yamashiro, Maria José Figueiredo, Nadine Maria Fernandes Leite, Osmar de Oliveira Cardoso, Priscila Sayuri Uyekita, Solange Lika Yotsuyanagi e Rodrigo Cristofolletti, pela amizade, pela alegria, apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas. Vocês são anjos em forma humana que Deus generosamente colocou em meu caminho. Obrigado por tudo!

À todos os pós-graduandos, alunos de iniciação científica, funcionários e professores do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pelo apoio, amizade e carinho sempre demonstrados.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia da FCFRP - USP: Miriam Cristina Contin Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Mayara Gomes, Luciana Ceribeli, Marlene Rodrigues da Silva e Maria Aparecida Rosa da Silva, pelo suporte técnico, amizade e carinho.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP - USP: Aldo Dias Feiteiro e Reinaldo Fernando Batista, pela atenção e amizade.

Às amigas: Carla Celotto e Renata Queiroz Vilela Lima, pela amizade, carinho, apoio em todos os momentos e pelas conversas enriquecedoras, risadas... Vocês são como irmãs para mim.

À Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira e José Waldick Ramon, pelo apoio.

Aos membros da comissão avaliadora, Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco e Edson Antunes que prontamente aceitaram avaliar o meu trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio constante.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos os amigos e colegas que torceram por mim, e que de alguma maneira contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse concluído, o meu muito obrigado.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”.

Thomas Huxley

RESUMO

Até o presente momento, estudos demonstraram que a parede celular de *S. aureus* induz febre em ratos e cabras, e que toxinas produzidas pelo *S. aureus*, como por exemplo, as enterotoxinas SEA e SEB (staphylococcal enterotoxins A e B) induzem febre em gatos e coelhos. Entretanto, nenhum estudo empregou a bactéria viva no modelo de febre. No presente estudo foi padronizado o modelo de resposta febril induzido pela injeção i.p. de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em ratos e posteriormente, avaliado o efeito de drogas que apresentam atividade antipirética sobre a febre induzida por esta bactéria. Verificou-se que a injeção i.p. de *S. aureus* induz aumento, duradouro e dose-dependente da temperatura corporal em ratos. Além disso, o aumento da temperatura corporal induzido por esta bactéria trata-se de febre e não hipertermia, pois foi acompanhado de redução da temperatura da pele da cauda dos animais, indicativo de vasoconstrição periférica também observado pela redução do índice de perda de calor (IPC). Demonstrou-se também, que o aumento de temperatura observado acompanha a presença de bactérias viáveis no foco infeccioso e sangue. Estudos têm apontado a enzima COX-2 como a principal isoforma de COX, responsável pela síntese de prostaglandinas durante a febre. No presente estudo, verificou-se que o celecoxibe, um inibidor seletivo para a COX-2, promoveu redução significativa e de maneira dose-dependente da resposta febril induzida pelo *S. aureus*. Além disso, o celecoxibe reverteu a vasoconstrição periférica induzida por esta bactéria. O pré-tratamento com paracetamol e dipirona reduziu significativamente a febre induzida pelo *S. aureus* sugerindo a participação de outros mediadores. Observou-se também que a administração de dexametasona, um antiinflamatório esteroidal, reduziu significativamente a temperatura corporal dos animais injetados com *S. aureus*, indicando que a resposta febril induzida por este estímulo depende de neo-síntese de mediadores pirogênicos. A fim de averiguar a participação de endotelinas neste modelo, avaliou-se o efeito de antagonistas de receptores para endotelinas. Verificou-se que tanto o BQ-123, antagonista seletivo de receptor ET_A, quanto o BQ-788, antagonista seletivo de receptor ET_B, reduziram significativamente a febre induzida pelo *S. aureus*. A IL-1 parece não estar envolvida nesta resposta, pois a injeção i.c.v. de antagonista de receptores da IL-1 (IL-1ra) não alterou a febre promovida pelo *S. aureus*. Em síntese, esses resultados sugerem que a febre induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* depende de PGs, sintetizadas via COX-2, de endotelinas e independe da produção central de IL-1.

Palavras chaves: Febre, *S. aureus*, ratos, prostaglandinas, endotelinas.

ABSTRACT

Several studies demonstrated that *S. aureus* cell walls as well as toxins produced by this bacteria, like staphylococcal enterotoxins A e B (SEA and SEB), are capable to induce fever in different animals species. However, there are no studies about fever induced by live *S. aureus*. In this study we established a model of fever induced by i.p. injection of live *S. aureus* (ATCC 25923) in rats. We also evaluated the effect of antipyretic drugs on *S. aureus*-induced fever. It was verified that i.p injection of *S. aureus* induced a long-lasting and dose-dependent increase in core temperature of rats. Furthermore, the increase in core temperature induced by i.p. injection of *S. aureus* is a real fever rather than hyperthermia, since it was accompanied by a simultaneous decrease in the tail skin temperature. The reduction in tail skin temperature indicates skin vasoconstriction also demonstrated here by a decrease in heat loss index (HLI). We also showed that the increase in core temperature induced by *S. aureus* i.p. injection is related with the number of live bacteria verified in the infectious focus (local of injection) and blood. Several studies have pointed COX-2 as the pivotal enzyme involved in PGs synthesis during fever. In the present study, it was demonstrated that celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, reduce in a dose-dependent manner the *S. aureus*-induced fever. Interestingly, the skin vasoconstriction induced by *S. aureus* was counteracted by celecoxib. The pre-treatment with acetaminophen and dipyron significantly reduced the *S. aureus*-induced fever suggesting the involvement of mediators other than prostaglandins. In addition, the treatment with dexamethasone, an esteroidal anti-inflammatory drug, promoted a significant reduction on bacteria-induced fever, indicating the participation on *de novo* synthesis of pyrogenic mediators to evoke this response. To evaluate the effect of endothelins on bacteria-induced fever, animals received i.c.v. injection of either BQ-123 or BQ-788 (selective ET_A and ET_B receptor antagonist, respectively). Both receptor antagonists significantly reduced the *S. aureus* induced fever suggesting the involvement of these peptide on this response. Differently, the i.c.v injection of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) did not modify the fever to *S. aureus*. In conclusion, these results suggest that *S. aureus*-induced fever depends on PGs synthesis, through COX-2 and on endothelins but seems to independ on central production of IL-1.

Keywords: Fever, *S. aureus*, rats, prostaglandins, endothelins.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora-1
APO/HA	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
COX	Ciclooxigenase
CRF	Fator liberador de corticotropina
ET	Endotelina
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor de IL-1
INF	Interferon
IP-10	Proteína (10 kDa) induzida pelo interferon
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MCP	Proteína quimiotática para monócito
MDP	Muramil-dipeptídeo
MIP	Proteína inflamatória derivada de macrófago
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NPV	Núcleo Paraventricular Hipotalâmico
OVLT	<i>Organum vasculosum da laminae terminalis</i>
PG	Prostaglandina
PGN	Peptidoglicano
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
SEA	Enterotoxina A de <i>S. aureus</i>
SEB	Enterotoxina B de <i>S. aureus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
1.1 - Inflamação, Resposta de Fase Aguda e Febre	11
1.2 - Mediadores da resposta febril.....	15
1.2.1 - Citocinas e quimiocinas	15
1.2.2 – Prostaglandinas.....	18
1.2.3 - Fator liberador de corticotropina.....	21
1.2.4 – Endotelina.....	23
1.3 - Comunicação entre a periferia e o sistema nervoso central.....	24
1.4 - Mecanismos de controle das respostas de defesa	26
1.5 - Controle farmacológico da resposta febril.....	26
1.6 - Modelos experimentais de febre.....	29
2 – OBJETIVO	33
2.1 - Objetivos específicos.....	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 – Animais.....	34
3.2 – Esterilização.....	34
3.3 - Cultura de bactérias	34
3.4 - Determinação do número de bactérias contidas nos tubos liofilizados.....	35
3.5 - Quantificação de bactérias no sangue e exsudato peritoneal	36
3.6 - Drogas e doses.....	37
3.7 - Via de administração das drogas	38
3.8 - Determinação da temperatura retal e da temperatura da pele da cauda por telemetria	39
3.9 - Implante do transmissor de temperatura na cavidade peritoneal	39
3.10 - Determinação da temperatura corporal por radiotelemetria	40
3.11 - Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral.....	41
3.12 - Análise estatística	43
4 – RESULTADOS.....	43
4.1 - Efeito da injeção intraperitoneal de diferentes doses de <i>S. aureus</i> sobre a temperatura corporal de ratos	43
4.2 - Quantificação de bactérias no lavado peritoneal e sangue dos animais após a injeção i.p. de <i>S. aureus</i>	47
4.3 - Efeito do pré-tratamento com celecoxibe na resposta febril induzida pela injeção i.p. de <i>S. aureus</i> em ratos.....	50
4.4 - Efeito do celecoxibe sobre o aumento da temperatura retal, redução da temperatura da pele da cauda e índice de perda de calor induzida pela administração de <i>S. aureus</i> em ratos.....	52

4.5 - Efeito do pré-tratamento com paracetamol e dipirona na resposta febril induzida pela injeção i.p. de <i>S. aureus</i> em ratos	55
4.6 - Efeito do pré-tratamento com dexametasona na resposta febril induzida pela injeção i.p. de <i>S. aureus</i> em ratos.....	58
4.7 - Efeito do pré-tratamento com BQ - 123 e BQ - 788 na resposta febril induzida pela injeção i.p. de <i>S. aureus</i> em ratos	60
4.8 - Efeito do pré-tratamento com antagonista de receptores de IL-1 na resposta febril induzida pela injeção de IL-1 β ou <i>S. aureus</i> em ratos	63
5 – DISCUSSÃO	65
6 – CONCLUSÕES	80
PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 - Inflamação, Resposta de Fase Aguda e Febre.

Quando um agente infeccioso invade o organismo, uma série de reações locais se desenvolve prontamente a fim de proteger o hospedeiro e manter a homeostase. O termo geral utilizado para designar essas reações denomina-se “inflamação”. A resposta inflamatória local é iniciada pela liberação de uma ampla variedade de mediadores solúveis, vasoativos e quimiotáticos (substância P, histamina, serotonina, prostaglandinas, e outros) induzidos por vários tipos celulares ativados pelo patógeno invasor. Esses mediadores promovem mudanças na permeabilidade vascular e, conseqüentemente, extravasamento de plasma e fatores circulantes solúveis. Dentre eles, as imunoglobulinas e componentes do sistema de cininas, complemento, coagulação e fibrinolítico os quais são ativados pelo contato com o pátogeno e seus produtos (por exemplo, lipopolissacarídeo derivado da parede celular de bactéria Gram-negativa, LPS) no local da inflamação. Concomitantemente, são desencadeados eventos celulares. Inicialmente neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais são ativados, a fim de remover o agente agressor, liberando uma série de outros mediadores como, por exemplo, citocinas, PGs, leucotrienos os quais irão amplificar a resposta inflamatória (revisado por BLATTEIS, 2006, *in press*)

Assim, a inflamação constitui uma resposta fisiológica, normal, e homeostática desencadeada pelo organismo após lesão tecidual ou infecção local, com intuito de restabelecer as funções normais do tecido injuriado. Contudo, essa resposta pode se tornar patológica uma vez que, os mediadores originados no sítio da resposta inflamatória ou originados na circulação podem atingir concentração suficiente para mediar sinais e sintomas sistêmicos, coletivamente denominados de reação de fase aguda (RFA). Estes

incluem: leucocitose, ativação do sistema complemento, ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas, diminuição da concentração plasmática de ferro e zinco e aumento da concentração de cobre, aumento da produção de proteínas de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa, ceruloplasmina e outras), anorexia e a mais comum manifestação da reação de fase aguda: *a febre* (KUSHNER, 1988, ZEISBERGER, 1999, BLATTEIS, 2006, *in press*).

A febre é uma resposta complexa que envolve vários componentes como sistema endócrino e metabólico, autonômico e comportamental (SAPER & BREDER, 1994). Ela tem sido definida como elevação da temperatura corporal que ocorre em defesa à entrada de patógenos pelo hospedeiro (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNETIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001). A regulação da temperatura corporal está sob o controle de uma hierarquia de estruturas neurais as quais são responsáveis por integrar as informações térmicas aferentes e centrais, antes de estimular a ativação de respostas fisiológicas e comportamentais apropriadas. Embora a estimulação de áreas do tronco cerebral e da medula espinhal possa evocar mecanismos termoregulatórios específicos, estudos realizados *in vivo* demonstraram que a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA) desempenha importante papel na regulação precisa da temperatura corporal (revisado por GRIFFIN, 2004).

Estudos eletrofisiológicos realizados na APO/HA, demonstraram que a maioria dos neurônios localizados nesta área são considerados insensíveis a variações de temperatura, ou seja, o aquecimento e o resfriamento da área não alteraram a frequência de disparos desses neurônios. Contudo, aproximadamente 30% são classificados como sensíveis ao

calor, uma vez que sua frequência de disparos aumenta durante o aquecimento e diminui durante o resfriamento da APO/HA. Existe ainda uma pequena proporção de neurônios denominados de sensíveis ao frio, os quais aumentam a frequência de disparos durante o resfriamento e diminuem durante o aquecimento da APO/HA (BOULANT, 1998; 2000).

Fisiologicamente, a frequência de disparo dos neurônios termosensíveis, localizados na APO/HA, é afetada tanto por variações da temperatura sanguínea adjacente, como por influência de conexões diretas com termoreceptores distribuídos na pele e nos músculos (DINARELLO et al., 1988). Assim, em resposta a variações de temperatura, os neurônios hipotalâmicos iniciam respostas termoregulatórias apropriadas (retenção, produção ou perda de calor), com o objetivo de manter a temperatura interna constante.

Boulant (2000) por meio de estudos de estimulação térmica, demonstrou que o resfriamento da área pré-óptica promove o aumento da temperatura corporal, inicialmente por evocar respostas de retenção de calor, as quais incluem vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais de conservação de calor. Em seguida, ocorrem respostas de produção de calor, tais como termogênese provocada por tremores (shivering), termogênese desencadeada pelo aumento da atividade metabólica do tecido adiposo marrom (non-shivering) e termogênese química, decorrente da elevação dos níveis de hormônios metabólicos, tais como tiroxina (T_4), catecolaminas e glicocorticóides. Por outro lado, o aquecimento da APO/HA promove vasodilatação cutânea, sudorese, e várias respostas comportamentais que favorecem a perda de calor.

A fina regulação da temperatura corporal observada nos animais homeotérmicos pode ser explicada por uma teoria baseada na existência de um mecanismo similar a um termostato, denominado de ponto de regulação térmica. O ponto de regulação térmica é

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

De acordo com o conceito de ponto de regulação, a febre é definida como elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais em decorrência da elevação do ponto de termoregulação hipotalâmico. Os mecanismos envolvidos nesse aumento do ponto de regulação consistem de alterações na frequência de disparos dos neurônios termoregulatórios do hipotálamo anterior, provocadas por substâncias, que são os mediadores da resposta febril, denominadas de pirogênicos (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001).

É importante ressaltar que febre é um processo distinto de hipertermia. Nesta, o ponto de regulação hipotalâmico não é alterado e o aumento de temperatura corporal observado é decorrente do comprometimento dos mecanismos de dissipação de calor ou de situações em que a dissipação não é suficiente para a manutenção da temperatura em níveis normais, devido a uma produção excessiva de calor ou a temperaturas externas muito elevadas (DINARELLO et al., 1988; BLATTEIS, 2006, *in press*). Uma característica, termoregulatória comportamental que diferencia as duas situações é que pessoas em estado febril preferem ambientes quentes, facilitando a conservação de calor; enquanto pessoas com hipertermia preferem ambientes frios, a fim de perder calor (BLATTEIS, 2006, *in press*).

1.2 - Mediadores da resposta febril.

No cérebro, a resposta febril resulta de uma complexa interação, entre citocinas, prostanóides, neuropeptídeos e neurotransmissores. Além disso, a febre depende do equilíbrio entre a liberação e a atividade de mediadores pirogênicos e de mediadores que controlam a resposta febril, os denominados criogênios.

As substâncias que induzem febre são designadas de pirogênios. Eles podem ser divididos em exógenos e endógenos. Em geral, a maioria dos pirogênios exógenos é oriunda de produtos gerados por microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (ZEISBERGER, 1999). Os pirogênios endógenos compreendem as proteínas termosensíveis e os mediadores lipídicos. Sua produção é geralmente estimulada pelos pirogênios exógenos, mas também por lesões, traumas e estresse.

Em 1948, BEESON apresentou a primeira evidência de que os pirogênios exógenos atuam por meio da produção e/ou liberação de pirogênios endógenos pelas células do hospedeiro. Estes, por sua vez, seriam os responsáveis pela ativação dos centros cerebrais, os quais controlam a temperatura, promovendo elevação da temperatura corporal (ATKINS, 1960). Atualmente, entretanto, a ação direta de pirogênios exógenos não pode ser descartada (DINARELLO, 2004).

Entre os principais pirogênios endógenos estão as citocinas e quimiocinas, prostaglandinas, fator liberador de corticotropina (CRF) e endotelina.

1.2.1 - Citocinas e quimiocinas.

As citocinas compreendem uma grande família de polipeptídeos que incluem as interleucinas, quimiocinas, fator de estimulação de crescimento, fator de necrose tumoral e interferons (ROTHWELL, 1991).

Segundo Thomson (1991) as citocinas podem ser definidas como “proteínas regulatórias secretadas pelas células brancas do sangue e por uma variedade de outras células no corpo; as ações das citocinas incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação das respostas inflamatórias” (TURNBULL & RIVIER, 1999).

É bem demonstrado que vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais, linfócitos e astrócitos, produzem citocinas com atividade pirogênica. Dentre elas, IL-1, IL-6 e TNF- α são consideradas as principais citocinas envolvidas na resposta febril.

A IL-1 constitui uma família de três polipeptídeos relacionados e codificados por genes distintos: IL-1 α , IL-1 β e o antagonista de receptores de IL-1, IL-1ra (DINARELLO, 1994). Os membros pertencentes a esta família são provavelmente as citocinas mais extensivamente investigadas (CONTI et al, 2004). Estudos demonstraram que tanto a IL-1 α como a IL-1 β induzem febre quando administradas por via intravenosa (i.v.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) em coelhos e ratos. Todavia, demonstrou-se que a febre induzida pela injeção i.v. ou i.c.v. de IL-1 β é muito mais intensa que aquela induzida pela IL-1 α , em diversas espécies (DASCOMBE et al., 1989; MORIMOTO et al., 1989; DAVIDSON et al., 1990; ROTHWELL et al., 1990b; ZAMPRONIO et al., 1994a). Adicionalmente, a administração i.v. de soro anti-IL-1 β , bem como a administração intraperitoneal (i.p.) ou i.c.v. de IL-1ra inibe a febre induzida por endotoxina em ratos (LONG et al., 1990; SMITH & KLUGER, 1992; LUHESHI & ROTHWELL, 1996).

Juntamente com a IL-1 β , a IL-6 é considerada um importante pirogênio endógeno (XIN & BLATTEIS, 1992). Em 2000, ZAMPRONIO e colaboradores detectaram concentrações elevadas de IL-6 no plasma, fluido cerebrospinal e perfusatos hipotalâmico, durante a febre

induzida por endotoxina, em ratos e cobaias. Adicionalmente, Souza e colaboradores (2002), demonstraram que a infusão central de IL-6, em uma dose correspondente às concentrações detectadas no hipotálamo de ratos, induz febre nesses animais. Outro estudo realizado por Miller et al. (1997), demonstrou que a injeção de LPS na bolha de ar subcutânea em ratos promove aumento na concentração de IL-6 bioativa no plasma e também aumento na temperatura corporal o qual é abolido pelo pré-tratamento com soro anti-IL-6 (CARTMELL et al., 2000).

Outra substância também classificada como pirogênio endógeno, liberada por macrófagos em resposta a endotoxina, é o fator de necrose tumoral (TNF). Todavia, o papel do TNF na resposta febril ainda é controverso, visto que dados da literatura demonstraram tanto efeitos pirogênicos como antipiréticos apresentados por esta citocina. O TNF- α , quando administrado por via periférica ou central, induz resposta febril em coelhos (DINARELLO et al., 1986), ratos (KETTELHUT E GOLDBERG, 1988; ZAMPRONIO et al., 2000a) e humanos (MICHIE et al., 1988). Contudo, Klir e colaboradores (1995) demonstraram que o tratamento de ratos com uma dose não pirogênica de TNF, promove redução da resposta febril em resposta ao LPS; enquanto o tratamento com receptor solúvel de TNF exacerba a febre induzida pelo LPS, evidenciando desta forma, a ação antipirética do TNF (revisado por CONTI et al, 2004).

Ao lado das citocinas, que também exercem atividade quimiotática, a quantidade de substâncias químicas definidas como quimioatraentes para leucócitos aumentou significativamente, principalmente com a descoberta das quimiocinas (OPPENHEIM et al., 1991; HORUK, 1994). Algumas substâncias desta classe apresentam atividade pirogênica, como por exemplo, a quimiocina RANTES e MIP-1 α e MIP-1 β . A quimiocina RANTES

(quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por linfócitos T normais ou “regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted”) induz resposta febril em ratos que foi neutralizada por anticorpo anti-RANTES e abolida pelo pré-tratamento de animais com ibuprofeno, sugerindo o envolvimento de prostaglandinas (PGs) no efeito pirogênico desta quimiocina (TAVARES E MIÑANO, 2000). Além disso, estudo de nosso laboratório demonstrou que a RANTES participa da febre induzida pelo LPS, visto que a injeção i.v. de met-RANTES (antagonista de receptores CCR1 e CCR5 para quimiocinas) reduziu a febre induzida por este estímulo (MACHADO et al., *em análise*).

Outra quimiocina que apresenta atividade pirogênica é a proteína inflamatória derivada de macrófagos, MIP-1. MIP-1 α e MIP-1 β produzem febre dose-dependente em concentrações femtomolar, através de sua ação direta na APO/HA. Diferentemente das respostas febris induzidas por IL-1, IL-6, TNF, IFN ou IL-11 (DINARELLO et al., 1988; DINARELLO et al., 1991; LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994), aquela induzida por MIP-1 em coelhos e ratos não é reduzida, quando os animais são tratados com inibidores da ciclooxigenase, sugerindo que esta proteína possa induzir febre por mecanismos que independem da síntese de prostaglandinas (DAVATELIS et al., 1989; MINÃO et al., 1990).

1.2.2 – Prostaglandinas (PGs).

As prostaglandinas são moléculas de origem lipídica, derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, o qual é formado a partir da clivagem de fosfolípidos de membrana pela ação das fosfolipases, principalmente da fosfolipase A₂. A conversão do ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos (PGG₂ e PGH₂) ocorre pela ação das enzimas

ciclooxigenases (COX). Esta enzima existe em duas isoformas, referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tipos celulares, podendo ser induzida em processos patológicos (CROFFORD et al., 1994; HWANG et al., 1998; SANO et al., 1995). Já a COX-2 não é expressa em condições fisiológicas, exceto nos rins, estômago e sistema nervoso central (KHAN et al., 2002). Contudo, a expressão da COX-2 pode ser induzida em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e em outros tipos celulares, por estímulos fisiológicos e inflamatórios (KUJUBU et al., 1991; ELMQUIST et al., 1997; PARENTE & PERRETI, 2003). Entretanto, em alguns tecidos como no encéfalo de mamíferos, as duas isoformas estão presentes constitutivamente (O NEILL & FORD-HUTCHINSON, 1993; BREDER et al., 1995). Baseado na expressão destas isoformas postula-se que as PGs derivadas da COX-1 estejam envolvidas nas funções celulares de manutenção da homeostasia e proteção celular (VANE, 2000), enquanto que a atividade da COX-2 seja responsável pelo aumento da produção de PGs, durante a inflamação e injúria tecidual (ELMQUIST et al., 1997).

Mais recentemente foi descrita uma variante da isoforma COX-1, denominada COX-3. Em cães, o RNA mensageiro (mRNA) para a COX-3 é expresso no córtex e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Entretanto, a participação desta isoforma de COX em processos fisiológicos e patológicos ainda não foi demonstrada, sendo que até mesmo a existência de uma COX-3 cataliticamente ativa tem sido questionada (DINCHUK et al., 2003).

Desde 1971 têm sido proposto que as PGs são mediadores centrais da resposta febril e que drogas antipiréticas (tal como a indometacina), reduziriam a febre por meio do bloqueio de sua síntese (MILTON & WENDLANT, 1971). Estudos realizados por Feldeberg e

Saxena (1971) e Stitt (1973) mostram que microinjeções de PGs na APO/HA foram capazes de induzir febre em ratos e coelhos. Corroborando esses dados, demonstrou-se que durante a resposta febril induzida por diferentes estímulos, ocorre aumento nas concentrações de PGs no sistema nervoso central (SNC), em diferentes espécies animais (COCEANI et al., 1988, 1995; SIRKO et al., 1989; FRAIFELD & KAPLANSKI, 1998). Foi demonstrado que camundongos nocautes para receptor EP₃ de prostaglandina ou a prostaglandina E sintase-1 microsossomal (mPGES-1) não desenvolvem febre em resposta a injeção periférica de LPS e IL-1 β (USHIKUBI et al., 1998; ENGBLOM et al., 2003).

Dentre as PGs, a PGE₂, é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril (MILTON & WENDLANDT, 1971, COCEANI et al., 1988; BLATTEIS E SEHIC, 1997; ENGBLOM et al., 2002), embora outros derivados ciclooxygenados do ácido araquidônico, particularmente a PGF_{2 α} , também possam induzir febre e termogênese em animais experimentais (COELHO et al., 1995; SOUZA et al., 2002) e seu nível, encontra-se elevado no fluído cerebrospinal de ratos durante a febre induzida por pirogênicos exógenos ou endógenos (COELHO et al., 1995; FABRÍCIO et al., 2005).

Diversas evidências demonstram que as PGs envolvidas na febre são produzidas pela COX-2, pois inibidores seletivos para essa isoforma abolem respostas febris induzidas por LPS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (FUTAKI et al, 1993; CAO et al., 1997; 1998; STEINER et al., 2001; ROTH et al., 2002). Corroborando esses achados demonstrou-se que febres produzidas pela injeção de LPS, IL-1 e IL-6 são bloqueadas em animais deficientes para COX-2, porém não para a COX-1 (LI et al., 1999a, 2001, 2003). Adicionalmente, em ratos, a síntese de COX-2 pode ser induzida no SNC, tanto por pirogênicos exógenos, quanto endógenos (CAO et al., 1995, 1996; INOUE et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

Entretanto, existem estudos que contrariam o papel crucial das PGs como mediadores centrais da resposta febril, uma vez que, após injeção i.c.v. de rmMIP-1 β , camundongos nocautes para COX-1 e COX-2 apresentaram febre semelhantemente a camundongos selvagens (LI et al., 2003). Sabe-se que além do MIP-1 α e β (MIÑANO et al., 1990; 1996), a febre induzida pela IL-8 (ZAMPRONIO et al., 1994b), pelo PFPF (ZAMPRONIO et al., 2000; VEIGA-SOUZA et al., *em análise*) e pela endotelina-1 (FABRICIO et al., 1998; 2005b) também independem de PGs.

Com exceção dos estímulos independentes de PGs, considera-se que os pirogênicos exógenos estimulem a síntese de pirogênicos endógenos, os quais estimulam a produção de PGE₂ no SNC, que seria responsável por elevar o ponto de regulação hipotalâmico, conseqüentemente desencadeando a febre (revisado por KLUGER, 1991; FRAIFELD & KAPLANSKI, 1998).

Ranels e Griffin (2003) demonstraram que a PGE₂ promove aumento e redução na frequência de disparos de neurônios hipotalâmicos insensíveis à temperatura e sensíveis ao calor, respectivamente. Em estudo posterior, estes autores sugeriram que isso ocorre por meio da ação direta da PGE₂ sobre a atividade de correntes iônicas voltagem-dependente, as quais são responsáveis por regular a excitabilidade e ritmicidade da frequência de disparo dos neurônios hipotalâmicos (RANELS & GRIFFIN, 2005).

1.2.3 – Fator liberador de corticotropina (CRF).

Além das PGs, o CRF também parece estar envolvido na mediação da resposta febril (ROTHWELL, 1989; 1990a). O CRF é um peptídeo composto de 41 aminoácidos, sintetizado nas células parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV). Ele

exerce seus efeitos por meio da ativação de dois subtipos de receptores, CRF₁ e CRF₂. A administração i.c.v. de CRF, em ratos, aumenta a atividade simpática (BROWN et al., 1982), estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (LEFEUVRE et al., 1987) e eleva a temperatura corporal (DIAMANT & DE WIED, 1991), sugerindo a participação deste fator na indução da termogênese nesta espécie.

O CRF também medeia ações centrais de citocinas (ROTHWELL, 1989; 1990a). Tem sido proposto que o CRF atue no SNC como um dos mediadores da febre induzida pela injeção central da IL-1 β , IL-6, IL-8 e PGF₂ α (ROTHWELL, 1989; ROTHWELL et al., 1991; STRIJOS et al., 1992), pois injeções de anticorpos anti-CRF ou do antagonista não seletivo de receptores de CRF, α -helical CRF₉₋₄₁, atenuaram significativamente essas respostas. Por outro lado, as respostas febris induzidas por IL-1 α e TNF- α não são alteradas pelo tratamento dos animais com este antagonista (ROTHWELL, 1989). Além disso, Zampronio e colaboradores (2000a) demonstraram que o antagonista não seletivo para receptores de CRF abole o aumento de temperatura induzido pela injeção central de PFPF (fator pirogênico pré-formado) e que este fator induz, *in vitro*, a liberação de CRF a partir de explantes hipotalâmicos de ratos.

Fabício e colaboradores (2006) evidenciaram a participação do CRF na febre induzida pela endotelina, uma vez que o tratamento com antagonista não seletivo para receptores ET_A e ET_B para endotelina (bosentan), bem como com antagonista seletivo de receptor ET_B (BQ – 788), reduzem a febre induzida pela injeção i.c.v. de CRF.

A atividade pirogênica do CRF não é inibida por fármacos bloqueadores de COX (STRIJOS et al., 1992; ZAMPRONIO et al., 2000a), sugerindo que possam existir

mecanismos de indução de febre independentes da participação de PGs, porém dependentes da liberação de CRF.

1.2.4 – Endotelina (ET).

A endotelina é um potente peptídeo vasoconstritor, secretado principalmente por células endoteliais (YANAGISAWA et al., 1988). Este peptídeo exerce seus efeitos biológicos basicamente por atuar em dois tipos de receptores acoplados a proteína G, ET_A e ET_B. As ETs são formadas a partir de diferentes pré-endotelinas, as quais são clivadas por endopeptidases, em propeptídeos denominados de big-ETs, as quais são convertidas a peptídeos maduros por ação da enzima conversora de endotelina (ECE) (HAYNES & WEBB, 1993).

Em 1998, Fabrício e colaboradores demonstraram que a administração i.c.v. de ET-1, em ratos, induziu aumento significativo da temperatura retal. Efeito este totalmente prevenido pelo bloqueio seletivo de receptores ET_B com BQ-788, porém não alterado pelo BQ-123, um antagonista seletivo de receptores ET_A. Também demonstraram que a resposta febril induzida pela administração intravenosa de LPS, em ratos, foi substancialmente reduzida pela injeção i.c.v. de BQ-788, pela injeção intravenosa de bosentan, um antagonista não seletivo de receptores ET_A e ET_B, porém não foi alterada pela injeção i.c.v. de BQ-123. Então a partir desses dados, os autores, sugeriram que as ETs, via ativação central de receptores ET_B, participam, juntamente com outros mediadores, da resposta febril induzida pelo LPS. Corroborando esses dados, em 2005 (b), estes mesmos autores demonstraram que a injeção i.v. de LPS, em dose que causa febre de longa duração,

promove aumento na produção de endotelina -1 e seu precursor imediato a big-endotelina no CSF de ratos.

Avaliando a participação das PGs na resposta febril induzida pela endotelina-1, Fabrício e colaboradores (2005a) utilizaram inibidores específicos da COX-2, celecoxibe e lumiracoxibe. Estes fármacos reduziram os níveis de PGs no CSF induzido tanto pela injeção i.v. de LPS quanto pela injeção i.c.v. de ET-1. Contudo, não foram capazes de inibir a febre da ET-1, quando administrados nas doses que efetivamente reduziram os níveis de PGs. A partir destes resultados, os autores sugeriram que os mecanismos envolvidos na resposta febril induzida pela ET-1 sejam independentes da ação das PGs.

Posteriormente, utilizando vários antagonistas de receptores específicos para determinadas substâncias, como IL-1ra (IL-1 β), α -helical CRF₉₋₄₁ (CRF); Bosentan, BQ-123 e BQ - 788 (endotelina) e em conjunto com dados obtidos em experimentos anteriores (FABRÍCIO et al., 1998 e 2005a), estes autores propuseram que a ET-1 seja um mediador intermediário na febre induzida pelo LPS, participando de um mecanismo que envolve a liberação de PFPF (fator pirogênico pré-formado), CRF, ET-1 (via receptores ET_B), e por último a IL-1 β (LPS \rightarrow PFPF \rightarrow CRF \rightarrow ET-1 \rightarrow IL -1 β \rightarrow *Febre*; FABRÍCIO et al., 2006a).

1.3 - Comunicação entre a periferia e o sistema nervoso central.

Embora esteja bem estabelecido que a resposta febril é desencadeada e regulada no sistema nervoso central (SNC), ainda é controverso o mecanismo pelo qual as citocinas pirogênicas, uma vez produzidas periféricamente, consigam alcançar o tecido cerebral e promover alterações no centro termorregulatório hipotalâmico. Os possíveis mecanismos envolvidos na sinalização da periferia para o SNC são:

- 1) Transporte ativo: foi demonstrada a existência de transportadores específicos na barreira hematoencefálica (BANKS & KASTING, 1991; BANKS et al., 1995);
- 2) Acesso ao cérebro através de áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, áreas estas denominadas coletivamente de órgãos circumventriculares, como o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), órgão subfornical, área postrema, os quais permitem a entrada de citocinas da periferia para o encéfalo (STITT, 1985; WATKINS et al., 1995a);
- 3) Alternativamente, foi proposto que as citocinas não alcancem o SNC através dos órgãos circumventriculares, mas sim ativem receptores específicos localizados em células gliais perivasculares ou endoteliais presentes nestes órgãos, estimulando a produção de mediadores liberados diretamente no SNC (BLATTEIS, 1992; MATSUMURA et al., 1998).
- 4) Interação com nervos periféricos: essa via envolve a transmissão da informação periférica até o SNC pela estimulação de nervos sensoriais periféricos. Nesse sentido demonstrou-se que a vagotomia subdiafragmática (secção dos ramos abdominais do nervo vago) inibe a febre induzida por estímulos administrados por via intraperitoneal (i.p.) (WATKINS et al., 1995b; GOLDBACH et al., 1997; WERNER et al., 2003). Sehic e Blatteis (1996), levantaram a hipótese de que sinais derivados de células periféricas de defesa poderiam ser transmitidos via o nervo vago até a medula, então os sinais seriam transportados através de um feixe noradrenérgico ventral para a área pré-óptica, onde a noradrenalina liberada induziria a síntese local de PGE₂ e, conseqüentemente, o início da febre.

1.4 - Mecanismos de controle das respostas de defesa.

Como para a maioria dos sistemas regulados na biologia, a febre também está sujeita a um processo inibitório endógeno e a mecanismos de retro-alimentação negativa. Tem sido identificada uma variedade de mecanismos inibitórios específicos para citocinas, incluindo proteínas ligantes circulantes, receptores solúveis e, no caso da IL-1, antagonista seletivo de receptor, IL-1ra (LUHESHI & ROTHWELL, 1996). Existem ainda substâncias que, ao contrário dos pirogênicos endógenos, são capazes de limitar as elevações na temperatura corporal. Assim, os chamados criogênicos endógenos (CEs) têm como principal papel fisiológico evitar que estas elevações cheguem a limites que possam comprometer as funções vitais do organismo. Entre eles estão os glicocorticóides (COELHO et al., 1992), a arginina vasopressina (AVP; revisado por KASTING, 1989), o hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH; MARTIN et al., 1991) e a IL-10 (LEDEBOER et al., 2002).

1.5 - Controle farmacológico da resposta febril.

Embora a febre desempenhe importante papel na resposta de defesa do hospedeiro, em algumas circunstâncias a resposta febril pode ser prejudicial ao organismo, como, por exemplo, em doenças auto-imunes controladas ou inativas como o lúpus e artrite reumatóide, uma vez que, ela aumenta a atividade dos componentes dos sistemas de defesa imune (celular e humoral) ou não-imune. Nesse sentido, o homem vem tentando descobrir drogas capazes de auxiliar no controle da resposta febril. Desde a descoberta dos efeitos antipiréticos da aspirina pelo Reverendo Edward Stone no século XVIII na Inglaterra, várias outras drogas antipiréticas foram descobertas e/ou sintetizadas. Mas foi apenas em 1971, que Vane relacionou o efeito das drogas antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs) à inibição da

síntese das PGs e Milton & Wedlandt propuseram que as substâncias pirogênicas poderiam induzir febre por meio da produção de PGs específicas e que as drogas antipiréticas (tais como a aspirina), reduziriam a febre por meio do bloqueio da sua síntese. Têm sido desenvolvidas drogas com alta seletividade para COX-2, entre eles o Celecoxibe (PENNING et al., 1997), e recentemente o Lumiracoxibe (BRUNE & HINS, 2004; ZELENAKAS et al., 2004), que apresentam atividade antiinflamatória e antipirética, com reduzida toxicidade gástrica.

Entretanto, os efeitos dos NSAIDS parecem envolver outros mecanismos que não apenas a inibição da COX. Entre estas evidências estão as controvérsias em relação ao papel das PGs na resposta febril (KLUGER, 1991) e a proposição de mecanismos de ação adicionais, como a inibição da ativação do NFK-B pelo salicilato de sódio e aspirina (KOPP & GOSH, 1994), inibição da ligação de um fator nuclear à região promotora de TNF- α pelo salicilato de sódio, aspirina, ibuprofeno e indometacina (AEBERHARD et al., 1995).

O paracetamol ou acetaminofeno é o derivado acetilado do ácido p-aminofenol, sendo o analgésico mais popular na maioria dos países do mundo (THOMAS, 1993). Embora possa causar danos hepáticos em doses altas, sua grande utilização foi motivada por apresentar vantagens em relação à aspirina, uma vez que, em doses terapêuticas, é desprovido de efeitos gastrintestinais, não altera as funções plaquetárias, não causa crises de asma brônquica e não está associado à síndrome de Reye em crianças. Esta droga antipirética apresenta fraca atividade antiinflamatória, característica esta que tem sido atribuída a sua capacidade reduzida de inibir a ciclooxigenase (ABRAMSON & WEISSMANN, 1989). O paracetamol parece inibir esta enzima somente em meio pobre em peróxidos, por exemplo, no hipotálamo, o que poderia explicar em parte sua baixa atividade antiinflamatória em tecidos periféricos, uma vez que locais inflamados geralmente contêm

concentrações aumentadas de peróxidos gerados por leucotrienos (MARSHALL, et al., 1987). Em estudo desenvolvido por Landolfi et al. (1998), evidenciou-se que, em células T98G de astrócitos humanos, o paracetamol inibe a síntese de PGE₂ induzida por IL-1 β , porém sem afetar a atividade da enzima COX-2. Este resultado sustenta a proposta de Mitchell et al., (1993) o qual classifica o paracetamol como fraco inibidor da enzima ciclooxigenase. Por outro lado, Kis e colaboradores (2005), demonstraram que o paracetamol inibe efetivamente a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) em células do endotélio cerebral, e que este efeito é decorrente da inibição da COX-2 e não da COX-1 e COX-3. Ainda neste estudo, os autores verificaram que o paracetamol não altera a expressão de nenhuma das isoformas das COX no tecido do endotélio cerebral.

Embora o paracetamol seja um dos mais eficientes analgésicos/antipiréticos, os dados existentes sobre seu mecanismo de ação antipirética são pouco conclusivos, principalmente aquele relacionado à inibição da síntese de PGs. Até o presente momento, não há evidências da participação da COX-3 na resposta febril para que possamos relacionar sua atividade antipirética à inibição da COX-3.

A dipirona é um derivado pirazolônico amplamente utilizado em vários países devido a sua eficácia como antipirético e antiálgico. No entanto, esta droga é praticamente desprovida de efeito antiinflamatório, possui baixa atividade antiedematogênica (LORENZETTI & FERREIRA, 1985) e é um fraco inibidor, reversível e competitivo, da ciclooxigenase (LÜTHY et al., 1983; ELDOR et al., 1984).

Em estudo realizado por Souza e colaboradores (2002), verificou-se que a dipirona não inibe a atividade da COX-1 ou da COX-2 em células COS-7 tranfectadas com estas isoformas e reduz a resposta febril induzida pela injeção central de PGF_{2 α} . Ainda neste

estudo, demonstrou-se que, enquanto a indometacina inibe a febre induzida por ácido araquidônico (AA), substrato da COX-1 constitutiva, bem como aquela decorrente da indução de COX-2 (injeção central de AA em animais pré-tratados com IL-1 β , administrados em doses que não induziram febre quando administradas separadamente), a dipirona não altera estas respostas. Em conjunto, estes resultados sugerem que o efeito antipirético da dipirona não está relacionado à inibição da COX-1 ou COX-2. Adicionalmente, foi demonstrado que a dipirona além de inibir a febre induzida por mediadores pirogênicos que promovem resposta dependente da ação do CRF, inibe também a liberação deste fator de explantes hipotalâmicos. E por essa razão, tem sido proposto que um dos mecanismos antipiréticos exercidos pela dipirona possa estar relacionado à inibição da síntese e/ou liberação do CRF (SOUZA et al., 2002).

1.6 - Modelos experimentais de febre.

Em modelos experimentais, várias substâncias exógenas de diferentes origens são utilizadas na tentativa de mimetizar infecções em estudos de febre.

O lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, tem sido amplamente empregado como pirogênio exógeno em muitos estudos experimentais e isto se deve ao interesse clínico nas respostas fisiopatológicas envolvidas em infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Embora a incidência de infecções causada por bactérias Gram-positivas tem aumentado consideravelmente na última década (BONE, 1994) pouco se sabe sobre a patogênese envolvida nas infecções induzidas por estas bactérias.

A parede celular de bactérias Gram-positivas contem ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano, os quais ativam leucócitos, estimulam a geração de citocinas pró-inflamatórias, e conseqüentemente causam resposta inflamatória sistêmica moderada. Ambos constituintes da parede celular de bactérias Gram-positivas bem como as toxinas liberadas por estes microorganismos podem estar envolvidas na patogênese destas infecções. Além disso, toxinas e componentes da parede celular podem agir sinergicamente; evidências sugerem que as toxinas podem acelerar os efeitos dos produtos da parede celular (BHAKDI et al., 1991).

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, é um dos patógenos mais importantes em causar infecções nosocomiais e sepse em humanos. É considerado também como o maior contribuinte para doenças como a osteomelite, endocardite invasiva e artrite séptica (BANNAN et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que bactérias Gram-positivas também são capazes de induzir resposta febril. Modelos experimentais de febre induzidos por pirogênios provenientes dessas bactérias, como o muramil-dipeptídeo (MDP) e parede celular de *S. aureus*, são semelhantes àqueles induzido pelo LPS (GOESLT & LABURN, 1991; CARTMELL et al., 2002).

Há vários estudos demonstrando que o MDP, componente da parede celular de bactérias Gram-positivas (peptidoglicano), apresenta atividade pirogênica quando injetado intracerebroventricularmente (i.c.v.) em coelhos (RIVEAU et al., 1980, 1986; SHOHAM et al., 1987), via intramuscular em cobaias (KAMERMAN & FULLER, 2000) e intravenosamente em ratos (FERREIRA et al., 2001).

Segundo Luker et al., (2000), a injeção intraperitoneal de parede celular de *S. aureus* induz resposta febril em ratos que é acompanhada de “sickness behaviour”, uma resposta comportamental característica de processos infecciosos.

Cartmell e colaboradores (2004), demonstraram que a injeção de microorganismos mortos - parede celular de *S. aureus* - na bolha de ar subcutânea em ratos foi capaz de induzir aumento significativo na temperatura corporal dos animais. Adicionalmente, Mphahlele et al., (2004) observaram que a infusão crônica de parede celular de *S. aureus* em cabras promove aumento sustentado na temperatura corporal desses animais.

Demonstrou-se também que as toxinas produzidas pelo *S. aureus*, como por exemplo, as enterotoxinas (staphylococcal enterotoxins A e B) SEA e SEB são capazes de induzir febre quando administrados intravenosamente em gatos (CLARK & PAGE, 1968) e coelhos (GREISMAN et al., 1966; HUANG et. al., 1997, 2001) .

Contudo, experimentos realizados com produtos/componentes bacterianos, como por exemplo, toxinas, LPS (Gram-negativo), muramil-dipeptídeo (Gram-positivo), parede celular de bactéria Gram-positiva, podem não estar refletindo a situação clínica adequadamente. Várias questões têm sido apontadas acerca desse assunto. Uma delas é que estas substâncias são injetadas em grande quantidade, portanto, sendo de pouca relevância fisiológica, uma vez que durante uma infecção além de existir um foco inflamatório, as bactérias liberam seus produtos gradativamente e em quantidades menores do que aquelas utilizadas nos estudos de resposta febril (CAMPISI et. al., 2003).

Além disso, a injeção de grande quantidade de produtos bacterianos induz produção e liberação de uma ampla variedade de mediadores e, conseqüentemente, o excesso de mediadores liberado poderia mascarar as citocinas realmente importantes para a indução desta resposta (JOHNSON et. al., 2003).

Diante desses fatos, fica evidente que os modelos de indução de resposta febril não são capazes de reproduzir situação real de infecção da qual a febre participa. Uma vez que não é capaz de reproduzir esta resposta, fica claro que a compreensão da característica bem como da importância ou não da febre nestes quadros também fica prejudicada.

Baseado nos fatos acima citados e levando-se em consideração a falta de dados relacionados à febre induzida por bactérias Gram-positivas, a hipótese do nosso estudo é que a injeção intraperitoneal de *S. aureus* induz febre em ratos e que esta resposta é modificada pelo tratamento com drogas que apresentam atividade antipirética.

2 OBJETIVOS

Padronizar no laboratório o modelo de resposta febril induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em ratos, e avaliar o efeito de drogas que apresentam atividade antipirética sobre a resposta febril induzida por esta bactéria.

2.1 - Objetivos específicos

- 1) Padronizar a dose de *S. aureus* (ATCC 25923) capaz de induzir febre e verificar se esta altera a sobrevivência dos animais;
- 2) Estabelecer relação entre o aumento de temperatura corporal induzido pela injeção i.p. de *S. aureus* e a quantidade de bactérias presentes no foco infeccioso e no sangue;
- 3) Verificar se o aumento de temperatura produzido pela administração i.p. de *S. aureus* é acompanhado pela ativação de mecanismos termofetores característicos de resposta febril;
- 4) Verificar o efeito do celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2), dexametasona (antiinflamatório esteroide), paracetamol e dipirona, sobre a febre nos animais submetidos à injeção i.p. de *S. aureus*;
- 5) Verificar o efeito de antagonistas de receptores para endotelina (seletivo de receptores ET_A, BQ-123; e antagonista de receptores ET_B, BQ-788) e IL-1ra (antagonista natural do receptor da IL-1) na resposta febril induzida pela injeção de *S. aureus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais.

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos, pesando entre 180 a 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Estes animais foram mantidos à temperatura de 24°C e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso à água e à ração. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº 134/2005).

3.2 – Esterilização.

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C por 30 minutos (material plástico e soluções), esterilizados por calor seco a 180°C por duas horas (material de vidro e metal) ou ainda por luz ultravioleta.

3.3 - Cultura de bactérias.

Primeiramente, por meio de cultivo e semeadura de uma amostra de suspensão de *S.aureus* (ATCC 25923), verificou-se a presença de colônias puras. Após a verificação da pureza, com o intuito de aumentar a população de bactérias na cultura, transferiu-se 50 µL desta suspensão para um tubo de polipropileno e o volume completado para 45 mL de meio de cultura líquido BHI (*Brain and Heart Infusion*). Por conseguinte, esta cultura foi incubada a 37°C por aproximadamente 20 horas. Após este período, o tubo contendo as

bactérias foi centrifugado por 10 minutos a 3000 r.p.m em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspense em 45 mL de meio BHI. Novamente a cultura foi incubada a 37°C por aproximadamente 20 horas.

Após repetir esse procedimento por quatro vezes, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado (bactérias) ressuspense em 10 mL de tampão salina-fosfato (PBS) e transferido para um tubo contendo 35 mL desta mesma solução. Esta suspensão foi homogeneizada e dividida em alíquotas de 400 µL. A seguir, as alíquotas contendo as bactérias foram liofilizadas por meio de Hetovac ® mod. CT110.

3.4 - Determinação do número de bactérias contidas nos tubos liofilizados.

O conteúdo de um tubo de bactérias liofilizadas, foi ressuspense em 600 µL de salina estéril e transferido para um tubo de polipropileno contendo 45 mL deste mesmo meio, o qual foi incubado por 20 horas a 37°C . Então, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimentado ressuspense em 45mL de tampão salina-fosfato (PBS). Este procedimento foi realizado duas vezes. As bactérias foram ressuspensas em 10 mL de PBS (suspensão final).

Em seguida, realizou-se uma diluição seriada da suspensão final (1:100; 1:1000; 1:10.000; 1:100.000; 1:1000.000; 1:10.000.000; 1:100.000.000) em PBS. Destas suspensões, 10 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido Ágar Mueller Hinton (Difco Laboratories) e incubadas por 20h a 37°C. Posteriormente, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi quantificado.

Para cada experimento, uma alíquota liofilizada foi incubada em meio de cultura BHI e mantida a 37°C durante 20h. Após este período, o meio foi centrifugado e as bactérias ressuspensas em 10 mL de PBS estéril. Desta forma, a partir desta suspensão foram obtidas as doses utilizadas na padronização do modelo de resposta febril induzida pela injeção intraperitoneal de *S. aureus* em ratos.

3.5 - Quantificação de bactérias no sangue e exsudato peritoneal.

A quantificação do número de bactérias no sangue e lavado peritoneal foi realizada 2; 6; 12 e 24 horas após a injeção i.p. de *S. aureus*. Para a obtenção das amostras de sangue para o estudo da bacteremia, os animais foram submetidos a punção cardíaca e para a quantificação do número de bactérias no exsudato, lavou-se a cavidade peritoneal com 10 mL de PBS estéril. O lavado peritoneal foi então diluído (1:100; 1:1000; 1: 10.000; 1: 100.000; 1:1000.000; 1: 10.000.000; 1: 100.000.000) em PBS estéril e 10 µL dessa solução semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). O sangue foi semeado sem diluições. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 h a 37 °C e o número de colônias contado. Os resultados foram expressos como Log de UFC/cavidade ou Log de UFC/mL para o lavado peritoneal e sangue, respectivamente.

3.6 - Drogas e doses.

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Antagonista de receptores de IL-1 recombinante humano (IL-1ra - NIBSC, Hertfordshire, UK): 9.1 pmol

- BQ 788 (2,6 Dimethylpiperidene-carbonyl- γ -methyl-Leu-N-[methoxycarbonyl]D-TRp-D-NLe., RBI- Sigma Chemical CO. St. Louis, MO -USA): 3,0 pmol,
- BQ 123 (lot. K 09038X-1, ET_A receptor antagonist, American Peptide Co., Sunnyvale, CA, EUA): 3,0 pmol
- Celecoxibe (Celebra[®], Pfizer, São Paulo, Brasil): 1,0; 2,5; 5,0 mg/ kg.
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, São Paulo, Brasil): 400 mg/kg
- Cloridrato de cetamina (Ketamina Agener[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil): 58 mg/kg
- Dexametasona (Decadronal[®], Prodome Laboratórios, São Paulo, Brasil): 0,5 mg/kg.
- Dipirona (Metamizol sódico, Hoechst Laboratórios, São Paulo, Brasil): 120 mg/kg
- Interleucina-1 β recombinante de rato (rr-IL-1 β - R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA): 180 fmol
- Paracetamol (Sigma Chem Co., St. Louis, EUA): 150 mg/kg.
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, gentilmente fornecido pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Darini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo): 10³, 10⁶, 10⁹, 10¹², 10¹³, 2x10¹³ UFC/cavidade.
- Xilazina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S/A - Espanha): 20 mg/kg

3.7 - Via de administração das drogas.

Via oral (v.o.): Celecoxibe e paracetamol foram administrados por esta via no volume de 0,5 mL e 2 mL respectivamente, utilizando seringas de 3 ou 5 mL conectadas a um tubo de polipropileno com 5 cm de comprimento.

Intraperitoneal (i.p.): *S. aureus*, solução salina, foram administradas por esta via em um volume de 2 mL/cavidade, utilizando-se agulhas 20 x 0,55 mm e seringas de 5 mL. A dipirona foi administrada por esta via no volume de 0,5 mL, utilizando-se agulhas 20 x 0,55 mm e seringas de 3 mL.

Subcutânea (s.c.): Dexametasona foi administrada subcutaneamente no volume de 0,2 mL, utilizando-se agulhas de 13 x 0,45 mm e seringas de 1 mL.

Intracerebroventricular (i.c.v.): as demais drogas foram administradas no ventrículo lateral direito no volume de 3 µL por meio de uma agulha de microinjeção (30 G) conectada a uma microseringa Hamilton (25 µL) por um tubo de polipropileno P20, sendo que a agulha excedeu a cânula em 2,5 mm.

3.8 - Determinação da temperatura retal e da temperatura da pele da cauda por telemetria.

A temperatura retal dos animais foi medida por inserção de sonda (YSI, nº 402, USA), conectada a um teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA), a 4,0 cm de profundidade no reto dos animais, sem que os animais fossem retirados de suas respectivas caixas. Os animais foram adaptados às condições experimentais por meio da realização deste procedimento (duas vezes) no dia anterior ao experimento, a fim de minimizar variações de temperatura induzidas por estresse decorrente do manuseio. Durante o experimento a temperatura ambiente foi mantida a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. No dia do experimento as temperaturas basais foram determinadas por 3 medidas, a intervalos de 30 minutos. Somente os animais com temperatura estável e na faixa de 36,8 a 37,4°C (temperatura basal) foram utilizados nos experimentos. Após a administração do estímulo (*S. aureus*) e

de salina estéril, as medidas de temperatura retal foram realizadas a cada 30 minutos durante 6 horas.

A temperatura da pele da cauda foi medida por meio de uma sonda posicionada na superfície lateral da cauda no seu primeiro terço distal. A sonda foi fixada à cauda e isolada da perda de calor para o ambiente com a utilização de uma fita adesiva de 2 a 3 cm de largura envolta por uma fita isolante. O isolamento da referida extensão da cauda não comprometeu os mecanismos de perda de calor, uma vez que os animais controle não apresentaram alteração da temperatura retal.

3.9 - Implante do transmissor de temperatura na cavidade peritoneal.

Os transmissores foram esterilizados pela imersão por 24 horas em solução de glutaraldeído 2% (v/v). Anteriormente à cirurgia, os transmissores foram lavados com solução salina estéril e deixados em repouso nesta solução por aproximadamente 30 minutos. Para o implante, primeiramente os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (58 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, após a tricotomia e anti-sepsia da pele, realizou-se uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos abdominais. O transmissor foi então inserido na cavidade peritoneal. Posteriormente, os músculos e a pele foram suturados separadamente e os animais receberam injeção intramuscular de 400 mg/kg de cloridrato de oxitetraciclina. O período de recuperação do estresse cirúrgico, antes da execução do experimento foi de 7 dias.

3.10 - Determinação da temperatura corporal por radiotelemetria.

No processo de leitura da temperatura corporal por radiotelemetria, transmissores operados por bateria (mini-mitter) foram implantados intraabdominalmente conforme

descrito anteriormente e acionados no dia anterior ao experimento. A frequência de saída (Hz) do transmissor foi monitorada por uma antena montada em uma mesa receptora situada embaixo da gaiola de cada animal e conectada a um processador periférico (Dataquest Sistem LabPro versão 3.1) conectado, por sua vez, a um computador pessoal. As frequências foram amostradas a intervalos de 15 minutos e convertidas para graus Celsius (°C) pelo processador. A temperatura corporal dos animais foi monitorada por um período de 24 horas após a injeção do estímulo, a qual foi realizada entre 11:00 – 12:00 horas. Os parâmetros de temperatura ambiente e temperatura basal foram os mesmos daqueles descritos para a medida por telemetria (item 3.8).

3.11 - Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (58 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) via intraperitoneal. Após tricotomia e assepsia da pele, as cabeças dos animais foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-USA). Posteriormente, administrou-se, por via subcutânea, lidocaína a 3% com noradrenalina na parte superior da cabeça que foi seguida de uma incisão na pele, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, para a exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo e a implantação das cânulas, inibindo o estímulo doloroso e diminuindo o sangramento, por se tratar de um anestésico local associado a um vasoconstritor.

As cânulas esterilizadas, constituídas de um segmento de agulha hipodérmica BD-7, com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foram conectadas por de meio de uma cânula guia, fixada ao estereotáxico. Assumindo-se o bregma como ponto de

referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e posterior implantação da cânula i.c.v. situam-se a -1,5 mm antero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, com uma inclinação da barra incisal de -2,5 mm.

As cânulas foram introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral 2,5 mm abaixo da superfície craniana quando da implantação no ventrículo lateral. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no Atlas de PAXINOS E WATSON (1986).

A fixação das cânulas foi realizada por meio de uma prótese de acrílico auto-polimerizável com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana. No final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de 400 mg/kg de cloridrato de oxitetraciclina. Os animais recém-operados foram mantidos em caixas acrílicas, sem restrição de água ou ração, em sala com temperatura controlada a 24°C, com ciclos dia-noite (intervalos de 12 horas), por no mínimo sete dias, para recuperação pós-cirúrgica.

Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com éter e 3 µL de corante azul de Evans foram injetados no local correspondente a microinjeção. Em seguida, os animais foram decapitados e os encéfalos extraídos. Foi realizado um corte transversal na região correspondente à localização da cânula e o local da microinjeção foi verificado macroscopicamente. Os animais cujos ventrículos laterais não estavam corados tiveram suas medidas de temperatura desconsideradas durante o cálculo dos resultados.

3.12 - Análise estatística.

Para calcular o índice de perda de calor, IPC, utilizou-se a seguinte fórmula: $IPC = (T_p - T_a) / (T_r - T_a)$. Onde T_p é a temperatura da pele da cauda; T_a , temperatura ambiente; T_r , temperatura retal. Os limites teóricos para o IPC são 0 (vasoconstrição máxima) e 1 (vasodilatação máxima) (ROMANOVSKY, et al, 2002).

Primeiramente, os dados foram submetidos à análise de variância Two-way ANOVA. Nos experimentos em que se visualizou significativa interação entre tempo-tratamento ou significativo efeito em um desses parâmetros a análise foi feita ponto a ponto pela análise de variância One-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). Em ambas análises, utilizou-se o nível de significância do erro de 5% ($P < 0,05$). Para realização da análise estatística usou-se o programa Graph Pad Prism 3,0.

4 RESULTADOS

4.1 - Efeito da injeção intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de *S. aureus* sobre a temperatura corporal de ratos.

Visando padronizar o modelo de resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* (ATCC 25923), os animais foram injetados com diferentes doses de bactéria (10^3 a 2×10^{13} UFC/cavidade) onde a temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 h após a infecção. Assim, em todas as figuras apresentadas no presente trabalho os dados referem-se a um período de observação de 24h após a indução de infecção, sendo o primeiro período diurno (0 – 6 hs), seguido por um noturno (6 – 18) e outro diurno (18,5 – 24 hs).

Além da temperatura corporal, avaliou-se a sobrevida dos animais. É importante ressaltar que este parâmetro foi avaliado durante 72 hs após a indução da infecção, sendo que houve 100% de sobrevida dos animais injetados com as diferentes doses de bactéria em todo período observado.

A injeção i.p. de salina (2 mL) e a dose 10^6 UFC/cavidade de *S. aureus* (2 mL, i.p.) não alteraram significativamente a temperatura corporal dos ratos durante todo o período observado. O *S. aureus* quando administrado nas doses de $10^3, 10^9$ UFC/cavidade induziu, discreto, mas significativo aumento da temperatura corporal (Fig. 1.1a, b). Em vista disso, doses maiores foram avaliadas. Verificou-se que a injeção intraperitoneal de 10^{12} UFC/cavidade promoveu aumento significativo na temperatura corporal dos animais, evidenciado entre a 2,5 e 4,5 h, com pico na 3^a. h ($38,13 \pm 0,18$ °C; Fig. 1.2a). Da mesma forma, a injeção de 10^{13} e 2×10^{13} UFC/cavidade alterou significativamente a temperatura corporal dos ratos, evidenciado a partir da 2 h até a 7^a. h, com o primeiro pico de elevação

na 2,5^a. h, em que a temperatura corporal chegou a $38,50 \pm 0,13$ °C; $38,55 \pm 0,10$ °C, respectivamente, e o segundo pico na 5h ($38,55 \pm 0,12$ °C; $38,16 \pm 0,15$ °C, respectivamente) após a indução de infecção (Fig 1.2a). Observou-se também que no período de 18,5 – 24 horas, somente a dose de 10^{13} UFC/cavidade promoveu aumento significativo na temperatura corporal ($37,56 \pm 0,02$ °C), quando comparado ao grupo que recebeu salina (Fig. 1.2b). Nas primeiras horas após a indução da infecção, não houve diferença estatística entre o aumento de temperatura corporal induzido pelas doses de 10^{13} e 2×10^{13} UFC/cavidade, ao passo que houve diferença estatística entre as doses de 10^{12} e 10^{13} UFC/cavidade (2,5 – 5,5 h). Todavia, o aumento de temperatura corporal induzido pela dose de 10^{13} (UFC/cavidade) foi mais duradouro e apresentou menor variabilidade entre os animais do grupo, quando comparado à dose de 10^{12} UFC/cavidade. Assim, a dose selecionada para os experimentos subseqüentes foi 10^{13} UFC/cavidade.

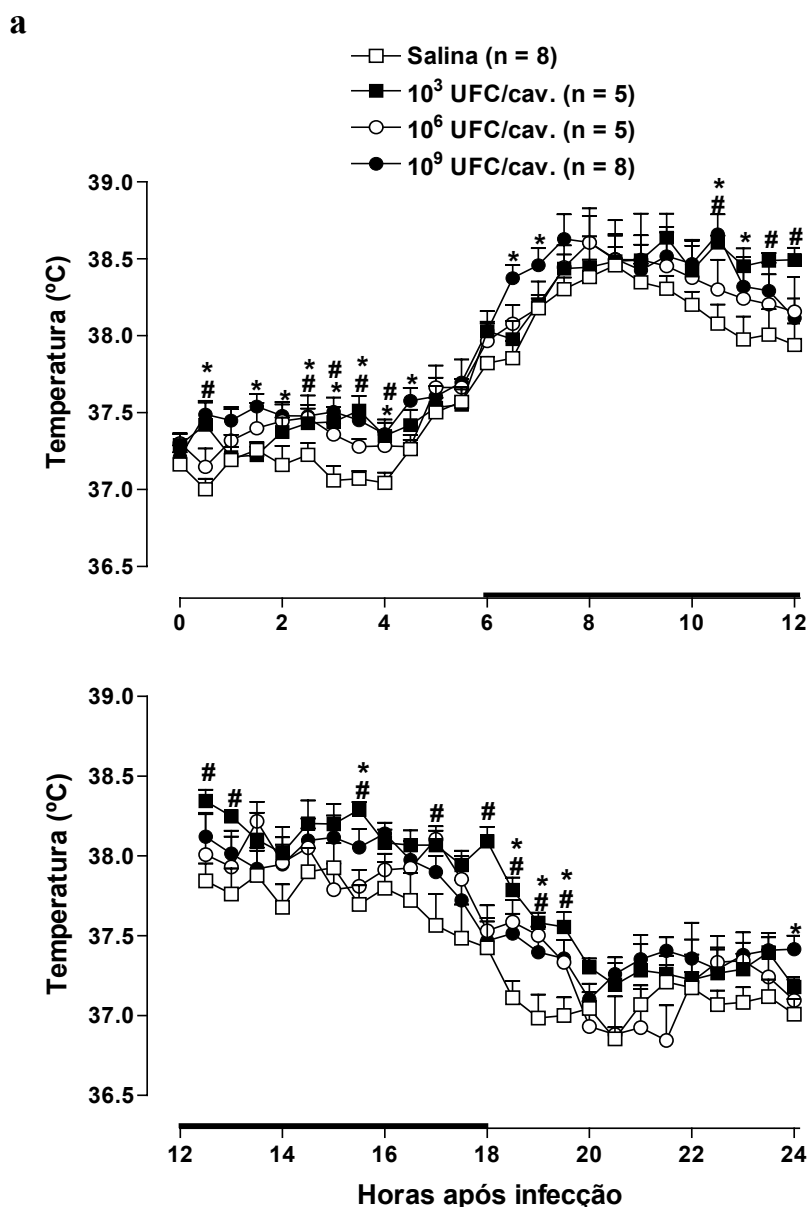


Figura 1.1 – Efeito da injeção intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de *S. aureus* sobre a temperatura corporal de ratos. *S. aureus* foi administrado i.p. (2 mL) nas doses de 10^3 , 10^6 e 10^9 UFC/cavidade. Os animais do grupo controle receberam salina estéril (2 mL). A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel a: 0 – 12 horas. Painel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 5 a 8 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,20 \pm 0,08$; ■, $37,30 \pm 0,07$; ○, $37,30 \pm 0,06$; ●, $37,20 \pm 0,06$. Painel a e b: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,9507$; $P = 0,8164$, respectivamente). # * $P < 0,05$, dose de 10^3 UFC/cav. e 10^9 UFC/cav., respectivamente quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido de teste tukey).

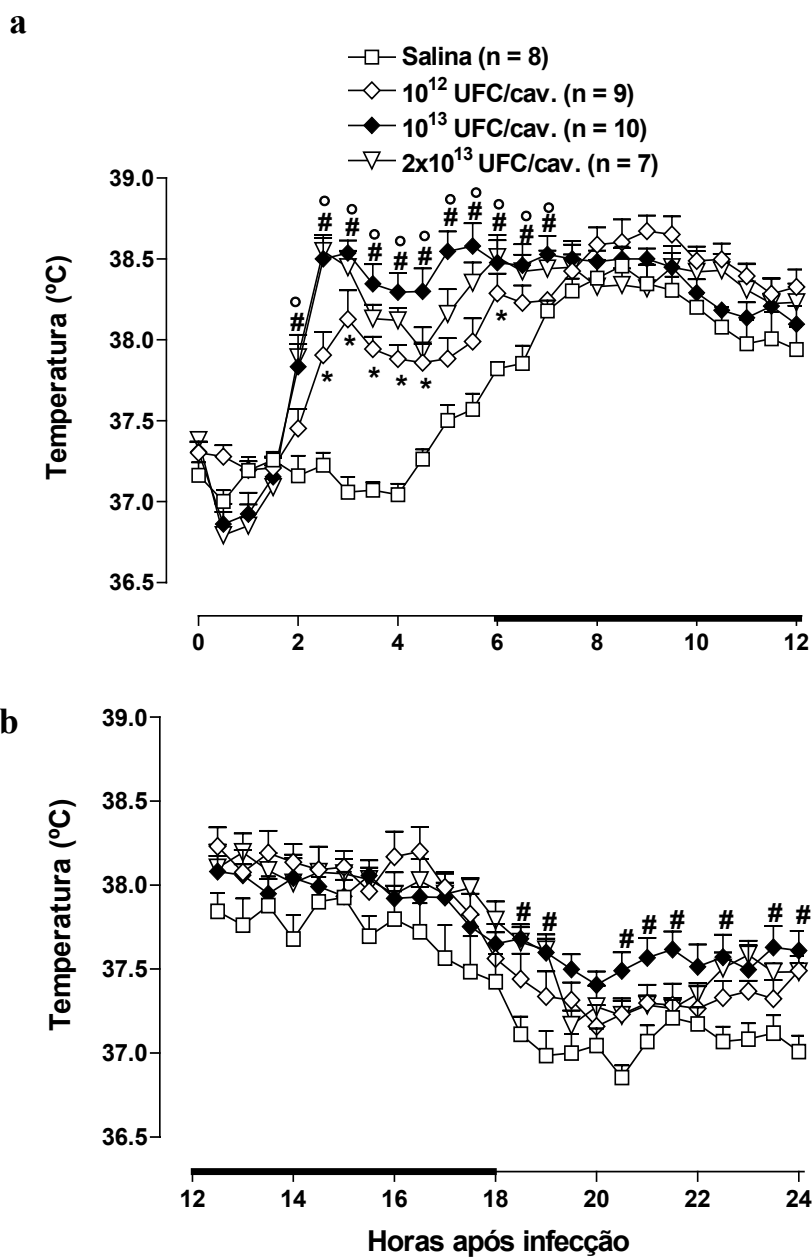


Figura 1.2 – Efeito da injeção intraperitoneal (i.p.) de diferentes doses de *S. aureus* sobre a temperatura corporal de ratos. *S. aureus* foi administrado i.p. (2 mL) nas doses de 10^{12} , 10^{13} e 2×10^{13} UFC/cavidade. Os animais do grupo controle receberam salina estéril (2 mL). A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Pannel a: 0 – 12 horas. Pannel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo *x* correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 7 a 10 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,2 \pm 0,08$; ◇, $37,30 \pm 0,07$; ●, $37,30 \pm 0,06$; ▽, $37,40 \pm 0,04$. Pannel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$). Pannel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,6049$). * # ° $P < 0,05$ dose de 10^{12} UFC/cav. e 10^{13} UFC/cav., 2×10^{13} UFC/cav, respectivamente quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.2 – Quantificação de bactérias no lavado peritoneal e sangue dos animais após a injeção i.p. de *S. aureus*.

Com o propósito de estabelecer relação entre o aumento de temperatura corporal e a quantidade de bactérias presentes no foco infeccioso e no sangue, nosso próximo passo foi quantificar o número de bactérias nestes fluídos 2, 6, 12 e 24 horas após a injeção i.p. de *S. aureus*.

A figura 2a mostra a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal nos diferentes tempos analisados. Verificamos que 2 horas após a indução da infecção a quantidade de bactérias presente no lavado é expressivamente alta, aproximadamente 10^{12} UFC/cavidade, contudo menor que a quantidade injetada (10^{13} UFC/cavidade). Na 6^a.h, ocorre aumento no número de bactérias que, embora não seja estatisticamente diferente, foi numericamente superior àquele verificado 2 h após a injeção i.p. de *S. aureus*. Observamos ainda que há redução na quantidade de bactérias presentes no lavado nas horas subseqüentes, sendo esta significativa na 24^a.h após a indução da infecção.

Ao avaliarmos a quantidade de bactérias que extravasaram para o sangue (bacteremia) (Fig. 2b), observamos que na 6^a h o número de bactérias foi maior, embora não seja estatisticamente diferente, quando comparado a 2^a e 12^a h. Não foi detectada presença de bactérias no sangue 24 h após a indução da infecção.

A figura 2c mostra a temperatura corporal dos animais antes da coleta do lavado peritoneal e do sangue. Observamos que na 2^a e 6^a h ocorre aumento significativo de temperatura, quando comparado ao grupo de animais que recebeu salina. Desta forma, quando relacionamos a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal e sangue (Fig 2a e 2b, respectivamente) com a temperatura corporal dos animais (Fig. 2c), podemos observar que o aumento de temperatura observado acompanha a presença de bactérias

viáveis no foco infeccioso e no sangue. O que nos mostra que no período de 24 hs após a injeção i.p. de *S. aureus* há eficiente controle da infecção e restabelecimento da temperatura corporal dos animais aos valores basais.

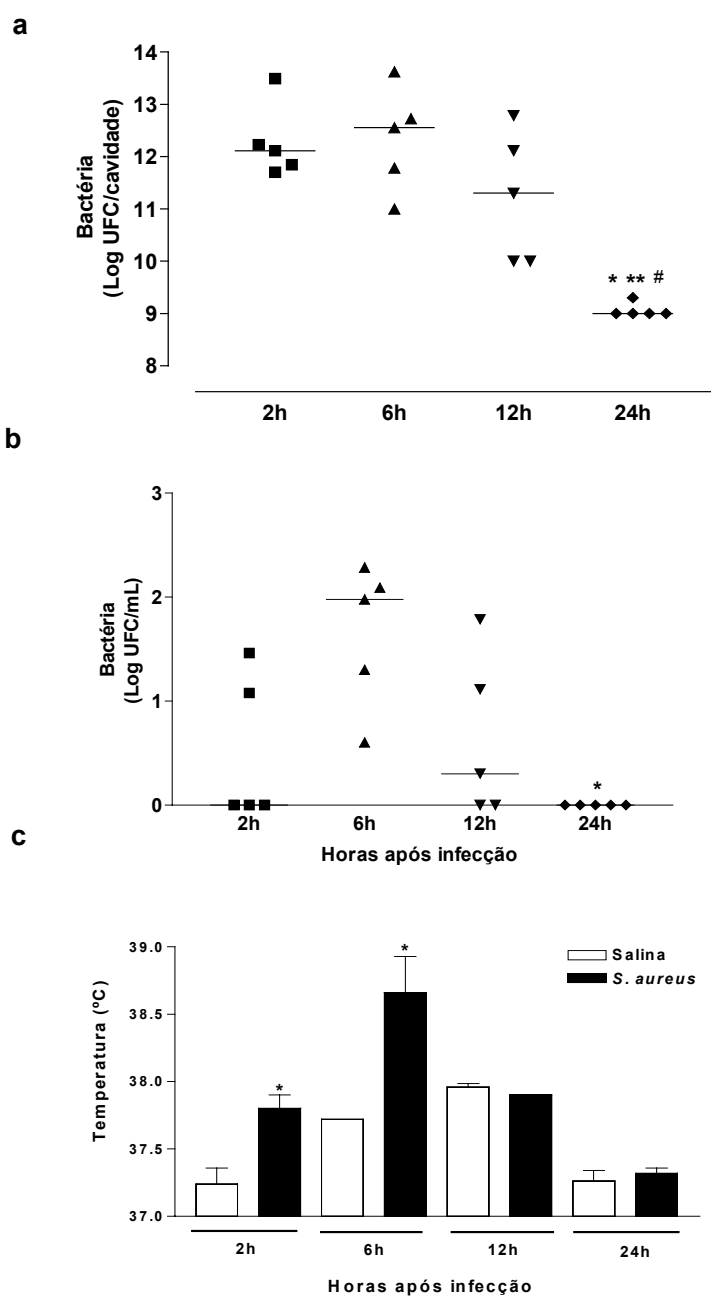


Figura 2 – Quantificação de bactérias no lavado peritoneal e sangue dos animais após a injeção i.p. de *S. aureus*. Número de bactérias no lavado peritoneal (painel a) e sangue (painel b) quantificados 2, 6, 12 e 24 h após a injeção i.p. de *S. aureus*. Painel a e b, os resultados são expressos como Log de UFC/cavidade e Log de UFC/mL, respectivamente. Painel a: * $P < 0,05$ comparado com o grupo 2h; ** $P < 0,05$ comparado com o grupo 6h; # $P < 0,05$ comparado com o grupo 12h (Mann-Whitney U). Painel b: * $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h (Mann-Whitney U). No painel c está representada a temperatura dos animais antes da coleta do lavado peritoneal e do sangue. Os valores representam a média \pm e.p.m. da temperatura corporal de 5 animais por grupo. A temperatura corporal foi medida por meio de radiotelemetria. As temperaturas basais foram: Salina, $37,33 \pm 0,056$; *S. aureus*: 2h, $37,06 \pm 0,045$; 6h, $37,13 \pm 0,041$; 12h, $37,35 \pm 0,028$; 24h, $37,17 \pm 0,098$. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido de teste de Tukey).

4.3 - Efeito do pré-tratamento com celecoxibe (Celec) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos.

Uma vez padronizado o modelo de resposta febril induzida pelo *S. aureus*, investigou-se o efeito do celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, sobre esta resposta. O celecoxibe foi administrado por via oral nas doses de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/Kg, 30 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL).

Como podemos observar na Fig. 3a, o *S. aureus* promoveu aumento da temperatura corporal, significativo entre a 2^a e 8,5^a horas após a indução da infecção. O pré-tratamento com celecoxibe na dose de 1,0 mg/kg promoveu redução significativa da temperatura corporal dos animais, evidenciada entre a 2^a – 10^a h, enquanto as doses de 2,5 e 5,0 mg/kg aboliram a resposta febril induzida pelo *S. aureus*, entre a 2^a – 12^a horas. Adicionalmente, verificou-se que no período compreendido entre 12 - 24 horas estas mesmas doses de celecoxibe reduziram significativamente o aumento da temperatura corporal, evidenciado em alguns pontos, induzido pelo *S. aureus* (Fig. 3b).

Não houve diferença estatística entre as doses de 2,5 e 5,0 mg/kg. A maior dose de celecoxibe testada (5,0 mg/kg) não alterou a temperatura dos animais controle que receberam salina 30 minutos após a sua administração (Fig. 3a e 3b).

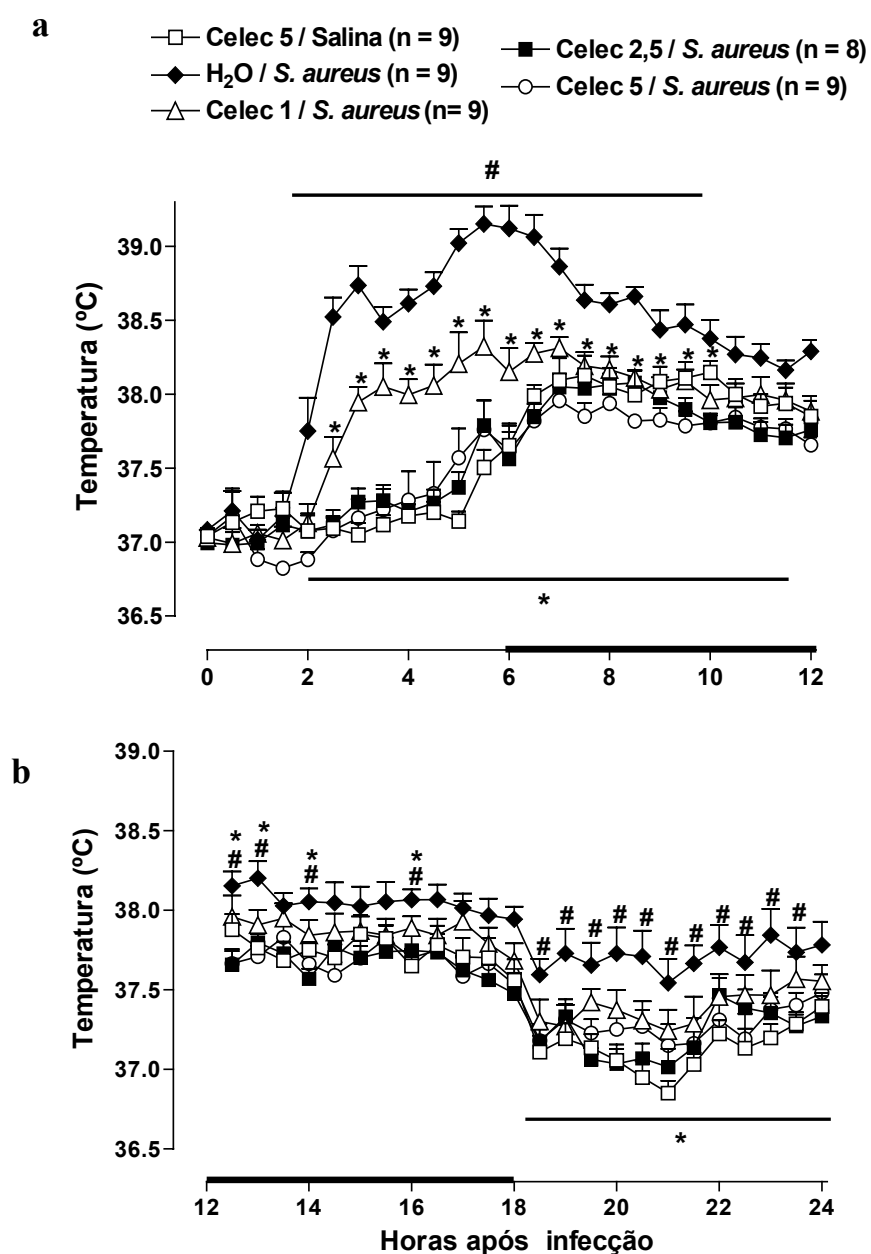


Figura 3 – Efeito do pré-tratamento com celecoxibe (Celec) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. O Celecoxibe (1,0; 2,5 e 5,0 mg/Kg, v.o.) foi administrado 30 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam celecoxibe (5 mg/Kg, v.o.) e salina estéril (2 mL, i.p.) A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel a: 0 – 12 horas. Painel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 8 a 9 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,0 \pm 0,04$; ◆, $37,10 \pm 0,04$; △, $37,0 \pm 0,05$; ■, $37,0 \pm 0,07$; ○, $37,0 \pm 0,05$. Painel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$),e Painel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 1,0000$). Painel a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Cele 5 / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo H₂O / *S. aureus*. (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.4 - Efeito do celecoxibe (Celec) sobre o aumento da temperatura retal, redução da temperatura da pele da cauda e índice de perda de calor (IPC) induzida pela administração de *S. aureus* em ratos.

Posteriormente, investigamos se o aumento de temperatura corporal induzido pela injeção i.p. de *S. aureus* estaria associado às respostas termorregulatórias efetoras apropriadas, as quais são indicativas de elevação do ponto de regulação hipotalâmico, entre elas, a vasoconstrição periférica. Além disso, avaliou-se o efeito do celecoxibe, em dose que reduz significativamente o aumento de temperatura promovido pelo *S. aureus*, sobre essa resposta.

Inicialmente foi determinado se, em dose que promove aumento de temperatura retal, o *S. aureus* induziria redução da temperatura da pele como reflexo da vasoconstrição cutânea, resposta termo-efetora para retenção de calor, característica da resposta febril. Desta forma, constatou-se que a injeção i.p. de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2 mL) além de promover aumento na temperatura retal (1,5 – 6 h) (Fig. 4a), reduziu a temperatura da pele da cauda dos animais (Fig. 4b) sendo esta significativa entre 1,5 e 6 h. Por sua vez, a administração de celecoxibe na dose 2,5 mg/kg, promoveu redução da temperatura retal induzida pelo *S. aureus* e além disso, reverteu significativamente a redução da temperatura da cauda induzida por esta bactéria, entre a 1,5 e 5 h. Os ratos que receberam celecoxibe (2,5 m/kg) / salina, não apresentaram alteração da temperatura retal ou da pele da cauda (Fig. 4a e b).

O índice de perda de calor (IPC) tem sido utilizado como parâmetro na avaliação de respostas termoeletoras (vasoconstrição e vasodilatação) da vasculatura da pele da cauda. Para o cálculo do IPC levamos em consideração a temperatura retal dos animais e a

temperatura ambiente. Segundo Romanovsky et al. (2002), os limites teóricos para o IPC são: 0, que corresponde a vasoconstrição máxima, e 1 a vasodilatação máxima da temperatura da pele da cauda dos animais. Na figura 4c podemos observar que houve redução significativa do IPC (vasoconstrição) entre a 2^a e 6^a h após a infecção com *S. aureus*. O cálculo do IPC na 2,5^a h, tempo em que se verificou redução máxima da temperatura da pele da cauda, foi de $0,39 \pm 0,009$, indicando marcante vasoconstrição periférica induzida pela injeção de *S. aureus*. O pré-tratamento com celecoxibe (2,5 mg/kg) reverteu esse efeito, evidenciado na 2^a - 4,5^a h. Em conjunto, esses resultados evidenciam o envolvimento de mecanismos termoregulatórios na resposta febril induzida pelo *S. aureus*.

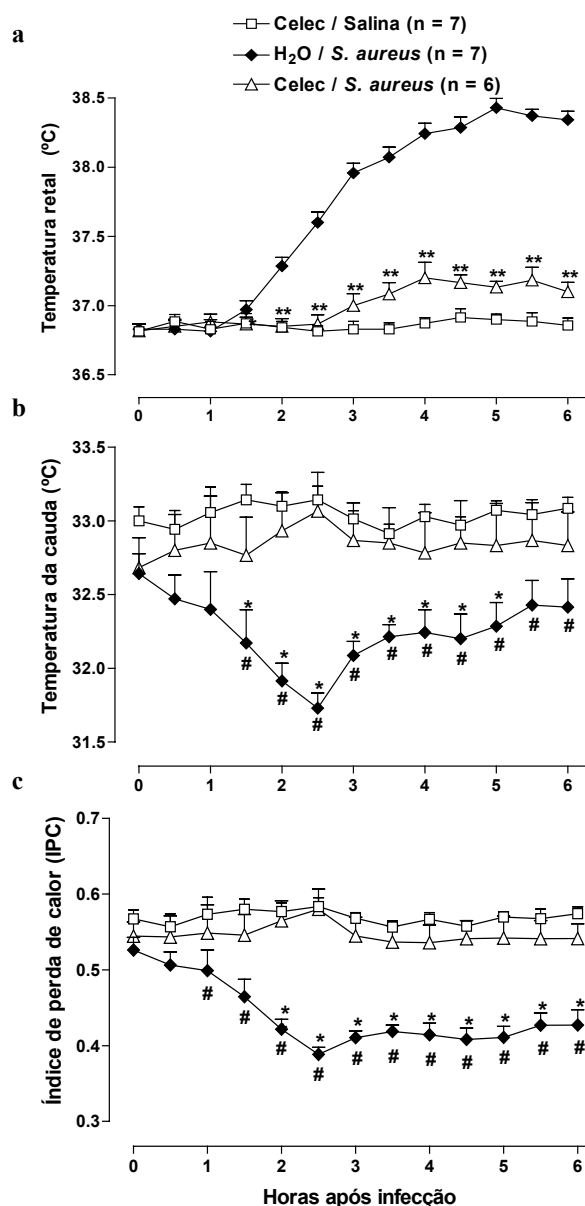


Figura 4 – Efeito do celecoxibe (Celec) sobre o aumento da temperatura retal, redução da temperatura da pele da cauda e índice de perda de calor (IPC) induzida pela administração de *S. aureus* em ratos. O celecoxibe (2,5 mg/Kg, v.o) foi administrado 30 minutos antes da injeção de *S.aureus* (10^{13} UFC/cavidade, i.p), sendo que este efeito foi analisado sobre a temperatura retal (painel a) e da pele da cauda (painel b) e o índice de perda de calor (painel c). Os valores representam a média \pm e.p.m. da temperatura retal e da pele da cauda, de 6 a 7 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) foram: painel a, □, $36,80 \pm 0,05$; ◆, $36,80 \pm 0,04$; △, $36,80 \pm 0,03$; painel b, □, $33,0 \pm 0,09$; ◆, $32,80 \pm 0,10$; △, $32,80 \pm 0,20$. Os animais do grupo controle receberam celecoxibe (2,5 mg/Kg, v.o) e salina estéril. A temperatura retal foi monitorada por meio de teletermômetro. Painel a e c: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,001$) e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$, painel a; $P = 0,0009$, painel c). Painel b: não se observou diferença significativa no efeito tempo ($P = 0,4234$).Painel a: ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo H₂O / *S. aureus*. Painel b e c: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Cele 5 / Salina, * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Celec / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.5 - Efeito do pré-tratamento com paracetamol e dipirona na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos.

Em seguida, investigamos o efeito do paracetamol e da dipirona sobre a resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*. Estes agentes, cujo mecanismo de ação antipirética ainda não se encontra totalmente elucidado se distinguem das drogas antipiréticas não-esteroidais por não apresentarem atividade antiinflamatória. O paracetamol foi administrado por via oral na dose de 150 mg/kg, e a dipirona por via intraperitoneal na dose de 120 mg/kg. Ambos foram administrados 30 minutos antes da injeção de *S. aureus*. As doses de paracetamol e dipirona foram escolhidas de acordo com experimentos de nosso laboratório que demonstraram que estas drogas, administradas nas doses acima citadas, além de reduzirem a febre do LPS, não induziram hipotermia nos animais controles (SANTOS et al., 1999; SOUZA et al., 2002).

Porém, no presente estudo o paracetamol e a dipirona alteraram a temperatura corporal dos animais controle nas primeiras duas horas após o tratamento (Fig. 5a e 6a).

Verificou-se que a injeção i.p. de *S. aureus* promoveu aumento na temperatura corporal dos animais, evidenciado entre 2 e 8 hs após a indução da infecção (Fig. 5a e 6a).

Ambos paracetamol e dipirona promoveram redução significativa da febre induzida pelo *S. aureus*, entre 1,5 - 7 hs e 1,5 - 5 hs, respectivamente. (Fig. 5a e 6a). Observa-se ainda que no período compreendido entre 18 e 24 hs, o aumento de temperatura induzido pelo *S. aureus* não foi alterado pelo tratamento com essas drogas (Fig. 5b e 6b).

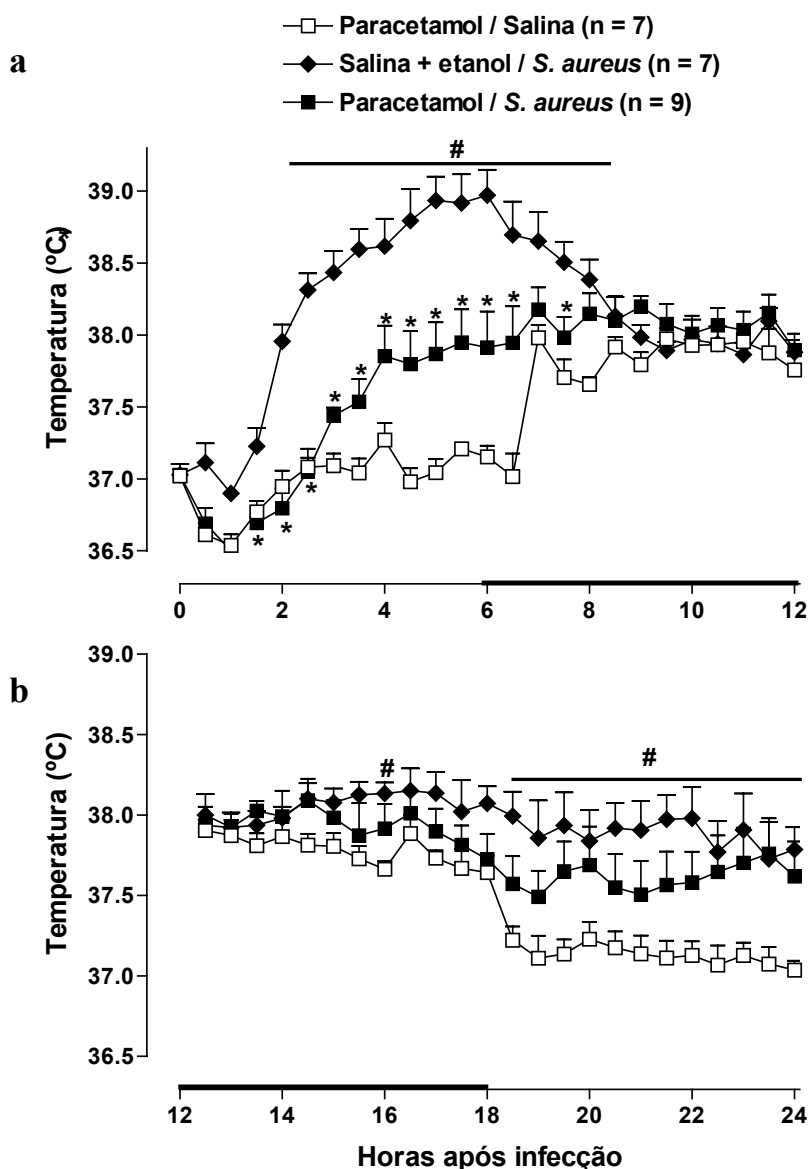


Figura 5 – Efeito do pré-tratamento com paracetamol na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. O paracetamol (150 mg/Kg, v.o.) foi administrado 30 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam paracetamol (150 mg/Kg, v.o.) e salina estéril (2 mL, i.p.). A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel a: 0 – 12 horas. Painel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 7 a 9 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,0 \pm 0,05$; ◆, $37,0 \pm 0,07$; ■, $37,0 \pm 0,03$. Painel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$), e Painel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,6623$). Painel a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Paracetamol / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina + etanol / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

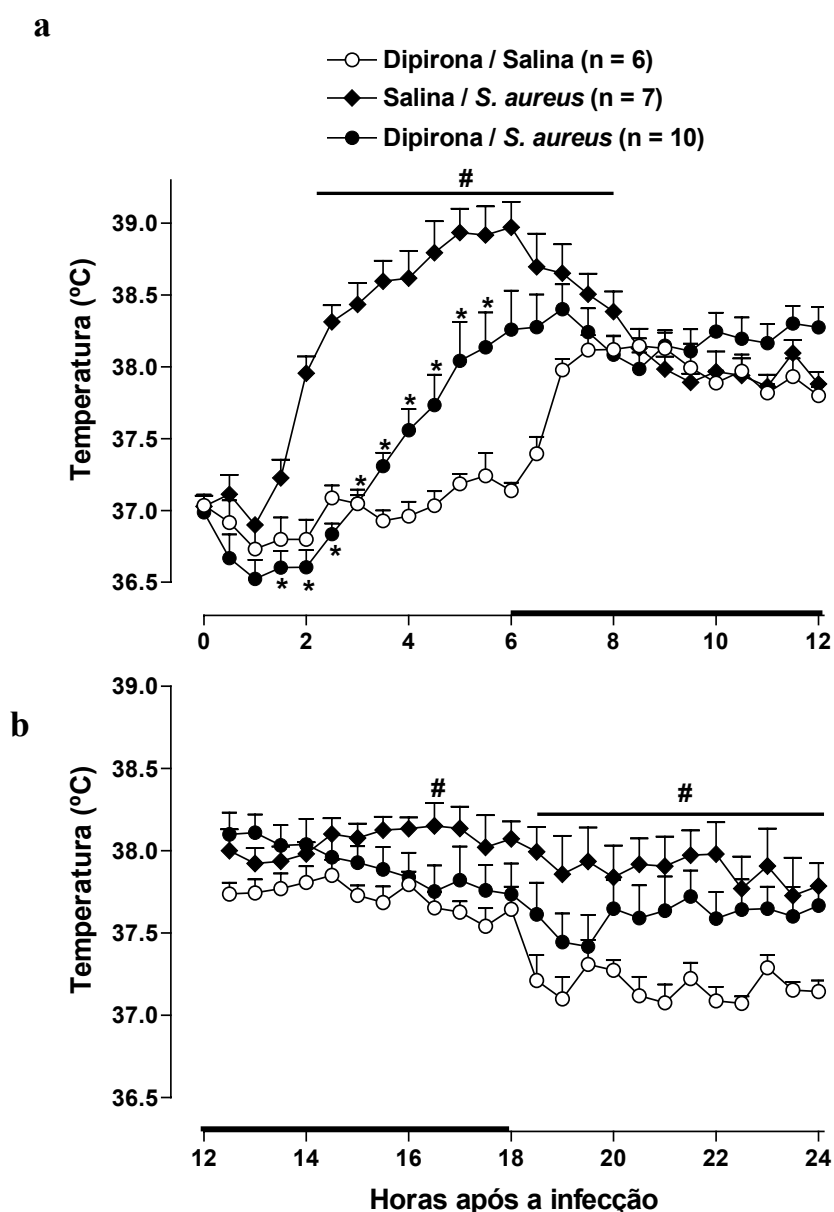


Figura 6 – Efeito do pré-tratamento com dipirone na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. A dipirone (120 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam dipirone (120 mg/Kg, i.p.) e salina estéril (2 mL, i.p.) A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painei a: 0 – 12 horas. Painei b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 6 a 10 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,0 \pm 0,06$; ◆, $37,0 \pm 0,07$; ●, $37,0 \pm 0,02$. Painei a: * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus*. Painei a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$), e Painei b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,8789$). Painei a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Dipirona / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.6 - Efeito do pré-tratamento com dexametasona (Dexa) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos.

Um dos efeitos decorrentes do tratamento com glicocorticóides é a inibição da síntese de alguns mediadores pró-inflamatórios de origem protéica. Desta forma, caso houvesse necessidade de neo-síntese protéica para a efetuação do aumento de temperatura induzido pela injeção i.p. de *S. aureus*, esta resposta seria inibida pela dexametasona.

A dexametasona foi administrada por via subcutânea na dose de 0,5 mg/kg, 1,0 hora antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). A dose de dexametasona e o esquema de tratamento foram escolhidos baseados em resultados prévios de nosso laboratório, onde esta droga reduziu significativamente a febre induzida pelo LPS (COELHO et al., 1992; ZAMPRONIO et al., 1994; 2000).

Observou-se que a injeção de *S. aureus* induziu aumento da temperatura corporal dos animais evidenciada entre a 2^a e 6^a h e que o pré-tratamento com dexametasona promoveu significativa redução dessa resposta (2 – 7 h; Fig. 7a). Efeito este que também foi observado entre 18,5 e 23 horas após a indução da infecção (Fig. 7b).

Os animais do grupo controle receberam dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) e salina estéril (2 mL, i.p.). Não se observou alteração na temperatura corporal dos animais após este tratamento (Fig. 7a).

Os resultados obtidos indicam que a febre induzida pelo *S. aureus* depende da neo-síntese de mediadores pirogênicos.

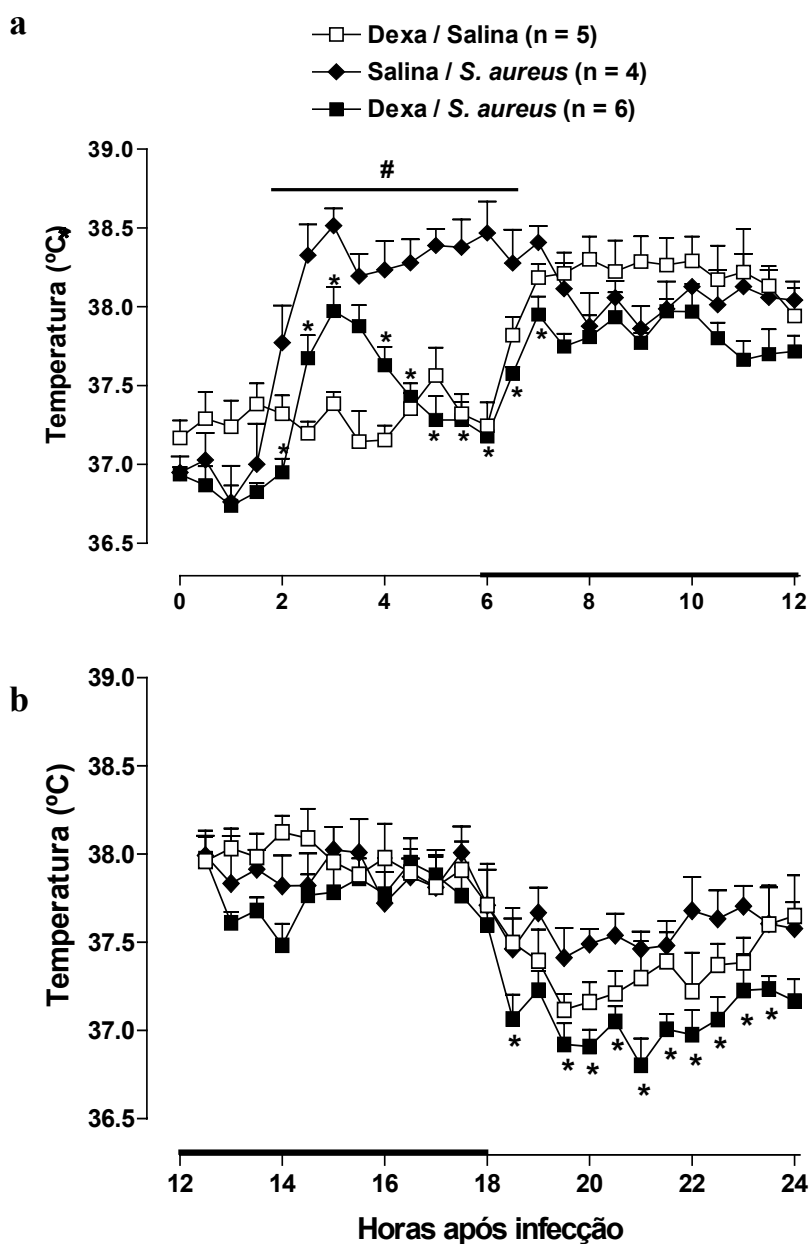


Figura 7 – Efeito do pré-tratamento com dexametasona (Dexa) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. A dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c) foi administrada 1 hora antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam dexametasona e salina estéril A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel a: 0 – 12 horas. Painel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 5 a 6 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,20 \pm 0,10$; ◆, $37,0 \pm 0,10$; ■, $36,90 \pm 0,05$. Painel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$),e Painel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,7207$). Painel a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Dexa / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.7 - Efeito do pré-tratamento com BQ - 123 e BQ - 788 (antagonista de receptores ET_A e ET_B para endotelina, respectivamente) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos.

Objetivando investigar a participação das endotelinas sobre a resposta febril induzida pelo *S. aureus* os animais foram pré-tratados com BQ-123, antagonista seletivo de receptor ET_A ou com BQ-788, antagonista seletivo de receptor ET_B para endotelinas ambos na dose de 3 pmol/rato, i.c.v, 15 minutos antes da infecção. A seleção desta dose e esquema de tratamento foi baseada em estudos anteriores de nosso laboratório (Fabrício et al., 1998, 2005).

A injeção i.p de *S. aureus* promoveu aumento significativo da temperatura corporal, entre a 2^a e 7^a hs (Fig. 8a e 9a). Verificou-se que o pré-tratamento com ambos antagonistas reduziu significativamente esse aumento (2 - 7 h, Fig. 7a; 2,5 - 6,5 h, Fig 8a, respectivamente). Adicionalmente, no período entre 18 e 24 horas após a indução da infecção, o aumento de temperatura induzido pelo *S. aureus*, visualizado somente em alguns pontos, não foi modificado pelos antagonistas (Fig. 8b e 9b).

O pré-tratamento com BQ-123 e BQ-788, não alterou significativamente a temperatura basal dos animais controles durante todo o período observado (Fig. 8a,b e Fig. 9a,b respectivamente).

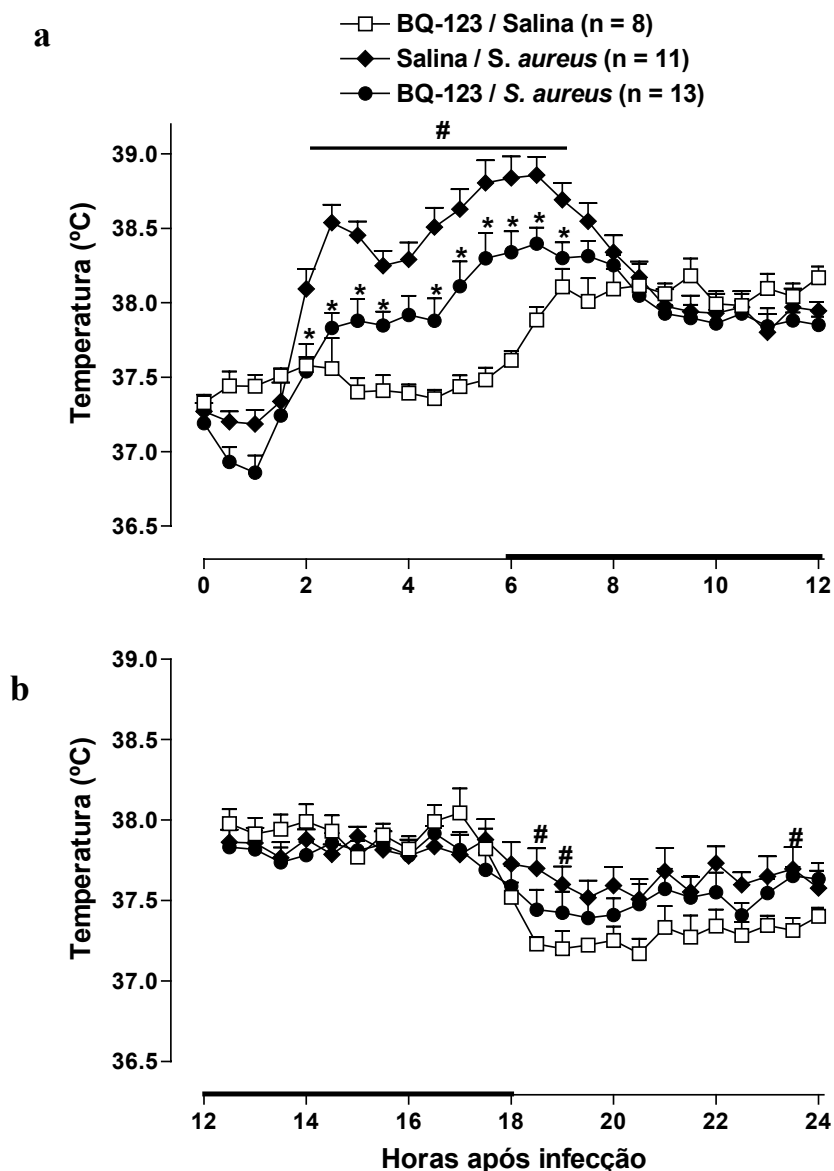


Figura 8 – Efeito do pré-tratamento com BQ-123 (antagonista de receptores ET_A para endotelina) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. O BQ-123 (3 pmol, 3 μ L, i.c.v.) foi administrado 15 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam BQ-123 (3 μ L, i.c.v.) e salina estéril (2 mL, i.p.). A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel a: 0 – 12 horas. Painel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 8 a 13 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,30 \pm 0,05$; ◆, $37,30 \pm 0,05$; ●, $37,20 \pm 0,08$. Painel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$), e Painel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,0816$). Painel a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo BQ - 123 / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

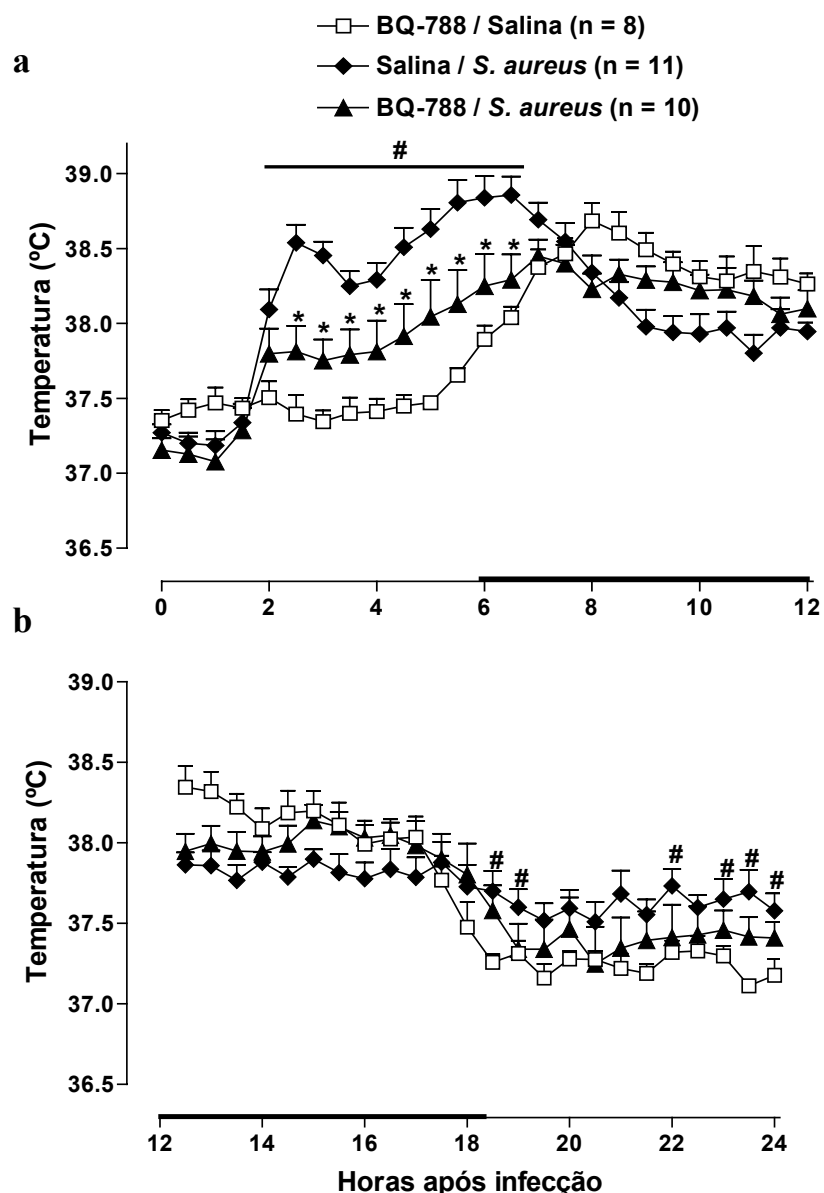


Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com BQ-788 (antagonista de receptores ET_B para endotelina) na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* em ratos. O BQ-788 (3 pmol, 3 μ L, i.c.v.) foi administrado 15 minutos antes da injeção de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL). Os animais do grupo controle receberam BQ-788 (3 μ L, i.c.v.) e salina estéril (2 mL, i.p) A temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Pannel a: 0 – 12 horas. Pannel b: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média \pm e.p.m da temperatura corporal de 8 a 11 animais por grupo. As temperaturas basais (média \pm e.p.m; °C) de cada grupo foram: □, $37,40 \pm 0,05$; ◆, $37,30 \pm 0,08$; ▲, $37,20 \pm 0,08$. Pannel a: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$),e Pannel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e interação tempo - tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação no efeito tratamento ($P = 0,2302$). Pannel a e b: # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo BQ - 788 / Salina e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

4.8 - Efeito do pré-tratamento com antagonista de receptores de IL-1 (IL-1 ra) na resposta febril induzida pela injeção de IL-1 β ou *S. aureus* em ratos.

Posteriormente, investigou-se o efeito do antagonista de receptores de IL-1, IL-1 ra, na resposta febril induzida pelo *S. aureus*. O pré-tratamento com IL-1ra na dose de 9,1 pmol, (i.c.v., 15 minutos antes), dose esta que reduziu significativamente a febre induzida pela injeção i.c.v. de IL-1 β (180 fmol, i.c.v; Fig. 10a), não alterou a resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* (Fig. 10b).

Da mesma forma, no período compreendido entre 17 e 24 hs após a indução da infecção, observou-se que o aumento na temperatura dos animais promovido pelo *S. aureus*, como visualizado no painel c, não foi alterado pelo IL-1 ra.

O IL-1ra não promoveu alteração significativa da temperatura basal dos animais controles (Fig. 10a, b e c).

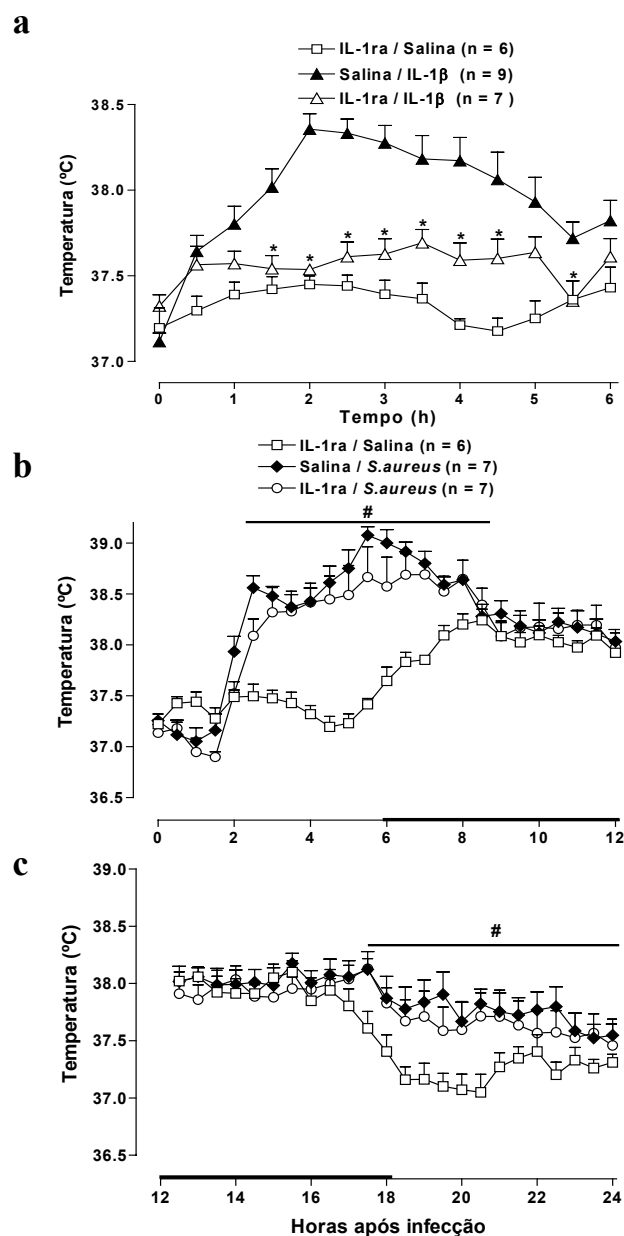


Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra) na resposta febril induzida pela injeção de IL-1β ou *S. aureus* em ratos. O IL-1ra (9,1 pmol, 3 μL, i.c.v.) foi administrado 15 minutos antes da injeção de IL-1β (180 fmol, 3 μL, i.c.v., painel a), *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade, 2mL, painel b) ou salina estéril (3 μL, painel a, b). Os animais do grupo controle receberam IL-1 ra (3 μL, i.c.v.) e salina estéril (2 mL, i.p). Painel b e c, a temperatura corporal dos animais foi monitorada durante um período de 24 horas após a infecção. Painel b: 0 – 12 horas. Painel c: 12 – 24 horas. As barras sólidas sobre o eixo x correspondem ao período noturno. Os valores representam a média ± e.p.m da temperatura corporal de 6 a 9 animais por grupo. As temperaturas basais (média ± e.p.m; °C) foram: painel a, □, $37,20 \pm 0,10$; ▲, $37,10 \pm 0,05$; painel b, □, $37,20 \pm 0,10$; ◆, $36,80 \pm 0,04$; ○, $37,10 \pm 0,08$. Painel a e b: pela análise de variância two-way ANOVA, foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento e interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$), e Painel b: foram observadas diferenças significativas no tempo e tratamento ($P < 0,0001$), enquanto não se observou significativa interação tempo-tratamento ($P = 0,3502$). Painel a: * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / IL-1β. Painel b e c: # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina / *S. aureus* (One-way ANOVA seguido de teste Tukey).

5 DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que a incidência de infecções causadas por bactérias Gram-positivas aumentou consideravelmente na última década (BONE, 1994). Dentre as bactérias Gram-positivas destaca-se o *Staphylococcus aureus*, um dos patógenos mais importantes envolvidos em infecções nosocomiais e sepse em humanos. É considerado também como o maior contribuinte para doenças como a osteomielite, endocardite invasiva e artrite séptica (BANNAN et al., 1999).

Até o presente momento, estudos demonstraram que a parede celular de *S. aureus* induz febre em ratos (LUKER et al., 2000; CARTMELL et al., 2004) e cabras (MPHAHLELE et al., 2004), e que toxinas produzidas pelo *S. aureus*, como por exemplo, as enterotoxinas SEA e SEB (staphylococcal enterotoxins A e B) são capazes de induzir febre em gatos (CLARK & PAGE, 1968) e coelhos (GREISMAN et al., 1966; HUANG et al., 1997, 2001).

Entretanto, uma das grandes críticas a estes modelos, que empregam partes das bactérias é de que estes não mimetizam o curso de uma situação real de infecção, sendo de pouca relevância fisiológica, pois durante uma infecção além de existir um foco inflamatório, as bactérias liberam seus produtos gradativamente e em quantidades menores do que aquelas utilizadas nos estudos de resposta febril (CAMPISI et al., 2003). Não há dados na literatura de estudos com a bactéria viva, *S. aureus*, no modelo de febre. Desta forma para tentar avaliar como se desenvolve a febre em uma situação de infecção mais próxima do real, avaliou-se a temperatura corporal dos ratos após a injeção intraperitoneal (i.p.) de *S. aureus*.

No presente estudo foi padronizado o modelo de resposta febril induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de *S. aureus* (ATCC 25923) em ratos e posteriormente,

avaliado o efeito de drogas que apresentam atividade antipirética sobre a resposta febril induzida por esta bactéria. Verificou-se que a injeção intraperitoneal de *S. aureus* induz aumento, duradouro e dose-dependente da temperatura corporal em ratos (Fig. 1.1; 1.2). Além disso, observou-se que nos animais injetados com a dose de 10^{13} UFC/cavidade a temperatura corporal permaneceu elevada, em relação ao grupo controle, no período compreendido entre 12 e 24 horas após a indução da infecção (Fig. 1.2b).

Visando relacionar o aumento de temperatura corporal e a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal e sangue, foi quantificado o número de bactérias nestes fluídos. Para isso, o lavado peritoneal e sangue foram coletados na 2; 6; 12 e 24 horas após a injeção i.p. de *S. aureus* (10^{13} UFC/cavidade). É importante ressaltar que a determinação dos tempos de coleta foi baseada no aumento de temperatura corporal induzido pelo *S. aureus*. De acordo com os dados obtidos no experimento anterior (Fig. 1.2a e b) na 2ª h após a indução da infecção, ocorreu aumento significativo na temperatura corporal; a temperatura permaneceu elevada até a 6ª h sendo que este horário corresponde ao início do período noturno - no período noturno, 12ª h e na 24ª h, na qual a temperatura corporal dos animais é relativamente menor quando comparado às primeiras horas após a indução da infecção.

Pode-se observar que quando relacionamos a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal e sangue (Fig 2a e 2b, respectivamente) com a temperatura corporal dos animais (Fig. 2c), o aumento de temperatura observado acompanha a presença de bactérias viáveis no foco infeccioso e no sangue, mostrando que no período de 24 hs após a injeção i.p. de *S. aureus* há eficiente controle da infecção e restabelecimento da temperatura corporal dos animais aos valores basais. A ausência de bactérias no sangue visualizada na

24^a hora após a indução da infecção, pode explicar o fato de que houve 100% de sobrevivência dos animais injetados com *S. aureus* durante todo o período em que a sobrevivência dos animais foi analisada, 72 hs. Vale ressaltar que na 12^a h após a injeção i.p. de *S. aureus*, horário este que corresponde ao período noturno, apesar de os animais apresentarem bactérias no foco infeccioso e no sangue (bacteremia), a temperatura corporal não foi estatisticamente diferente dos animais controles (Fig. 2a, b, c).

É bem estabelecido que animais de hábito noturno, como hamster, camundongo e rato, exibem variação circadiana na temperatura corporal caracterizado pela elevação na temperatura durante o período noturno (BRIESE, 1986, REFFINETTI & MENAKER, 1992, GORDON, 1993). Isto se correlaciona com aumento na função autonômica, resultando em alteração nas respostas fisiológicas e comportamentais destes animais no período da noite. Assim, a elevação da temperatura corporal dos animais no período noturno tem sido atribuída ao aumento da atividade motora (GORDON, 1993) e ativação de mecanismos autonômicos efetores de ganho e conservação de calor, incluindo reflexos vasomotores periféricos alterados e aumento na taxa metabólica (SHIDO et al., 1986).

Em virtude do aumento de temperatura corporal observado durante a noite tanto em animais controles quanto naqueles que receberam bactéria, torna-se difícil avaliar o efeito do *S. aureus* sobre a temperatura dos animais durante este período. Uma possível explicação para o fato de não haver diferença de temperatura entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam bactérias pode ser devido a uma equiparação do ponto de regulação hipotalâmico dos animais infectados com a temperatura que eles apresentam no período noturno. Desta forma, nos animais infectados, depois de alcançado o valor de temperatura determinado pelo ponto de regulação, haveria ativação de mecanismos termoregulatórios, como perda de calor por sudorese ou vasodilatação cutânea, que

contrabalançariam um possível aumento de temperatura superior ao novo ponto determinado pelo hipotálamo devido ao aumento de atividade motora observado no período noturno.

Tem sido demonstrado que o aumento na temperatura corporal durante o período noturno deve-se a mudança no ponto de regulação hipotalâmico. Suportando esta hipótese, Scales e Kluger (1987) observaram que a administração de antipiréticos como o salicilato de sódio e a indometacina não afetam a temperatura corporal de ratos durante o dia, porém atenuam o aumento de temperatura observado no período noturno. Como estes antipiréticos bloqueiam a síntese de PGs, mediadores importantes para o desenvolvimento da febre, estes autores propuseram que a elevação na temperatura corporal dos ratos durante o período noturno seja decorrente de elevação no ponto de regulação hipotalâmico.

Contudo, há estudos que contrariam esta hipótese. A elevação no ponto de regulação hipotalâmico deveria ser acompanhada de aumento na temperatura ambiente selecionada pelos ratos durante a noite, a fim de ativar mecanismos de ganho e retenção de calor. Porém estudos demonstram que no período noturno, ratos preferem temperaturas ambientes mais baixas (BRIESE, 1985, 1986; GORDON 1993, 1994), o que sugere que há envolvimento de termoregulação comportamental utilizado para controlar a temperatura corporal neste período (GORDON, 1993).

Várias são as respostas comportamentais desencadeadas durante o processo infeccioso, como redução da atividade locomotora, do apetite, da interação social, sonolência, entre outros, os quais são denominados coletivamente de *sickness behaviour*.

Luker e colaboradores (2000) demonstraram que a injeção i.p. de parede celular de *S. aureus* em ratos, além de induzir febre, reduz a atividade locomotora destes animais, o

que evidencia a participação de respostas de *sickness behaviour* em modelo experimental de febre induzida por bactéria Gram-positiva.

Desta forma, outro ponto a ser levantado para explicar o fato de não haver diferença de temperatura entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam bactérias é que, os animais injetados com *S. aureus* podem apresentar respostas de *sickness behaviour*, como por exemplo, diminuição da locomoção. Assim, durante o período noturno estes animais poderiam apresentar menor atividade locomotora, mantendo a sua temperatura nos patamares determinados pelo hipotálamo. Por sua vez, os animais que não receberam bactérias aumentam suas temperaturas, normalmente pelo aumento da atividade locomotora alcançando assim, valores semelhantes daqueles animais que receberam bactérias. Dessa forma, para solucionar esta questão, além da temperatura corporal, seria interessante avaliar a atividade dos animais no período noturno.

Posteriormente, demonstrou-se que o aumento de temperatura corporal verificado após a injeção i.p. de *S. aureus* é característico de resposta febril, e não de hipertermia, pois foi acompanhado de redução da temperatura da pele da cauda dos animais. A cauda dos ratos tem sido comumente utilizada para o estudo do controle do tônus vasomotor. Propriedades anatômicas e fisiológicas fazem com que a cauda seja crucial para a dissipação de calor, pois ela não tem pêlos, o que acentua a perda de calor; é altamente vascularizada, permitindo grande fluxo sanguíneo e apresenta alta razão superfície/volume, facilitando a troca de calor (GORDON, 1990). O aumento de temperatura corporal associado à redução da temperatura da pele da cauda indica que, após a administração de *S. aureus* são ativados mecanismos de ganho e conservação de calor, aqui verificado pela vasoconstrição periférica e representado pela redução do índice de perda de calor (IPC; Fig. 4c).

O índice de perda de calor (IPC) tem sido utilizado como parâmetro na avaliação de respostas termofetoras (vasoconstrição e vasodilatação) da vasculatura da pele da cauda. O valor do IPC pode variar de 0 a 1, que corresponde a vasoconstrição máxima e vasodilatação máxima, respectivamente (ROMANOVSKY, 2002).

No presente estudo, observou-se que o cálculo do IPC na 2,5^a h, tempo em que se verificou redução máxima da temperatura da pele da cauda foi de $0,39 \pm 0,009$, indicando marcante vasoconstrição periférica induzida pela injeção de *S. aureus* (Fig. 4c). A vasoconstrição periférica é uma resposta termoregulatória efetora acionada para diminuir a perda de calor e contribuir para o aumento da temperatura corporal. Desta forma, o aumento de temperatura verificado é característico de elevação do ponto de regulação hipotalâmico, que ocorre durante a resposta febril (revisado por BOULANT, 2000).

Dentre os mediadores centrais envolvidos na resposta febril, destaca-se a PGE₂. Sua estimulação tanto por pirogênios exógenos e/ou endógenos seria a responsável por elevar o ponto de regulação hipotalâmico, conseqüentemente desencadeando a febre (revisado por KLUGER, 1991; FRAIFELD & KAPLANSKI, 1998). Vários estudos apontam a enzima COX-2 como a principal isoforma de COX responsável pela síntese de prostaglandinas envolvidas nesta resposta (CAO et al., 1995, 1996; ELMQUIST et al., 1997; MATSMURA et al., 1998; INOUE et al., 2002). Baseado nesta evidência investigou-se o efeito do celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, sobre a febre induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*. Paralelamente, avaliou-se o efeito do celecoxibe (dose de 2,5 mg/kg que reduziu significativamente a temperatura corporal dos animais injetados com *S. aureus*) na redução da temperatura da pele da cauda dos animais induzida por esta bactéria.

Verificou-se que o celecoxibe promoveu redução significativa e de maneira dose-

dependente da resposta febril induzida pelo *S. aureus*, sendo que as doses de 2,5 e 5 mg/kg aboliram esta resposta em praticamente todo o período observado (24 hs) (Fig 3a e b). Ainda, o celecoxibe foi capaz de reverter a vasoconstrição periférica induzida pela bactéria demonstrando o papel das prostaglandinas sintetizadas via COX-2 na ativação dos mecanismos vasoconstritores, ou seja, ativação simpática/núcleo da rafe, uma vez que o fluxo sanguíneo da cauda dos ratos é regulada pela atividade dos nervos vasoconstritores simpáticos, especificamente controlados pelos neurônios do núcleo da rafe (BLESSING & NALIVAICO, 2001).

Lin e colaboradores (2001) demonstraram que o ácido lipoteicoico (LTA), componente da parede celular de *S. aureus*, induz a expressão de COX-2, promove aumento na atividade desta enzima, assim como liberação de PGE₂ em células epiteliais pulmonares de humanos (A549). Adicionalmente, Chen et al. (2004) verificaram que o peptidoglicano (PGN), outro componente da parede celular do *S. aureus*, induz a expressão de COX-2, dose e tempo-dependente, em macrófagos RAW-2647. Os resultados do presente estudo, aliados aos estudos acima descritos sugerem o possível envolvimento da COX-2 e da PGE₂ na febre induzida por esta bactéria.

Foi recentemente demonstrado que o celecoxibe possui um mecanismo de ação adicional para sua ação antiinflamatória. Observou-se que o celecoxibe impede a translocação do NF-κB para o núcleo, inibindo a transcrição de genes dependentes deste fator, incluindo COX-2 (SHISCHODIA et al., 2004a e b). Sabe-se que a ativação do NF-κB, um importante fator de transcrição nuclear, é um dos eventos que ocorre durante a ativação da célula de defesa em resposta a estímulo nocivo (MULLER et al., 1993; JANG et al., 2002), promovendo a síntese ou liberação de mediadores pirogênicos.

Desta forma, sugere-se que a antipirese promovida pelo celecoxibe neste modelo depende não somente da inibição da enzima COX-2, mas também por suprimir a ativação do fator de transcrição NF- κ B o que explica pelo menos em parte o potente efeito antipirético do celecoxibe na resposta febril induzida pelo *S. aureus*.

Investigou-se também o efeito da dipirona, um potente e muito utilizado antipirético. O pré-tratamento com a dipirona (120 mg/kg, via i.p.) alterou significativamente, entre a 1,5^a e 5^a h, a resposta febril induzida pelo *S. aureus* (Fig. 6a).

Com relação ao mecanismo de ação envolvido no efeito antipirético da dipirona, sugere-se que este não esteja relacionado à inibição da síntese de PGs, uma vez que este fármaco é praticamente desprovido de efeito antiinflamatório, apresenta baixa atividade antiedematogênica (LORENZETTI & FERREIRA, 1985) e é um fraco inibidor, reversível e competitivo, da ciclooxigenase (LÜTHY et al., 1983; ELDOR et al., 1984). Em estudo realizado por Souza e colaboradores (2002), verificou-se que a dipirona não inibe a atividade da COX-1 ou da COX-2 em células COS-7 tranfectadas com estas isoformas e reduz a resposta febril induzida pela injeção central de PGF_{2 α} .

Beirith et al. (1998) demonstraram que a dipirona bloqueia a hiperalgesia induzida pelo glutamato em camundongos. O envolvimento de vias glutamatérgicas na gênese da resposta febril, também foi demonstrado pelo fato de que a administração de glutamato no *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) induz um aumento na temperatura corporal em coelhos, que foi atenuado significativamente pelo tratamento com MK 801 e cetamina (bloqueadores do canal de receptor de NMDA) (HUANG et al., 2001). Além disso, resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que a administração central de glutamato promove aumento dose-dependente da temperatura corporal de ratos (dados não

publicados). Desta forma é possível que a dipirona possa reduzir a febre pelo bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica como ocorre na hiperalgesia.

Posteriormente avaliou-se o efeito do paracetamol, sobre a febre induzida pelo *S. aureus*. Verificou-se que o paracetamol administrado por via oral na dose de 150 mg/Kg reduziu significativamente, entre a 1,5^a e 7^a h, a febre induzida por esta bactéria (Fig. 5a).

Embora os dados existentes acerca do mecanismo de ação antipirético exercido pelo paracetamol sejam pouco conclusivos, há evidências de que esta droga exerça seus efeitos por inibir a síntese de PGs, possivelmente via COX-2.

Kis e colaboradores (2005) utilizando células endoteliais de cérebro de rato, demonstraram que o paracetamol inibe de maneira dose-dependente a produção de PGE₂ e que o NS398, um inibidor seletivo COX-2, apresenta efeito similar sobre a inibição da síntese de PGE₂. Estudos de nosso laboratório demonstraram que o paracetamol inibe a resposta febril induzida por citocinas pirogênicas, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, que sabidamente dependem da síntese de prostaglandinas para exercerem seus efeitos (dados não publicados).

Outro possível mecanismo antipirético desta droga recai também sobre a hipótese da inibição da via glutamatérgica, uma vez que estudos de nosso laboratório demonstraram que o paracetamol, administrado por via oral na dose de 150 mg/kg, reduz a febre induzida pela injeção central deste aminoácido (dados não publicados). Vale ressaltar que a mesma dose e esquema de tratamento foram utilizados para avaliar o efeito do paracetamol sobre a febre induzida pelo *S. aureus*.

Huang e cols. (2001) demonstraram que a administração de enterotoxina de *S. aureus* (SEA) aumenta a concentração de glutamato no OVLT bem como, a temperatura

colônica de coelhos. O pré-tratamento ou pós-tratamento com MK 801 ou cetamina (bloqueadores de canal do receptor NMDA) reduz significativamente a resposta febril induzida pela SEA. Adicionalmente, em 2004, estes mesmos autores demonstraram que o paracetamol reduz significativamente tanto a febre quanto os níveis de glutamato no OVLT induzidos pela injeção de SEA sugerindo, desta forma, que o paracetamol exerce seu efeito antipirético por inibir a liberação de glutamato no OVLT de coelhos após a administração de SEA.

Estes dados em conjunto, permite-nos sugerir que o paracetamol exerce seu efeito antipirético na febre induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*, por inibir a síntese de PGE₂, possivelmente via COX-2, e/ou por inibir a liberação de glutamato no SNC.

Demonstrou-se também, que a administração de dexametasona promoveu significativa redução da febre induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* (Fig 5a e b). Os glicocorticóides, incluindo a dexametasona, inibem os efeitos de fatores de transcrição como o AP-1 e NFκB, os quais regulam a expressão de genes que codificam citocinas, enzimas inflamatórias, como a COX-2, moléculas de adesão entre outros Além disso, foi demonstrado que os glicocorticóides podem afetar a síntese de proteínas por reduzirem a estabilidade do RNAm (revisado por BARNES, 2006). Um outro mecanismo de ação da dexametasona ocorre através da indução da síntese de lipocortina (anexina-1) a qual inibe a atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂), portanto, inibindo indiretamente a síntese de prostaglandinas por impedir a liberação do substrato das enzimas COX (FLOWER & ROTHWELL, 1994).

Wright e Friedland (2004) demonstraram que o *S. aureus* induz expressão, bem como liberação de quimiocinas, como a RANTES, MCP-1 e IP-10, em osteoblastos (MG-

63). Este efeito é reduzido pelo tratamento com dexametasona. Em 1997, Huang e colaboradores, demonstraram que a injeção i.v. de SEA em coelhos induz febre e aumento nos níveis circulantes de TNF, IFN e IL-2, porém não de IL-1 e IL-6. O tratamento com dexametasona atenuou ambos, febre e o aumento nos níveis circulantes de citocinas induzidos pela injeção i.v. de SEA em coelho. Em outro estudo, Won e colaboradores (2000) verificaram que ocorre aumento nos níveis de IL-1, TNF, IFN, IL-2 e IL-6 em sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com SEA e que a injeção deste sobrenadante em coelhos induz febre. Demonstraram também que ambos aumento nos níveis desta citocinas e a febre são atenuados pelo tratamento com anisomicina (inibidor de síntese protéica), dexametasona (antiinflamatório esteroidal) e aminoguanidina (inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida-NOSi). Nesse contexto, sugere-se que a resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* depende da neo-síntese de mediadores pirogênicos.

Em 2005, Fabrício e colaboradores demonstraram que a endotelina-1 (ET-1) é um importante mediador central na febre induzida pelo LPS, componente da parede celular de bactéria Gram-negativa. A fim de averiguar a participação das endotelinas no modelo de resposta febril induzida por bactéria Gram-positiva, avaliou-se o efeito de antagonistas de receptores para endotelinas. Observou-se que tanto o BQ-123, antagonista seletivo de receptor ET_A, quanto o BQ 788, antagonista seletivo de receptor ET_B para endotelinas, reduziu significativamente a febre induzida pelo *S. aureus*. A partir deste resultado pode-se inferir que há participação de endotelinas na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* e que este efeito é mediado tanto pelos receptores ET_A como ET_B.

Wahl e colaboradores (2005) em estudo *in vitro*, observaram que macrófagos da medula óssea de murinos quando estimulados com *S. aureus* são capazes de produzir endotelina-1 (ET-1).

No presente estudo, o resultado obtido com o BQ-123 foi surpreendente, uma vez que resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que a resposta febril induzida pela ET-1 é abolida pelo tratamento com BQ-788, porém não com o BQ-123. Este fato também é observado na resposta febril induzida pelo LPS, onde somente o BQ-788 reduziu esta resposta. Estes resultados sugerem que receptores ET_B, porém não ET_A, estão envolvidos na febre induzida pela ET-1 e LPS (Fabrício et al., 1998, 2005).

Shimada e colaboradores (1998) demonstraram que a ET-1 induz a expressão de COX-2 e liberação de PGE₂, em macrófagos residentes do peritônio de camundongos, via receptor ET_A e ET_B, uma vez que antagonistas destes receptores (BQ-123 e BQ-788, respectivamente) atenuaram este efeito. Adicionalmente, a combinação destes antagonistas promoveu efeito aditivo sobre a inibição da expressão da COX-2 e liberação de PGE₂.

Sabe-se que a injeção central de IL-1ra, antagonista de receptor para a IL-1, inibe a febre induzida pela injeção i.c.v. de ET-1, sugerindo que esta resposta é mediada pela IL-1 (Fabrício et al., 2006a). Posteriormente estes mesmos autores demonstraram, em estudo *in vitro*, que este peptídeo promove liberação de IL-1 β de explantes hipotalâmicos. Demonstraram ainda, que a injeção intrahipotalâmica de ET-1 foi prevenida pela coinjeção de IL-1ra (Fabrício et al., 2006b).

Imeri e colaboradores (1993) demonstraram que a administração central de IL-1ra reduziu a resposta febril, induzida pelo muramil-dipeptídeo (MDP), componente sintético da parede celular de bactérias Gram-positivas. Vários estudos *in vitro* demonstraram que *S.*

aureus induz a produção de IL-1 β em células microgлияis de camundongos (KIELIAN et al., 2004) e em monócitos humanos (WANG et al., 2000; RABEHI et al., 2001; MEGYERI et al., 2002; HESSLE et al., 2005). Além da bactéria intacta, tem sido demonstrado que o LTA, derivado da parede celular de *S. aureus*, assim como a SEB, enterotoxina produzida por esta bactéria, induzem a liberação de IL-1 β *in vitro*, em células do sangue humano (ELLINGSEN et al., 2002) e *in vivo*, em modelo de dermatite em humanos (SKOV et al., 2000), respectivamente.

Diante desses fatos, investigou-se a possível participação da IL-1 β na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*. Demonstrou-se que o pré-tratamento i.c.v. com IL-1ra a qual reduziu a febre induzida pela IL-1 β , não alterou a febre promovida pelo *S. aureus*. Estes resultados sugerem que a IL-1, produzida centralmente, não participa da febre induzida pelo *S. aureus*.

Entretanto, não se pode excluir o envolvimento da IL-1 produzida periféricamente. Demonstrou-se em ratos que a injeção intraperitoneal (i.p.) de IL-1 β induz resposta febril a qual é atenuada pela vagotomia subdiafragmática (secção dos ramos abdominais do nervo vago) (WATKINS et al., 1995b) o que sugere que o sinal pirogênico produzido por esta citocina seja transmitido da periferia até o SNC por estimular nervos sensoriais periféricos, neste caso, o nervo vago. Corroborando esta hipótese, observou-se que células do paraglânglio do nervo vago (*glomus cells*) expressam sítios de ligação para o antagonista de receptor de IL-1, IL-1ra (GOEHLER et al., 1997). Em 1998, estes mesmos autores verificaram um aumento na imunorreatividade para *Fos* (marcador de ativação neuronal) em neurônios aferentes primários do nervo vago de ratos após a injeção i.p. de IL-1 (GOEHLER et al., 1998).

Em 2001, Goehler e colaboradores demonstraram que a injeção i.p. de SEB em ratos promove aumento da temperatura corporal, bem como a expressão de *Fos* no núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV), núcleo este envolvido na febre (CALDEIRA et al., 1998). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2004), observaram aumento na expressão de *Fos* no NPV após a injeção i.p. de SEB em ratos, sugerindo a participação do nervo vago na transmissão de sinais induzidos por estímulos administrados por via intraperitoneal.

Assim, após a injeção i.p. de *S. aureus* pode-se sugerir que a bactéria; componentes da parede celular do *S. aureus*, ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano (PGN), os quais são liberados após sua lise; toxinas (enterotoxinas), como SEA e SEB, liberadas por esta bactéria durante seu crescimento; ou ainda um efeito sinérgico entre estes eventos; induzem a produção local de mediadores protéicos, como citocinas (por exemplo, a IL-1), os quais podem:

- 1) Ser transportados ativamente através da barreira hematoencefálica e desencadear a febre, uma vez que foi demonstrada a existência de transportadores específicos na barreira hematoencefálica;
- 2) Acessar o cérebro através de áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, áreas estas denominadas coletivamente de órgãos circumventriculares, como o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), órgão subfornical, área postrema, os quais permitem a entrada de citocinas da periferia para o encéfalo.
- 3) Estimular nervos sensoriais periféricos - fibras aferentes do nervo vago – sendo assim o sinal pirogênico transmitido da periferia ao SNC, e assim resultar na produção/liberação de mediadores centrais (por exemplo, CRF, glutamato, PGE₂, ET-1) e conseqüentemente febre;

- 4) Ativar receptores específicos localizados em células glias perivasculares ou endoteliais presentes nos órgãos circumventriculares, como o OVLT, estimulando a produção de mediadores pirogênicos (acima mencionados) diretamente no SNC desencadeando a febre.

Além do mais, não se descarta a hipótese de que a bactéria, ou mesmo seus produtos promova a liberação local de PGE_2 , que por sua vez, interage com seus receptores, no nervo vago (EK, et al., 1998) o qual transmite o sinal pirogênico da periferia para o SNC.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que:

- O aumento de temperatura corporal induzido pela injeção i.p de *S. aureus* é característico de febre e não de hipertermia;
- Existe correlação entre a quantidade de bactérias no foco infeccioso e sangue com o aumento de temperatura corporal induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*;
- A resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus* parece depender de prostaglandinas, formadas pela atividade da COX-2, de endotelinas e ser independente da produção central de IL-1.

PERSPECTIVAS

Permanece a ser investigado:

- A participação de outros mediadores na febre induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*, como a bradicinina (BK), outras citocinas (IL-6, IL-1 periférica, TNF), quimiocinas, como a RANTES, as quais sabidamente participam da febre induzida pelo LPS, componente da parede celular de bactérias Gram-negativas;
- Se paralelo ao aumento de temperatura corporal há aumento nos níveis de prostaglandinas no hipotálamo dos ratos após a injeção i.p. de *S. aureus*;
- A importância da neurotransmissão vagal na resposta febril induzida pela injeção i.p. de *S. aureus*, uma vez que a vagotomia subdiafragmática inibe a febre induzida por estímulos administrados intraperitonealmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S.R.; WEISSMANN, G. The mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis Rheum., v.32, p.1-9, 1989.

AEBERHARD, E.E.; HENDERSON, S.A.; ARABOLOS, N.S.; GRISCAVAGE, J.M.; CASTRO, F.E.; BARRETT, C.T.; IGNARRO, L.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.208, p.1053-1059, 1995.

ATKINS, E. Pathogenesis of fever. Physiol. Rev., v.40, p.580-646, 1960.

BANKS, W. A., KASTIN, A. J. Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. Life Sci., v.48, p. PL117-1121, 1991.

BANKS, W.A., KASTIN, A. J, BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation., v. 2, p. 241-248, 1995.

BANNAN, J., VISVANATHAN,K., ZABRIESKE, J.B. Structure and function of streptococcal and staphylococcal superantigens in septic shock. Infect. Dis. Clin. North. Am., v. 13, p. 387-396, 1999.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. Br. J. Pharmacol.,p. 1-10, 2006.

BHAKDI, S., KLONISCH, T., NUBER, P., FISCHER, W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. Infect. Immun., v. 59, p. 4614-4620, 1991.

BEESON, P. B. Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear cells. J. Clin. Invest., v. 27, p. 524, 1948.

BEIRITH, A., SANTOS, A. R., RODRIGUES, A. L., CRECZYNSKI-PASA, T. B., CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. Eur. J. Pharmacol. v. 345, p. 233-245, 1998.

BLATTEIS, C. M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. Prog. Brain Res., v. 91, p. 409-412, 1992.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Fever: How many circulating pyrogens signal the brain? News Physiol. Sci., v.12, p.1-9, 1997.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. Pharmacology & Therapeutics , *in press*, 2006.

BLESSING, W.W., NALIVAIKO, E., 2001. Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. Neuroscience, v. 105, p. 923-929.

BONE, R.C. Gram-positive organisms and sepsis. Arch. Intern. Me., v.154, p.26-34, 1994.

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 29, p. 108-115, 1998.

BOULANT, J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. Clin. Infect. Dis., v.31, p.S157-S161, 2000.

BREDER., C.D.; DEWITT, D.; KRAIG, R.P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. J. Comp. Neurol., v.355, p.296-315, 1995.

BRIESE, E. Circadian body temperature rhythm and behavior of rats in thermoclines. Physiol. Behav., v. 37 (6), p. 839-847, 1986.

BRIESE, E. Rats prefer ambient temperatures out of phase with their body temperature circadian rhythm. Brain Res., v. 345 (2), p.389-393, 1985.

BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; RIVIER, J.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. Life Sci., v.30, p.207-210, 1982.

BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. Scand. J. Rheumatol., v. 33 (1), p. 1-6, 2004.

CALDEIRA, J. C., FRANCI, C. R., PELA, I. R. Bilateral lesion of hypothalamic paraventricular nucleus abolishes fever induced by endotoxin and bradykinin in rats. Ann N Y Acad Sci., v. 856, p. 294-297, 1998.

CAMPISI, J., HANSEN, M.K., O'CONNOR, K.A., BIEDENKAPP, J.C., WATKINS, L.R., MAIER, S.F., FLESHNER, M. Circulating cytokines and endotoxin are not necessary for the activation of the sickness or corticosterone response produced by peripheral *E. coli* challenge. J. Appl. Physiol., v.95, p. 1873-1882, 2003.

CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., WATANABE, Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. Brain Res., v. 697, p.187-196, 1995.

CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., WATANABE, Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. Brain Res., v. 733, p. 263-272, 1996.

CAO, C.; MATSUMURA, K., YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. Am. J. Physiol., v. 272, p. R1712-1715, 1997.

CAO, C.; MATSUMURA, K., YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. Mol. Brain Res., v. 56, p. 45-46, 1998.

CARTMELL, T., POOLE, A. V., TURNBULL, N. J., ROTHWELL, N. J., LUHESHI, G. N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. J. Physiol., v. 526 (3), p. 653-661, 2000.

CARTMELL, T., MITCHELL, D., LAMOND, F.J.D., LABURN, H.P. Route of administration differentially affects fevers induced by Gram-negative and Gram-positive. Exp. Physiol., v. 83, p. 391-399, 2002.

CARTMELL, T., BALL, C., BRISTOW, A.F., MITCHELL, D., POOLE, S. Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. J. Physiol., v. 549, p. 653-664, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAÍ, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci USA, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, B. C., CHANG, Y. S., KANG, J.C., HSU, M. J., SHEU, J.R., CHEN, T. L., TENG, C. M., LIN, C. H. Peptidoglycan induces nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via Ras, Raf-1, and ERK in RAW 264.7 macrophages. J. Biol. Chem., v. 279, p. 20889-20897, 2004.

CLARK, W. G & PAGE, J. S. Pyrogenic responses to staphylococcal enterotoxins A e B in cats. J. Bacteriol., v. 96, p. 1940-1946.

COCEANI, F.; BISHAI, I.; ENGELBERTS, D.; HOUSE, R.V.; ADAMSON, S. L. Response of newborn and adult sheep to pyrogens; relation between fever and brain eicosanoid changes. Brain Res. v. 700, p. 191-204, 1995.

COCEANI, F.; LEES, J.; BISHAI, I. Further evidence implicating prostaglandin E₂ in the genesis of pyrogen fever. Am. J. Physiol. v. 254, p. R463-469, 1988.

COELHO, M.M.; SOUZA, G.E.P.; PELÁ, I.R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. Am. J. Physiol., v. 263, p. R423-7, 1992.

- COELHO, M.M.; LUHESHI, G.; HOPKINS, S.J.; PELÁ, I.R.; ROTHWELL, N.J. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. Am. J. Physiol., v.269, p.R527-R535, 1995.
- CONTI, B., TABAREAN, I., ANDREI, C., BARTFAI, T. Cytokines and fever. Frontiers in Bioscience, v. 9, p. 1433-1449, 2004.
- CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L.; RISTIMAKI, A. P.; SANO, H.; REMMERS, E. F.; EPPS, H. R.; et al.. Cyclooxygenases-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. J. Clin. Invest. v. 93, p. 1095-1101, 1994.
- DASCOMBE, M.J.; ROTHWELL, N.J.; SAGAY, B.O.; STOCK, M.J. Pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. Am. J. Physiol., v.256, p.E7-E11, 1989.
- DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; DAYER, J.-M.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. Science, v.243, p.1066-8, 1989.
- DAVIDSON, J.; MILTON, A.S.; ROTONDO, D. A study of the pyrogenic actions of interleukin-1 α and interleukin-1 β : interactions with a steroidal and a non-steroidal anti-inflammatory agent. Br. J. Pharmacol., v.100, p.542-546, 1990.
- DIAMANT, M.; De WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. Endocrinology, v.129, n.1, p.466-454, 1991.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. N. Engl. J. Med., v. 311, p. 1413-1418, 1984.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIN, H. BEAUTLER, B.; et al. Tumor necrosis factor (cachetin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. J. Exp. Med., v. 163, p. 1433-1450, 1986.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. Rev. Infect. Dis., v.10, n.1, p.168-189, 1988.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. Brain Res., v.562, p.199-206, 1991.
- DINARELLO, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J., v.8, p.1314-1325, 1994.
- DINARELLO, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. J. Endotoxin Res. v. 10 (4), p. 201-222, 2004.

DINCHUK, J. E.; LIU, R.Q.; TRZASKOS, J. M. COX-3: in the wrong frame in mind. Immunology Letters., v. 86, p.121, 2003.

EK M, KUROSAWA M, LUNDEBERG T, ERICSSON A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. J. Neurosci., v. 18, p. 9471-9479, 1998.

ELDOR, A.; ZYLBER-KATZ, E.; LEVY, M. The effect of oral administration of dipyron on the capacity of blood platelets to synthesize thromboxane A₂ in man. Eur. J. Clin. Pharmacol., v.26, p.171-176, 1984.

ELLINGSEN, E., MORATH, S., FLO, T., SCHROMM, A., HARTUNG, T., THIEMERMANN, C., ESPEVIK, T., GOLENBOCK, D., FOSTER, D., SOLBERG, R., AASEN, A., WANG, J. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. Med. Sci. Monit., v. 8, p. BR149-156, 2002.

ELMQUIST, J. K., BREDER, C. D., SHERIN, J. E., SCAMMELL, T. E., HICKEY, W. F., DEWITT, D., SAPER, C. B. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. J. Comp. Neurol., v.381, p. 119-129, 1997.

ENGBLOM, D.; SAHA, S.; ENGSTROM, L.; WESTMAN, M.; AUDOLY, L.P.; JAKOBSON, P.J.; et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. Nature Neurosci., v. 6, p.1137-8, 2003.

FABRICIO, A.S.C.; SILVA, C.A.A.; RAE, G.A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Essential role for endothelin ET_B receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. Br. J. Pharmacol., v. 125, p.542-548, 1998.

FABRICIO, A.S.C.; RAE, G.A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. Brain Research., v.1066, p. 92-100, 2005a.

FABRICIO, A.S.; VEIGA, F.H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P.; SOUZA, G.E. The effects of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 288, p. R671-R677, 2005b.

FABRICIO, A.S.C.; RAE, G.A.; ZAMPRONIO, A.R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Central endothelin ET_B receptors mediate IL-1 dependent fever induced by preformed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 290, p. R164- R171, 2006a.

FABRICIO, A. S., TRINGALI, G., POZZOLI, G., MELO, M. C., VERCESI, J. A., SOUZA, G. E., NAVARRA, P. Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and

prostaglandin production in the preoptic area of rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. v. 290, p. R1515-R1523, 2006b.

FELDBERG, W.; SAXENA, P.N. Fever produced by prostaglandin E₂. J. Physiol., v.217, p.547-56, 1971.

FERREIRA, M. E., COELHO, M. M., PELA, I. R. Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 281, R162-169, 2001.

FLOWER, R. J.; ROTWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. Trends Pharmacol. Sci., v. 15, p. 141-157, 1994.

FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences. Prog. Brain Res., v. 115, p. 141-157, 1998.

FUTAKI, N., YOSHIKAWA, K.; HAMASAKA, Y.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; IIZUKA, H.; OTOMO, S. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. Gen. Pharmacol., v. 339, p. 469-476, 1993.

GOEHLER, L. E., RELTON, J. K., DRIPPS, D., KIECHLE, R., TARTAGLIA, N., MAIER, S. F., WATKINS, L. R. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. Brain Res. Bull., v. 43, p. 357-364, 1997.

GOEHLER, L. E., GAYKEMA, R. P., HAMMACK, S. E., MAIER, S. F., WATKINS, L. R. Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. Brain Res., v. 804, p. 306-310, 1998.

GOEHLER, L. E., GAYKEMA, R. P., HANSEN, M. K., KLEINER, J. L., MAIER, S. F., WATKINS, L. R. Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 280, p. R1434-R1439, 2001

GOELST, K.; LABURN, H.P. Response of body temperature and serum iron concentration to repeated pyrogen injection in rabbits. Pflugers Arch., v. 417, p. 558-561, 1991.

GOLDBACH, J.M.; ROTH, J.; ZEISBERGER, E. Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. Am. J. Physiol., v. 272, p. R675-R681, 1997.

GORDON, C. J. 24-hour control of body temperature in rats. I. Integration of behavioral and autonomic effectors. Am. J. Physiol., v. 267, p. R71-R 77, 1994.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. Physiol. Behav., v. 47 (5), p. 963-991, 1990.

GORDON, C. J. Twenty-four hour rhythms of selected ambient temperature in rat and hamster. Physiol. Behav., v. 53 (2), p.257-263, 1993.

GREISMAN, S. E.; YOUNG, E.J.; WOODWARD, W. E. Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusion of endotoxin. J. Exptl. Med., v. 124, p. 983-1000, 1966.

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

HAYNES, W.G.; WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? Clin. Sci., v.84, p.485-500, 1993.

HESSLE, C. C., ANDERSSON, B., WOLD, A.E. Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. Cytokine., v. 30, p. 311-318, 2005.

HORUK, R. Molecular properties of the chemokine receptor family. Trends Pharmacol. Sci., v. 5, p. 159-165, 1994.

HUANG, W. T., LIN, M. T., WON, S. J. Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. Infect. Immun., v. 65, p. 2656-2662, 1997.

HUANG, W. T.; TSAI, S. M.; LIN, M. T. Involvement of brain glutamate release in pyrogenic fever. Neuropharmacology., v. 41, p. 811-818, 2001.

HUANG, W. T., WANG, J. J., LIN, M. T. Antipyretic effect of acetaminophen by inhibition of glutamate release after staphylococcal enterotoxin A fever in rabbits. Neurosci. Lett., v. 355, p. 33-66, 2004.

HWANG, D.; SCOLLARD, D.; BYRNE, J.; LEVINE, E. Expression of cyclooxygenases-1 and -2 in human breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. v. 90, p. 455-460, 1998.

IMERI, L., OPP, M. R., KRUEGER, J. M. An IL-1 receptor and an IL-1 receptor antagonist attenuate muramyl dipeptide and IL-1-induced sleep and fever. Am. J. Physiol., v. 265, p. R907-R913, 1993.

INOUE, W., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., TAKEMIYA, T., SHIRAKI, T., KOBAYASHI, S. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. Neurosci. Res., v. 44, p. 51-61, 2002.

JANG, S. B., WON, J., KIM, H., KIM, J., LEE, K. H., HAN, H., RHA, H. K., CHOI, C. R. TAK1 mediates lipopolysaccharide-induced RANTES promoter activation in BV-2 microglial cells. Mol. Cells., v. 14, p. 35-42, 2002.

JOHNSON, J.D., O'CONNOR, K.A., HANSEN, M.K., WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness response. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v.284, p.R422-R432, 2003.

KAMERMAN, P., FULLER, A. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the febrile response to lipopolysaccharide and muramyl dipeptide in guinea pigs. Life Sci., v. 67, p. 2639-2645, 2000.

KASTING, N. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in thermoregulation during fever and antipyresis. Brain Res. Rev., v.14, p.143-53, 1989.

KETTELHUT, I.C.; GOLDBERG, A.L. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. J. Clin. Invest., v.81, p.1384-1389, 1988.

KHAN, K. N.; PAULSON, S. K.; VRBURG, K. M.; LEFKOWITH, J. B.; MAZIASZ, T. J. Pharmacology of cyclooxygenases-2 inhibition in the kidney. Kidney Int., v. 61, p. 1210-1219, 2002.

KIELIAN, T., BEARDEN, E. D., BALDWIN, A. C., ESEN, N. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. J. Neuropathol. Exp. Neurol., v. 63, p. 381-396. 2004.

KIS, B., SNIPES, J. A., SIMANDLE, S. A., BUSIJA, D. W. Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 288, p. R897-R902, 2005.

KLIR, J.J.; McCLELLAN, J.L.; KOZAK, W.; SZELENYI, Z.; WONG, G. H. W.; KLUGER, M. J. Systemic but not central administration of tumor necrosis factor α attenuates LPS-induced fever in rats. Am. J. Physiol., v.268, p.R480-R486, 1995.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. Physiol. Rev., v.71, p.93-127, 1991.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. Science, v.265, p.956-559, 1994.

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. J. Biol. Chem., v. 266, p.12866-72, 1991.

KUSNHER, I. The acute phase response: an overview. Methods Enzimol., v. 163, p.373-383, 1988.

LANDOLFI C.; SOLDI, L. POLENZANI, L. APICELLA C., CAPEZONNE de JOANNON A., COLETTA I., DI CESARE F., BRUFANI M., PINZAM., MILANESE C. Inflammatory molecule release by b-amyloid-treated T98G astrocytoma cells: role of prostaglandins and modulation by paracetamol, Eur. J. Pharmacol. v. 360, p. 55–64. 1998.

LEDEBOER, A.; BINNEKADE, R.; BREVE', J. J. P.; BOL, J. G. J. M.; TILDERS, F. J. H.; VAN DAM, A. Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1_α expression in rats by interleukin-10. Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp Physiol., v. 282, p. R1762–R1772, 2002.

LeFEUVRE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. Neuropharmacology, v.26, n.8, p.1217-1221, 1987.

LI, S., WANG, Y.; MATSUMURA, K., BALLOU, L.R.; MORHAM, S. G.; BLATTEIS, C.M. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2^{-/-} mice. Brain Res., v. 285, p. 86-94, 1999a.

LI, S.; BALLOU, L.R.; MORHAM, S. G.; BLATTEIS, C.M. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin (IL)-1β. Brain Res., v. 910, p. 163-173, 2001.

LI, S.; GOORHA, S.; BALLOU, L.R.; BLATTEIS, C.M. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1β and IL-18: pyrogenic and PGE₂ mediated? Brain Res., v. 992, p.76-84, 2003.

LIN, C. H., KUAN, I. H., LEE, H. M., LEE, W. S., SHEU, J. R., HO, Y. S., WANG, C. H., KUO, H. P. Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. Br. J. Pharmacol., v. 134, p. 543-552, 2001.

LONG, N.C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S.L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Roles of interleukin 1β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. Am. J. Physiol., v. 259, p.R724-R728, 1990.

LOPEZ-VALPUESTA, F.J.; MYERS, R.D. Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. Neuropharmacology, v.33, n.8, p.989-94, 1994.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. Eur. J. Pharmacol., v.114, p.375-381, 1985.

LUHESHI, G.; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. Int. Arch. Allergy Immunol., v. 109, p.301-307, 1996.

LUKER, F.I., MITCHELL, D., LABURN, H.P. Fever and motor activity in rats following day and night injections of *Staphylococcus aureus* cell walls. Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol., v.279, p.R610-R616, 2000.

LÜTHY, C.; MULTHAUPT, M.; OETLIKER, O.; PERISIC, M. Differential effect of acetylsalicylic acid and dipyron on prostaglandin production in human fibroblast cultures. Br. J. Pharmacol., v.79, p.849-854, 1983.

MACHADO, R. R.; SOARES, D.M.; PROUDFOOT, A.E.; SOUZA, G.E.P.; Essential role for RANTES and CCR1 and CCR5 receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. (*em análise*).

MARSHALL, P. J.; KULMACZ, R.J. and LANDS, W.E.M. Constraints on prostaglandin biosynthesis in tissues. J. Biol. Chem., v.262, p.3510-3517, 1987.

MARTIN, L.W.; CATANIA, A.; HILTZ, M.E.; LIPTON, J.M. Neuropeptide α -MSH antagonizes IL-6- and TNF-induced fever. Peptides, v.12, p.297-9, 1991.

MATSUMURA, K., CAO, C., OZAKI, M., MORII, H., NAKADATE, K., WATANABE, Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. J. Neurosci., v. 18 6279-6289, 1998.

MEGYERI, K., MANDI, Y., DEGRE M, ROSZTOCZY, I. Induction of cytokine production by different Staphylococcal strains. Cytokine., v. 19, p. 206-212, 2002.

MICHIE, H.R.; SPRIGGS, D.R.; MANOGUE, K.R.; SHERMAN, M.L.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; ARTHUR, K.; DINARELLO, C.A.; CERAMI, A.; WOLFF, S.M.; et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. Surgery, v.104, p.280-286, 1988.

MILLER, A.J., LUHESHI, G. N.; ROTHWELL, N. J., HOPKINS, S. J. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. Am. J. Physiol., v. 272, R 857-861, 1997.

MILTON, A.S.; WEDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanesthetized cats and rabbits. J. Physiol., v. 218, p.325-36, 1971.

MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, et al. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. Brain Res. Bull., v.24, p.849-52, 1990.

MIÑANO, F.J.; FERNANDES-ALONSO A.; BENAMAR, K.; MYERS, R.D.; SANCIBRIAN, M.; RUIZ, R.M.; ARMENGOL, J. A. Macrophage inflammatory protein-

1 β (MIP-1 β) produced endogenously in rat brain during *E. coli* fever in rats. Eur. J. Neurosci., v. 8, p. 424-428, 1996.

MITCHELL, J. et al. Selectivity of non-steroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA v.90, p.11693-7, 1993.

MORIMOTO, A.; SAKATA, Y.; WATANABE, T.; MURAKAMI, N. Characteristics of fever and acute-phase response induced in rabbits by IL-1 and TNF. Am. J. Physiol., v. 256, p.R35-R41, 1989.

MPHALELE, N.R., FULLER, A., ROTH, J., KAMERMAN, P.R. Body temperature, behaviour, and plasma cortisol changes induced by chronic infusion of *Staphylococcus aureus* cell walls in goats. Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol., v.287, p.863-869, 2004.

MULLER, J. M., ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., BAEUERLE, P. A. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. Immunobiology., v. 187, v. 233-256, 1993.

NILSSON, O.G. H. SAVELAND, F. BORIS-MOLLER, T. BRANDT, T. WIELOCH, Increased levels of glutamate in patients with subarachnoid haemorrhage as measured by intra-cerebral microdialysis, Acta Neurochir. Suppl. (Wien) v. 67, p. 45-47, 1996.

'O NEILL, G.P. & FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. FEBS LETT., v. 330, p. 156-160, 1993.

OPPENHEIN, J.J.; ZACHARIE, COC.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. Annu. Rev. Immunol., v. 9, p. 617-648, 1991.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York Academic Press, 1986.

PARENTE, L.; PERRETI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. Biochem. Pharmacol., v. 65, p. 153-159, 2003.

PENNING, TD, TALLEY JJ, BERTENSHAW SR, CARTER JS, COLLINS PW, DOCTER S, GRANETO MJ, LEE LF, MALECHA JW, MIYASHIRO JM, ROGERS RS, ROGIER DJ, YU SS, ANDERSON GD, BURTON EG, COGBURN JN, GREGORY SA, KOBOLDT CM, PERKINS WE, SEIBERT K, VEENHUIZEN AW, ZHANG YY, ISAKSON PC. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-

1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). J. Med. Chem., v. 40, p. 1347-1365, 1997.

RABEHI, L., IRINOPOULOU, T., CHOLLEY, B., HAEFFNER-CAVAILLON, N., CARRENO, M. P. Gram-positive and gram-negative bacteria do not trigger monocytic cytokine production through similar intracellular pathways. Infect. Immun. v. 69, p. 4590-4599, 2001.

RANELS, H. J.; GRIFFIN, J. D. The effects of prostaglandin E₂ on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. Brain Res., v. 964, p. 42-50, 2003.

RANELS, H. J.; GRIFFIN, J. D. Effects of prostaglandin E₂ on the electrical properties of thermally classified neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. BMN Neuroscience, v. 6 (14), 2005.

REFINETTI, R., MENAKER, M. The circadian rhythm of body temperature. Physiol. Behav., v. 51(3), p. 613-637, 1992.

RIVEAU, G., MASEK, K., PARANT, M., CHEDID, L. Central pyrogenic activity of muramyl dipeptide. J. Exp. Med., v. 52, p.869-77, 1980.

RIVEAU G, PARANT M, DAMAIS C, PARANT F, CHEDID L. Dissociation between muramyl dipeptide-induced fever and changes in plasma metal levels. Am. J. Physiol., v. 250, p. C572-577, 1986.

ROMANOVSKY, A. A., IVANOV, A. I., SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. J. Appl. Physiol., v. 92, p.2667-2679, 2002.

ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. Am. J. Physiol., v.256, p.E111-E115, 1989.

ROTHWELL, N.J. Central action of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. Horm. Metab. Res., v.22, p.616-8, 1990a.

ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; HUMPHRAY, H.; HISSEY, P. Central action of interleukin-1 β on fever and thermogenesis. In: Physiological and Pathological Effects Cytokines. Wiley-Liss, Inc., p.307-311, 1990b.

ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. Am. J. Physiol., v.256, p.E111-E115, 1989.

ROTHWELL, N.J. The endocrine significance of cytokines. J. Endocrinology, v. 128, p. 171-173, 1991.

SANO, H.; KAWAHITO, Y.; WILDER, R. L.; HASHIRAMOTO, A.; MUKAI, S.; ASAI, K.; et al. Expression of cyclooxygenases-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res. v. 55, p. 3785-3789, 1995.

SANTOS, D.R.; FULIARO, A.F.; FABRICIO, A.S.C.; SOUZA, G.E.P. Antipyresis induced by paracetamol: Is CRH the target? In: XIV REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, MG, 1999. Anais. Res. 14.029, p.113, 1999.

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

SEHIC, E.; BLATTEIS, C.M. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. Brain Res., v.726, p.160-166, 1996.

SCALES, W. E., KLUEGER, M. J. Effect of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature of rats. Am. J. Physiol., v. 253, p. R306-R313, 1987.

SHIDO, O.; SUGANO, Y.; NAGASAKA, T. Circadian change of heat loss in response to change in core temperature in rats. J. Therm. Biol., v. 11, p. 199-202, 1986.

SHIMADA, K., YONETANI, Y., KITA, T., SUZUMURA, A., TAKAYANAGI, T., NAKASHIMA, T. Cyclooxygenase 2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages in vitro. Eur. J. Pharmacol., v. 356, p. 73-80, 1998.

SHISHODIA, S., AGGARWAL, B. B. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of I kappa B kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. Cancer Res. v. 64, p. 5004-5012, 2004.

SHISHODIA, S., KOUL, D., AGGARWAL, B. B. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. J. Immunol., v. 173, p. 2011-2022, 2004.

SHOHAM, S., AHOKAS, R. A., BLATTEIS, C. M., KRUEGER, J. M. Effects of muramyl dipeptide on sleep, body temperature and plasma copper after intracerebral ventricular administration. Brain Res., v. 419, p.223-228, 1987.

SIRKO, S.; BISHAI, I.; COCEANI, F. Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. Am. Physiol. Soc. v. 256, p. R616-624, 1989.

SKOV, L., OLSEN, J.V., RAMM, M., BAADSGAARD, O. Superantigen Staphylococcal enterotoxin B induces release of IL-1beta in human epidermis. Acta Derm. Venereol., v. 80, p.17-18, 2002.

SMITH, B.K.; KLUGER, M.J. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. Am. J. Physiol., v. 263, p. R653-R655, 1992.

SOUZA, G.E.P.; CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.C.; FABRICIO, A.S.C.; SILVA, V.M.S.; LORA, M.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; FERREIRA, S.H.; ZAMPRONIO, A.R. A comparative study of antipyretic profiles of indomethacin and dipyron in rats. Inflam. Res., v. 51, p.24-32, 2002.

STEINER, A. A.; LI, S.; LLANOS-Q, J.; BLATTEIS, C.M. Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. Neuroimmunomodulation, v. 9, p. 263-275, 2001.

STITT, J.T. Prostaglandin E₁ fever induced in rabbits. J. Physiol. Lond., v. 232, p.163-79, 1973.

STITT, J. T. Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. Physiol., v. 368, p. 501-511, 1985.

STRIJBOS, P.J.; HARDWICK, A.J.; RELTON, J.K.; CAREY, F.; ROTHWELL, N.J. Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF. Am. J. Physiol., v.263, p.E632-E636, 1992.

TAVARES, E.; MINANO, F.J. RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. Neuropharmacology, v.39, p.2505-2513, 2000.

THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES (IUPS THERMAL COMMISSION). Glossary of Terms for Thermal Physiology. Jpn. J. Physiol., v. 51, p. 245– 280, 2001.

THOMAS, S.H.L. Paracetamol (Acetaminophen) poisoning. Pharmac. Ther., v.60, p.91-120, 1993.

THOMSON, A. The cytokine handbook. London: Academic, 1991.

TURNBULL, A.V., RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. Physiol. Rev., v. 79, p.1-71, 1999.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; et al Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. Nature, v. 395, p.281- 284, 1998.

VANE, S. J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. Thorax., v. 55, p. S3-9, 2000.

- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature New Biol., v.231, p.232-235, 1971.
- VEIGA-SOUZA, F.H.; FABRICIO, A.S.C.; CRISTOFOLETTI, R.; SOARES, D.M.; MELO, M.C.C.; ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P. Where are placed prostaglandins in the PFPF-induced fever? (*em análise*).
- WAHL, J. R., GOETSCH, N. J., YOUNG, H. J., VAN MAANEN, R. J., JOHNSON, J. D, PEA, A. S., BRITTINGHAM, A. Murine macrophages produce endothelin-1 after microbial stimulation. Exp. Biol. Med., v. 230, p. 652-658, 2005.
- WANG, Z. M., LIU, C., DZIARSKI, R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. J. Biol. Chem., v. 275, p. 20260-2027, 2000.
- WANG, X., WANG, B.R., ZHANG, X.J., DUAN, X. L, GUO, X., JU, G. Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of *Staphylococcus enterotoxin B* and the effect of vagotomy. Neurochem. Res., v. 29, p. 1667-1674, 2004.
- WATKINS, L. R., MAIER, S. F., GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. Life Sci. v. 57, p.1011-1026, 1995a.
- WATKINS, L. R., GOEHLER, L. E., RELTON, J. K., TARTAGLIA, N., SILBERT, L., MARTIN, D., MAIER, S. F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. Neurosci. Lett.,1 v. 183, p. 27-31, 1995b.
- WERNER, M.F.P.; FRAGA, D.; MELO, M.C.C.; SOUZA, G.P.E.; ZAMPRONIO, A.R. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by LPS injection. Inflam. Res., v. 52, p. 1-6, 2003.
- WON, S. J., HUANG, W. T., LAI, Y. S., LIN, M. T. Staphylococcal enterotoxin A acts through nitric oxide synthase mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells to stimulate synthesis of pyrogenic cytokines. Infect. Immun., v. 68, p. 2003-2008, 2000.
- WRIGHT, K. M., FRIEDLAND, J. S. Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. Microbes Infect., v. 6, p. 844-852, 2004.
- XIN, L., BLATTEIS, C. M., Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 : studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. Brain Res. Bull., v. 29, p. 27-35, 1992.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, v.332, p.441-5, 1988.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. Mediat. Inflamm., v. 3, p.365-73, 1994a.

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C.A.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. Am. J. Physiol., v.266, p.R1670-R1674, 1994b.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; POLL, S.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor (PFPF). Inflam. Res, v. 49, p.1-7, 2000a.

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

ZELENAKAS, K.; FRICKE, J. R.; JAYAWARDENE, S.; KELLSTEIN, D. Analgesic efficacy of single oral doses of lumiracoxib and ibuprofen in patients with postoperative dental pain. Int J Clin Pract., v. 58 (3), p. 251-256, 2004.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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