

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

DANIEL FRAGA

Envolvimento de canabinóides endógenos na resposta febril

RIBEIRÃO PRETO

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL FRAGA

Envolvimento de canabinóides endógenos na resposta febril

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2008

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

FRAGA, Daniel

Envolvimento de canabinóides endógenos na resposta febril

Ribeirão Preto, 2008.

151 f. :fig.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) -
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

1. Febre; 2. Canabinóides endógenos; 3. Ratos; 4. Prostaglandinas; 5.
Peptídeos Opióides Endógenos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Fraga

Envolvimento de canabinóides endógenos na resposta febril

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza

Instituição: FMRP – USP

Assinatura _____

Prof. Dr. Giles Alexandre Rae

Instituição: UFSC

Assinatura _____

Profa. Dra. Iolanda Margherita Fierro

Instituição: UERJ

Assinatura _____

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: FMRP – USP

Assinatura _____

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Instituição: UNICAMP

Assinatura _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Rogério e Odete e minhas irmãs, Priscila e Elisângela, pelo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada por gentilmente ter fornecido as ferramentas farmacológicas relacionadas ao estudo dos canabinóides endógenos na resposta febril, sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos professores Dr. Giles Alexandre Rae, Dra. Iolanda Margherita Fierro e Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra por tão prontamente aceitarem participar da banca examinadora e pelas sugestões que enriqueceram o trabalho.

À amiga e colaboradora Cristiane Isabel Silva Zanoni, pela amizade, apoio, pelas discussões e afinal este trabalho nasceu da sua curiosidade de avaliar o efeito da anandamida sobre a temperatura quando administrada na pata dos ratos.

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.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia da resposta febril da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP: Alexandre (Kanashiro), Andréa, Bruno, Denis, Fabiane, Fernando, Juliano, Lívia, Maria José (Zezé), Osmar e Renes, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Farmacologia da FCFRP e FMRP - USP, pelo apoio e amizade.

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, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP - USP: em especial Reinaldo Fernando Batista, pela atenção e amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

E a todos que torceram por mim, e que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído, meu muito obrigado.

"Que a inspiração chegue não depende de mim. A única coisa que posso fazer é garantir que ela me encontre trabalhando."

Pablo Picasso

RESUMO

O envolvimento dos endocanabinóides no controle da temperatura corporal e na resposta febril ainda não estavam bem claros. Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento dos canabinóides endógenos no controle da temperatura corporal e na resposta febril. As alterações na temperatura corporal foram medidas em intervalos de 30 minutos até a sexta hora após a administração do tratamento, através de uma sonda retal em ratos Wistar machos. Todos os pré-tratamentos foram administrados 30 minutos antes do tratamento. Tanto a administração intracerebroventricular (0,01, 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) como intrahipotalâmica (0,1, 1, 10 e 100 ng/0,2 μl , i.h.) de anandamida (AEA) induziram aumentos dose-dependentes na temperatura corporal. O aumento na temperatura corporal induzido pela AEA (1 μg , i.c.v.) foi precedido e acompanhado por uma redução da temperatura da pele da cauda dos animais o que foi causado por uma significativa vasoconstrição representada pelo índice de perda de calor (IPC). A dose de 1 μg , i.c.v. de AEA foi selecionada para os demais experimentos. O URB597 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ng/2 μl , i.c.v.), inibidor da enzima amido hidrolase dos ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), promoveu uma curva em forma de sino. O agonista CB_1 seletivo ACEA (0,001, 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) também induziu um aumento na temperatura corporal em forma de sino. O pré-tratamento dos animais com o antagonista CB_1 seletivo, AM251 (1,0, 5,0 e 10,0 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) reduziu de forma dose-dependente a resposta febril induzida pela AEA e ACEA 0,01 μg , i.c.v. A dose 5 μg de AM251 foi selecionada para os demais experimentos. A injeção i.c.v. do agonista CB_2 seletivo AM1241 (0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal. O pré-tratamento com o antagonista CB_2 seletivo AM630 (10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.), assim como com o antagonista dos receptores vanilóides capsazepina (1, 3 e 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.), não alteraram a resposta febril induzida pela AEA. O inibidor não seletivo das enzimas ciclooxigenase (COX) indometacina (2 mg/kg, i.p.), e o inibidor seletivo da COX-2 celecoxib (5 mg/kg, p.o.), reduziram a febre induzida pela AEA. A AEA induziu um aumento significativo na concentração de PGE_2 no fluido cerebrospinal (CSF) que foi abolido pelo pré-tratamento com o AM251. O antagonista não seletivo dos receptores opióides, naloxona (1 mg/kg, s.c.), aboliu a febre induzida pela AEA. Por sua vez, a AEA aumentou a concentração no CSF de β -endorfina. O pré-tratamento com AM251 foi capaz de reduzir este aumento induzido pela AEA. O AM251 também reduziu a febre induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.), interleucina (IL)-1 β (3 ng, i.c.v.), fator de necrose tumoral (TNF)- α (250 ng, i.c.v.), IL-6 (300 ng, i.c.v.), fator liberador de corticotrofina (CRF 2,5 μg , i.c.v.) e da endotelina (ET-1 1 pmol, i.c.v.). Porém, o AM251 não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelas prostaglandinas (PGE_2 250 ng, i.c.v.) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (250 ng, i.c.v.) Em conjunto, estes dados sugerem que a AEA, pela ativação dos receptores CB_1 , é capaz de induzir febre. Esta resposta é dependente da síntese/liberação de prostaglandinas e opióides endógenos. Além disso, os endocanabinóides estão envolvidos no desenvolvimento da resposta febril induzida pelo LPS e por diversos mediadores que orquestram esta resposta incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6, CRF e ET-1, mas não PGE_2 ou a $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Palavras-chaves: Febre, endocanabinóides, anandamida, LPS, citocinas, prostaglandinas e opióides endógenos.

ABSTRACT

The involvement of endocannabinoids in the control of body temperature and in the fever response has not been well understood. For this reason, the present study aimed to investigate the contribution of the endogenous cannabinoids on the body temperature control and in the febrile response. Changes in rectal temperature were measured in a 30 min interval up to 6h by inserting a thermistor probe in the rectum of male Wistar rats. All pre-treatments were made 30 min before the stimuli. Both intracerebroventricular (AEA 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) and intrahypothalamic (0.1, 1, 10 and 100 ng/0.2 μl , i.h.) injection of anandamide induced a dose dependent increase on body temperature. The increase on body temperature induced by AEA (1 μg , i.c.v.) was preceded by a decrease in the tail skin temperature and consequently by a significant vasoconstriction represented by the heat loss index (HLI). The dose of 1 μg , i.c.v. was selected for the following experiments. The fatty acid amide hidrolase inhibitor, URB597 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 ng/2 μl , i.c.v.), induced a bell shaped increase on body temperature. The selective CB₁ agonist ACEA (0.001, 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) also induced a bell shaped increase on body temperature. The i.c.v. pre-treatment with the selective CB₁ antagonist AM251 (1, 5 and 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) reduced in a dose dependent fashion the fever induced by AEA (1 μg , i.c.v.) and ACEA (0.01 μg , i.c.v.). The dose of 5 μg , i.c.v. of AM251 was selected for the following experiments. The i.c.v injection of the selective CB₂ agonist AM1241 (0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) did not induce a significant change on body temperature. Both the pretreatment with the CB₂ selective antagonist AM630 (10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.), as with the vanilloid receptor antagonist capsazepine (1, 3 e 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) did not reduced the febrile response induced by AEA. The non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, indomethacin (2 mg/kg, i.p.) and the selective COX-2 inhibitor, celecoxib (5 mg/kg, p.o.) reduced the fever induced by AEA. AEA induced an increase in the PGE₂ concentration in the cerebrospinal fluid (CSF), which was abolished by the pre-treatment with AM251. The non-selective opioid receptor antagonist naloxone (1 mg/kg, s.c.) abolished the fever induced by AEA. AEA also increased the β -endorphin concentration in the CSF. AM251 reduced this β -endorphin increase. AM251 also reduced the fever response induced by lipopolysaccharide (LPS 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.), interleukin (IL)-1 β (3 ng, i.c.v.), tumor necrosis factor (TNF)- α 250 ng, i.c.v.), IL-6 (300 ng, i.c.v.) corticotrophin release factor (CRF) 2.5 μg , i.c.v.) and endothelin (ET)-1 (1 pmol, i.c.v.). Nevertheless AM251 was not able to reduce the fever induced by prostaglandins (PG)E₂ (250 ng, i.c.v.) and PGF_{2 α} (250 ng, i.c.v.). Altogether, these results suggest that AEA, through the activation of the CB₁ receptors, is able to induce a true fever. This response is dependent on the synthesis and release of prostaglandin and opioids. Besides, endocannabinoids are involved in the development of the febrile response induced by LPS and by the different mediators that orchestrate this response (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CRF e ET-1), but not of PGE₂ and PGF₂.

Key-words: Fever, endocannabinoids, anandamide, LPS, cytokines, prostaglandins and β -endorphin

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
ACEA	araquidonoil-2-cloroetilamida
AcP	Proteína acessória
AEA	Araquidonoil Etanolamida, anandamia
AM1241	(<i>R,S</i>)-(+)-(2-Iodo-5-nitrobenzoil)-[1-(1-metil-piperidina-2-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol-3-il] metanona
AM251	N-(piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida
AM630	6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1 <i>H</i> -indol-3-il](4-metoxifenil) metanona
APO/HA	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
AVP	Arginina vasopressina
COX	Ciclooxigenase
CRF	Fator liberador de corticotrofina
CRF ₉₋₄₁	α -helical CRF ₉₋₄₁
CSF	Fluído cerebrospinal
CVO	Órgão circunventricular
CPZ	Capsazepina
ET	Endotelina
I.C.V.	Intracerebroventricular
INF	Interferon
I.H.	Intrahipotalâmico
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista de receptor de IL-1

I.P.	Intraperitoneal
IPC	Índice de perda de calor
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
MAPK	Proteína quinase ativada pelo mitógeno
MIP-1	Proteína inflamatória derivada de macrófago
NFκB	Fator nuclear κB
OVLTL	<i>Órgão vascular da lâmina terminal</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PE	Pirogênio endógeno
PEx	Pirogênio exógeno
PFPF	Fator pirogênico pré-formado em macrófagos estimulados com LPS
PG	Prostaglandina
RANTES	Regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
RFA	Resposta de fase aguda
SAL	Salina
S.C.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
V.O.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O Processo inflamatório e a resposta de fase aguda.....	14
1.2	Controle da temperatura corporal e resposta febril.....	15
1.2.1	Citocinas envolvidas na resposta febril.....	19
1.2.2	Mediadores centrais da resposta febril.....	24
1.3	Canabinóides e temperatura corporal.....	30
2	OBJETIVOS.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	Animais.....	39
3.2	Drogas e reagentes.....	39
3.3	Administrações e diluições.....	41
3.4	Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral e na área pré-óptica hipotalâmica.....	41
3.5	Determinação da temperatura corporal.....	42
3.6	Determinação da temperatura da pele (cauda).....	42
3.7	Coleta do fluido cerebrospinal (CSF).....	43
3.8	Determinação da concentração de PGE ₂ e β-endorfina no fluido cerebrospinal.....	44
3.9	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Efeito da administração por via i.c.v. e i.h. de anandamida na temperatura corporal, na pele da cauda e IPC.....	46
4.2	Efeito da administração por via i.c.v. de URB597 na temperatura corporal.....	51
4.3	Efeito do tratamento com AM251, AM630 e capsazepina no aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida.....	53
4.4	Efeito da administração i.c.v. dos agonistas seletivos dos receptores CB ₁ e CB ₂ ACEA e AM1241 respectivamente.....	57
4.5	Participação de prostaglandinas na resposta febril induzida pela anandamida.....	61
4.6	Participação de peptídeos opióides endógenos na resposta febril induzida pela anandamida.....	65
4.7	Efeito do tratamento com AM251 no aumento da temperatura corporal induzido pelo LPS e das citocina IL-1β, TNF-α e IL-6.....	68
4.8	Efeito do tratamento com AM251 no aumento da temperatura corporal induzido pelos mediadores centrais PGE ₂ , PGF _{2α} , CRF e ET-1.....	73
4.9	Efeito do tratamento com dexametasona e IL-1ra no aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida.....	78
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÕES.....	99
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8	ANEXO.....	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Processo Inflamatório e a Resposta de Fase Aguda

Os seres vivos são expostos constantemente a uma grande variedade de agentes potencialmente fatais que incluem agentes de origem física, química e/ou microbiana. Felizmente, a maioria dos seres vivos é dotada de sistemas de defesa complexos e eficientes que permitem combater estes agentes agressores. Dentre estes sistemas destaca-se a reação inflamatória, cuja ativação resulta na mobilização de células pertencentes ao sistema imune e na produção de mediadores inflamatórios.

A reação inflamatória visa restaurar a homeostase do tecido agredido atuando através da diluição, destruição ou isolamento dos agentes agressores (revisado por GALLIN et al., 1992; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). Contudo, a magnitude desta resposta pode ser tal que os mediadores liberados alcançam a circulação sanguínea desencadeando um sistema complexo de reações organizadas, que são coletivamente chamadas de resposta de fase aguda (RFA). Esta resposta é caracterizada por sinais e sintomas como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, alteração nas concentrações plasmáticas de metais como ferro, zinco e cobre (STADNYK e GAULDIE, 1991).

A RFA é iniciada e mediada por um grande número de proteínas solúveis que regulam o sistema imune, designadas citocinas. Estas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares como polimorfonucleares, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, células da glia, dentre outras (revisado por ZEISBERGER, 1999). Estas citocinas podem ser divididas em pró-inflamatórias, que são responsáveis por desencadear e direcionar o processo inflamatório ou antiinflamatórias, que conferem proteção contra uma reação exagerada, bem como promovem a finalização do processo inflamatório. Dentre os mediadores pró-inflamatórios destacam-se as interleucinas (IL)-1 (α e β), fator

de necrose tumoral- α (TNF- α); IL-6, proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 (MIP-1); o fator pirogênico pré-formado em macrófagos (PFPP) dentre outras. Por sua vez, dentre os mediadores antiinflamatórios encontram-se a IL-10, arginina vasopressina (AVP) e os glicocorticóides (KUBES, 1993).

Dentre os fenômenos da RFA, um dos mais evidentes e comumente associados às doenças é a resposta febril, sendo por esta razão um dos mais estudados e conhecidos.

1.2 Controle da Temperatura Corporal e Resposta Febril

A temperatura corporal é regulada tanto em animais homeotérmicos (endotérmicos) como nos heterotérmicos (ectotérmicos; poiquilotérmicos), embora neste último grupo este controle dependa da temperatura ambiente (BLATTEIS, 1998).

De modo geral, acredita-se que a temperatura corporal seja regulada por uma ativa rede neuronal, que exerce seus efeitos sobre os sistemas controladores da temperatura presente por todo o corpo (ADLER et al., 1988). Muitas evidências sugerem que o local de controle termorregulatório primário nos mamíferos, que são endotérmicos, seja a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA), a qual receberia as informações aferentes dos neurônios sensoriais de frio e de calor provenientes tanto da periferia do corpo como dos órgãos internos. No entanto, existem outros locais como, por exemplo, a medula espinhal que também são de grande importância para a termorregulação. (BLIGH, 1973; NECKER, 1984; GRIFFIN, 2004).

Estudos eletrofisiológicos realizados na APO/HA demonstraram que esta área apresenta uma classe especial de neurônios capaz de responder a alterações de temperatura. Cerca de 30% dos neurônios presentes nesta estrutura 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. Há ainda uma classe de neurônios em menor quantidade denominados de sensíveis ao frio que, ao contrário dos neurônios sensíveis ao calor, aumentam sua frequência de disparos durante o resfriamento e diminuem durante o aquecimento da APO/HA (BOULANT, 1998; 2000; 2006). Os demais neurônios nesta área são considerados insensíveis a variações de temperatura, ou seja, não apresentam alteração de sua frequência de disparos durante o aquecimento ou resfriamento.

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 termorregulatórias 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 APO/HA promove o aumento da temperatura corporal, inicialmente por evocar respostas de retenção de calor, as quais incluem vasoconstrição cutânea, piloereção e alterações comportamentais como a procura por ambientes favoráveis. 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.

Neste contexto, surge o conceito de ponto de regulação ou ponto de balanço (*set point*). O modelo do ponto de regulação pode ser descrito simplificadaamente como a regulação da temperatura corporal dentro dos níveis determinados pela APO/HA. Este

ponto de regulação da temperatura corporal relativamente constante, pode ser alterado em algumas situações patológicas, principalmente nas de origem microbiana, como as causadas por vírus e bactérias onde o indivíduo apresenta um aumento da temperatura corporal conhecido como febre (DINARELLO, 1997). Assim, a febre consiste na elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico (DINARELLO et al., 1988). A elevação do ponto termorregulatório desencadeia a inibição de mecanismos de perda de calor e a ativação de mecanismos de produção e retenção de calor (DINARELLO et al., 1988; KLUGER, 1991; BOULANT, 2000).

Vale ressaltar que febre é um processo distinto de hipertermia. Na hipertermia, o ponto de regulação hipotalâmico não é alterado e o aumento da 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). Uma característica termorregulatória comportamental familiar a qualquer pessoa e 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).

Contudo, qual seria o benefício para o organismo deste aumento controlado da temperatura corporal? Tem-se demonstrado que o aumento da temperatura corporal traz benefícios nas situações de infecção. Nesta situação, há aumentos na capacidade fagocítica das células de defesa, na migração de neutrófilos, na proliferação de células T e na produção de radicais livres de O₂, além de uma redução na proliferação de alguns agentes infectantes (BLATTEIS, 1998).

ATKINS (1960) propôs que diferentes substâncias exógenas provenientes de vírus, bactérias ou fungos seriam capazes de induzir resposta febril (por isso foram chamados pirogênios exógenos PEx), além de produzirem também outros sinais e sintomas da inflamação. Estes PEx entrariam então em contato com células fagocíticas que, por sua vez, produziriam e liberariam mediadores endógenos da resposta febril, sendo estes designados pirogênios endógenos (PE).

Sendo assim, para estudar a resposta febril em laboratório, algumas estratégias são adotadas para mimetizar, em animais, o que ocorre em um organismo infectado por um agente agressor. Sabe-se que as infecções com bactérias GRAM-negativas em particular resultam na liberação de complexos lipopolissacarídeos (LPS), que constituem um potente pirogênio derivado de suas paredes celulares, que pode ser fagocitado por leucócitos, especialmente macrófagos, os quais, por sua vez, passam a sintetizar e liberar citocinas, os PE descritos por ATKINS (1960). Algumas destas citocinas são ativadores endógenos do processo de elevação do termostato hipotalâmico (DINARELLO et al., 1999). Outra substância menos freqüentemente utilizada para induzir febre é o muramil-dipeptídeo (MDP), uma estrutura imunoadjuvante da parede de peptidoglicanos de bactérias GRAM-positivas. Ele apresenta muitos dos efeitos biológicos do LPS, porém, é menos potente que este (ZEISBERGER e ROTH, 1998).

Embora não represente exatamente o que ocorre durante uma invasão microbiana, o LPS tem sido empregado como desencadeador da resposta febril na maioria dos estudos experimentais, pois seus efeitos são mais uniformes do que os obtidos com bactérias vivas ou mortas e porque ele é comercialmente disponível em forma altamente purificada (ZEISBERGER, 1999).

1.2.1 Citocinas envolvidas na resposta febril

O termo citocina é usado como nome genérico para um vasto grupo de proteínas solúveis, as quais atuam como moduladores humorais das funções de células individuais e de tecidos (THOMSON, 1994). Seu peso molecular pode variar entre 8 e 26 kDa e podem ser produzidas por uma grande variedade de tipos celulares.

Estas proteínas são em sua maioria fatores de crescimento que modulam a proliferação e desenvolvimento das células do sistema imune, além de estarem envolvidas na embriogênese e no desenvolvimento de órgãos (BARTFAI et al., 1993; ROTHWELL et al., 1996).

As citocinas são mediadores que habitualmente atuam no tecido onde são produzidos. Em situações como o processo inflamatório, em que são produzidas em grandes quantidades, podem ser rapidamente transportadas para a corrente sanguínea, podendo atuar em diferentes regiões do corpo (HOPKINS et al., 1995).

Dentre as citocinas que participam da resposta febril, podem-se destacar: IL-1 (α e β) (DINARELLO, 1984), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DINARELLO et al., 1986); IL-6 (HELLE et al., 1988), IL-8 (ROTHWELL et al., 1990; ZAMPRONIO et al., 1994a) e IL-11 (LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994); interferon (IFN) α , β e γ (DINARELLO et al., 1984; DINARELLO et al., 1988); proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 (MIP-1; DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990 MELO-SOARES et al., 2006), fator neurotrófico ciliar (SHAPIRO et al., 1993) e RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) (TAVARES & MIÑANO, 2000, MACHADO et al., 2007).

Nesse contexto, certamente a citocina que é mais estudada e que, por isso, apresenta maior número de detalhes sobre o seu mecanismo de ação é a IL-1. A IL-1 existe na forma de três proteínas relacionadas IL-1 α , IL-1 β e o antagonista do receptor de

IL-1 (IL-1ra) as quais são produtos de três genes distintos (ROTHWELL et al., 2000). A IL-1 α e a IL-1 β atuam como agonistas, e suas ações ocorrem por ativação de um receptor de superfície celular de 80 kDa, o IL-1RI, que necessita da associação de uma proteína acessória (AcP) para a transdução de sua resposta (SIMS et al., 1988; GREENFEDER et al., 1995).

Existe ainda, um segundo receptor de 68 kDa, o IL-1RII, ao qual a IL-1 também se liga, porém, este receptor não apresenta um domínio intracelular e, desta forma, não é capaz de iniciar a transdução de sinais (MCMAHAN, et al., 1991; SIMS, et al., 1993). Sugere-se que este receptor funcionaria como um modulador da atividade da IL-1 por competir pela sua ligação no receptor IL-1RI (SIMS, et al., 1993). Ensaio de imunohistoquímica demonstraram a presença de ambos os receptores para IL-1 em várias regiões do sistema nervoso central (SNC) de camundongos (FRENCH et al., 1998).

O terceiro membro da família da IL-1 é o IL-1ra, o qual é um antagonista competitivo altamente seletivo que se liga ao IL-1RI. Contudo, como ele não é capaz de promover a associação do receptor com a AcP, não inicia a transdução de sinais e conseqüentemente bloqueando a ação da IL-1 α e β ; (GREENFEDER et al., 1995).

Quanto à participação da IL-1 na resposta febril, tem sido sugerido que especificamente a IL-1 β constitui o principal mediador da resposta febril (LONG et al., 1990; ROTHWELL, 1991). Esta citocina, natural ou recombinante, induz febre em diferentes espécies animais, seja ela administrada no SNC ou periféricamente (DINARELLO et al., 1984; FARRAR et al., 1987; LONG et al., 1990). Outra observação importante é que camundongos deficientes em IL-1 β apresentam resposta febril reduzida após a administração intraperitoneal (i.p.) de LPS em relação aos não deficientes (KOZAK, et al., 1995). Além disso, o pré-tratamento de animais com o anti-soro para IL-1 β ou com o IL-1ra, inibiu a febre induzida por injeções periféricas de LPS e IL-6, sugerindo sua participação nas

respostas febris induzidas por estes pirogênicos (LeMAY et al., 1990; LUHESHI et al., 1996). Foi constatado, ainda, que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de LPS promove um aumento da expressão de mRNA para IL-1 β , IL-1RI e para a AcP no hipotálamo de ratos (ILYIN, et al., 1998).

Além da IL-1, outra potente citocina pró-inflamatória é o TNF- α . Esta citocina está presente na circulação sanguínea durante a sepse e após a administração de endotoxina em voluntários humanos (CANNON et al., 1990). Esta citocina também é um pirogênio endógeno capaz de induzir febre quando administrada periféricamente ou i.c.v. (DINARELLO et al., 1986).

De maneira geral, os efeitos do TNF- α no organismo podem envolver a ativação de dois tipos de receptores, denominados p55 e p75. Além disso, foi verificada a presença de mRNA constitutivo para o receptor p55 em várias regiões do SNC, o que não ocorre para o receptor p75. No entanto, estímulos imunogênicos promoveram o aumento da expressão para ambos os receptores no SNC. Em relação à resposta febril, estudos apontam para um envolvimento maior do receptor p55 do que do receptor p75. (BENIGNI et al., 1996; SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998).

A IL-6 é uma citocina produzida em grandes quantidades após a administração de PEx e é potente indutora de febre quando administrada no SNC de ratos (SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998; CARTMELL et al., 2000). O pico de aumento nos níveis desta citocina no fluido cérebrospinal (CSF) acompanha o pico da febre em animais experimentais (HOUSSIAU et al., 1988; LeMAY et al., 1990; ROTH et al., 1993). Além disso, a administração de LPS e IL-1 β promovem um aumento nos níveis de IL-6 no CSF, e a imunoneutralização da IL-6 diminuiu a febre induzida por estes mediadores (LeMAY et al., 1990; ROTHWELL et al., 1991).

Os efeitos da IL-6 são mediados no SNC pelo receptor IL-6R, encontrado em condições basais no SNC de ratos. Porém, a administração periférica de LPS, mas não de IL-1 β (intravenosa i.v.), promove o aumento de sua expressão em várias regiões do SNC, com especial importância no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e no hipotálamo (VALLIERES, 1997).

A IL-8, o MIP-1 e a RANTES pertencem a um grupo de citocinas com atividade quimiotática, denominadas quimiocinas. Estas podem ser produzidas e secretadas por vários tipos celulares, tendo efeito regulatório sobre a migração leucocitária (LUSTER, 1998). A administração central de IL-8, MIP-1 α ou MIP-1 β e RANTES induz febre em ratos (ROTHWELL et al, 1990; ZAMPRONIO et al., 1994a; MYERS et al., 1993; MINÃNO et al., 1996; BAJETTO et al., 1999; MELO-SOARES et al., 2006; MACHADO et al., 2007). As quimiocinas produzem seus efeitos biológicos por interagirem com receptores específicos acoplados a proteínas G da superfície celular das respectivas células-alvos (SCHALL, 1991).

As citocinas não são as responsáveis diretas pela alteração no termostato hipotalâmico, uma vez produzidas na periferia, estas citocinas devem traduzir a sua informação para o SNC, através da produção de mediadores centrais, para que ocorra uma alteração no ponto de termorregulação localizado na APO/HA. Embora o mecanismo pelo qual estas citocinas alcançam o SNC não esteja totalmente elucidado, existem várias hipóteses que tentam explicar como ocorre esta comunicação.

Como proteínas com peso molecular variando de 8 a 26 kDa as citocinas circulantes não podem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) (BANKS et al., 1991). No entanto, o SNC possui áreas específicas denominadas órgãos circumventriculares (CVOs), as quais apresentam capilares fenestrados e são, portanto, desprovidas de BHE (BROADWELL et al, 1976). Uma das hipóteses é a de que as

citocinas poderiam entrar no SNC via CVOs, particularmente através do OVLT, visto que a destruição desta estrutura por lesões eletrolíticas reduz a resposta febril induzida por IL-1 β e TNF- α (BLATTEIS et al., 1983; HASHIMOTO et al., 1994).

A segunda hipótese, proposta por BANKS et al. (1991), considera que as citocinas hidrofílicas podem entrar no cérebro através da BHE, através de um sistema específico de transporte saturável, realizado por carreadores específicos. No entanto a hipótese mais aceita é a de que as citocinas atuem nas células endoteliais do SNC estimulando a produção dos mediadores lipofílicos, os quais seriam os responsáveis pelas alterações no termostato hipotalâmico. Dentre estes mediadores estariam as prostaglandinas (PGs) que serão discutidas mais adiante (CAO et al., 1999).

Outra linha de pesquisa investiga a participação de nervos aferentes periféricos na comunicação entre elementos do sistema imune e o SNC. Esses estudos têm levantando a hipótese de que o transporte de sinais inflamatórios da periferia para o SNC, induzindo febre durante a reação inflamatória, não se deve exclusivamente a mecanismos humorais (ROTH, 1999). A vagotomia subdiafragmática inibe respostas controladas pelo cérebro, incluindo a febre, induzida pela administração periférica de LPS ou PE (WATKINS et al., 1995a, WERNER et al., 2003), a indução de RNAm para IL-1 β no cérebro (LAYÉ et al., 1995), a hiperalgesia (WATKINS, 1994) e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (FLESHNER et al., 1995).

Após chegarem ao SNC, estas citocinas devem traduzir a informação nelas contida em um sinal para que ocorra a elevação do termostato hipotalâmico. Aparentemente, não são elas que atuam diretamente sobre o hipotálamo promovendo esta alteração. Muitas evidências sugerem que estas citocinas induzem a produção de mediadores centrais, sendo eles: a prostaglandina (PG)E₂, PGF_{2 α} , fator liberador de corticotrofina (CRF), endotelina (ET) e opióides endógenos.

1.2.2 Mediadores centrais da resposta febril

Os mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e LPS, podem ativar a fosfolipase A₂ e promover uma rápida liberação de ácido araquidônico (AA) que se encontra esterificado na membrana celular (DINARELLO, 1991). Uma vez liberado, o AA, pode ser metabolizado principalmente por duas classes de enzimas, sendo elas as enzimas lipoxigenases ou ciclooxigenases (COX).

As lipoxigenases são uma família de enzimas que catalisam a oxigenação do AA em hidroperóxidos lipídicos denominados hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE). Os HPETE são metabólitos instáveis, metabolizados por várias enzimas. A 5-lipoxigenase, é considerada uma das principais enzimas de metabolização do AA, pois é ela que possibilita a formação dos leucotrienos (LT) (SAMUELSSON et al., 1987). Os LT parecem não participar na indução da resposta febril, uma vez que a injeção de LTB₄, LTD₄ e LTE₄ i.c.v. ou na área pré-óptica do hipotálamo de ratos não promoveu aumento na temperatura retal destes animais (O'ROURKE e RUDE, 1984).

Por outro lado, as enzimas COX oxidam o AA, gerando endoperóxidos cíclicos instáveis, os quais são designados PGG₂ e PGH₂. Através da ação de isomerasas teciduais específicas, a PGH₂ é convertida em PGD₂, PGE₂ ou PGF_{2 α} , ou em prostaciclina (PGI₂) pela ação da enzima de síntese da prostaciclina, ou ainda em tromboxano A₂ (TxA₂) gerado pela enzima de síntese do tromboxano (VANE & BOTTING, 1992; O'NEILL & FORD-HUTCHINSON, 1993; O'BANION, 1999).

Existem duas isoformas da enzima COX que são responsáveis pela produção de PGs. A COX-1 é a isoforma expressa constitutivamente nas células, e responsável pela produção de PGs que atuam em processos fisiológicos, como na proteção da mucosa gástrica, pela diminuição da secreção ácida gástrica e aumento da produção de muco (O'NEILL & FORD-HUTCHINSON, 1993; O'BANION, 1999). Já a isoforma COX-2

tem sua expressão seletivamente aumentada no cérebro após estímulos inflamatórios, como LPS, IL-1 α , IL-1 β e TNF- α . (KÖMHOFF et al., 1997; MAJERUS, 1998; CAO et al., 1997).

Uma constatação muito importante com relação às enzimas que metabolizam o AA foi feita por LI et al. (1999). Utilizando camundongos com deficiência para os genes que codificam ou COX-1 ou COX-2, estes autores observaram que após a injeção periférica de LPS, somente os animais com genes nocauteados para a COX-2 não apresentaram febre, reforçando a importância da isoforma induzida na gênese da febre promovida por este PEx.

Embora a indução de COX-2 pelas citocinas, com conseqüente aumento na produção de PGs, só tenha sido demonstrada na década de 90, a participação destes eicosanóides na resposta febril já havia sido prevista anteriormente. Em 1971, MILTON & WENDLANDT propuseram que a ação antipirética dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) devia-se a sua capacidade de inibir a formação de PGs no SNC em resposta aos PEx e demonstraram, ainda, que a PGE₁, quando injetada no terceiro ventrículo de gatos, induzia febre de forma dose dependente. No mesmo ano, FELDBERG & SAXENA observaram que a PGE₁ induzia febre quando injetada por via i.c.v., não apenas em gatos, como também em ratos e coelhos e que o CSF coletado do terceiro ventrículo de gatos com febre continham níveis elevados de PGs. Posteriormente, diversos estudos confirmaram estes achados, utilizando particularmente ratos e camundongos (revisado por KLUGER, 1991).

A PGE₂, quando administrada pela via i.c.v., induz febre por atuar em neurônios sensíveis a variações de temperatura no hipotálamo, estimulando diretamente a termogênese (MURAKAMI e WATANABE, 1989; DINARELLO, 1991). A PGE₂ pode atuar através da ativação de quatro subtipos de receptores da série-E para prostaglandinas

sendo eles: EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (COLEMAN et al., 1994; USHIKUBI et al., 1995). Dentre estes quatro, os receptores EP₁, EP₃ e EP₄ são expressos na APO/HA (OKA et al., 2000) e parecem ser importantes para o desenvolvimento da resposta febril. A administração por via i.c.v. de PGE₂ ou por via i.v. de IL-1 β ou LPS não foi capaz de induzir febre em camundongos *knockout* para o subtipo EP₃, indicando que este receptor seria importante na gênese da febre (USHIKUBI et al., 1998). OKA et al., (2000) observaram que a administração i.v. de LPS em ratos promoveu um aumento na expressão dos receptores EP₄ no SNC e sugeriram que este receptor estaria envolvido no desenvolvimento da fase inicial da resposta febril induzida por essa toxina. Posteriormente, estes mesmos pesquisadores observaram que camundongos *knockout* para os receptores EP₁ também não desenvolviam resposta febril depois de tratados com LPS (OKA et al., 2003).

No entanto, a PGE₂ não é a única PG que está envolvida na gênese da febre. A PGF_{2 α} é outro eicosanóide derivado do AA que parece ter participação efetiva como um dos indutores da resposta febril. Essa PG também induz aumento da temperatura corporal de ratos e coelhos quando administrada via i.c.v. (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990) e é encontrada em níveis elevados no fluido cerebrospinal de ratos durante a febre induzida por pirogênicos exógenos ou endógenos (COELHO et al., 1995; FABRICIO et al., 2005; MELO SOARES et al., 2006; MACHADO et al., 2007).

A administração via i.p. de indometacina, que é um inibidor não seletivo das enzimas COX e que, conseqüentemente, reduz a produção de PGs, foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela IL-1 β , TNF- α e IL-6 em ratos (SOUZA et al., 2002)

Embora a participação de PGs na resposta febril esteja bem documentada, existem evidências de que algumas citocinas induzem resposta febril em ratos por mecanismos independentes da ação destes eicosanóides. A febre induzida por MIP-1 não foi

modificada pelo tratamento dos animais com ibuprofeno ou indometacina (DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990), e a febre induzida por IL-8 não foi reduzida pelo tratamento dos animais com indometacina (ZAMPRONIO et al., 1994).

A exemplo das PGs, vários peptídeos, são capazes de induzir um aumento na temperatura corporal quando administrados no SNC de animais experimentais. Dentre eles destacam-se o fator liberador de corticotrofina (CRF), endotelina (ET) e os opióides endógenos.

O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos, produzido principalmente por neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico, que atua na glândula pituitária induzindo a síntese de pró-opiomelanocortina (POMC), que é processada em diferentes peptídeos, dentre eles: ACTH, β -endorfina e MSH (VALE et al., 1981; YASUDA et al., 1978; ROTHWELL, 1990).

Sabe-se que a administração intracerebral de CRF modifica a liberação de insulina e glucagon, inibe a ingestão de alimentos, aumenta a atividade simpática. Além disso, quando administrado em pequenas quantidades por via i.c.v. em ratos, o CRF promove um grande e rápido aumento da taxa metabólica, e estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom, o que eleva a temperatura corporal destes animais (BROWN et al., 1982; LeFEUVRE et al., 1987; DIAMANT et al., 1991).

Desta forma, ROTHWELL (1991) sugeriu que os efeitos pirogênicos de citocinas como IL-1 β e IL-6 são mediados por CRF, já que o antagonista do CRF (CRF₉₋₄₁), reverteu o aumento da temperatura corporal e o aumento do consumo de oxigênio induzido por estas citocinas. Entretanto, as respostas da IL-1 α e TNF- α não foram reduzidas pelo antagonista do CRF, demonstrando que embora elas dependam de PGs, não dependem de CRF para sua ação.

Como a febre causada pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ é inibida pelo antagonista de CRF (α -helic CRF₉₋₄₁), diferentemente da resposta febril promovida pela PGE_2 , sugere-se que as respostas da IL-1 β e IL-6 são mediadas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ e que as da IL-1 α e TNF- α são mediadas por PGE_2 (ROTHWELL, 1990). Aparentemente, o efeito pirogênico da IL-8 que, como citado anteriormente, é independente da síntese de PGs, também seja mediado pelo CRF, já que a resposta febril induzida por essa citocina foi inibida pelo antagonista de CRF (ZAMPRONIO et al., 1994).

Outro peptídeo que tem sua expressão aumentada por LPS e por diferentes citocinas (IL-1 e TNF- α) é a endotelina (ET)-1 (EHRENREICH et al., 1990, CORDER et al., 1995; MARSDEN et al., 1992). Este peptídeo que é a isoforma mais conhecida da família, possui ação vasoconstritora potente e participa de vários eventos inflamatórios por ativar receptores específicos ET_A e ET_B (EHRENREICH et al., 1990; RAE & HENRIQUES, 1998).

A administração por via i.v. de ET-1 é capaz de promover um aumento dose-dependente da temperatura corporal de coelhos (KOSHI et al., 1992). FABRÍCIO e cols. (1998) demonstraram que a ET-1, quando administrada por via i.c.v., também é capaz de induzir um aumento da temperatura corporal de ratos. Estes últimos pesquisadores observaram que o bosentan, antagonista dual de receptores ET_A/ET_B, foi capaz de reduzir a resposta febril do LPS em ratos (FABRÍCIO et al., 1998). Aparentemente o receptor envolvido na resposta febril mediada pela ET-1 corresponde ao tipo ET_B, já que tanto as febres induzidas pela injeção central de ET-1 e de LPS por via i.v., foram inibidas pelo antagonista seletivo dos receptores ET_B BQ 788, mas não foram modificadas pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo ET_A, BQ 123 (FABRÍCIO et al., 1998).

Corroborando esses dados, outro estudo dos mesmos autores (FABRÍCIO et al., 2005b) demonstrou que a injeção via i.v. de LPS, em dose que causa febre de longa

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

Avaliando a participação das PGs na resposta febril induzida pela ET-1, FABRÍCIO e cols. (2005a) utilizaram inibidores seletivos da COX-2, o celecoxibe e o lumiracoxibe. O lumiracoxibe, em base molar, foi duas vezes mais potente que o celecoxibe em reduzir a resposta induzida pela ET-1 e pelo LPS. Entretanto, o celecoxibe reduziu os níveis de PGs no CSF induzido tanto pela injeção via i.v. de LPS quanto pela injeção via i.c.v. de ET-1. Contudo, o celecoxibe não alterou a febre induzida pela ET-1, quando administrado em doses que efetivamente reduziram os níveis de PGs. Apoiados nestes resultados, os autores sugeriram que a resposta febril induzida pela ET-1 independe das PGs.

Posteriormente, utilizando vários antagonistas de receptores específicos para mediadores da resposta febril como IL-1ra (IL-1 β), α -helical CRF₉₋₄₁ (CRF); bosentan, BQ-123 e BQ-788 (endotelinas) 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 (FABRÍCIO et al., 2006).

Os peptídeos opióides endógenos também são importantes mediadores envolvidos na resposta febril. Os primeiros relatos de seu envolvimento na regulação da temperatura corporal foram observados com a morfina, um agonista opióide com efeito predominante sobre receptores μ (ADLER et al., 1988; ZIMMERMAN et al., 1990).

Em ratos, a administração tanto periférica como central de morfina apresenta um efeito dual na temperatura corporal em doses baixas causa aumento de temperatura, já em doses altas promove redução da temperatura. É provável que isso ocorre porque a morfina, em doses baixas ativa os receptores μ , que estão associados com respostas que resultam em

ganho de calor e quando em doses altas, este opióide ativa os receptores κ que medeiam respostas de perda de calor (revisado por ADLER et al., 1988).

BLATTEIS et al. (1991), observaram que a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS, TNF- α e IL-6 em cobaias. Além disso, o pré-tratamento por via i.c.v. de ratos com CTAP, um antagonista seletivo para os receptores μ , promoveu uma redução significativa da resposta febril induzida por LPS, TNF- α , IL-6, MIP-1 α e ET-1, demonstrando assim que os peptídeos opióides endógenos, atuando através da ativação dos receptores μ -opióides, são importantes mediadores da resposta febril (HANDLER et al., 1998, BENAMAR et al., 2000, BENAMAR et al., 2002, FRAGA et al., 2008).

1.3 Canabinoides e temperatura corporal

A planta *Cannabis sativa* (canábis) foi uma das primeiras plantas usadas pelo homem para obter fibras têxteis, medicamentos e em rituais religiosos e sociais (SCHULTES, 1969). A planta parece ser originária da China, apesar de outras evidências apontarem para a Ásia Central. O famoso Pen Tsao Ching, farmacopéia escrita em 100 d.C., baseada nas compilações de plantas com propriedades farmacológicas do imperador Shen Nung (2737 a.C.), mostrava que os chineses já conheciam há alguns milênios as propriedades alucinógenas da canábis. Nesses períodos, a utilização da planta estava intrinsecamente ligada ao misticismo e ao curandeirismo.

Os efeitos da canábis em humanos são bem conhecidos e incluem a sensação de euforia, alteração da percepção, sedação, diminuição da memória, efeitos na função motora, analgésica, estimulação do apetite entre outros (BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, 1997).

Atualmente, mais de 60 compostos derivados da canábis foram identificados. O principal princípio psicoativo canabinóide presente na canábis é o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), o qual foi isolado na década de 60 (MECHOULAM et al., 1965).

Em 1990, o receptor canabinóide CB₁ foi clonado do cérebro de ratos (MATSUDA et al., 1990). Além do cérebro de ratos, os receptores CB₁ também foram clonados de tecidos de camundongos e humanos e apresentam uma semelhança de 97 a 99% dos seus aminoácidos entre as espécies (HOWLETT et al., 2002). Posteriormente, em 1993, um segundo receptor canabinóide foi identificado em uma linhagem de células promielocíticas de leucemia humana HL60 (MUNRO et al., 1993). Os receptores CB₂ possuem cerca de 48% de homologia com os receptores CB₁, e a estrutura de ambos é indicativa de receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteínas G (HOWLETT & FLEMING, 1984).

O receptor CB₁ é considerado o receptor acoplado à proteína G mais abundante no cérebro humano (HERKENHAM et al., 1990). Os receptores CB₁ e CB₂ são receptores acoplados à proteína Gi/o e exercem seus efeitos fisiológicos pela inibição da enzima adenilil ciclase, com conseqüente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc (Felder *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1993). Além disso, a ativação de receptores canabinóides pode dar início a uma cascata de ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (BOUABOULA et al., 1995) e sinalização mediada por genes de expressão rápida, como c-FOS (PATEL et al., 1998) e a quinase N-terminal do c-Jun (JNK) (RUEDA et al., 2000). Os receptores CB₁ também podem aumentar a condutância de canais de potássio (Henry e Chavkin, 1995; Mackie *et al.*, 1995) ou diminuir a condutância de canais de cálcio atuando indiretamente pela ativação de proteína G e produção de segundos mensageiros (FELDER et al., 1993; MACKIE et al., 1995; GEBREMEDHIN et al., 1999). Os receptores CB₁ são expressos predominantemente em tecido nervoso tanto da

periferia como do SNC e podem ser encontrados em maiores concentrações em fibras axonais, especialmente localizados em botões terminais de neurônios pré-sinápticos (HAJOS et al., 2000; KATONA et al., 2000).

Fora do sistema nervoso, os receptores CB₁ podem ser encontrados em tecidos periféricos como em células do sistema imune, nas glândulas pituitária e adrenal, medula óssea, pulmões, coração, fígado, timo, e em tecidos de órgãos reprodutivos como a próstata e os testículos (BOUABOULA et al., 1993; GALIEGUE et al., 1995; NOE et al., 2000; PERTWEE, 2005a).

Já a ativação dos receptores CB₂ está ligada a funções do sistema imune onde regulam a liberação de citocinas e a migração de células de defesa, podendo ser encontrados em diversos tecidos linfóides dentro ou fora do SNC (PERTWEE, 2005a). Ensaio de hibridização *in situ* demonstraram a existência de RNAm para os receptores CB₂ no fígado, timo, medula óssea, pâncreas, assim como em macrófagos, monócitos e em uma ampla variedade de células imunes em cultura (LYNN & HERKENHAM, 1994; BUCKLEY et al., 1998). RNAm para os receptores canabinóides CB₂ também foi encontrado em tecido glial de córtex retirados de ratos recém-nascidos, inclusive em concentrações mais elevadas do que os níveis de RNAm para os receptores CB₁ encontrados na mesma preparação, demonstrando uma possível função dos receptores CB₂ no desenvolvimento cerebral (CARLISLE et al., 2002).

Após a descoberta dos receptores, iniciou-se a procura pelos seus ligantes canabinóides endógenos. Surpreendentemente, o primeiro ligante endógeno isolado foi um lipídeo, ao contrário de um peptídeo, como era esperado. Ele foi identificado como o derivado amida do ácido araquidônico com etanolamida e foi denominado anandamida (DEVANE et al., 1992). A anandamida se liga com afinidade moderada e é um agonista

parcial dos receptores CB₁, além de ser um agonista fraco dos receptores CB₂ (DEVANE et al., 1992).

Três anos depois, um segundo ligante endógeno denominado 2-araquidonilglicerol (2-AG) foi identificado, este é capaz de ativar os receptores CB₁ e CB₂ (MECHOULAM et al., 1995).

É interessante ressaltar que os endocanabinóides diferem dos neurotransmissores clássicos, pois não são estocados e liberados por vesículas. Eles são sintetizados e liberados rapidamente pelos neurônios em decorrência da atividade elétrica induzida por despolarização e conseqüente influxo de íons cálcio (DI MARZO et al., 1998). Existem evidências de que a ativação de receptores metabotrópicos possa induzir a síntese neuronal de anandamida independentemente de influxo iônico (GIUFFRIDA et al., 1999). De modo geral, os endocanabinóides são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana que são hidrolisados por fosfolipases às respectivas formas finais dos neurotransmissores (BISOGNO et al., 2005). A formação da anandamida, por exemplo, é realizada pela hidrólise de uma N-acil-fosfatidiletanolamina por uma fosfolipase D específica, enquanto o 2-AG é formado pela hidrólise de um acilglicerol contendo o araquidonato na posição 2 catalisado por uma hidrolase de diacilgliceróis (BISOGNO et al., 2005). Ainda não se tem certeza se a liberação dos endocanabinóides, a partir da membrana neuronal ocorre por simples difusão ou se existe algum mecanismo de difusão passiva ou carreamento por proteínas envolvido neste processo (Di MARZO et al., 1994; PIOMELLI, 2003). Contudo, acredita-se que uma vez sintetizados, os endocanabinóides ajam como mensageiros retrógrados, sendo liberados pela membrana pós-sináptica, difundindo-se para a membrana pré-sinapse e agindo nos receptores canabinóides, muitas vezes diminuindo a probabilidade de liberação de outros neurotransmissores, por

interferirem em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesículas sinápticas (HOFFMAN & LUPICA, 2000).

O processo de inativação dos endocanabinóides ocorre por dois processos cooperativos, a recaptção e a degradação. Embora os endocanabinóides possam se difundir livremente através da membrana plasmática, a recaptção é facilitada por um sistema rápido e seletivo de carreamento presente em neurônios e em células gliais (Di MARZO et al., 1994; BELTRAMO et al., 1997a; HILLARD & CAMPBELL, 1997).

Depois de recaptados, os endocanabinóides são metabolizados por enzimas de degradação específicas para cada ligante. A amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) é responsável pela hidrólise da anandamida a etanolamina e ácido araquidônico e do 2-AG a glicerol e ácido araquidônico (CRAVATT et al., 1996; GOPARAJU et al., 1999). O 2-AG também pode ser hidrolisado por uma lipase de monoacilgliceróis que, ao contrário da FAAH, parece ser específica para este tipo de molécula, dada a sua incapacidade de catalisar a degradação da anandamida (GOPARAJU et al., 1999).

Com relação aos efeitos dos canabinóides na temperatura corporal, existem relatos de médicos árabes que descreviam as preparações da canábis como um bom agente antipirético antes mesmo do século 10. Posteriormente, em 1845, Moreau menciona os efeitos hipotérmicos do *hashish* (WENGER & MOLDRICH, 2002).

O principal efeito relatado sobre a temperatura corporal após a administração do Δ^9 -THC é a redução da temperatura corporal. O Δ^9 -THC produz uma resposta hipotérmica significativa quando administrado por via i.c.v. ou no quarto ventrículo em camundongos, sendo que este efeito é acompanhado por uma diminuição no consumo de oxigênio (FITTON & PETERWEE, 1982), e é antagonizado pelo antagonista de receptores CB₁ SR141716A (COMPTON et al., 1996).

OVADIA et al. (1995) relataram que a administração do agonista canabinóide sintético HU-210 induziu hipotermia após a administração direta na APO/HA de ratos. A administração do WIN 55212-2, um agonista canabinóide mais potente que o Δ^9 -THC, na APO/HA também induziu hipotermia de forma dose dependente em ratos. Esta resposta parece ser mediada por receptores CB₁, pois foi abolida pela administração por via i.m. do antagonista de receptores CB₁ SR141716A, mas não foi alterada pelo antagonista de receptores CB₂ SR144528 (RAWLS et al., 2002).

CRAWLEY et al. (1993) observaram que a administração periférica de altas doses do endocanabinóide anandamida em ratos diminuiu a temperatura corporal. Embora a hipotermia seja a resposta mais relatada com a administração de Δ^9 -THC, existem dados na literatura que sugerem que a administração desta substância pode promover tanto aumento como redução na temperatura, dependendo da dose administrada. Em doses baixas, foi observado aumento da temperatura e, em doses altas, redução da temperatura em ratos e camundongos (revisado por PERTWEE, 1985). Ainda com relação à controversa participação dos endocanabinóides na temperatura corporal, nenhum dado foi encontrado na literatura quanto ao efeito da administração central desses agonistas endógenos.

2 OBJETIVO

Como supracitado, os dados da literatura sugerem que os canabinóides podem promover tanto diminuição como aumento na temperatura corporal. No entanto, existem poucos dados a respeito da participação dos endocanabinóides, principalmente no que se refere aos efeitos centrais destes mediadores, na temperatura corporal.

Sendo assim, o presente estudo avaliou o efeito dos endocanabinóides na temperatura corporal, utilizando agonistas e antagonistas de receptores CB₁ e CB₂ para caracterizar o papel de cada um nesta resposta. Assim também, investigamos a possível participação de prostaglandinas e opióides nesta resposta. Numa etapa posterior, avaliamos ainda a possível contribuição dos endocanabinóides na resposta febril induzida tanto pelo LPS como pelos mediadores pirogênicos endógenos envolvidos no desencadeamento da resposta febril.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais.

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, pesando entre 180-200 g. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 hs) com livre acesso à ração e água.

3.2 Drogas e reagentes

- (*R,S*)-(+)-(2-Iodo-5-nitrobenzoil)-[1-(1-metil-piperidina-2-ilmetil)-1*H*-indol-3-il] metanona (AM1241, TOCRIS, EUA)
- N-(piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (AM251, TOCRIS, EUA)
- 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1*H*-indol-3-il](4-metoxifenil) metanone (AM630, TOCRIS, EUA);
- Antagonista de receptores de IL-1 recombinante de rato (R & D Systems Inc., EUA);
- Araquidoniletanolamida (Anandamida, TOCRIS, EUA);
- Capsazepina (CPZ Sigma Chem. & Co., USA);
- Celecoxib (Celebra[®], Pfizer, Brasil);
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, Brasil);
- Cloridrato de cetamina (Ketamina Agener[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil);
- Dexametasona (Decadronal[®], Prodome Laboratórios, Brasil)
- Endotelina-1 (American Peptide Co., EUA)
- Fator Liberador de Corticotropina (Sigma Chem. Co., EUA)
- Indometacina (Merck, Sharp & Dohme, Brasil)

- Interleucina-1 β recombinante murina (lote n°. BN024121, R & D Systems, Inc., EUA)
- IL-1ra (R & D Systems, Inc., EUA)
- Interleucina-6 recombinante murina (R & D Systems, Inc., EUA)
- Kit de Elisa para dosagem de PGE₂ (Caymam Chemical Co., EUA)
- Kit de Elisa para dosagem de β -endorfina (Bachem, EUA)
- Lidostesim (Probem, Brasil)
- LPS (endotoxina de *E. coli* 0111:B4, Sigma Chem Co., EUA)
- PGE₂ (Sigma Chem Co., EUA)
- PGF_{2 α} (Sigma Chem Co., EUA)
- Fator de necrose tumoral- α (R & D Systems, Inc., EUA)
- URB597 (Caymam Chemical Co., EUA)
- Xilazina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S/A - Espanha)

3.3 Administração dos estímulos e veículos

Anandamida, ACEA, AM251, AM1241, AM630 e URB597 foram diluídos com propilenoglicol a 10% e Tween 80 a 1% e salina administrados por via i.c.v. em um volume de 2 μ l e a anandamida quando administrada i.h. em volume de 0,2 μ l usando uma agulha de microinjeção (30 G curta), conectada a uma microseringa Hamilton (10-25 μ l) por um tubo de polipropileno. A capsazepina foi diluída em etanol a 20%, cremofor a 20% e salina e administrada pó via i.c.v. em um volume de 2 μ l. O celecoxib foi diluído em água e administrado via oral. A indometacina foi diluída em tampão TRIS (Tris(hidroximetil)-aminometano 24,22 g em água q.s.p. 1 litro) e administrada por via i.p. A dexametasona e a naloxona foram diluídos em salina e administrada por via s.c. O LPS,

IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂, PGF_{2 α} , CRF ET-1 e IL-1ra foram diluídos com salina. O LPS foi administrado por via i.p. e as demais drogas por via i.c.v.

AM251 foi administrado 30 minutos antes da AEA, ACEA, LPS, IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂, PGF_{2 α} , CRF e ET-1. AM630, capsazepina, indometacina, celecoxib, naloxone e IL-1ra foram administrados 30 minutos antes da administração de AEA. Já a dexametasona foi administrada uma hora antes da AEA.

As doses das drogas foram obtidas da literatura ou de curvas doses-respostas previamente determinadas no laboratório em estudos anteriores e que não representam o efeito máximo.

3.4 Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral e na área pré-óptica hipotalâmica.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg por via intraperitoneal (ip). Após tricotomia e antissepsia da pele, a cabeça do rato foi imobilizada em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-USA). Foi administrado pela via subcutânea cerca de 0.2 mL de uma solução de lidocaína a 3% com levoarterenol na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para a exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo, inibindo o estímulo doloroso e diminuindo o sangramento.

Após a localização do bregma (tomado como ponto de referência) os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral foram de: -0.8 mm anteroposterior e -1.5 mm lateralmente, com uma inclinação de -3.3 mm da barra incisal. As cânulas esterilizadas, constituídas de segmentos de agulhas hipodérmicas BD, com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula

guia, fixada ao estereotáxico e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2.5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no atlas de PAXINOS & WATSON (1997).

Já para a implantação na APO/HA as coordenadas a partir do bregma foram: 0.6 mm lateral, 7.7 mm anteroposterior com uma inclinação de -3.0 mm da barra incisal. As cânulas esterilizadas, constituídas de segmentos de agulhas hipodérmicas BD, com 15 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro, foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotáxico e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 6.5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no atlas de PAXINOS & WATSON (1997).

3.5 Determinação da temperatura corporal.

A determinação da temperatura corporal foi realizada à temperatura ambiente de 28° C, através da inserção de uma sonda (YSI, n° 402, USA) conectada a um teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA) a 4 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 desse procedimento duas vezes no dia anterior ao experimento, a fim de minimizar variações de temperatura induzidas pelo estresse decorrente do manuseio.

3.6 Determinação da temperatura da pele (cauda) e cálculo do índice de perda de calor.

A temperatura da cauda foi medida por meio de uma sonda posicionada na superfície lateral do primeiro terço distal da cauda. A sonda foi fixada à cauda e isolada termicamente com a utilização de uma fita adesiva de 2 a 3 cm de largura envolta por uma

fita isolante. Um pedaço de fita micropore foi colocado sobre o local onde a sonda foi inserida, para que não ocorresse irritação da pele cauda do animal e facilitar a inserção e retirada da sonda. Para o cálculo do índice de perda de calor (IPC) levamos em consideração a temperatura retal (T_r) dos animais, a temperatura da pele da cauda (T_p) e a temperatura ambiente (T_a) sendo a seguinte formula: $IPC = (T_p - T_a) \cdot (T_r - T_a)^{-1}$. Os limites teóricos para o IPC são: 0 (vasoconstrição máxima) e 1 (vasodilatação máxima).

3.7 Coleta do fluido cerebrospinal (CSF)

A técnica de coleta de CSF foi padronizada segundo o método descrito por CONSIGLIO & LUCION (2000). O animal foi anestesiado com pentobarbital (40 mg kg⁻¹, i.p.) e fixado ao aparelho estereotáxico. A cabeça foi colocada no plano de fixação dos incisivos superiores com o occipital posicionado quase no plano horizontal. O corpo do animal foi deitado por baixo das barras auriculares para que o tórax ficasse posicionado verticalmente. Com o animal nesta posição, é possível a visualização de uma pequena depressão entre a protuberância occipital e o processo espinhoso da vértebra. Um “scalp” conectado a uma seringa de 1 ml foi inserido verticalmente na depressão até atingir a cisterna magna. A correta colocação da agulha é percebida por meio da mudança de resistência durante o percurso. Com uma leve aspiração o CSF pode ser coletado no “scalp”. Um volume variável de 30 a 100 µl de CSF foi coletado e transferido para um tubo plástico do tipo “Eppendorf” mantido em gelo até que as amostras de CSF fossem centrifugadas a 1300 g durante 15 min e estocadas a -70°C até o momento do ensaio. As amostras que foram contaminadas com sangue não foram utilizadas.

3.8 Determinação da concentração de PGE₂ e β-endorfina no fluido cerebrospinal

A concentração de PGE₂ e de β-endorfina no CSF foi determinadas por meio de ensaio imunoenzimático usando “kits” comerciais (PGE₂, Cayman Chemical e β-endorfina, Bachem).

3.9 Análise estatística

As respostas febris foram avaliadas pela variação da temperatura retal dos animais em °C e expressas como média ± EPM da variação entre as médias das temperaturas basais e a diferentes tempos após a injeção do estímulo (variação da temperatura retal - ΔT_c).

Os dados relativos à variação da temperatura corporal dos animais foram submetidos à análise de variância “ANOVA” de duas vias seguido pelo teste post hoc de Bonferroni, ao passo que os dados relativos à concentração de PGE₂ e β-endorfina foram submetidos a análise de ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%. Para realização da análise estatística usou-se o programa “Graph Pad Prism[®] 4.0”.

4 RESULTADOS

4.1 - Efeito da administração por via i.c.v. e i.h. de anandamida na temperatura corporal, na pele da cauda e IPC

O primeiro passo deste estudo foi avaliar o efeito dos endocanabinóides sobre a temperatura corporal. A administração de anandamida por via i.c.v. promoveu um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente. Este aumento teve início a partir da 2^a. h após o tratamento para as doses de 0,1, 1 e 10 µg e o pico da resposta para estas doses ocorreu na 5^a. h, perdurando até 6^a. h após o tratamento. A dose de 0,01 µg não promoveu aumento significativo da temperatura corporal (Figura 1). Neste experimento selecionamos a dose de 1 µg para os demais experimentos.

A administração por via i.c.v. de anandamida 1 µg promoveu aumento da temperatura corporal (Figura 2A) precedido e acompanhado por uma redução da temperatura da pele da cauda (Figura 2B). A redução da temperatura da pele da cauda iniciou-se na primeira meia hora após a administração, sendo que a menor temperatura foi registrada em 1,5 h após o tratamento, mantendo-se estável neste patamar até a 6^a. h.

A administração por via i.c.v. de anandamida 1 µg promoveu uma redução significativa no IPC. Essa redução começou a partir da 1^a. h e o pico desta resposta ocorreu em 1,5 h, perdurando até a 6^a. h após o tratamento (Figura 3).

A administração de anandamida por via i.h. promoveu um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente. Este aumento teve início a partir da 1^a. h para a dose de 100 ng e em 1,5 h para as doses de 1 e 10 ng após o tratamento, já o pico da resposta para estas doses ocorreu na 4^a. h, perdurando até o final do experimento para as doses de 10 e 100 ng e até a 5^a. h após o tratamento para a dose de 1 ng. A dose de 0,1 ng não promoveu aumento significativo da temperatura corporal (Figura 4).

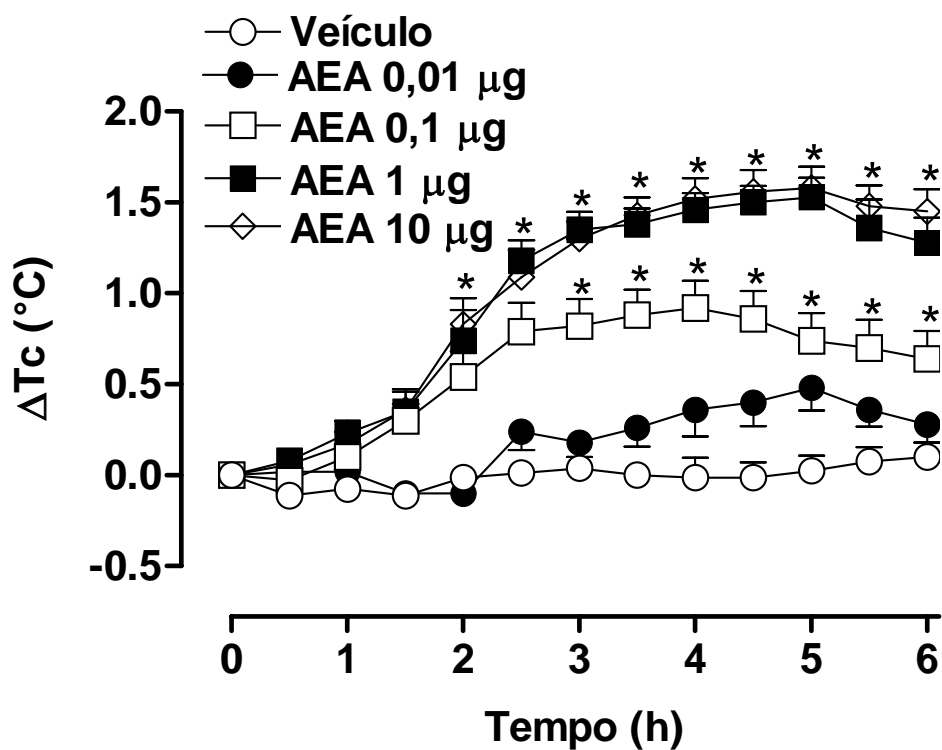


Figura 1: Efeito da administração por via i.c.v de anandamida na temperatura corporal. Os animais receberam veículo 2 μl , por via i.c.v. ou anandamida nas doses de 0,01, 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais ($n=8-10$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p<0,05$ (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

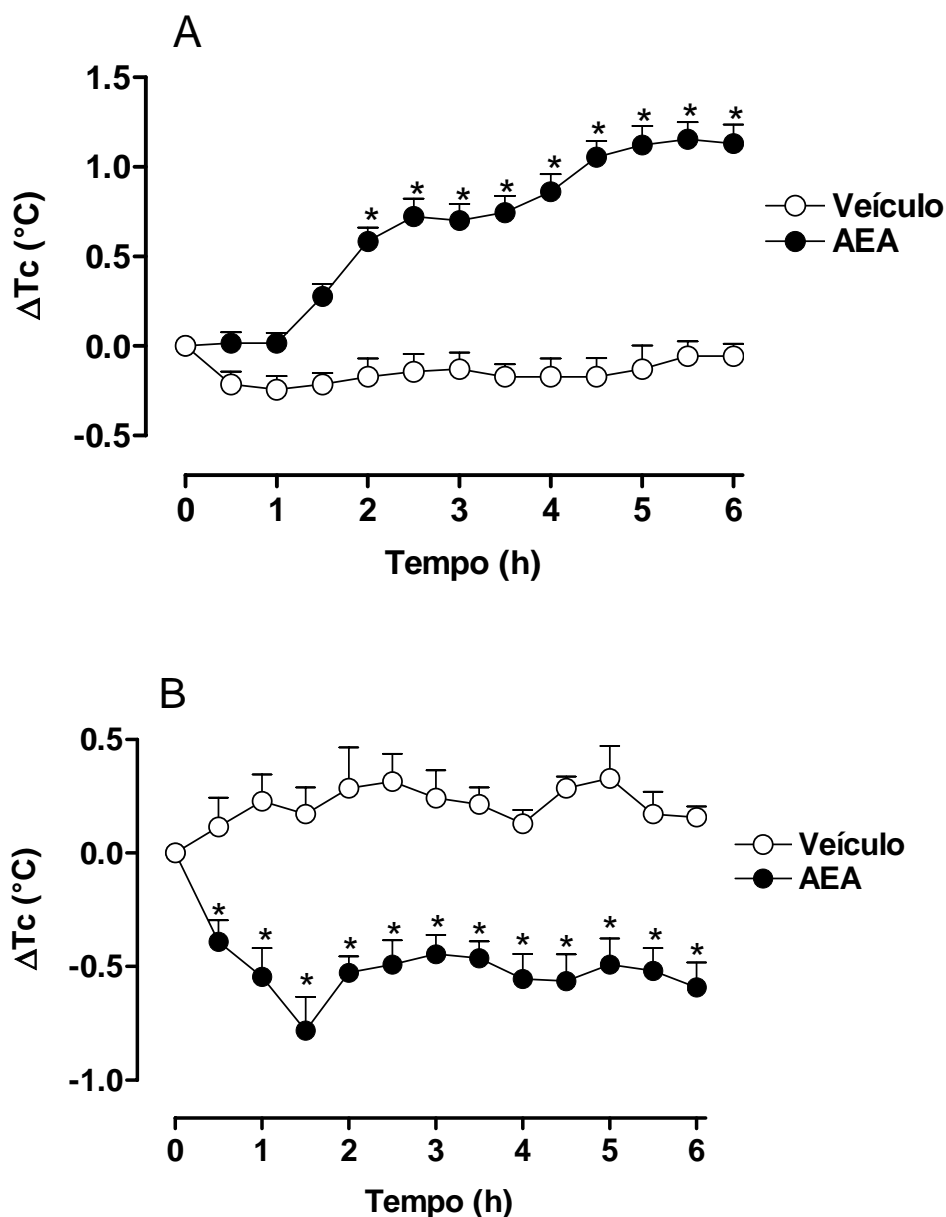


Figura 2: Efeito da administração por via i.c.v. de anandamida na temperatura corporal (A) e da pele da cauda (B). Os animais receberam veículo 2 μ l, por via i.c.v. ou anandamida na dose de 1 μ g/2 μ l, por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais (n=7-10). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

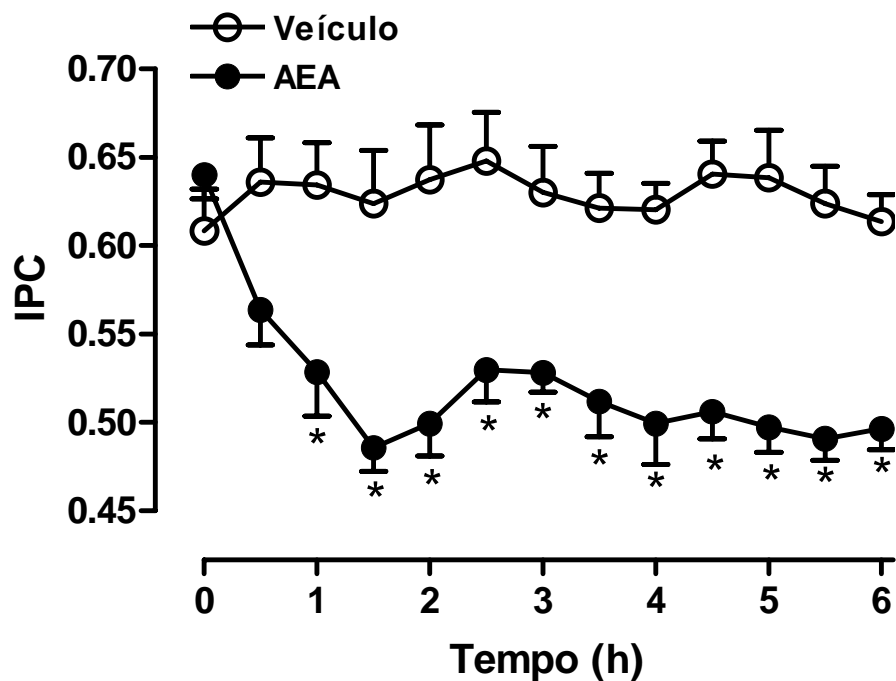


Figura 3: Efeito da administração por via i.c.v de anandamida no índice de perda de calor (IPC). Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v. ou anandamida 1 μ g/2 μ l, por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação do IPC dos animais (n=7-10). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

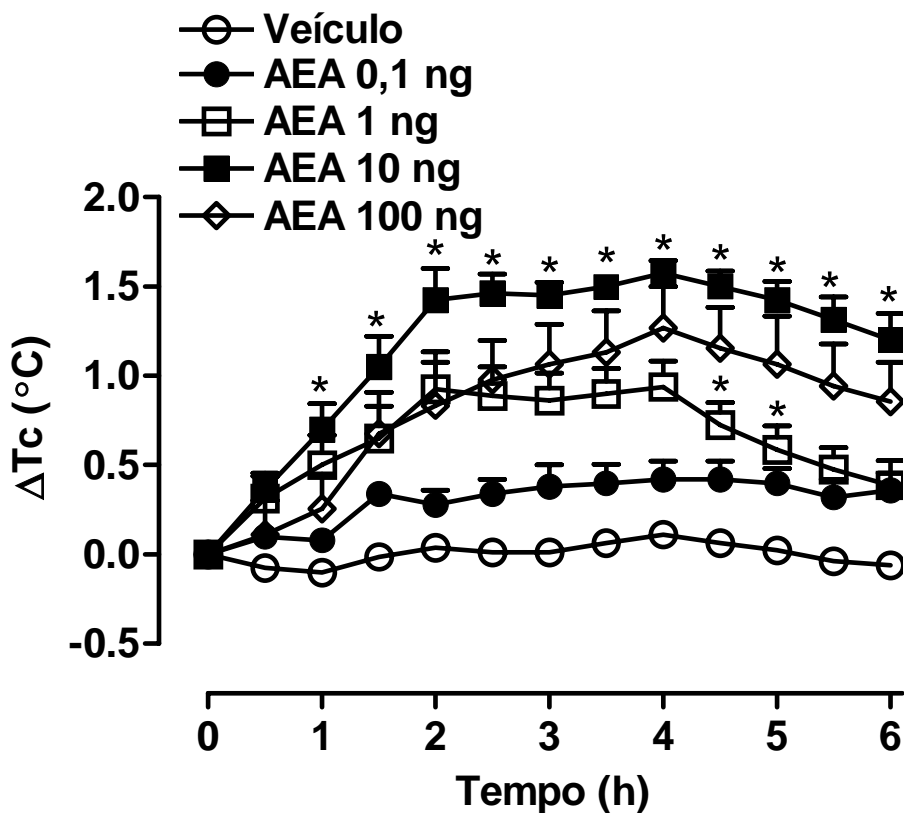


Figura 4: Efeito da administração por via i.h. de anandamida na temperatura corporal. Os animais receberam veículo 0,2 μ l por via i.h. ou anandamida nas doses de 0,1, 1, 10 e 100 ng/0,2 μ l, por via i.h. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais (n=7-9). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

4.2 - Efeito da administração por via i.c.v. de URB597 na temperatura corporal

Posteriormente foi avaliado se a inibição da enzima FAAH, responsável pela degradação dos endocanabinóides, seria capaz de alterar a temperatura corporal.

A administração por via i.c.v. de URB597, um inibidor da enzima FAAH, promoveu um aumento da temperatura corporal descrevendo uma curva em forma de sino. Este aumento teve início a partir de 1,5 h após o tratamento para a dose de 0,1 ng e o pico da resposta para esta dose ocorreu na 5^a. h, perdurando até o final do experimento. O aumento de temperatura para a dose de 1 ng ocorreu em 2,5 h após o tratamento e o pico da resposta ocorreu na 6^a. h após o tratamento. O aumento de temperatura para as doses de 0,01, 10, 100 e 1000 ng ocorreu na 3^a. h após o tratamento sendo que o pico da resposta ocorreu na 4^a. h, todas perduraram até a 6^a. h. Somente a dose de 0,001ng não promoveu aumento significativo da temperatura corporal (Figuras 5A e 5B). A figura 5C representa a média de temperatura na 5^a. h após o tratamento.

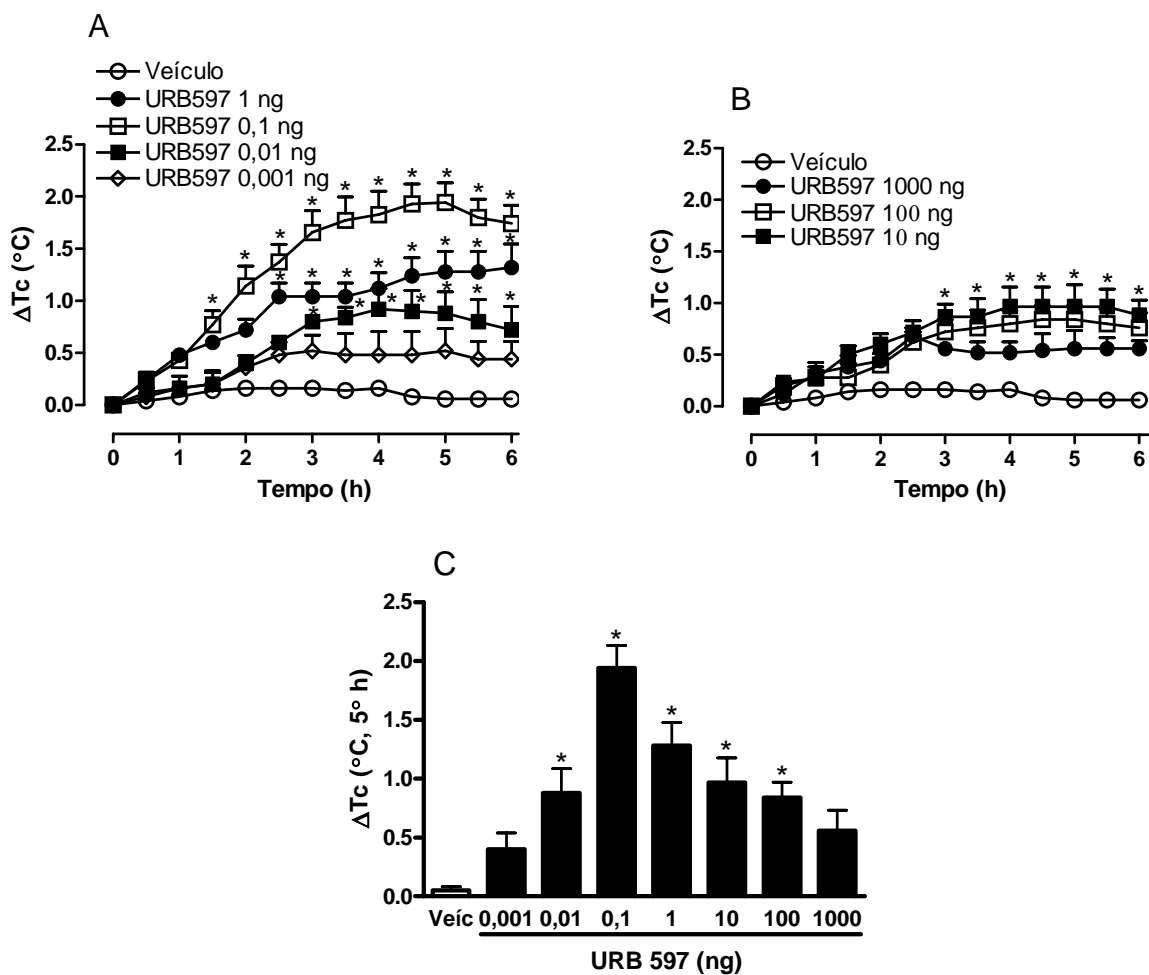


Figura 5: Efeito da administração por via i.c.v de URB597 na temperatura corporal. Os animais receberam veículo 2 μ l ou URB597 nas doses de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ng/2 μ l, por via i.c.v (Figuras A e B). A figura C representa o efeito do URB 597 sobre a temperatura corporal na 5^a. h. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

4.3 - Efeito do tratamento com AM251, AM630 e capsazepina no aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida

Como a anandamida é capaz de ativar os receptores CB₁, CB₂ e vanilóides (DEVANE et al., 1992), investigou-se qual destes seria responsável pelo aumento da temperatura corporal induzido por este endocanabinóide.

A administração por via i.c.v. de anandamida 1 µg/2 µl promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 2^a. h após o tratamento, com pico da resposta na 5^a. h e sustentável até a 6^a. h após o tratamento. O pré-tratamento dos animais com AM251, antagonista seletivo dos receptores CB₁, nas doses de 5 e 10 µg/2µl, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pela anandamida a partir da 2^a. h após o tratamento permanecendo esta redução até a 6^a. h, por sua vez, a dose de 1 µg de AM251 não promoveu redução significativa na resposta febril induzida pela anandamida. A administração de AM251 10 µg sozinho não promoveu alterações significativas na temperatura corporal dos animais (Figura 6). Neste experimento selecionamos a 5 µg de AM251 para os demais experimentos.

O pré-tratamento dos animais com AM630, antagonista seletivo dos receptores CB₂, na dose de 10 µg/2 µl, por via i.c.v. não modificou a temperatura corporal dos animais quando administrado sozinho e nem o aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida (Figura 7).

O pré-tratamento dos animais com capsazepina, antagonista dos receptores vanilóides, nas doses de 1, 3 e 10 µg/2 µl, por via i.c.v. não modificou o aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida. A administração de capsazepina 10 µg sozinha não promoveu variações significativas na temperatura corporal dos animais (Figura 8).

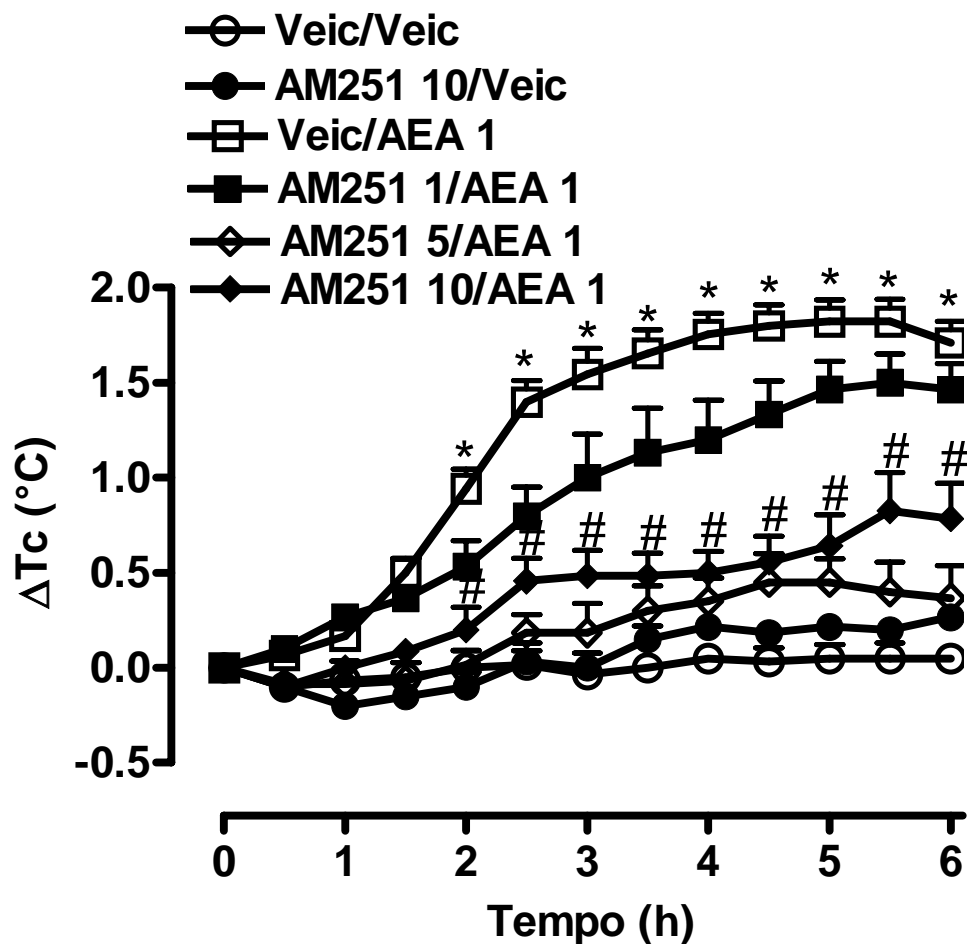


Figura 6: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam veículo 2 μl por via i.c.v ou AM251 1, 5 e 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ por via i.c.v, após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais (n=5-9). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veic/Veic, $p < 0,05$. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veic/AEA, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

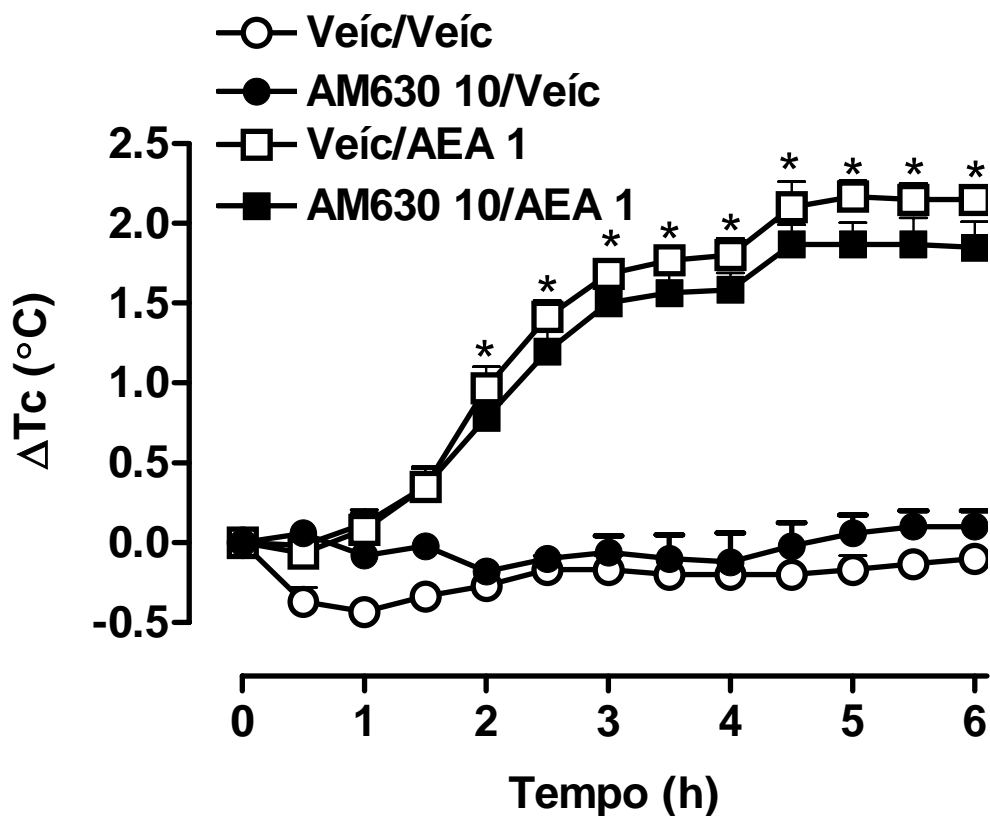


Figura 7: Efeito do AM630 sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v ou AM630 10 μ g/2 μ l por via i.c.v, após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/Veíc $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

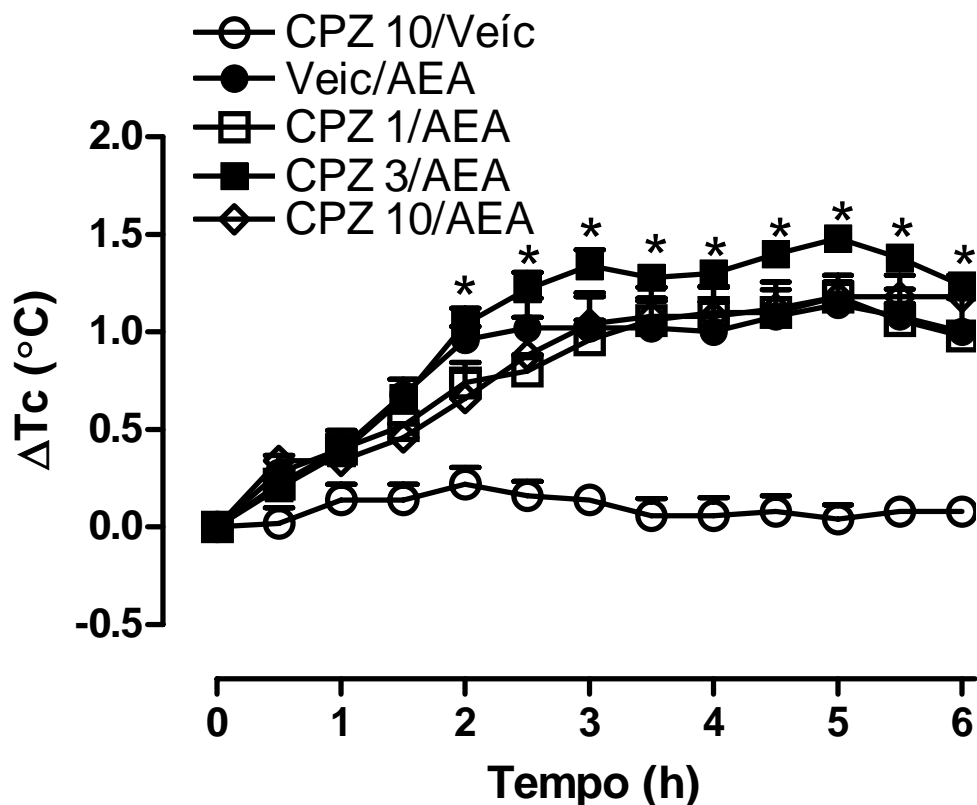


Figura 8: Efeito do capsazepina sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v. ou capsazepina 1, 3 e 10 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo CPZ 10/Veíc $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

4.4 - Efeito da administração i.c.v. dos agonistas seletivos dos receptores CB₁ e CB₂ ACEA e AM1241 respectivamente

Foi avaliado também, o efeito da administração central de agonistas canabinóides seletivos sobre a temperatura corporal.

A administração por via i.c.v. de ACEA, agonista seletivo dos receptores CB₁, promoveu um aumento da temperatura corporal descrevendo uma resposta em forma de sino. Este aumento teve início a partir de 3^a. h para a dose de 0,01 µg e o pico da resposta para esta dose ocorreu na 5^a. h, perdurando até a 6^a. h após a administração da droga. O aumento de temperatura para as doses de 0,1 e 1 µg ocorreu a partir de 3,5 h sendo o pico da resposta em 4 e 3,5 h respectivamente, somente a resposta da dose de 0,1 perdurou até a 6^a. H após a administração da droga. A dose de 0,001 µg não promoveu aumento significativo da temperatura corporal (Figura 9A). A figura 9B representa a média de temperatura na 5^a. h após a administração da droga. O pré-tratamento dos animais com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v., dose esta que foi capaz de abolir a resposta febril da AEA, reduziu a febre induzida pelo ACEA 0,01 µg, por via i.c.v. a partir da 3^a. h permanecendo esta redução até a 6^a. h (Figura 10).

A administração de AM1241, agonista seletivo dos receptores CB₂, nas doses de 0,01, 0,1 e 1 µg/2 µl, por via i.c.v., não promoveu alteração significativa na temperatura corporal dos animais (Figura 11).

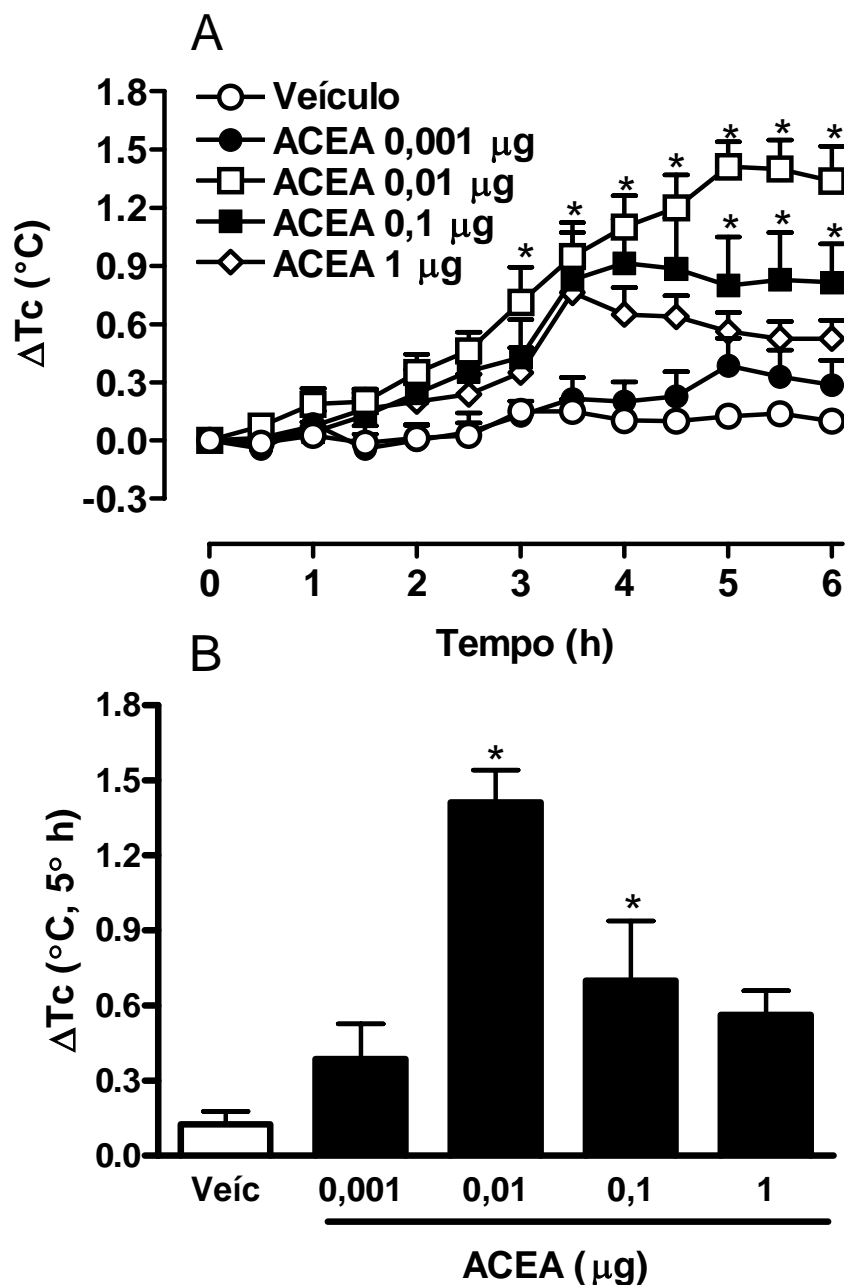


Figura 9: Efeito da administração por via i.c.v de ACEA na temperatura corporal. Os animais receberam veículo 2 μl ou ACEA nas doses de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. (Figura A). A figura B representa o efeito do ACEA sobre a temperatura corporal na 5^a. h. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais (n=8-9). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

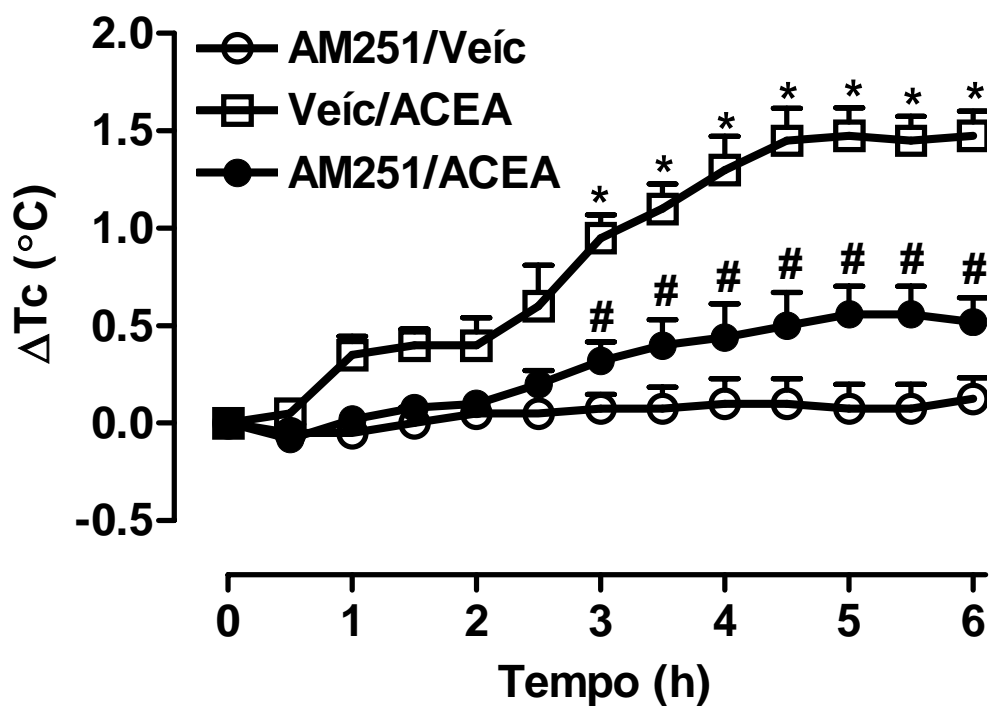


Figura 10: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pelo ACEA. Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v. ou AM251 5 μ g/2 μ l, i.c.v, após 30 minutos os animais receberam ACEA 0,01 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Veíc. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/ACEA p<0,05. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

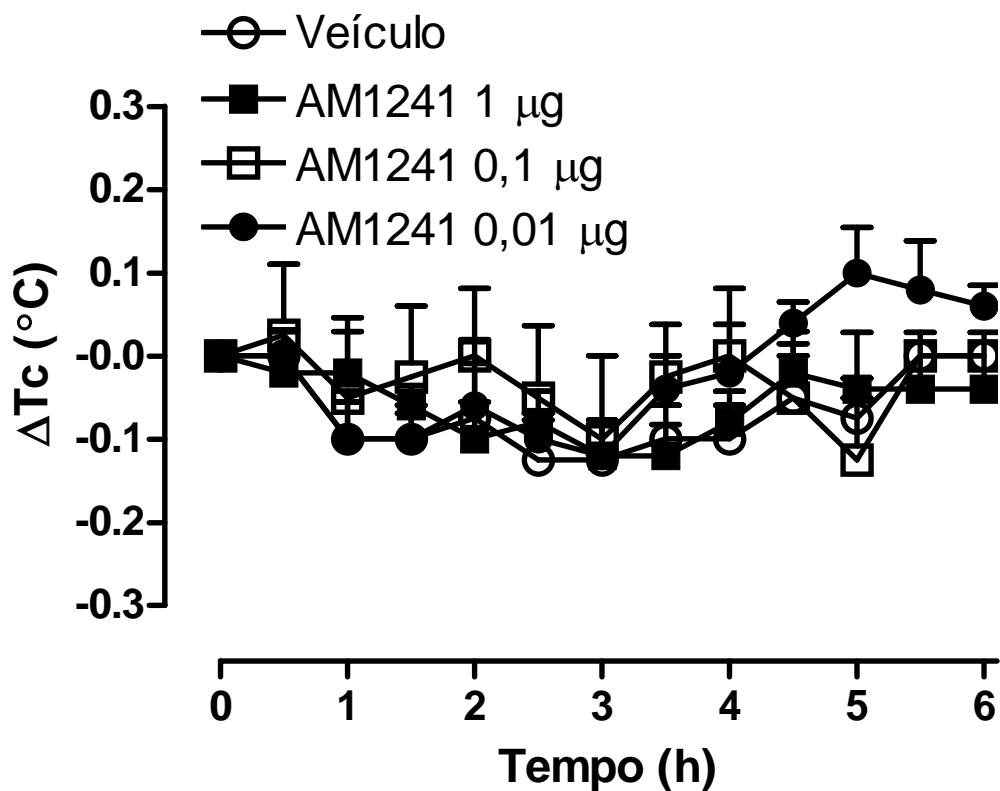


Figura 11: Efeito da administração i.c.v de AM1241 na temperatura corporal. Os animais receberam veículo 2 μl por via i.c.v. ou AM1241 nas doses de 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal dos animais (n=6)

4.5 – Participação de prostaglandina na resposta febril induzida pela anandamida

O próximo passo foi avaliar se a anandamida induz febre diretamente ou se ela depende da síntese e liberação de outros mediadores para induzir esta resposta.

Para tanto, inicialmente investigou-se a possível participação de prostaglandinas na resposta febril induzida pela anandamida. A anandamida promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 2^a. h, com pico da resposta na 5^a. h e sustentável até a 6^a. h após o tratamento. A administração de indometacina, um inibidor não seletivo das enzimas COX, sozinha 2 mg/kg, por via i.p. não modificou a temperatura corporal dos animais. O pré-tratamento com indometacina nesta dose reduziu a resposta febril induzida pela anandamida a partir de 2,5 h até 6^a. h após tratamento (Figura 12).

A administração de celecoxib, um inibidor seletivo da enzima COX-2, 5,0mg/kg, por via v.o. não modificou a temperatura corporal dos animais quando administrado sozinho. Já o pré-tratamento com celecoxib nesta dose reduziu a resposta febril induzida pela anandamida com início na 3^a. h perdurando até 6^a. h após o tratamento (Figura 13).

Anandamida 1 µg/2 µl, por via i.c.v. foi capaz ainda, de aumentar a concentração de PGE₂ no CSF na quarta hora após a sua administração. Por sua vez, o pré-tratamento com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v. aboliu este aumento. A administração de AM251 5 µg sozinho não promoveu alteração significativa na concentração de PGE₂ no CSF (Figura 14).

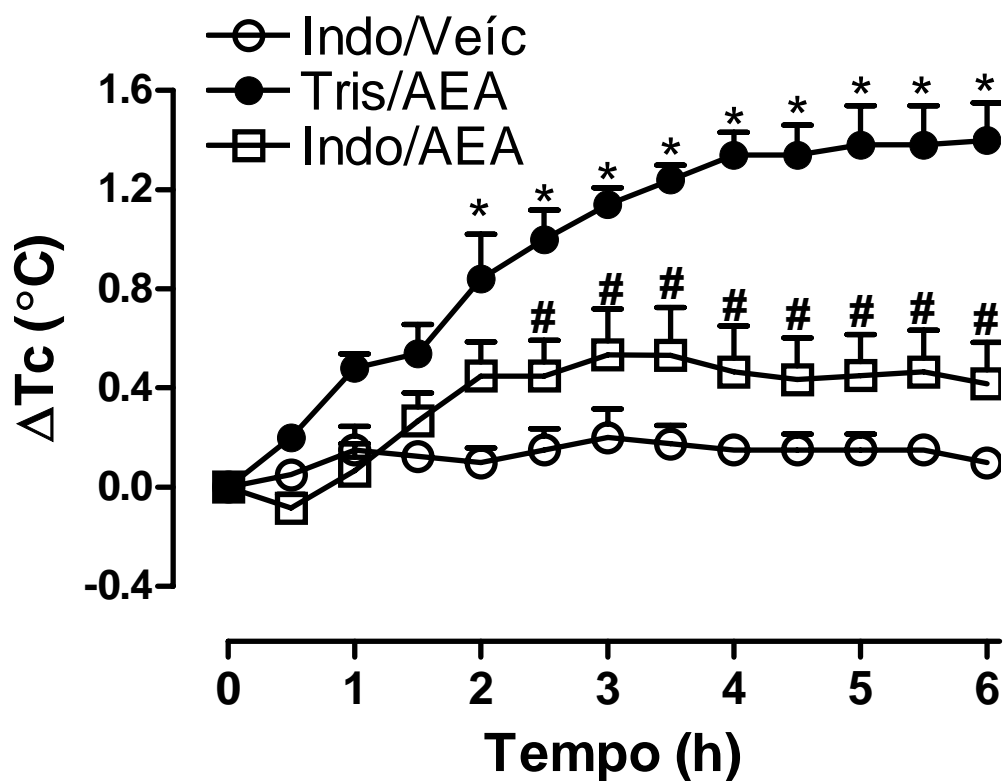


Figura 12: Efeito da indometacina sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam TRIS estéril 1 ml/kg ou indometacina 2 mg/kg, por via i.p., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais (n=6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Indo/Veíc; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Tris/AEA $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

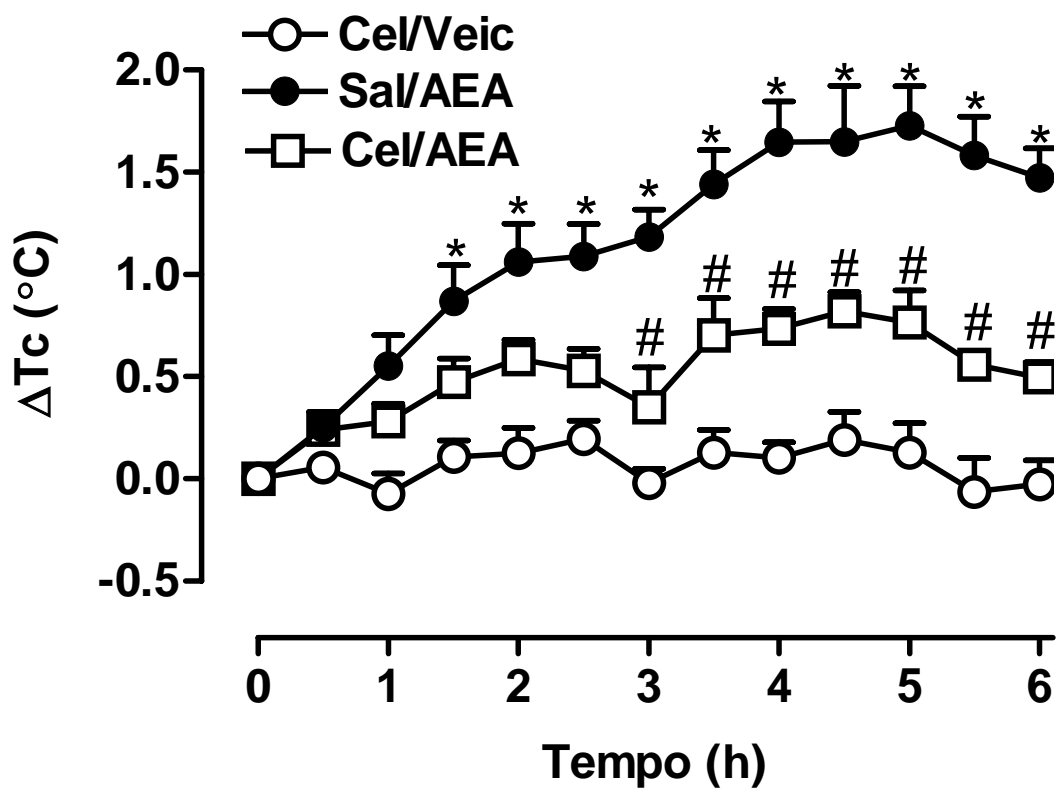


Figura 13: Efeito do celecoxib sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam salina estéril ou celecoxib 5 mg/kg por via v.o. , após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Cel/Veic; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Sal/AEA, $p<0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

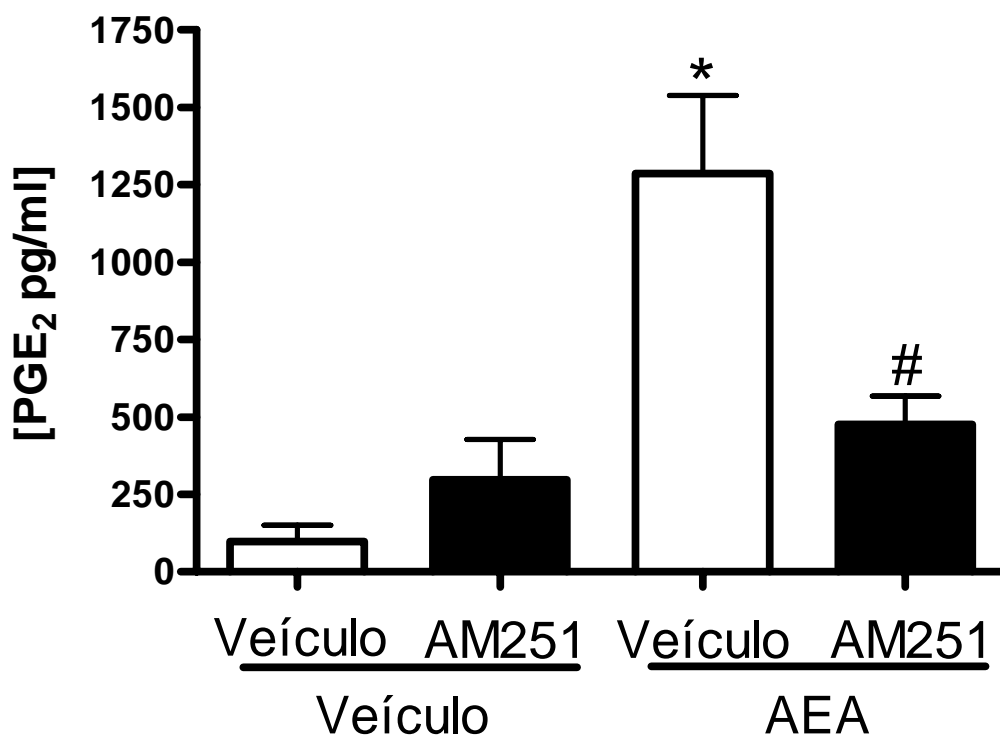


Figura 14: Efeito do AM251 e anandamida nos níveis de PGE₂ no CSF. Os animais receberam veículo 2 μ l i.c.v ou AM251 5 μ g/2 μ l, por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação na concentração de PGE₂ promovida pela anandamida após a quarta hora de tratamento (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Veíc. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/AEA, $p < 0,05$. (ANOVA de uma via e Tukey)

4.6 - Participação de peptídeos opióides endógenos na resposta febril induzida pela anandamida

A anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 2^a. h, com pico da resposta na 5^a. h e sustentável até a 6^a. h após o tratamento. A administração de naloxona 1 mg/kg, s.c. não modificou a temperatura corporal dos animais quando administrado sozinho. Já o pré-tratamento com naloxona nesta mesma dose aboliu a resposta febril induzida pela anandamida (Figura 15).

Por sua vez, a administração de anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. promoveu um aumento significativo na concentração de β -endorfina no líquido cerebrospinal na 4^a. h após o tratamento. A administração de AM251 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. não modificou a concentração de β -endorfina no CSF dos animais quando administrado sozinho. Já o pré-tratamento com AM251 nesta mesma dose reduziu o efeito da anandamida sobre a concentração de β -endorfina no CSF (Figura 16).

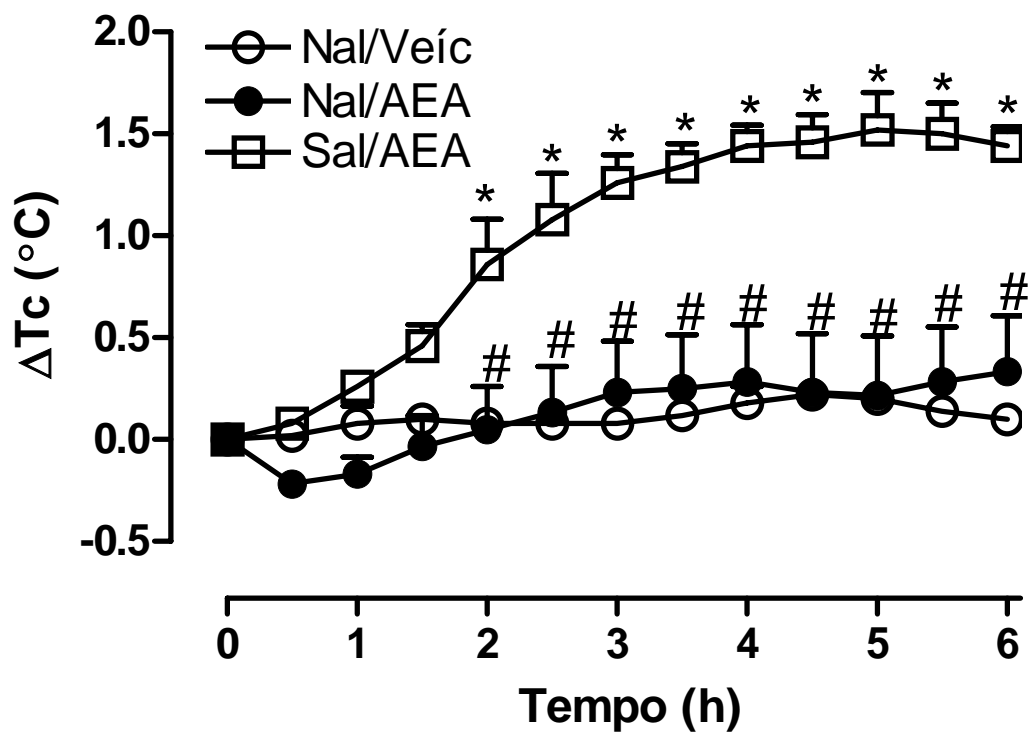


Figura 15: Efeito da naloxona sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam salina estéril ou naloxona 1 mg/kg por via s.c., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais (n=6-7). * Representa diferença significativa em relação ao grupo Nal/Veic; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Sal/AEA $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

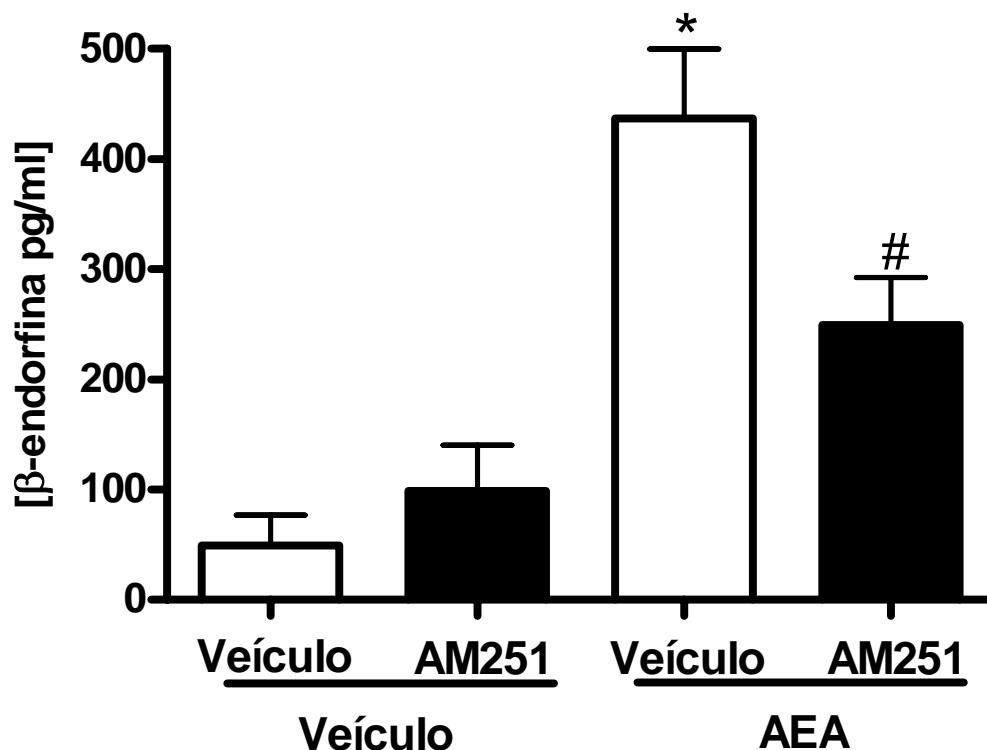


Figura 16: Efeito do tratamento com AM251 e anandamida na concentração de β -endorfina no fluído cerebrospinal. Os animais receberam veículo ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da concentração de β -endorfina no CSF na 4^a. h após tratamento (n=4-5). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/AM251; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/AEA $p < 0,05$. (ANOVA de uma via e Tukey).

4.7 - Efeito do tratamento com AM251 no aumento da temperatura corporal induzido pelo LPS e das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6

Posteriormente investigou-se a participação de endocanabinóides na resposta febril desencadeada tanto pelo pirogênio exógeno, LPS como dos pirogênios endógenos IL-1 β , TNF- α e IL-6.

A administração do pirogênio exógeno, LPS 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por via i.p. promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 1^a. h, com pico da resposta na 2^a. h e sustentável até 6^a. h após o tratamento. O pré-tratamento dos animais com AM251 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pelo LPS a partir de 1,5 h até a 6^a. h após tratamento (Figura 17).

A administração de IL-1 β 3 $\text{ng}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 min., com em 1,5 h e sustentável até a 6^a. h após a administração da droga. O pré-tratamento com AM251 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pela IL-1 β a partir da 1^a. h até a 6^a. h após tratamento (Figura 18).

O TNF- α 250 $\text{ng}/2 \mu\text{l}$ por via i.c.v., por sua vez, promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 1^a. h, com pico da resposta na 3^a. h e sustentável até a 6^a. h após a administração da droga. O pré-tratamento com AM251 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pelo TNF- α a partir da 1^a. h até a 6^a. h após tratamento (Figura 19).

Já a IL-6 250 $\text{ng}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 1,5 h, com pico da resposta em 3,5 h e sustentável até 5,5 h. O pré-tratamento com AM251 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pela IL-6 a partir da 2^a. h até a 5,5 h após tratamento (Figura 20).

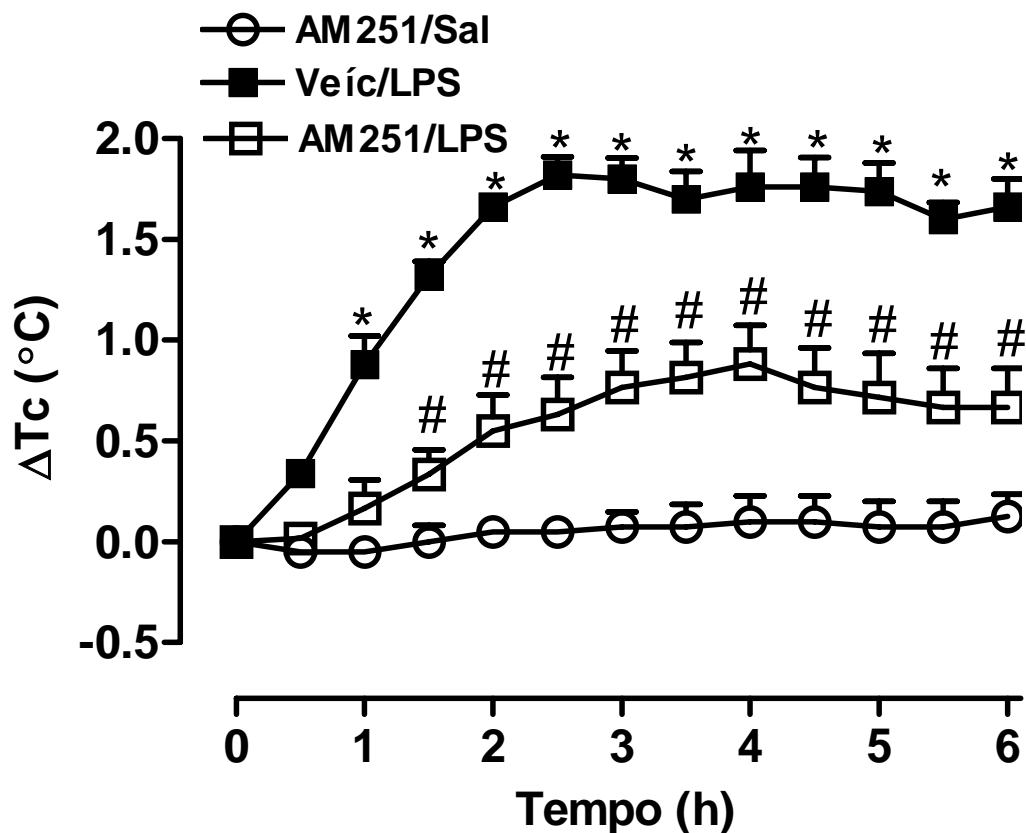


Figura 17: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pelo LPS. Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v. ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam LPS 50 μ g/kg ou salina estéril 1 ml/kg por via i.p. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/LPS, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

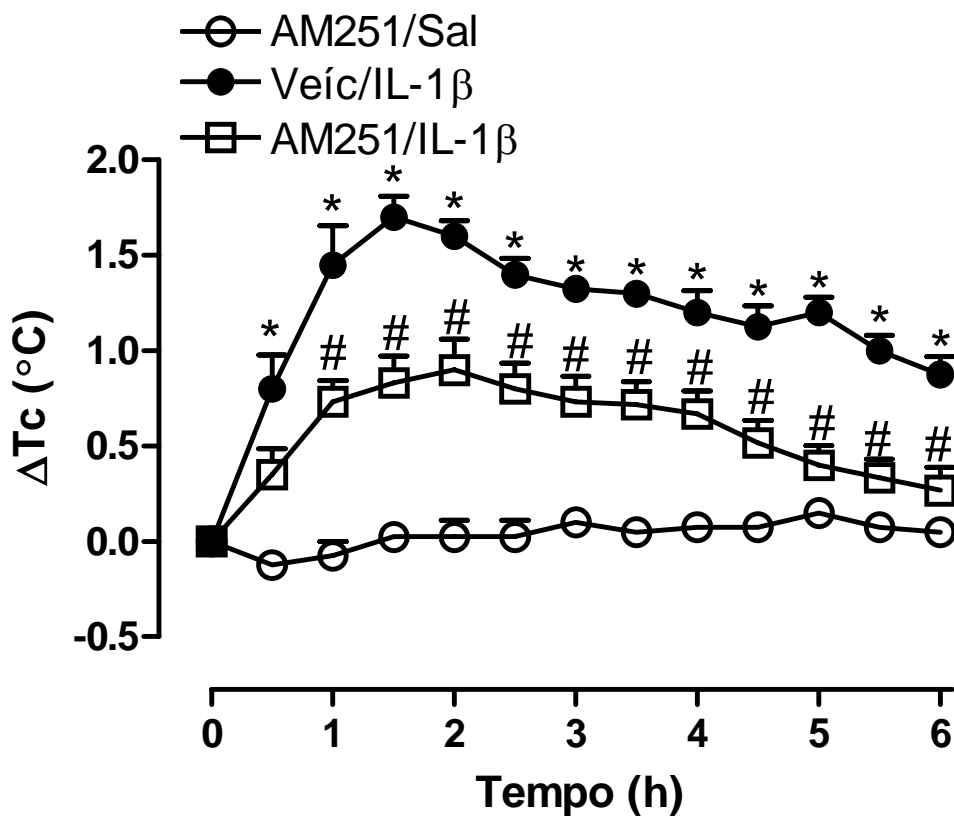


Figura 18: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela IL-1 β . Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v, após 30 minutos os animais receberam IL-1 β 3 ng/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/IL-1 β , p<0,05. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

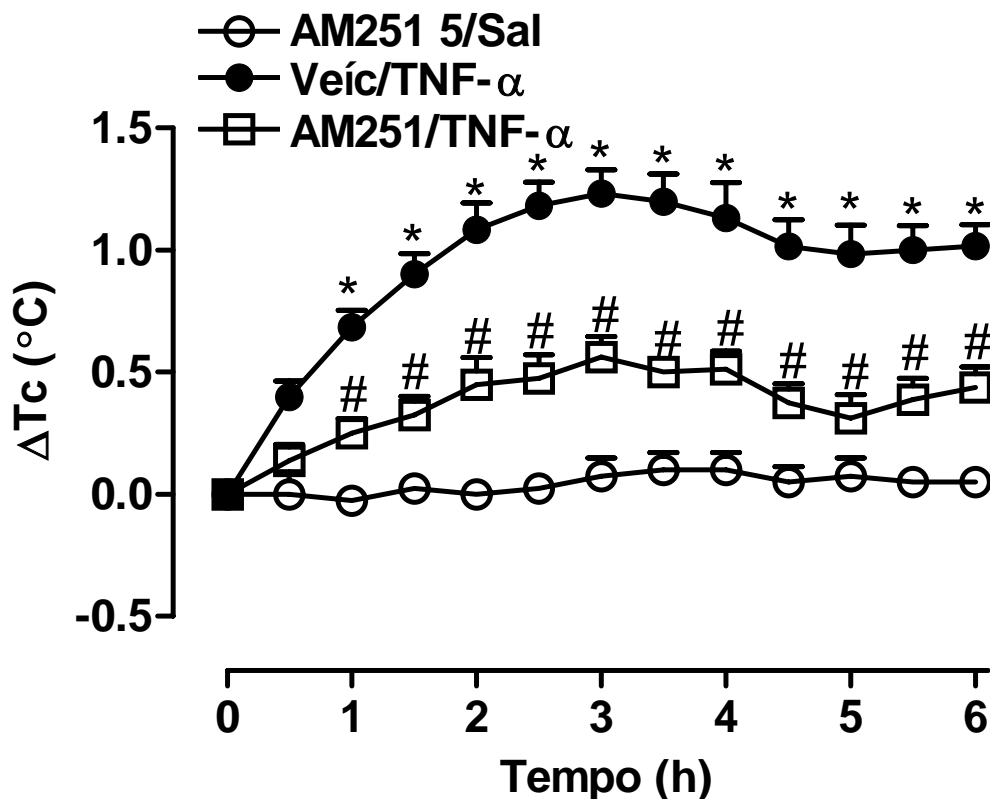


Figura 19: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α . Os animais receberam veículo 2 μ l por via i.c.v ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v, após 30 minutos os animais receberam TNF- α 250 ng/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/TNF- α , p<0,05. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

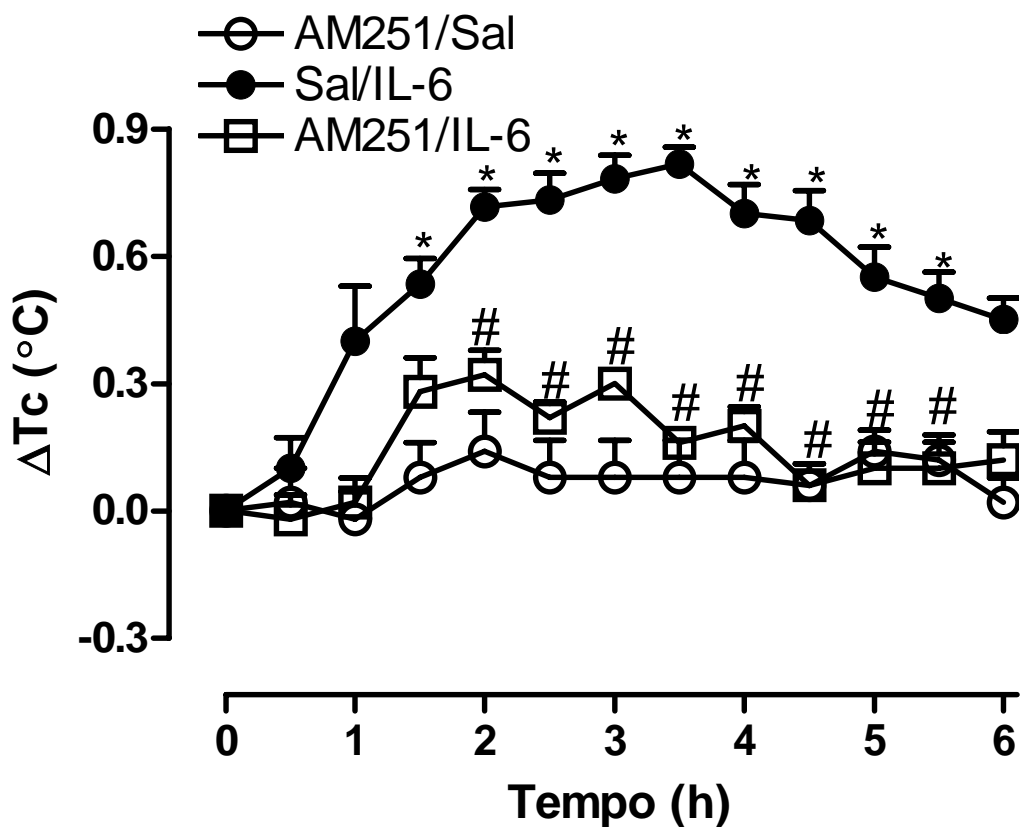


Figura 20: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela IL-6. Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam IL-6 300 ng/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veic/IL-6, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

4.8 - Efeito do tratamento com AM251 no aumento da temperatura corporal induzido pelos mediadores centrais PGE₂, PGF_{2α}, CRF e ET-1

O passo seguinte foi investigar se os endocanabinóides participam da resposta febril dos mediadores pirogênicos centrais PGE₂, PGF_{2α}, CRF e ET-1.

A administração de PGE₂ 250 ng/2 µl por via i.c.v. promoveu um rápido e efêmero aumento da temperatura corporal a partir de 30 minutos, sendo este o pico da resposta. O pré-tratamento com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v. não foi capaz de reduzir a febre induzida pela PGE₂ após tratamento (Figura 21).

Por sua vez, a PGF_{2α} 250 ng/2 µl por via i.c.v. promoveu uma resposta bifásica de aumento da temperatura corporal. O primeiro aumento começou a partir de 30 minutos, sendo este o pico da resposta e perdurando até a 1^a. h. A segunda fase iniciou-se na 3 h com pico em 4,5 h e com duração até o fim do experimento. O pré-tratamento com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v. não foi capaz de reduzir nenhuma das fases de aumento de temperatura induzida pela PGF_{2α} após tratamento (Figura 22).

Já o CRF 2,5 µg/2 µl administrado por via i.c.v. aumentou a temperatura corporal a partir de 1,5 h, sendo o pico da resposta em 4,5 h e perdurando até a 6^a. h. O pré-tratamento com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v. reduziu a resposta febril induzida pelo CRF a partir de 2,5 h até a 5^a. h após tratamento (Figura 23).

A administração de ET-1 1 pmol/2 µl administrada por via i.c.v. promoveu um aumento da temperatura corporal a partir de 1,5 h, sendo o pico da resposta na 3^a. h e perdurando até a 6^a. h. O pré-tratamento com AM251 5 µg/2 µl, por via i.c.v. reduziu a resposta febril induzida pela ET-1 a partir da 2^a. h até a 6^a. h após tratamento (Figura 24).

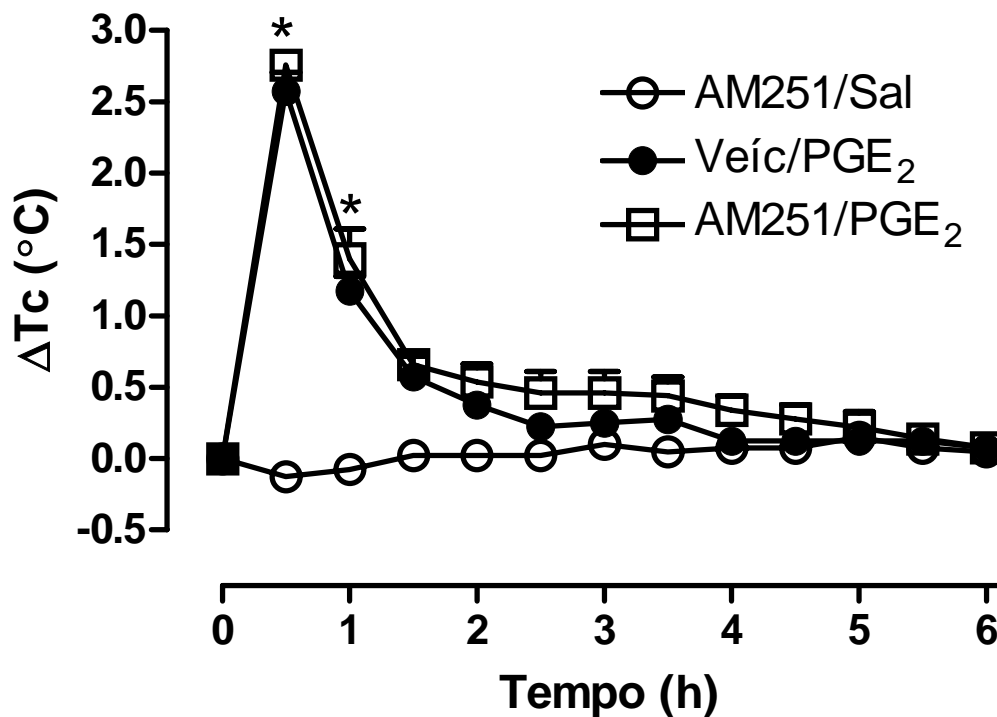


Figura 21: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela PGE₂. Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam PGE₂ 250 ng/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

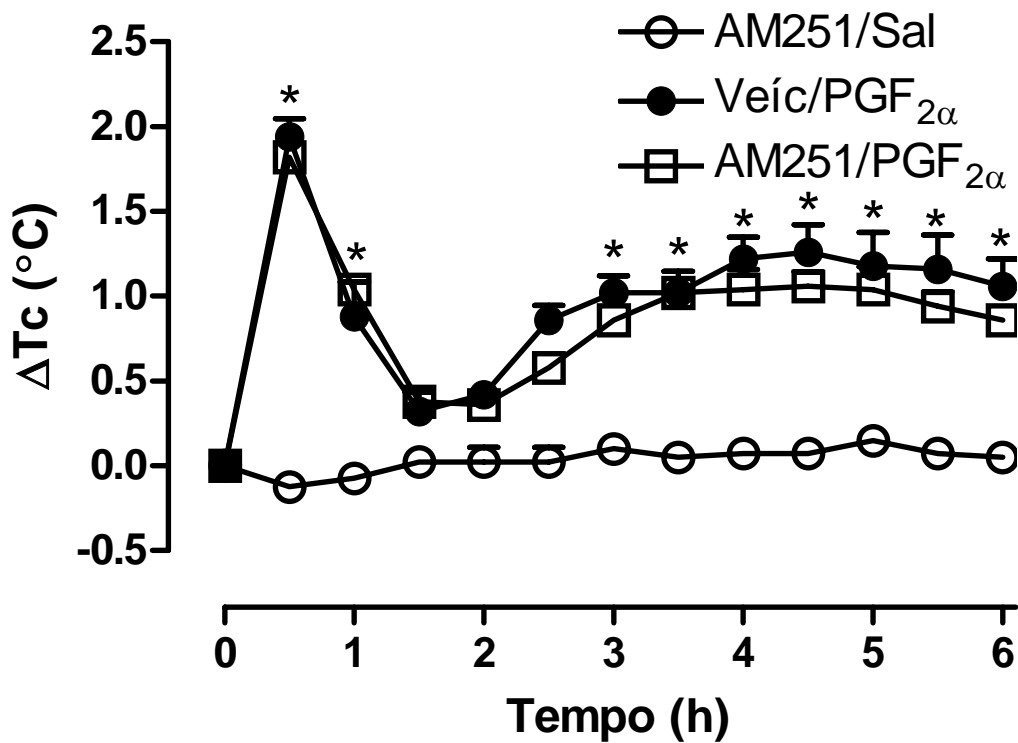


Figura 22: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela PGF_{2α}. Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam PGF_{2α} 250 ng/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

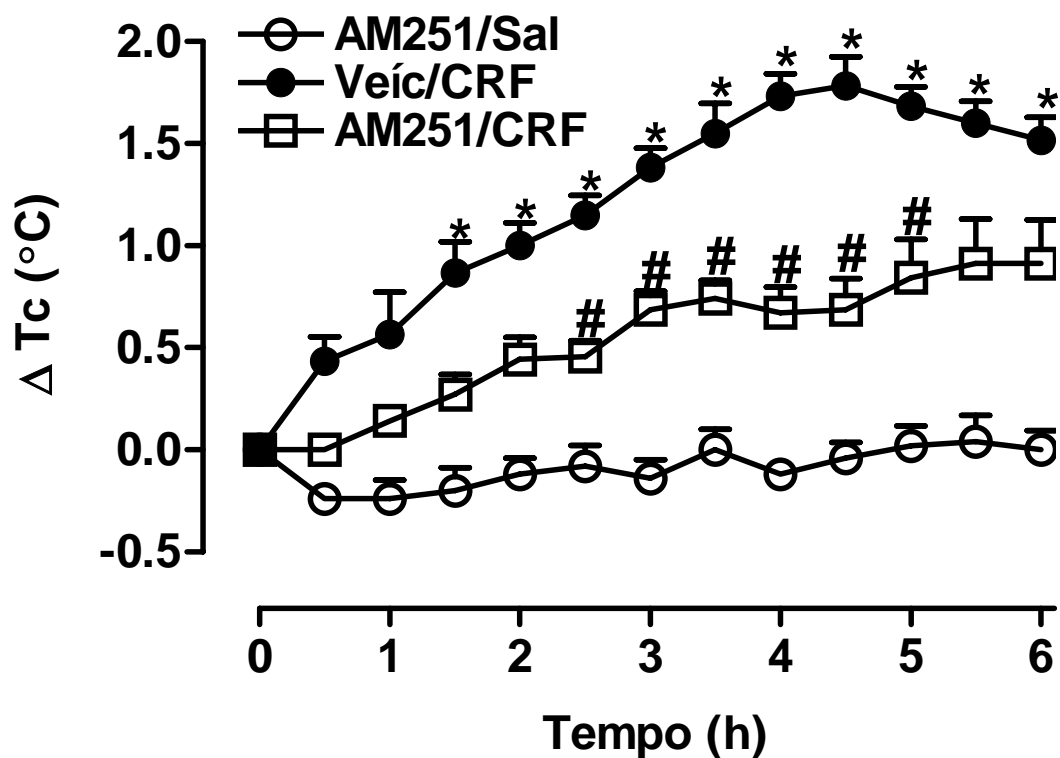


Figura 23: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pelo CRF. Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam CRF 2,5 μ g/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/CRF, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

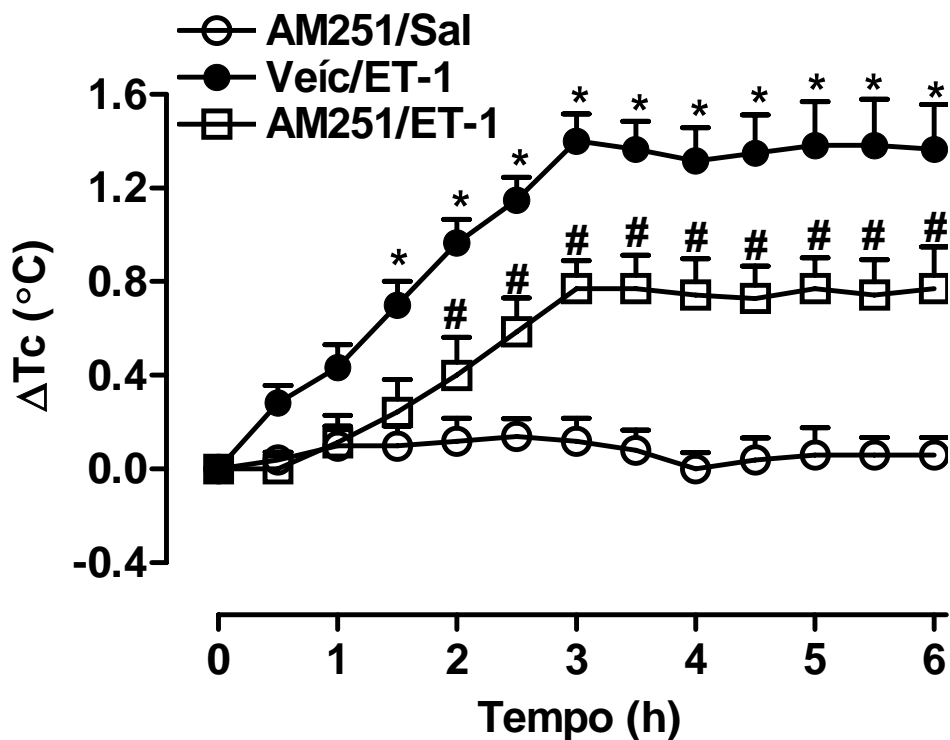


Figura 24: Efeito do AM251 sobre a resposta febril induzida pela ET-1. Os animais receberam veículo 2 μ l ou AM251 5 μ g/2 μ l por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam ET-1 1 pmol/2 μ l ou salina estéril 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=6-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo AM251/Sal. # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Veíc/ET-1, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

4.9 - Efeito do tratamento com dexametasona e IL-1ra no aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida

A anandamida promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 2^a. h, com pico da resposta na 5^a. h e sustentável até a 6^a. h após a administração da droga. A administração de dexametasona 0,5 mg/kg, por via s.c. não modificou a temperatura corporal dos animais quando administrada sozinha, já o pré-tratamento com dexametasona nesta dose reduziu a resposta febril induzida pela anandamida com início em 2,5 h até a 6^a. h após tratamento (Figura 25).

A administração de IL-1ra 200 µg/2 µl, por via i.c.v. não modificou a temperatura corporal dos animais quando administrada sozinha, por sua vez, o pré-tratamento com IL-1ra nesta dose reduziu a resposta febril induzida pela anandamida com início na 2,5 h até 6^a. h após tratamento (Figura 26).

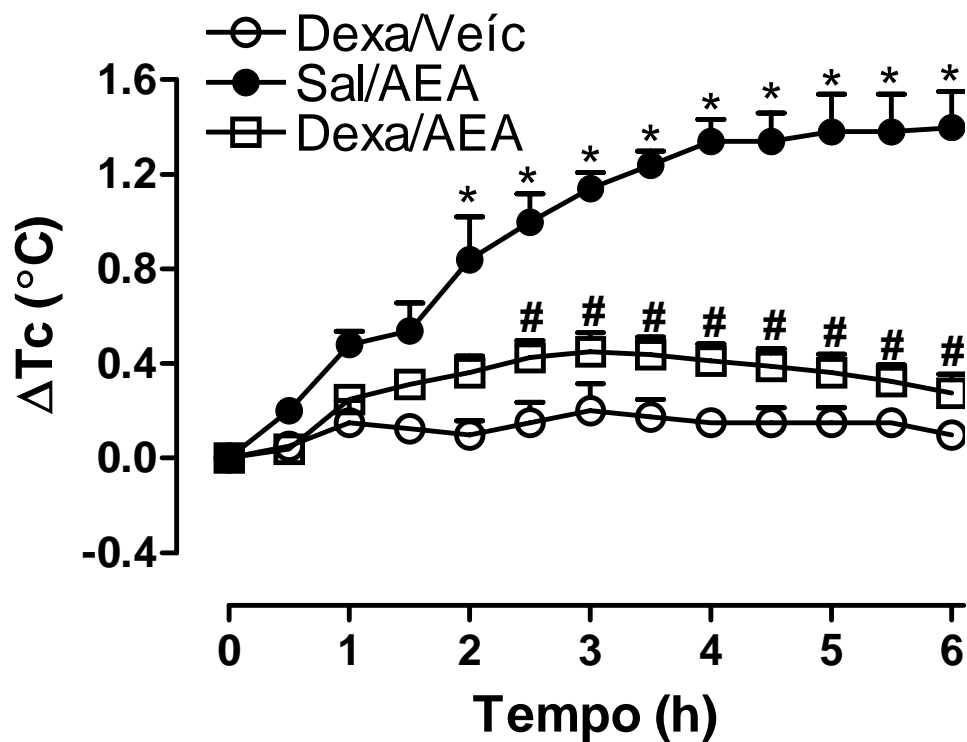


Figura 25: Efeito da dexametasona sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam salina estéril ou dexametasona 0,5 mg/kg por via s.c., após 1 h os animais receberam anandamida 1 μ g/2 μ l ou veículo 2 μ l por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Dexa/Veíc; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Sal/AEA, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

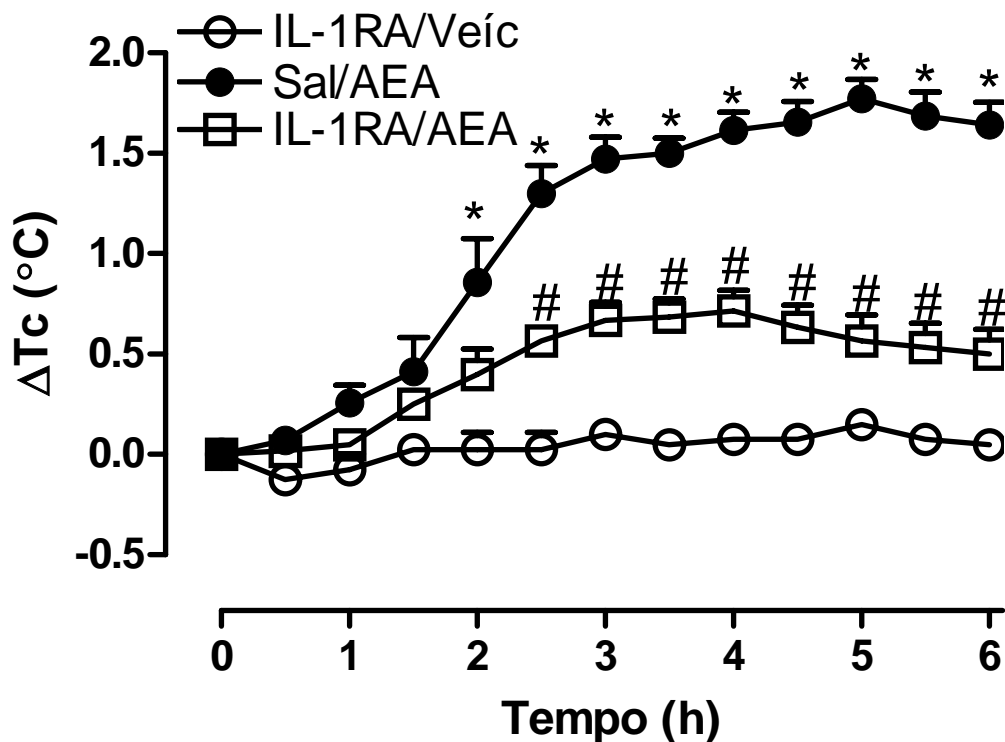


Figura 26: Efeito IL-1ra sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Os animais receberam salina estéril ou IL-1ra 200 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam anandamida 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo IL-1ra/Veíc; # Representa a diferença significativa em relação ao grupo Sal/AEA, $p < 0,05$. (ANOVA de duas vias e Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo sugerem que os canabinóides endógenos, pela ativação dos receptores CB₁, mas não dos receptores CB₂ e vanilóides, são capazes de produzir um aumento controlado da temperatura corporal, que pode ser designado como febre. A resposta febril desencadeada pelos endocanabinóides parece ser dependente da síntese/liberação de prostaglandinas e opióides endógenos. Além disso, os endocanabinóides estão envolvidos no desenvolvimento da resposta febril induzida pelo LPS, bem como, naquelas promovidas por diversos mediadores que orquestram esta resposta, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRF e ET-1. Por sua vez, os endocanabinóides não contribuem para a resposta febril induzida pela PGE₂ ou PGF_{2 α} .

Embora o envolvimento dos canabinóides na temperatura corporal já venha sendo estudado há algum tempo, os dados disponíveis a respeito do tema, não permitiam uma visão clara do papel dos endocanabinóides nesta resposta. Desta forma, procuramos estudar os efeitos da administração central de endocanabinóides na temperatura corporal e investigar por quais mecanismos eles promovem seus efeitos.

Inicialmente, avaliamos o efeito da administração central de anandamida na temperatura corporal. É interessante notar que, a administração por via i.c.v. de anandamida, o primeiro endocanabinóide a ser descoberto e que apresenta uma maior seletividade para os receptores CB₁ (DEVANE et al., 1992), promoveu um aumento dose-dependente da temperatura corporal, que foi máximo com a dose de 1 μ g desta substância (Figura 1). A partir desse experimento selecionamos a dose de 1 μ g/2 μ l de anandamida para uso nos demais ensaios que envolveram a administração deste lipídio.

Este resultado nos surpreende, já que há diversos relatos na literatura de que as administrações de diferentes agonistas canabinóides promovem hipotermia, tanto quando administrados periféricamente, como quando administrados centralmente. (DIAMANTIS et al., 1979, PERTWEE & FITTON, 1982; OVADIA et al., 1995; COMPTON et al.,

1996; RAWLS et al., 2002a; PERTWEE, 2005). Além disso, a hipotermia é considerada um dos quatro sinais característicos que os canabinóides promovem em roedores, que incluem ainda hipolocomoção, analgesia e catalepsia (PERTWEE, 2005).

O principal efeito relatado sobre a temperatura corporal após a administração do Δ^9 -THC, que é considerado um dos principais componentes ativos presentes na *Canabis sativa*, é a hipotermia. A administração intraperitoneal de Δ^9 -THC produziu uma hipotermia dose-dependente em ratos, que foi observada logo nos primeiros 30 minutos após a injeção (DIAMANTIS et al., 1979). O Δ^9 -THC também produziu hipotermia significativa quando administrado por via i.c.v., sendo esta resposta acompanhada por diminuição no consumo de oxigênio (FITTON & PETERWEE, 1982). Em outro estudo, o efeito hipotérmico produzido pelo Δ^9 -THC foi antagonizado pelo antagonista dos receptores CB₁, SR141716A (COMPTON et al., 1996).

OVADIA et al. (1995), relataram que a administração do agonista canabinóide sintético HU-210, o qual apresenta maior potência e afinidade pelos receptores canabinóides do que o Δ^9 -THC, induziu hipotermia após a administração direta na APO/HA de ratos (OVADIA et al., 1995). Corroborando estes resultados, RAWLS et al. (2002), utilizando o WIN 55212-2, outro agonista canabinoide sintético mais potente que o Δ^9 -THC, administrado diretamente na APO/HA, também observaram a ocorrência de hipotermia de forma dose-dependente em ratos. Esta resposta foi reduzida pela administração por via i.m. do antagonista dos receptores CB₁, SR141716A, mas não foi alterada pela administração por via i.m. do antagonista dos receptores CB₂, SR144528, sugerindo que a hipotermia induzida pelos canabinóides seja mediada pela ativação do receptor CB₁.

Embora a hipotermia seja a resposta mais relatada com relação à administração de Δ^9 -THC, existem dados na literatura que sugerem que a administração desta substância pode promover aumento ou redução na temperatura, dependendo da dose administrada.

Até onde conseguimos saber, o primeiro relato deste padrão paradoxal de resposta do Δ^1 -THC tenha sido observado por SOFIA (1972). Este pesquisador observou que tanto a administração intraperitoneal como a administração oral de Δ^1 -THC foi capaz de promover um aumento significativo da temperatura corporal em doses baixas (0,125-2,0mg/kg, i.p., 1,25-10mg/kg, p.o.), enquanto, doses mais elevadas deste agonista (4,0-8,0mg/kg, i.p., 20,0-80,00mg/kg, p.o.), foram capazes de promover uma intensa diminuição da temperatura corporal.

Cinco anos mais tarde, TAYLOR & FENNESSY (1977), observaram o mesmo padrão bifásico de efeito com o Δ^9 -THC na temperatura corporal, quando administrado endovenosamente. Em doses baixas (0,05-0,1 mg/kg, i.v.), a administração de Δ^9 -THC promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, já doses maiores (1,0-5,0 mg/kg, i.v.) promoveram redução da temperatura corporal (TAYLOR & FENNESSY, 1977).

Convém ressaltar, que a resposta hipotérmica produzida pela administração de canabinóides é sempre acompanhada por diminuição da atividade locomotora e até mesmo de catalepsia. Assim, esta hipotermia pode ser, na verdade, um reflexo da perda de importantes mecanismos termorregulatórios responsáveis por manter a temperatura corporal em níveis normais, ao invés de constituir um efeito específico dos canabinóides em promover alterações no termostato hipotalâmico.

CRAWLEY et al. (1993) e CHAEPRON et al. (1999) observaram que a administração periférica de altas doses de anandamida (10 e 20 mg/kg) em ratos

promoveu hipotermia. COSTA et al. (1999), demonstraram que a hipotermia induzida pela anandamida foi bloqueada pelo antagonista dos receptores CB₁, SR141716A.

Contudo, é importante ressaltar que nos experimentos de CRAWLEY et al. (1993), a temperatura corporal dos animais foi avaliada apenas 15 e 30 minutos após a administração de anandamida. Ainda, uma observação cuidadosa do efeito da dose de 0,2 mg/kg relatada naquele estudo, pode-se concluir que esta promoveu um aumento da temperatura corporal quando comparado ao veículo (variação de +0,6°C), sendo que a hipotermia produzida pela dose de 10 mg/kg e que apresentou diferença estatisticamente significativa, produziu uma variação de apenas -0,7°C quando comparada ao veículo. Isto sugere que doses baixas deste endocanabinóide podem promover aumento da temperatura corporal quando administrado perifericamente.

Portanto, embora existam evidências de que canabinóides possam causar aumento de temperatura, quando administrados por via sistêmica, o presente estudo é pioneiro em demonstrar que a administração central de anandamida causa aumento de temperatura em ratos.

Em seguida, avaliamos se o aumento da temperatura corporal induzido pela anandamida tratava-se de uma resposta febril ou apenas um efeito hipertérmico. Para tanto, monitoramos concomitantemente a temperatura corporal e a temperatura da cauda dos animais. Observamos que o aumento de temperatura corporal induzido pela anandamida foi precedido e acompanhado por uma redução sustentada da temperatura da pele da cauda (Fig. 2A e 2B, respectivamente). Esta redução da temperatura da pele da cauda indica o desenvolvimento de uma vasoconstrição periférica, fenômeno característico observado durante o aumento controlado da temperatura corporal, o qual tem a função de reduzir a dissipação de calor para o ambiente e conservar a temperatura do organismo. Durante as respostas hipertérmicas, ao contrário do que ocorre durante o

aumento controlado de temperatura, ocorre um aumento da temperatura da pele da cauda dos animais, com o intuito de reduzir a temperatura corporal. Sendo assim, podemos caracterizar o aumento de temperatura corporal induzido pela anandamida como febre.

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 nesta espécie, pois ela é glabra, 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).

Podemos observar na figura 3 que a anandamida induziu uma redução significativa no índice de perda de calor (IPC), quando comparado ao veículo, o que indica que a administração i.c.v do endocanabinóide promoveu uma significativa vasoconstrição, corroborando a hipótese de que a mesma, por ativar respostas termofetoras de conservação de calor, induz um aumento controlado da temperatura corporal que é típica da resposta febril.

O IPC tem sido utilizado como parâmetro na avaliação de respostas termofetoras (vasoconstrição e vasodilatação) da vasculatura da pele da cauda. Segundo ROMANOVSKY et al. (2002) os limites teóricos para o IPC são: 0, que corresponde à vasoconstrição máxima; e 1, que corresponde à vasodilatação máxima da temperatura da pele da cauda dos animais.

Na seqüência do presente estudo, avaliou-se a capacidade da administração de anandamida no hipotálamo em promover alterações na temperatura corporal. Conforme ilustra a figura 4, observou-se que a administração de anandamida nesta importante área envolvida no controle da temperatura corporal, promoveu um aumento dose-dependente da temperatura corporal.

É importante ressaltar que os receptores canabinóides estão presentes no hipotálamo. Em particular, células expressando RNAm para os receptores CB₁ estão distribuídas pelo hipotálamo e estudos de ligação específica usando técnicas de radioautográfica demonstraram densa expressão de receptores CB₁ nesta área do cérebro (HERKENHAM et al., 1991; MAILLEUX e VANDERHAEGHEN, 1992). Sendo a expressão particularmente intensa na APO/HA (MOLDRICH & WENGER, 2000).

Outra estratégia que se utilizou para avaliar a contribuição dos endocanabinóides no controle da temperatura corporal, foi o emprego do URB597, um inibidor seletivo da enzima amido hidrolase dos ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), enzima esta considerada a principal responsável pela degradação dos endocanabinóides, particularmente da anandamida. É interessante observar que a administração por via i.c.v. do URB597 promoveu um claro aumento na temperatura corporal, mas a curva para este efeito apresentou-se em forma de sino (Figura 5A e 5B). Na faixa de doses entre 0,001 ng e 0,1 ng houve um aumento dose-dependente da temperatura corporal, mas doses maiores promoveram aumentos da temperatura proporcionalmente menores (Figuras 5A e 5B). Este resultado reforça a idéia de que os endocanabinóides estejam envolvidos no aumento da temperatura, uma vez que a inibição da degradação pode promover um acúmulo destes mediadores na fenda sináptica, o que facilitaria ou intensificaria a ativação dos receptores CB₁ que sinalizam aumento na temperatura corporal. O padrão da resposta com curva em sino pode resultar do maior acúmulo de endocanabinóides, ocasionado pelas doses maiores do inibidor da FAAH, esse maior acúmulo poderia promover uma perda de seletividade dos mesmos sobre os receptores CB₁ ou até mesmo uma interação com outros sistemas de neurotransmissão, já que foi constatado que os endocanabinóides podem interferir com a liberação de diferentes neurotransmissores quando em altas doses

(GERDEMAN et al., 2001; HUANG et al., 2001; WILSON et al., 2001). No entanto, uma investigação mais detalhada será necessária para esclarecer este padrão de resposta.

Posteriormente, investigamos qual o receptor canabinoide é ativado pela anandamida para promoção da resposta febril. Sabe-se que a anandamida liga-se com afinidade moderada e é um agonista parcial dos receptores CB₁, além de ser um agonista fraco dos receptores CB₂ e também poder ativar os receptores vanilóides (DEVANE et al., 1992; ZYGMUNT et al., 1999). Inicialmente, avaliamos se os receptores CB₁ seriam os responsáveis por este aumento da temperatura corporal. Para isso, tratamos previamente os animais com o antagonista CB₁ seletivo, AM251 e avaliamos o seu efeito sobre a resposta febril induzida pela injeção por via i.c.v. de anandamida. O tratamento dos animais com este antagonista reduziu de forma dose-dependente a febre induzida pela anandamida e nas doses de 5 e 10 µg/2 µl, o mesmo aboliu esta resposta (Figura 6). Este resultado sugere que receptores CB₁ centrais desempenhem um papel prevalente na resposta febril desencadeada pela injeção por via i.c.v. de anandamida.

Outro dado que confirma o envolvimento dos canabinóides no aumento da temperatura corporal, em especial através da ativação dos receptores CB₁, foi obtido com a administração do agonista CB₁ seletivo ACEA. A administração deste agonista promoveu um aumento da temperatura corporal descrevendo uma curva em forma de sino (Figuras 9A e 9B). Este análogo sintético da anandamida é um agonista que apresenta maior seletividade para o receptor CB₁. A exemplo do observado com o URB597, o ACEA também originou uma curva em forma de sino, com o aumento da dose (a partir de 0,1 µg/2 µl) houve uma redução da resposta febril sugerindo uma possível perda da seletividade deste agonista. Além disso, como esperado, o pré-tratamento dos animais com o AM251, antagonista seletivo dos receptores CB₁ foi capaz de reduzir o aumento da temperatura corporal induzido pelo ACEA (Figura 10). Estes dados fortalecem

substancialmente a hipótese de que o aumento de temperatura corporal induzido pelos canabinóides seja mediado pela ativação dos receptores CB₁ centrais.

Em seguida, foi avaliada se a ativação dos receptores CB₂ contribuiria de alguma forma para as alterações da temperatura corporal. A administração do antagonista CB₂ seletivo AM630 não promoveu nenhuma alteração do aumento de temperatura corporal induzido pela anandamida, assim como não alterou a temperatura corporal dos animais quando administrado isoladamente (Figura 7). Por sua vez, a administração do agonista CB₂ seletivo AM1241 também não promoveu nenhuma alteração significativa na temperatura dos animais (Fig. 11). Estes dados sugerem que mecanismos operados por ativação dos receptores CB₂ não estejam implicados nas alterações na temperatura corporal provocados por endocanabinóides centrais.

RAWLS et al. (2002), utilizando o SR144528, outro antagonista dos receptores CB₂, administrado por via i.m. em ratos também não observaram nenhum efeito deste antagonista, que também não foi capaz de alterar a hipotermia induzida pela administração de WIN55212-2 por via i.m.

Estes dados sugerem, ainda, que nem os receptores CB₁, nem os receptores CB₂ exercem influência tônica sobre o controle da temperatura corporal, visto que nenhum dos antagonistas canabinóides utilizados promoveu qualquer alteração da temperatura corporal quando administrado isoladamente.

Sabe-se que, além de interagir com os receptores CB₁ e CB₂, a anandamida pode também interagir com os receptores vanilóides (TRPV1), sendo que a ativação destes receptores é importante em especial para os efeitos analgésicos deste endocanabinóide (RICE et al., 2002; PERTWEE, 2005). Por esta razão, avaliamos a influência do tratamento prévio com um antagonista de receptores vanilóides sobre o efeito da anandamida na temperatura corporal. O pré-tratamento dos animais com o antagonista dos

receptores vanilóides, capsazepina, não foi capaz de alterar a resposta febril induzida pela anandamida em nenhuma das doses testadas (Figura 8), sugerindo que a ativação deste receptor não contribui para os efeitos deste endocanabinóide na temperatura corporal.

Após constatar que a anandamida é capaz de induzir febre e de que esta resposta é mediada pela ativação dos receptores CB₁, o passo seguinte foi avaliar se ela induzia febre diretamente ou através da síntese e liberação de outros mediadores para induzir esta resposta.

Inicialmente, investigou-se a possível contribuição das prostaglandinas na resposta febril induzida pela anandamida. O tratamento prévio dos animais com indometacina, um inibidor não seletivo das enzimas COX, reduziu significativamente o aumento de temperatura induzido pela anandamida (Figura 12). Por sua vez, o tratamento prévio dos animais com celecoxib também reduziu a resposta febril induzida pela anandamida (Fig. 13).

Avaliou-se também o efeito da administração central de anandamida sobre a concentração de PGE₂ no líquido cerebrospinal. A administração de anandamida promoveu um aumento significativo na concentração de PGE₂ no líquido cerebrospinal na quarta hora após a sua administração. Já, o pré-tratamento dos animais com o AM251 aboliu este aumento (Figura 14). A administração isolada de AM251 não promoveu alteração significativa na concentração de PGE₂ no CSF.

Em conjunto, estes dados sugerem que a anandamida, através da ativação dos receptores CB₁, induz a síntese e liberação de prostaglandinas as quais podem ser as responsáveis pelo aumento da temperatura corporal induzido por este endocanabinóide.

Sabe-se que a anandamida, após sofrer a ação da enzima FAAH, é convertida rapidamente em ácido araquidônico e etanolamida, o que aumentaria o substrato para a formação de prostaglandinas pela ação da enzima COX (DEUTSCH et al., 1997; MACCARRONE et al., 2000; CHEN et al., 2004).

Dados da literatura sugerem que devido a sua grande similaridade estrutural aos ácidos graxos poliinsaturados, a anandamida pode também servir como substrato para enzimas, como a lipooxigenase e COX, podendo produzir potentes produtos bioativos. O ácido araquidônico (AA) é o substrato para a formação de prostanoídes pelas enzimas COX-1 e COX-2. A anandamida é estruturalmente idêntica ao AA, exceto pelo ácido carboxílico presente no AA, que é substituído pelo grupo etanolamida na anandamida. YU et al., (1997) demonstraram que a COX-2 humana, mas não a COX-1, é capaz de oxidar a anandamida. O produto formado a partir da anandamida é um composto similar ao formado quando o substrato é o AA, sendo este a PGE₂ etanolamida. ROTH et al. (2002), demonstraram, utilizando diversas preparações *in vitro*, que a PGE₂ etanolamida é um composto farmacologicamente ativo, todavia não foram capazes de estabelecer a sua relevância fisiológica.

KOZAK et al. (2002) demonstraram que, através da metabolização da anandamida e do 2-AG pela enzima COX-2, associado à ação de isomerases específicas, podem ser formados os derivados “prostaglandina etanolamida” e “prostaglandina glicerol éster” da PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, tromboxana e prostaciclina. Os dados daquele estudo sugerem que talvez o aumento de temperatura corporal induzido pela administração de anandamida possa ser ocasionado pela formação destes metabólitos de prostaglandinas, através da enzima COX-2.

Contudo, CHEN et al. (2005) utilizando preparações de microvasculatura cerebral, observaram que, após incubar estas células com anandamida triciada, houve um substancial aumento na produção de prostaglandina. No entanto, não houve formação significativa de prostaglandina marcada, sugerindo que a anandamida não foi o substrato para a formação desta prostaglandina. Além disso, o aumento na concentração de prostaglandinas não foi alterado pelo inibidor da enzima FAAH, o OTMK, como também

quando foi utilizada a meta-anandamida, um análogo estável que é muito pouco metabolizado pela FAAH. Isto fortalece a hipótese de que o ácido araquidônico proveniente da degradação da anandamida não é a fonte para a formação de prostaglandinas.

Neste mesmo estudo, CHEN et al., (2005) observaram que tanto a produção de prostaglandinas promovida pela anandamida, como pela meta-anandamida foi completamente inibida pelo inibidor seletivo da enzima COX-2, NS-398, e que esses dois canabinóides promoveram um aumento dose- e tempo-dependente na expressão da enzima COX-2. Por sua vez, o pré-tratamento das células com o antagonista CB₁ seletivo, AM251 inibiu tanto a produção de prostaglandina, como diminuiu a expressão da enzima COX-2 induzida pela anandamida (CHEN et al., 2005).

Nossos dados, em conjunto com os de CHEN et al., (2005), sugerem que as prostaglandinas responsáveis pela indução da febre induzida pela anandamida sejam formadas pela ativação dos receptores CB₁. A ativação destes receptores levaria a um aumento na expressão da enzimas COX-2, com conseqüente promoção da metabolização do ácido araquidônico endógeno, em prostaglandinas, mediadoras da resposta febril induzida pela anandamida.

Investigou-se também, a possível interação entre canabinóides e opióides. O pré-tratamento dos animais com o antagonista não seletivo dos receptores opióides naloxona, foi capaz de abolir o aumento na temperatura induzido pela anandamida (Figura 15). A administração por via i.c.v. de anandamida promoveu, ainda, um aumento na concentração de β -endorfina no CSF, sendo que este aumento foi reduzido pelo pré-tratamento com o antagonista CB₁ seletivo AM251 (Figura 16). Estes dados sugerem que, além de prostaglandinas, a anandamida depende da síntese e liberação de opióides endógenos para promover os seus efeitos sobre a temperatura corporal.

Embora existam muitos dados na literatura que sugerem interação entre canabinóides e opióides, em especial com relação aos efeitos analgésicos, não há resultados na literatura que demonstrem que a anandamida é capaz de aumentar a concentração de opióides endógenos no CSF.

Os peptídeos opióides endógenos, juntamente com as prostaglandinas, são considerados os mediadores finais da resposta febril. FRAGA et al. (2008), observaram que os opióides endógenos não participam no controle da temperatura corporal em condições basais. Contudo, através da ativação de receptores μ -opióides, estes peptídeos são importantes mediadores envolvidos no desenvolvimento da resposta febril desencadeada pelo LPS, TNF- α , IL-6, MIP-1 α e ET-1 (BLATTEIS et al., 1991; BENAMAR et al., 2000; BENAMAR et al., 2002; FRAGA et al., 2008).

Os dados obtidos até o momento permitem sugerir que a anandamida é capaz de promover um aumento controlado da temperatura corporal e que pode assim ser designada febre. Esta resposta é mediada pela ativação dos receptores CB₁, mas não por receptores CB₂ e vanilóides. Ainda, esta resposta febril é dependente da síntese e liberação de prostaglandinas e peptídeos opióide endógenos. Neste sentido, foi considerado importante que se avaliasse se os endocannabinóides contribuiriam de alguma forma para a resposta febril desencadeada tanto por pirogênios exógenos, como pelos mediadores endógenos desta resposta.

Inicialmente, foi avaliado se a administração central prévia do antagonista CB₁ seletivo AM251 era capaz de reduzir a resposta febril desencadeada pela administração periférica do pirogênio exógeno LPS, o qual é parte da parede das bactérias GRAM negativas e que é muito utilizado para mimetizar quadros de invasão bacteriana. O pré-tratamento dos animais com o AM251 foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo

LPS (Figura 17), demonstrando assim, que a resposta febril induzida por este pirogênio é mediada pelo menos parcialmente pela liberação central de endocanabinóides.

Sabe-se que o LPS não é o responsável direto pelo aumento de temperatura corporal. Ele após ser reconhecido pelas células de defesa, desencadeia a produção de pirogênios endógenos, como as citocinas. Desta forma, avaliamos se os endocanabinóides participariam da resposta febril induzida pelas principais citocinas pirogênicas IL-1 β , TNF- α e IL-6. O pré-tratamento dos animais com AM251 foi capaz de reduzir a resposta febril desencadeada pela IL-1 β (Figura 18), TNF- α (Figura 19) e IL-6 (Figura 20).

BENAMAR et al., (2007) observaram que a administração periférica do agonista CB₁ seletivo WIN 55,212-2 em doses que não promovem hipotermia foi capaz de reduzir o aumento de temperatura corporal induzido por 50 μ g de LPS por via i.p., mesma dose empregada neste estudo. Contudo, eles observaram que o WIN 55,212-2 promoveu uma redução na concentração de IL-6 no plasma dos animais, o que sugere que essa diminuição da febre promovida pelo WIN 55,212-2 ocorra pela diminuição desta importante citocina pirogênica.

Nesse mesmo trabalho, estes pesquisadores observaram que a administração periférica do antagonista CB₁ SR141716A foi capaz de abolir a resposta febril induzida pelo LPS. Este resultado surpreendeu os autores, já que este antagonista apresentou o mesmo efeito que o agonista cannabinoide WIN 55,212-2. A possível explicação sugerida pelos autores para esta aparente contradição baseou-se no fato de que o SR141716A, que foi sugerido inicialmente como um potente e seletivo antagonista dos receptores CB₁, também apresenta propriedades de agonista inverso (RINALDI-CARMONA et al., 1994; BOUABOULA et al., 1997; BENAMAR et al., 2007). Além disso, dados da literatura sugerem que a administração de SR141716A é capaz de suprimir os efeitos centrais e periféricos das citocinas de maneira qualitativa e quantitativa similar aos efeitos

imunossupressivos do HU210, um potente agonista canabinoide sintético (ROCHE et al., 2006).

Nossos dados, em contrapartida, sugerem que a liberação central de endocanabinóides contribua para a resposta febril induzida pelo LPS e que esta resposta não se deva a um efeito imunossupressivo do antagonista. Outro ponto importante em que nosso estudo difere do supracitado está no fato de que utilizamos a administração central do antagonista ao invés da administração periférica. Desta forma, dificilmente o antagonista poderia interferir com as concentrações periféricas das citocinas. Além disso, o AM251 também foi capaz de reduzir a resposta febril desencadeada pelas citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, sugerindo que os endocanabinóides estão envolvidos na resposta febril induzida pelos mediadores que são responsáveis pela indução da febre do LPS e que a síntese e liberação dos endocanabinóides ocorreria após a liberação destes mediadores pirogênicos periféricos.

Posteriormente, investigamos se os endocanabinóides estavam envolvidos na resposta febril induzida pelos mediadores centrais desta resposta que incluem PGE₂, PGF_{2 α} , CRF e ET-1.

Neste sentido, avaliamos se os endocanabinóides participariam da resposta febril induzida pelas PGE₂ e PGF_{2 α} . O pré-tratamento dos animais com AM251 não reduziu nem a resposta febril induzida pela PGE₂ (Figura 22) nem aquela induzida pela PGF_{2 α} (Figura 23). Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com AM251 foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo CRF (Figura 23) e pela ET-1 (Figura 24), sugerindo, desta forma, que na via independente de prostaglandinas exista a participação de endocanabinóides.

Sabe-se que a via independente de prostaglandinas mediada pelo CRF e ET-1 é dependente da liberação central de IL-1. Por esta razão, investigamos o possível envolvimento da IL-1 central na resposta febril induzida pela anandamida. Para tanto, inicialmente pré-tratamos os animais com dexametasona, a qual reconhecidamente interfere

com a síntese das citocinas envolvidas no processo inflamatório (YAMAMOTO, 1985; NEWTON, 2000), e avaliamos o seu efeito sobre a resposta febril induzida pela anandamida. Este glicocorticóide praticamente aboliu a resposta febril induzida por este endocanabinóide (Figura 25).

Os glicocorticóides são capazes de interagir com proteínas receptoras específicas e regular a expressão de genes responsivos aos corticosteróides, alterando a síntese de diversas proteínas (YAMAMOTO, 1985). A dexametasona é capaz de inibir a síntese de quase todas as citocinas (revisado por NEWTON, 2000), é uma droga altamente efetiva em suprimir a febre induzida pelo LPS (COELHO et al., 1992, 1995; ZAMPRONIO et al., 1994a; 2000) e por quase todas as citocinas pirogênicas conhecidas, exceto o MIP-1 β e MIP-1 α (COELHO et al., 1995; TAVARES & MIÑANO, 1998; ZAMPRONIO et al., 2000; MELO SOARES 2006). Os efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides são mediados, ainda, pela diminuição da expressão de COX-2, NOS e principalmente do fator nuclear (NF κ B) (LEACH, 1998; ADCOCK et al., 2004).

No passo final deste trabalho, pré-tratamos os animais com o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) e observamos que este foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela anandamida (Figura 26). Isso sugere que a resposta febril induzida pela anandamida seja dependente da ação central da IL-1, a qual também é importante para a via desencadeada pela ET-1 (FABRICIO et al., 2006).

Sabe-se que a cascata de eventos que culmina com o aumento da temperatura corporal é iniciada por um agente agressor externo que após ser reconhecido pelas células de defesa induz a síntese e liberação de diferentes mediadores periféricos, tais como as citocinas. Dependendo da citocina que é formada, pode ocorrer a ativação de duas vias distintas, que pode acarretar no aumento na temperatura corporal: uma que é dependente da síntese e liberação de prostaglandinas, e uma segunda que é independente de

prostaglandinas. Esta via que é independente de prostaglandinas é mediada pela seguinte seqüência de mediadores centrais: CRF, ET-1, IL-1 e opióides endógenos (FABRICIO et al., 2006, FRAGA et al., 2008). As diferentes vias de indução da febre estão representadas na figura 27.

Com os dados obtidos neste estudo, podemos incluir os endocanabinóides nestas duas vias de indução de febre. Na primeira, já que está bem demonstrado que os endocanabinóides, através da ativação dos receptores CB₁, são capazes de induzir a síntese/liberação de prostaglandinas, em especial por aumentar a expressão da enzima COX-2. Na segunda, numa seqüência que seria CRF, ET-1, endocanabinóide, IL-1 e opióide endógeno. A figura 27 sumariza a cascata de mediadores responsável pelo desenvolvimento da resposta febril com a inclusão dos endocanabinóides.

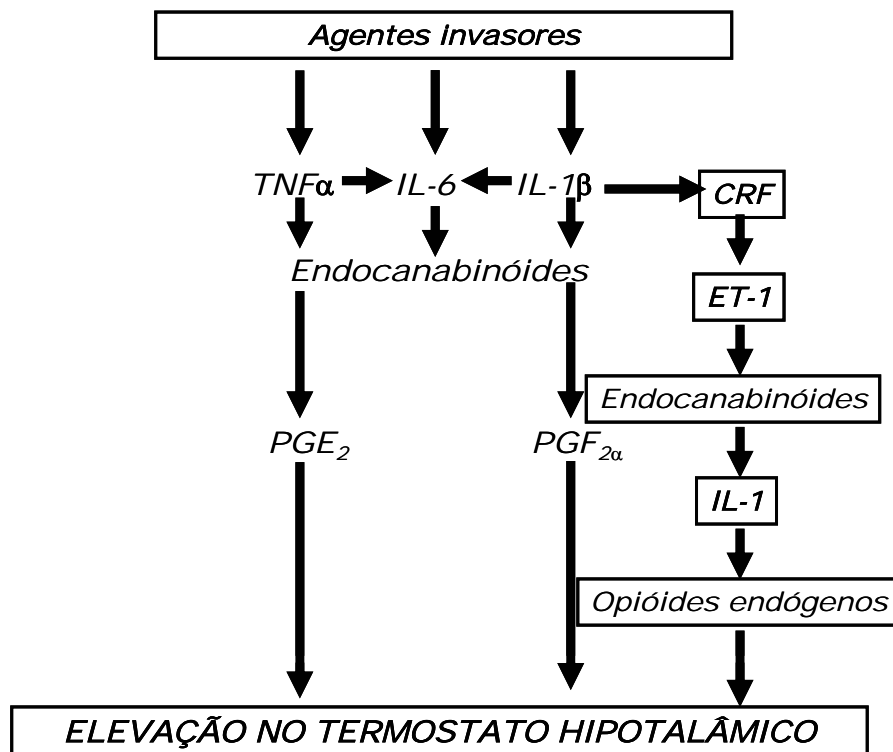


Figura 27: Este esquema representativo da cascata de mediadores da resposta febril foi baseada nos trabalhos de STRIJBOS et al. 1992; ZAMPRONIO et al., 2000; FABRICIO et al., 2006 e FRAGA et al., 2008.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que:

- O aumento de temperatura corporal induzido pela administração central de anandamida é uma resposta controlada (i.e. febre) e não hipertermia.
- Os endocanabinóides centrais não contribuem para o controle tônico da temperatura corporal.
- A resposta febril induzida pela injeção via i.c.v. de anandamida é mediada pela ativação dos receptores CB₁, mas não pelos receptores CB₂ ou vanilóides.
- A liberação central de endocanabinóides está envolvida na resposta febril induzida pelo LPS e pelas citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6.
- A liberação central de endocanabinóides está envolvida no desencadeamento da resposta febril do CRF e endotelina-1, mas não da PGE₂ e PGF_{2 α} .
- O aumento de temperatura corporal induzido pela anandamida é dependente tanto da formação de prostaglandinas, como de IL-1 central e opióides endógenos.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADCOCK, I.M., ITO, K. & BARNES, P.J. (2004). Glucocorticoids: effects on gene transcription. *Proc Am Thorac Soc*, 1, 247-54.
- ADLER, M.W., GELLER, E.B., ROSOW, C.E. & COCHIN, J. (1988). The opioid system and temperature regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 28, 429-49.
- ATKINS, E. (1960). Pathogenesis of fever. *Physiol Rev*, 40, 580-646.
- BAJETTO, A., BONAIVIA, R., BARBERO, S., FLORIO, T., COSTA, A. & SCHETTINI, G. (1999). Expression of chemokine receptors in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*, 876, 201-9.
- BANKS, W.A., ORTIZ, L., PLOTKIN, S.R. & KASTIN, A.J. (1991). Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, 259, 988-96.
- BANKS, W.A., KASTIN, A.J. & GUTIERREZ, E.G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett*, 179, 53-6.
- BELTRAMO, M., STELLA, N., CALIGNANO, A., LIN, S.Y., MAKRIYANNIS, A. & PIOMELLI, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277, 1094-7.
- BENAMAR, K., XIN, L., GELLER, E.B. & ADLER, M.W. (2000). Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a mu-opioid receptor-selective antagonist in rats. *Eur J Pharmacol*, 401, 161-5.
- BENAMAR, K., GELLER, E.B. & ADLER, M.W. (2002). Effect of a mu-opioid receptor-selective antagonist on interleukin-6 fever. *Life Sci*, 70, 2139-45.
- BENAMAR, K., YONDORF, M., MEISLER, J.J., GELLER, E.B., TALLARIDA, R.J., EISENSTEIN, T.K. & ADLER, M.W. (2007). A novel role of cannabinoids: implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther*, 320, 1127-33.
- BENIGNI, F., FAGGIONI, R., SIRONI, M., FANTUZZI, G., VANDENABEELE, P., TAKAHASHI, N., SACCO, S., FIERS, W., BUURMAN, W.A. & GHEZZI, P. (1996). TNF receptor p55 plays

- a major role in centrally mediated increases of serum IL-6 and corticosterone after intracerebroventricular injection of TNF. *J Immunol*, 157, 5563-8.
- BISOGNO, T., LIGRESTI, A. & DI MARZO, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*, 81, 224-38.
- BLATTEIS, C.M., XIN, L. & QUAN, N. (1991). Neuromodulation of fever: apparent involvement of opioids. *Brain Res Bull*, 26, 219-23.
- BLATTEIS, C.M., BEALER, S.L., HUNTER, W.S., LLANOS, Q.J., AHOKAS, R.A. & BLATTEIS, C.M., SEHIC, E. & LI, S. (1998). Afferent pathways of pyrogen signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 856, 95-107.
- BLATTEIS, C.M. (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther*, 111, 194-223.
- BLIGH, J. (1979). The central neurology of mammalian thermoregulation. *Neuroscience*, 4, 1213-6.
- BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., BOURRIE, B., CANAT, X., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G. & CASELLAS, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312 (Pt 2), 637-41.
- BOULANT, J.A. & GONZALEZ, R.R. (1977). The effect of skin temperature on the hypothalamic control of heat loss and heat production. *Brain Res*, 120, 367-72.
- BOULANT, J.A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*, 31 Suppl 5, S157-61.
- BOULANT, J.A. (2006a). Counterpoint: Heat-induced membrane depolarization of hypothalamic neurons: an unlikely mechanism of central thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R1481-4; discussion R1484.

- BOULANT, J.A. (2006b). Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol*, 100, 1347-54.
- BROADWELL, R.D. & BLEIER, R. (1976). A cytoarchitectonic atlas of the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, 167, 315-39.
- BROWN, M.R., FISHER, L.A., RIVIER, J., SPIESS, J., RIVIER, C. & VALE, W. (1982). Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. *Life Sci*, 30, 207-10.
- BUCKLEY, N.E., HANSSON, S., HARTA, G. & MEZEY, E. (1998). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, 82, 1131-49.
- CANNON, J.G., TOMPKINS, R.G., GELFAND, J.A., MICHIE, H.R., STANFORD, G.G., VAN DER MEER, J.W., ENDRES, S., LONNEMANN, G., CORSETTI, J., CHERNOW, B. & ET AL. (1990). Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*, 161, 79-84.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1996). 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*, 733, 263-72.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1997). Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol*, 272, R1712-25.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1998). Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res*, 56, 45-56.

- CARLISLE, S.J., MARCIANO-CABRAL, F., STAAB, A., LUDWICK, C. & CABRAL, G.A. (2002). Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol*, 2, 69-82.
- CARTMELL, T., POOLE, S., TURNBULL, A.V., ROTHWELL, N.J. & LUHESHI, G.N. (2000). Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol*, 526 Pt 3, 653-61.
- CHAPERON, F. & THIEBOT, M.H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 243-81.
- CHEN, P., HU, S., HARMON, S.D., MOORE, S.A., SPECTOR, A.A. & FANG, X. (2004). Metabolism of anandamide in cerebral microvascular endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 73, 59-72.
- CHEN, P., HU, S., YAO, J., MOORE, S.A., SPECTOR, A.A. & FANG, X. (2005). Induction of cyclooxygenase-2 by anandamide in cerebral microvascular endothelium. *Microvasc Res*, 69, 28-35.
- COELHO, M.M., SOUZA, G.E. & PELA, I.R. (1992). Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am J Physiol*, 263, R423-7.
- COELHO, M.M., PELA, I.R. & ROTHWELL, N.J. (1993). Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F2 alpha, but not prostaglandin E2. *Eur J Pharmacol*, 238, 391-4.
- COELHO, M.M., LUHESHI, G., HOPKINS, S.J., PELA, I.R. & ROTHWELL, N.J. (1995). Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. *Am J Physiol*, 269, R527-35.
- COLEMAN, R.A., SMITH, W.L. & NARUMIYA, S. (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 46, 205-29.

- COMPTON, D.R., ACETO, M.D., LOWE, J. & MARTIN, B.R. (1996). In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 277, 586-94.
- CONSIGLIO, A.R. & LUCION, A.B. (2000). Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res Brain Res Protoc*, 5, 109-14.
- CORDER, R., CARRIER, M., KHAN, N., KLEMM, P. & VANE, J.R. (1995). Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 3, S56-8.
- COSTA, B., VAILATI, S. & COLLEONI, M. (1999). SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, reverses the behavioural effects of anandamide-treated rats. *Behav Pharmacol*, 10, 327-31.
- CRAVATT, B.F., GIANG, D.K., MAYFIELD, S.P., BOGER, D.L., LERNER, R.A. & GILULA, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384, 83-7.
- CRAWLEY, J.N., CORWIN, R.L., ROBINSON, J.K., FELDER, C.C., DEVANE, W.A. & AXELROD, J. (1993). Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav*, 46, 967-72.
- CRONSTEIN, B.N. (1993). The pharmacology of antiinflammatory agents: a new paradigm. *Mt Sinai J Med*, 60, 209-17.
- CRONSTEIN, B.N. & WEISSMANN, G. (1993). The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum*, 36, 147-57.

- DAVATELIS, G., WOLPE, S.D., SHERRY, B., DAYER, J.M., CHICHEPORTICHE, R. & CERAMI, A. (1989). Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science*, 243, 1066-8.
- DE SOUZA, G.E., CARDOSO, R.A., MELO, M.C., FABRICIO, A.S., SILVA, V.M., LORA, M., DE BRUM-FERNANDES, A.J., RAE, G.A., FERREIRA, S.H. & ZAMPRONIO, A.R. (2002). A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. *Inflamm Res*, 51, 24-32.
- DEUTSCH, D.G. & MAKRIYANNIS, A. (1997). Inhibitors of anandamide breakdown. *NIDA Res Monogr*, 173, 65-84.
- DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECHOULAM, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-9.
- DI MARZO, V., GIANFRANI, C., DE PETROCELLIS, L., MILONE, A. & CIMINO, G. (1994). Polyunsaturated-fatty-acid oxidation in Hydra: regioselectivity, substrate-dependent enantioselectivity and possible biological role. *Biochem J*, 300 (Pt 2), 501-7.
- DI MARZO, V. (1998). 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1392, 153-75.
- DI MARZO, V., BISOGNO, T., MELCK, D., ROSS, R., BROCKIE, H., STEVENSON, L., PERTWEE, R. & DE PETROCELLIS, L. (1998a). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett*, 436, 449-54.
- DI MARZO, V. & DEUTSCH, D.G. (1998b). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*, 5, 386-404.

- DI MARZO, V., MELCK, D., BISOGNO, T. & DE PETROCELLIS, L. (1998c). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21, 521-8.
- DIAMANTIS, W., MELTON, J. & SOFIA, R.D. (1979). Comparative effects of delta 9-tetrahydrocannabinol, tetrabenazine and chlorpromazine on rectal temperature in the rat. *Pharmacology*, 18, 251-6.
- DIAMANT, M. & DE WIED, D. (1991). Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. *Endocrinology*, 129, 446-54.
- DINARELLO, C.A. (1984). Interleukin-1. *Rev Infect Dis*, 6, 51-95.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M., BERNHEIM, H.A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I.S., PALLADINO, M.A., JR. & O'CONNOR, J.V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, 163, 1433-50.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G. & WOLFF, S.M. (1988). New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*, 10, 168-89.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., MANCILLA, J., BISHAI, I., LEES, J. & COCEANI, F. (1991). Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res*, 562, 199-206.
- DINARELLO, C.A. & BUNN, P.A., JR. (1997). Fever. *Semin Oncol*, 24, 288-98.
- DINARELLO, C.A. (1999). Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, 179 Suppl 2, S294-304.
- EHRENREICH, H., ANDERSON, R.W., FOX, C.H., RIECKMANN, P., HOFFMAN, G.S., TRAVIS, W.D., COLIGAN, J.E., KEHRL, J.H. & FAUCI, A.S. (1990). Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med*, 172, 1741-8.

- FABRICIO, A.S., SILVA, C.A., RAE, G.A., D'ORLEANS-JUSTE, P. & SOUZA, G.E. (1998). Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. *Br J Pharmacol*, **125**, 542-8.
- FABRICIO, A.S., VEIGA, F.H., CRISTOFOLETTI, R., NAVARRA, P. & SOUZA, G.E. (2005). The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **288**, R671-7.
- FABRICIO, A.S., RAE, G.A., ZAMPRONIO, A.R., D'ORLEANS-JUSTE, P. & SOUZA, G.E. (2006a). 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*, **290**, R164-71.
- FABRICIO, A.S., TRINGALI, G., POZZOLI, G., MELO, M.C., VERCESI, J.A., SOUZA, G.E. & NAVARRA, P. (2006b). Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and prostaglandin production in the preoptic area of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R1515-23.
- FARRAR, W.L., KILIAN, P.L., RUFF, M.R., HILL, J.M. & PERT, C.B. (1987). Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol*, **139**, 459-63.
- FELDBERG, W. & SAXENA, P.N. (1971). Fever produced by prostaglandin E1. *J Physiol*, **217**, 547-56.
- FELDER, C.C., BRILEY, E.M., AXELROD, J., SIMPSON, J.T., MACKIE, K. & DEVANE, W.A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7656-60.
- FENNESSY, M.R. & TAYLOR, D.A. (1977). The effect of delta9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amine concentrations in the rat at different ambient temperatures. *Br J Pharmacol*, **60**, 65-71.

- FITTON, A.G. & PERTWEE, R.G. (1982). Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of delta 9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol*, 75, 409-14.
- FLESHNER, M., GOEHLER, L.E., HERMANN, J., RELTON, J.K., MAIER, S.F. & WATKINS, L.R. (1995). Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull*, 37, 605-10.
- FRAGA, D., MACHADO, R.R., FERNANDES, L.C., SOUZA, G.E. & ZAMPRONIO, A.R. (2008). Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294, R411-20.
- GALIEGUE, S., MARY, S., MARCHAND, J., DUSSOSSOY, D., CARRIERE, D., CARAYON, P., BOUABOULA, M., SHIRE, D., LE FUR, G. & CASELLAS, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232, 54-61.
- GALLIN, J.I., LETO, T.L., ROTROSEN, D., KWONG, C.H. & MALECH, H.L. (1992). Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Opin Immunol*, 4, 53-6.
- GATTI, S. & BARTFAI, T. (1993). Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res*, 624, 291-4.
- GEBREMEDHIN, D., LANGE, A.R., CAMPBELL, W.B., HILLARD, C.J. & HARDER, D.R. (1999). Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol*, 276, H2085-93.
- GERDEMAN, G. & LOVINGER, D.M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, 85, 468-71.

- GIUFFRIDA, A., PARSONS, L.H., KERR, T.M., RODRIGUEZ DE FONSECA, F., NAVARRO, M. & PIOMELLI, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci*, 2, 358-63.
- GOPARAJU, S.K., KURAHASHI, Y., SUZUKI, H., UEDA, N. & YAMAMOTO, S. (1999a). Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis(1). *Biochim Biophys Acta*, 1441, 77-84.
- GOPARAJU, S.K., UEDA, N., TANIGUCHI, K. & YAMAMOTO, S. (1999b). Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 57, 417-23.
- GORDON, C.J. (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav*, 47, 963-91.
- GORDON, C.J. & MOHLER, F.S. (1990). Thermoregulation at a high ambient temperature following the oral administration of ethanol in the rat. *Alcohol*, 7, 551-5.
- GREENFEDER, S.A., NUNES, P., KWEE, L., LABOW, M., CHIZZONITE, R.A. & JU, G. (1995a). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*, 270, 13757-65.
- GREENFEDER, S.A., VARNELL, T., POWERS, G., LOMBARD-GILLOOLY, K., SHUSTER, D., MCINTYRE, K.W., RYAN, D.E., LEVIN, W., MADISON, V. & JU, G. (1995b). Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity. *J Biol Chem*, 270, 22460-6.
- GRIFFIN, M.R., WALKER, F.J., IWANE, M.K., WEINBERG, G.A., STAAT, M.A. & ERDMAN, D.D. (2004). Epidemiology of respiratory infections in young children: insights from the new vaccine surveillance network. *Pediatr Infect Dis J*, 23, S188-92.
- HAJOS, N., KATONA, I., NAIEM, S.S., MACKIE, K., LEDENT, C., MODY, I. & FREUND, T.F. (2000). Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, 12, 3239-49.

- HANDLER, C.M., GELLER, E.B. & ADLER, M.W. (1992). Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 43, 1209-16.
- HANDLER, C.M., PILIERO, T.C., GELLER, E.B. & ADLER, M.W. (1994). Effect of ambient temperature on the ability of mu-, kappa- and delta-selective opioid agonists to modulate thermoregulatory mechanisms in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 847-55.
- HASHIMOTO, M., UENO, T. & IRIKI, M. (1994). What roles does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? *Pflugers Arch*, 429, 50-7.
- HELLE, M., BRAKENHOFF, J.P., DE GROOT, E.R. & AARDEN, L.A. (1988). Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol*, 18, 957-9.
- HENRY, D.J. & CHAVKIN, C. (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett*, 186, 91-4.
- HERKENHAM, M., LYNN, A.B., LITTLE, M.D., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE COSTA, B.R. & RICE, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1932-6.
- HILLARD, C.J. & CAMPBELL, W.B. (1997a). Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Lipid Res*, 38, 2383-98.
- HILLARD, C.J., EDGEMOND, W.S., JARRAHIAN, A. & CAMPBELL, W.B. (1997b). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, 69, 631-8.
- HOFFMAN, A.F. & LUPICA, C.R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci*, 20, 2470-9.
- HOPKINS, S.J. & ROTHWELL, N.J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*, 18, 83-8.

- HOUSSIAU, F.A., BUKASA, K., SINDIC, C.J., VAN DAMME, J. & VAN SNICK, J. (1988). Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin Exp Immunol*, 71, 320-3.
- HOWLETT, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 619-31.
- HOWLETT, A.C. (1984). Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds. *Life Sci*, 35, 1803-10.
- HOWLETT, A.C. & FLEMING, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 26, 532-8.
- HOWLETT, A.C., BARTH, F., BONNER, T.I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W.A., FELDER, C.C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B.R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R.G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 161-202.
- HUANG, C.C., LO, S.W. & HSU, K.S. (2001a). Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol*, 532, 731-48.
- HUANG, W., MOODY, D.E., ANDRENYAK, D.M., SMITH, E.K., FOLTZ, R.L., HUESTIS, M.A. & NEWTON, J.F. (2001b). Simultaneous determination of delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in human plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 25, 531-7.
- ILYIN, S.E., GAYLE, D., FLYNN, M.C. & PLATA-SALAMAN, C.R. (1998). Interleukin-1beta system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-

- alpha, TGF-beta1 and neuropeptide Y mRNAs in specific brain regions during bacterial LPS-induced anorexia. *Brain Res Bull*, 45, 507-15.
- KATONA, I., SPERLAGH, B., MAGLOCZKY, Z., SANTHA, E., KOFALVI, A., CZIRJAK, S., MACKIE, K., VIZI, E.S. & FREUND, T.F. (2000). GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*, 100, 797-804.
- KLUGER, M.J. (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*, 71, 93-127.
- KOMHOFF, M., GRONE, H.J., KLEIN, T., SEYBERTH, H.W. & NUSING, R.M. (1997). Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol*, 272, F460-8.
- KOSHI, T., EDANO, T., ARAI, K., SUZUKI, C., EHARA, Y., HIRATA, M., OHKUCHI, M. & OKABE, T. (1992). Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. *Biochem Biophys Res Commun*, 186, 1322-6.
- KOZAK, W., ZHENG, H., CONN, C.A., SOSZYNSKI, D., VAN DER PLOEG, L.H. & KLUGER, M.J. (1995). Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol*, 269, R969-77.
- KOZAK, K.R., CREWS, B.C., MORROW, J.D., WANG, L.H., MA, Y.H., WEINANDER, R., JAKOBSSON, P.J. & MARNETT, L.J. (2002). Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylethanolamide and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem*, 277, 44877-85.
- KUBES, P. (1993). Polymorphonuclear leukocyte--endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Physiol Pharmacol*, 71, 88-97.
- LEACH, C. (1998a). Targeting inhaled steroids. *Int J Clin Pract Suppl*, 96, 23-7.
- LEACH, C.L. (1998b). Relevance of radiolabeled steroid inhalation studies to clinical outcomes. *J Aerosol Med*, 11 Suppl 1, S29-34.

- LEFEUVRE, R.A., ROTHWELL, N.J. & STOCK, M.J. (1987). Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. *Neuropharmacology*, 26, 1217-21.
- LEMAY, L.G., VANDER, A.J. & KLUGER, M.J. (1990). Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol*, 258, R798-803.
- LI, S., WANG, Y., MATSUMURA, K., BALLOU, L.R., MORHAM, S.G. & BLATTEIS, C.M. (1999). The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res*, 825, 86-94.
- LONG, N.C., OTTERNESS, I., KUNKEL, S.L., VANDER, A.J. & KLUGER, M.J. (1990). Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol*, 259, R724-8.
- LOPEZ-VALPUESTA, F.J. & MYERS, R.D. (1994). Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. *Neuropharmacology*, 33, 989-94.
- LUHESHI, G., MILLER, A.J., BROUWER, S., DASCOMBE, M.J., ROTHWELL, N.J. & HOPKINS, S.J. (1996a). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol*, 270, E91-5.
- LUHESHI, G. & ROTHWELL, N. (1996b). Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol*, 109, 301-7.
- LUSTER, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338, 436-45.
- LYNN, A.B. & HERKENHAM, M. (1994). Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 1612-23.

- MACCARRONE, M., BARI, M., LORENZON, T., BISOGNO, T., DI MARZO, V. & FINAZZI-AGRO, A. (2000a). Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, 275, 13484-92.
- MACCARRONE, M., DE FELICI, M., BARI, M., KLINGER, F., SIRACUSA, G. & FINAZZI-AGRO, A. (2000b). Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem*, 267, 2991-7.
- MACCARRONE, M., FIORUCCI, L., ERBA, F., BARI, M., FINAZZI-AGRO, A. & ASCOLI, F. (2000c). Human mast cells take up and hydrolyze anandamide under the control of 5-lipoxygenase and do not express cannabinoid receptors. *FEBS Lett*, 468, 176-80.
- MACHADO, R.R., SOARES, D.M., PROUDFOOT, A.E. & SOUZA, G.E. (2007). CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (E. coli) and RANTES in rats. *Brain Res*, 1161, 21-31.
- MACKIE, K., LAI, Y., WESTENBROEK, R. & MITCHELL, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15, 6552-61.
- MAJERUS, P.W. (1998). Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. *Curr Biol*, 8, R87-9.
- MARSDEN, P.A. & BRENNER, B.M. (1992). Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol*, 262, C854-61.
- MASHBURN, T.A., JR. (1983). Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull*, 11, 519-26.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. & BONNER, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-4.

- MCMAHAN, C.J., SLACK, J.L., MOSLEY, B., COSMAN, D., LUPTON, S.D., BRUNTON, L.L., GRUBIN, C.E., WIGNALL, J.M., JENKINS, N.A., BRANNAN, C.I. & ET AL. (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J*, 10, 2821-32.
- MECHOULAM, R. & GAONI, Y. (1965a). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron*, 21, 1223-9.
- MECHOULAM, R. & GAONI, Y. (1965b). A Total Synthesis of DL-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 87, 3273-5.
- MILTON, A.S. & WENDLANDT, S. (1971). Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol*, 218, 325-36.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N.E., SCHATZ, A.R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B.R., COMPTON, D.R. & ET AL. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50, 83-90.
- MELO SOARES, D., HIRATSUKA VEIGA-SOUZA, F., SUELI COELHO FABRICIO, A., JAVIER MINANO, F. & PETTO SOUZA, G.E. (2006). CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha induces fever and increases prostaglandin E2 in cerebrospinal fluid of rats: effect of antipyretic drugs. *Brain Res*, 1109, 83-92.
- MINANO, F.J., SANCIBRIAN, M., VIZCAINO, M., PAEZ, X., DAVATELIS, G., FAHEY, T., SHERRY, B., CERAMI, A. & MYERS, R.D. (1990). Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. *Brain Res Bull*, 24, 849-52.
- MOLDRICH, G. & WENGER, T. (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21, 1735-42.

- MORIMOTO, A., NAKAMORI, T., WATANABE, T., ONO, T. & MURAKAMI, N. (1988). Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. *Am J Physiol*, 254, R633-40.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L. & ABU-SHAAR, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
- MURAKAMI, N. & WATANABE, T. (1989). Activation of ACTH release is mediated by the same molecule as the final mediator, PGE₂, of febrile response in rats. *Brain Res*, 478, 171-4.
- MYERS, R.D., PAEZ, X., ROSCOE, A.K., SHERRY, B. & CERAMI, A. (1993). Fever and feeding: differential actions of macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), MIP-1 alpha and MIP-1 beta on rat hypothalamus. *Neurochem Res*, 18, 667-73.
- NEWTON, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*, 55, 603-13.
- NOE, S.N., NEWTON, C., WIDEN, R., FRIEDMAN, H. & KLEIN, T.W. (2000). Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. *J Neuroimmunol*, 110, 161-7.
- O'BANION, M.K. (1999). Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 45-82.
- O'NEILL, G.P. & FORD-HUTCHINSON, A.W. (1993). Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, 330, 156-60.
- O'ROURKE, S.T. & RUDY, T.A. (1984). Intracerebroventricular and preoptic injections of leukotrienes C₄, D₄, and E₄ in the rat: lack of febrile effect. *Brain Res*, 295, 283-8.
- OKA, T., NOZAKI, M. & HOSOYA, E. (1972). Effects of p-chlorophenylalanine and cholinergic antagonists on body temperature changes induced by the administration of morphine to nontolerant and morphine-tolerant rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 180, 136-43.

- OKA, T., OKA, K., SCAMMELL, T.E., LEE, C., KELLY, J.F., NANTEL, F., ELMQUIST, J.K. & SAPER, C.B. (2000). Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol*, 428, 20-32.
- OKA, T., OKA, K., KOBAYASHI, T., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S. & SAPER, C.B. (2003a). Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol*, 551, 945-54.
- OKA, T., OKA, K. & SAPER, C.B. (2003b). Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res*, 968, 256-62.
- OVADIA, H., WOHLMAN, A., MECHOULAM, R. & WEIDENFELD, J. (1995). Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*, 34, 175-80.
- PATEL, N.A., MOLDOW, R.L., PATEL, J.A., WU, G. & CHANG, S.L. (1998). Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*, 797, 225-33.
- PAXINOS, G., WATSON, C., PENNISI, M. & TOPPLE, A. (1985). Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods*, 13, 139-43.
- PERTWEE, R.G. (2005a). Pharmacological actions of cannabinoids. In *Handb Exp Pharmacol*. pp. 1-51.
- PERTWEE, R.G. (2005b). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *Aaps J*, 7, E625-54.

- PIOMELLI, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4, 873-84.
- RAWLS, S.M., CABASSA, J., GELLER, E.B. & ADLER, M.W. (2002). CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1ij]quinolin-6-one)-induced hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 963-8.
- RICE, A.S., FARQUHAR-SMITH, W.P. & NAGY, I. (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 243-56.
- RINALDI, L. (1994). Marijuana: a research overview. *Alaska Med*, 36, 107-13.
- ROCHE, R., HOAREAU, L., BES-HOUTMANN, S., GONTHIER, M.P., LABORDE, C., BARON, J.F., HAFFAF, Y., CESARI, M. & FESTY, F. (2006). Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol*, 126, 177-87.
- ROMANOVSKY, A.A., IVANOV, A.I. & SHIMANSKY, Y.P. (2002). Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol*, 92, 2667-79.
- ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1992). Evidence for antipyretic vasopressinergic pathways and their modulation by noradrenergic afferents. *Physiol Res*, 41, 49-55.
- ROTH, J., HUBSCHLE, T., PEHL, U., ROSS, G. & GERSTBERGER, R. (2002). Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflugers Arch*, 443, 411-7.
- ROTHWELL, N.J. (1990). Mechanisms of the pyrogenic actions of cytokines. *Eur Cytokine Netw*, 1, 211-3.

- ROTHWELL, N.J., HARDWICK, A.J. & LINDLEY, I. (1990). Central actions of interleukin-8 in the rat are independent of prostaglandins. *Horm Metab Res*, 22, 595-6.
- ROTHWELL, N.J. (1991). Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 430-6.
- ROTHWELL, N.J., BUSBRIDGE, N.J., LEFEUVRE, R.A., HARDWICK, A.J., GAULDIE, J. & HOPKINS, S.J. (1991). Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 69, 1465-9.
- ROTHWELL, N.J. & LUHESHI, G.N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, 23, 618-25.
- RUEDA, D., GALVE-ROPERH, I., HARO, A. & GUZMAN, M. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, 58, 814-20.
- SAMUELSSON, B., DAHLEN, S.E., LINDGREN, J.A., ROUZER, C.A. & SERHAN, C.N. (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 237, 1171-6.
- SCHALL, T.J. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*, 3, 165-83.
- SCHULTES, R.E. (1969). Hallucinogens of plant origin. *Science*, 163, 245-54.
- SIMS, J.E., GAYLE, M.A., SLACK, J.L., ALDERSON, M.R., BIRD, T.A., GIRI, J.G., COLOTTA, F., RE, F., MANTOVANI, A., SHANEBECK, K. & ET AL. (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6155-9.
- SIMS, J.E., MARCH, C.J., COSMAN, D., WIDMER, M.B., MACDONALD, H.R., MCMAHAN, C.J., GRUBIN, C.E., WIGNALL, J.M., JACKSON, J.L., CALL, S.M. & ET AL. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*, 241, 585-9.

- SOFIA, R.D. (1972). A paradoxical effect for Δ^9 -tetrahydrocannabinol on rectal temperature in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 4, 281-8.
- STADNYK, A. & GAULDIE, J. (1991). The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunol Today*, 12, A7-12.
- SUNDGREN-ANDERSSON, A.K., OSTLUND, P. & BARTFAI, T. (1998). IL-6 is essential in TNF- α -induced fever. *Am J Physiol*, 275, R2028-34.
- TAVARES, E. & MINANO, F.J. (2000). RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. *Neuropharmacology*, 39, 2505-13.
- TAYLOR, D.A. & FENNESSY, M.R. (1977). Biphasic nature of the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amines of the rat. *Eur J Pharmacol*, 46, 93-9.
- THOMSON, A.W., SATOH, S., NUSSLER, A.K., TAMURA, K., WOO, J., GAVALER, J. & VAN THIEL, D.H. (1994). Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in autoimmune liver disease and evidence for the production of ICAM-1 by cytokine-stimulated human hepatocytes. *Clin Exp Immunol*, 95, 83-90.
- USHIKUBI, F., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., MURATA, T., MATSUOKA, T., KOBAYASHI, T., HIZAKI, H., TUBOI, K., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, A., TANAKA, T., YOSHIDA, N. & NARUMIYA, S. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395, 281-4.
- VALE, W., RIVIER, C., BROWN, M.R., SPIESS, J., KOOB, G., SWANSON, L., BILEZIKJIAN, L., BLOOM, F. & RIVIER, J. (1983). Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog Horm Res*, 39, 245-70.
- VALLIERES, L. & RIVEST, S. (1997). Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator

lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem*, 69, 1668-83.

VANE, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-5.

VOGEL, Z., BARG, J., LEVY, R., SAYA, D., HELDMAN, E. & MECHOULAM, R. (1993). Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J Neurochem*, 61, 352-5.

WATKINS, L.R., WIERTELAK, E.P., GOEHLER, L.E., SMITH, K.P., MARTIN, D. & MAIER, S.F. (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654, 15-26.

WATKINS, L.R., MAIER, S.F. & GOEHLER, L.E. (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63, 289-302.

WENGER, T., GERENDAI, I., FEZZA, F., GONZALEZ, S., BISOGNO, T., FERNANDEZ-RUIZ, J. & DI MARZO, V. (2002a). The hypothalamic levels of the endocannabinoid, anandamide, peak immediately before the onset of puberty in female rats. *Life Sci*, 70, 1407-14.

WENGER, T. & MOLDRICH, G. (2002b). The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 301-7.

WERNER, M.F., FRAGA, D., MELO, M.C., SOUZA, G.E. & ZAMPRONIO, A.R. (2003). Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. *Inflamm Res*, 52, 291-6.

WILSON, R.I., KUNOS, G. & NICOLL, R.A. (2001a). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31, 453-62.

WILSON, R.I. & NICOLL, R.A. (2001b). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410, 588-92.

- YAMAMOTO, I., WATANABE, K., NARIMATSU, S., HAMAJIMA, K. & YOSHIMURA, H. (1985a). Cross-tolerance to the hypothermic effect of delta 8-tetrahydrocannabinol 11-hydroxy-delta 8-tetrahydrocannabinol and chlorpromazine in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 111, 159-66.
- YAMAMOTO, J., TSUCHIYA, M., SAITO, M. & IKEDA, M. (1985b). Cardiac contractile and coronary flow reserves in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 7, 569-77.
- YASUDA, I., HIRANO, T., YUSA, T. & SATOH, M. (1978). Tracheal constriction by morphine and by fentanyl in man. *Anesthesiology*, 49, 117-9.
- YASUDA, K., RAYNOR, K., KONG, H., BREDER, C.D., TAKEDA, J., REISINE, T. & BELL, G.I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6736-40.
- YU, M., IVES, D. & RAMESHA, C.S. (1997). Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 272, 21181-6.
- ZAMPRONIO, A.R., MELO, M.C.C., SILVA, C.A.A., PELA, I.R., HOPKINS, S.J. & SOUZA, G.E.P. (1994a). A Preformed Pyrogenic Factor Released by Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 3, 365-373.
- ZAMPRONIO, A.R., SOUZA, G.E., SILVA, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1994b). Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. *Am J Physiol*, 266, R1670-4.
- ZAMPRONIO, A.R., HOADLEY, M.E., LUHESI, G., ROTHWELL, N.J., DE SOUZA, G.E. & HOPKINS, S.J. (2000a). Interleukin (IL)-6 release and fever induced by a pre-formed pyrogenic factor (PFPF) derived from LPS-stimulated macrophages. *Eur Cytokine Netw*, 11, 589-96.

ZAMPRONIO, A.R., MELO, M.C., HOPKINS, S.J. & SOUZA, G.E. (2000b). Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor (PFPP). *Inflamm Res*, 49, 473-9.

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

ZIMMERMAN, D.M. & LEANDER, J.D. (1990a). Selective opioid receptor agonists and antagonists: research tools and potential therapeutic agents. *J Med Chem*, 33, 895-902.

ZIMMERMAN, R.S., HAYES, R.L., MORRIS, D.L., LYETH, B.G., DEWEY, W.L. & YOUNG, H.F. (1990b). Beta-endorphin in cerebrospinal fluid and serum after severe head injury. *Neurosurgery*, 26, 764-70.

ZYGMUNT, P.M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D.A., CHUANG, H., SORGARD, M., DIMARZO, V., JULIUS, D. & HOGESTATT, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-7.

11 ANEXO

BIOLOGICAL SCIENCES: Pharmacology

**ENDOGENOUS CANNABINOIDS INDUCE FEVER THROUGH THE
ACTIVATION OF CB₁ RECEPTORS.**

Daniel Fraga¹, Cristiane I. S. Zanoni², Giles A. Rae³, Carlos A. Parada⁴, Glória E.P. Souza¹

¹ Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

² Laboratory of Pain, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

³ Department of Pharmacology, Biological Sciences Center, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴ Department of Physiology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Glória Emília Petto de Souza

Laboratory of Pharmacology

Av. Café s/n Monte Alegre

Zip Code 14040-903

Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Telephone number: +55 16 3602-4184

Fax number: +55 41 3602-4880

e-mail address: gepsouza@fcfrp.usp.br

Manuscript information: pages 25 and figures 4

Abbreviations: Arachidonylethanolamide (AEA), arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA), (*R,S*)-(+)-(2-Iodo-5-nitrobenzoyl)-[1-(1-methyl-piperidin-2-ylmethyl)-1*H*-indole-3-yl] methanone (AM1241), N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AM251), 6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morfolinyl)etil]-1*H*-indol-3-yl](4-methoxyphenyl) methanone (AM630), Capsazepine (CPZ), Lipopolysaccharide (LPS), body temperature (*T_c*) [3-(3-carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate (URB597).

Abstract

The present study investigated the effects of endogenous cannabinoids on the body core temperature (Tc) and febrile responses to lipopolysaccharide (LPS) in Wistar rats. Intracerebroventricular (i.c.v.) or intrahypothalamic (i.h.) administration of anandamide (AEA) induced dose-dependent increases in Tc. The increase in Tc induced by AEA (1 µg, i.c.v.) microinjection was preceded by decreases in tail skin temperature and heat loss index, and thus constituted a concerted real fever response. The fatty acid amid inhibitor (FAAH), URB597 and the selective CB₁ agonist ACEA induced a bell shaped increase on Tc. Nevertheless, the i.c.v. injection of the selective CB₂ agonist AM1241 did not induce any change on Tc. The i.c.v. pre-treatment with the selective CB₁ antagonist AM251 reduced the fever induced by AEA 1.0 µg, i.c.v. and ACEA 0.01 µg i.c.v. However, the i.c.v. pre-treatment with AM630, selective CB₂ antagonist, did not alter the fever induced by AEA. AM251 injected i.c.v. also reduced the fever induced by LPS 50 µg, i.p. All together these results suggest that the endogenous cannabinoid AEA induce a real fever, through the activation of the CB₁ receptors and that endocannabinoids are involved in the development of febrile response induced by LPS.

Introduction

Fever is a multi-mediated response which integrates the complex physiological defence strategy of the host when invading microbial or non-microbial organisms are recognized as foreign by immune cells. Recognition of the invader activates the production and release of a diverse array of peptidic and non-peptidic mediators which includes many cytokines, CRF, endothelins (1-5), endogenous opioids (6) and prostaglandins (6, 7). Such mediators activate mechanisms which ultimately increase the thermoregulatory set-point located in the hypothalamus to promote the febrile response (8).

The recreational, medicinal and ritualistic uses of the *Cannabis sativa* date back thousands of years, but it was only in the 1960s that the plant's main active constituent, Δ^9 -THC, was isolated and structurally characterised (9, 10). Since then, it has been disclosed that Δ^9 -THC largely mimics the effects of the lipidic endocannabinoids anandamide (arachidonylethanolamide, AEA, (11) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG, (12), which promote widespread effects through activation of two specific G protein-coupled cannabinoid receptors, named CB₁ (13) and CB₂ receptors (14), respectively. These receptors can signal inhibitions of adenylyl cyclase and calcium channel activities and activate mitogen-activated protein kinases and potassium channels. CB₁ receptors are heterogeneously distributed within the central nervous system and can account for several of the characteristic pharmacological properties of cannabinoid receptor agonists (15). CB₂ receptors are present mainly in the periphery, have been detected in cells of the immune system and are responsible for the immunoregulatory effects of cannabinoids (16, 17). Endocannabinoid inactivation is dependent on two mechanisms, reuptake and

degradation (18-20). The fatty acid amide hydrolase (FAAH) is the main enzyme responsible for the degradation of AEA to arachidonic acid and ethanolamide (21-23).

It has long been recognized that rodents treated with cannabinoids display four characteristic symptoms: analgesia, catalepsy, hypoactivity and hypothermia (15). Despite the prominence of hypothermia (i.e. a reduction in body core temperature, T_c), this symptom is only observed in animals administered high doses of Δ^9 -THC. In fact, at lower doses this cannabinoid have been found to increase T_c, rather than decrease it (24, 25). As to the effects of endocannabinoids on T_c, CRAWLEY et al., (1993) and CHAPERON et al., (1999) have shown that systemic administration of AEA induces a dose-dependent reduction in the T_c (26, 27). However, the effects of centrally-administered endocannabinoids on T_c responses and the role of CB₁ and CB₂ receptors in bringing about their putative effects are currently unknown. The present study was designed to examine this issue and also the possible roles of central endocannabinoids and their receptors in the febrile response to LPS.

Results

Our first goal was to evaluate the effect of i.c.v (0.01, 0.1, 1 and 10 μg , in 2 μl) or i.h. (0.1, 1, 10 and 100 μg , in 0.2 μl) administration of the endocannabinoid anandamide (AEA) on Tc. Figure 1 A shows that the i.c.v. administration of AEA induced a dose-dependent increase in Tc which started at 2 h after administration and peaked at 5 h. Likewise, i.h. AEA microinjection also induced a dose-dependent increase in Tc (Figure 1B), with onset at 1 h and a peak at 4 h after administration. The increase in Tc induced by i.c.v. AEA (1 μg) was preceded (and accompanied) by significant and long-lasting reductions in the temperature of the tail skin (Figure 1C) and decreases in the heat loss index (HLI; Figure 1D), indicating the occurrence of vasoconstriction.

Next, we investigated the effects of a FAAH inhibitor (URB597) and of selective agonists of CB₁ (ACEA) and CB₂ (AM1241) receptors on Tc. The i.c.v. administration of URB597 (0.001, 0.01, 0.1 and 1 ng in 2 μl) or ACEA (0.001, 0.01, 0.1 and 1 μg in 2 μl) induced a bell-shaped increase on Tc (Figure 2A and 2B, respectively). The increase on Tc induced by URB597 0.1 ng started 1.5 h after its administration and peaked at 5 h, whereas the onset and peak of the Tc increase caused by 0.01 μg of ACEA were at 3 and 5 h after injection, respectively. On the other hand, the i.c.v. administration of the selective CB₂ receptor agonist AM1241 (0.01, 0.1 and 1 μg in 2 μl), did not affect Tc values significantly (Figure 2C).

It is well known that AEA can interact with CB₁, CB₂ and vanilloid receptors (15, 28). This prompted us to evaluate the effects of prior treatment with antagonists of CB₁ (AM251), CB₂ (AM630) and vanilloid (capsazepine) receptors on the development of the fever responses to AEA and ACEA. Prior i.c.v. treatment with AM251, at doses of 1, 5 and 10 μg , caused dose-dependent inhibitions of the febrile response to AEA (1 μg , i.c.v.;

Figure 3A). AM251 also reduced the fever induced by ACEA (0.01 μg , i.c.v.) when given i.c.v. at 5 μg (Figure 3B). However, neither AM630 (10 μg , i.c.v.) nor capsazepine (1, 3, 10 μg , i.c.v.) influenced the fever induced by AEA (Figures 3C and 3D, respectively). In addition, it is important to note that i.c.v. injection of AM251, AM630 or capsazepine alone (each tested at their highest dose) failed to alter the Tc of control animals (Figure 3A, 3B and 3C).

A last experiment was designed to investigate if endogenous cannabinoids contribute to the fever induced by LPS. Systemic administration of LPS (50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.) induced an increase in Tc which started 1 h after the injection, peaked at 2.5 h and remained until 6 h. Prior treatment of the animals with the selective CB₁ receptor antagonist AM251 (5 μg , i.c.v) promoted a marked and long-lasting decrease in the fever induced by LPS, from the 1.5 h time point onwards (Figure 4).

Discussion

The present study shows that central administration of the endocannabinoid AEA promotes a dose-dependent Tc increase in rats, which appears to integrate a genuine febrile response. The effect of AEA on Tc was mimicked by i.c.v. injection of a selective CB₁ receptor agonist and prevented by treatment with a CB₁ receptor antagonist, whereas ligands selective for CB₂ receptor were inactive. Moreover, as blockade of AEA metabolism by an FAAH inhibitor increased Tc and LPS-induced fever was reduced by blockade of central CB₁ receptors, central endocannabinoids appear to play a relevant physiological role in thermoregulation.

Various studies have reported that systemic or i.c.v. treatment with exogenous cannabinoids induces robust hypothermic responses in rodents (29-32), which are likely to be subsequent to stimulation of CB₁ receptors (31). Likewise, systemic (i.p.) AEA administration in rats was reported to cause solely hypothermic responses (CRAWLEY et al., 1993; CHAPERON et al., 1999), and this effect was blocked by i.p. treatment with the CB₁ receptor antagonist SR141716A (33). Conversely, i.p. and p.o. administration of Δ^1 -THC (SOFIA, 1972) or i.v. Δ^9 -THC injection (TAYLOR & FENNESSY, 1977) were found to cause dual effects in rats, i.e. increases in Tc at lower doses, but profound hypothermia following higher doses. The current study, which is possibly the first to assess Tc responses to a centrally-administered endocannabinoid, detected clear-cut sustained and dose-related increases in Tc following i.c.v. injection of AEA.

Although CB₂ receptors are normally absent from the brain, CB₁ receptors are widely, but heterogeneously, expressed throughout the CNS (13-15). Importantly, the hypothalamus is particularly enriched with CB₁ receptors (34), especially in the lateral hypothalamic area and preoptic anterior nucleus (35), structures which are critically implicated in thermoregulation (36). In agreement with this evidence, we observed that

AEA was about 10-fold more potent in promoting increases in Tc when microinjected directly into the hypothalamus than when the i.c.v. route of administration was employed.

By measuring body and tail skin temperatures concomitantly, we also examined if the increase in Tc induced by i.c.v. AEA was an integrated thermoregulatory response (i.e. fever) or merely the result of hyperthermia. Indeed, the long-lasting increase in Tc caused by AEA (1 μ g, i.c.v.) was preceded and accompanied by a reduction of the tail skin temperature, which led to a sustained reduction of the calculated HLI (24). Therefore, endocannabinoid-treated rats clearly developed an integrated response comprising an increase in body temperature associated with significant decrease in heat dissipation due to tail skin vasoconstriction, as is characteristic of the febrile response phenomenon in this species (37).

Even though AEA displays higher affinity for the CB₁ receptors, it can also interact with the CB₂ and vanilloid receptors (13-15, 28). We have thus attempted to carefully evaluate which of these targets was relevant for the development of AEA-induced fever. Our findings demonstrate that the fever induced by i.c.v. AEA was sensitive to dose-dependent inhibition by prior treatment with the CB₁ receptor antagonist AM251, but not the CB₂ receptor antagonist AM630. Moreover, i.c.v. injections of the CB₁ receptor agonist ACEA caused graded increases in Tc over a broad range of doses, whereas similar treatment with the CB₂ receptor agonist AM1241 (up to 1 μ g) did not change body temperature. Finally, central administration of capsazepine, a vanilloid receptor antagonist (38), prior to AEA administration, did not modify the fever response induced by this endocannabinoid. Therefore, the evidence collected points to a pivotal role of CB₁ receptors in the signaling of the AEA-induced fever response.

It is perhaps important to comment that i.c.v. ACEA yielded a bell-shaped dose-response curve for its Tc increasing effect, whereas AEA did not. This difference could be

ascribed to: 1) the limited range of AEA doses chosen for the curve impeded the detection of the curve's downward deflection portion; 2) at higher doses ACEA (unlike AEA) may lose its selectivity towards CB₁ receptors and act on additional AEA-insensitive targets; and/or 3) i.c.v. injection of high doses of CB₁ receptor agonists might stimulate hypothermic responses, as reported to occur in rats following systemic injection of endocannabinoids (26, 27, 33). Further studies are needed to address each of these possibilities.

To investigate if central endogenous cannabinoids participate in thermoregulation, we assessed the effects of an inhibitor of FAAH (URB597), the main enzyme responsible for AEA degradation (21, 22), on T_c, as well as the influence of the selective CB₁ receptor antagonist AM251 on fever induced by an exogenous pyrogen (LPS). Indeed, i.c.v. administration of URB597 (0.001 to 1 ng) caused graded increases in T_c, even though 1 ng induced a smaller effect than 0.1 ng. The reasons why this dose-response curve to URB597 displays a bell-shaped pattern remain to be clarified. Nonetheless, since selective FAAH inhibition would be expected to increase endogenous AEA concentration in the synaptic cleft to enhance stimulation of CB₁ receptors, this data favors the hypothesis that endocannabinoids contribute to T_c regulation.

On the other hand, the febrile response to systemic (i.p.) LPS injection was reduced by prior i.c.v. injection of the CB₁ receptor antagonist AM251, at a dose which did not alter T_c in control rats *per se*. This constitutes strong functional evidence for the participation of the central endocannabinoid system in mediating, at least partially and via CB₁ receptor-operated mechanisms, the fever promoted by this exogenous pyrogen. A recent study (39) also reported that systemic administration of the selective CB₁ receptor antagonist SR141716 prevented the development of fever induced by LPS (50 µg/kg, i.p.) in rats. Surprisingly, the same study found that i.p. injections of the CB₁ selective agonist

WIN 55212-2 or Δ^9 THC, at doses that did not cause hypothermia *per se*, also inhibited the febrile response to LPS, and that the anti-pyretic effect of WIN 55212-2 (which also raised plasma IL-6 levels) was prevented by SR141716. The authors suggested that perhaps their unexpected findings could be due to a partial agonistic activity of SR141716 at CB₁ receptors. The different findings, concerning Tc changes induced by systemic (39) and i.c.v. (present study) injections of agonists and antagonists of CB₁ receptor agonists, might indicate that central and peripheral endocannabinoids exert distinct modulatory functions in thermoregulatory changes induced by pyrogens.

In summary, the current study has shown that i.c.v. injection of a CB₁ (but not CB₂) receptor agonist causes sustained increases in Tc. This effect is associated with simultaneous peripheral vasoconstriction and a reduction in HLI, thus characterizing an integrated fever response. Importantly, as central injection of an inhibitor of AEA catabolism raised Tc and LPS-induced fever was sensitive to attenuation by central CB₁ receptor blockade, brain endocannabinoids seem to be implicated in pyrexia. We are presently engaged in studies to determine at what level(s) endocannabinoids are recruited to take part in the complex central signaling mechanisms triggered by LPS to provoke fever. Such studies could help establish the potential of central CB₁ receptors as a new relevant target for anti-pyretic therapy.

Material and methods

Animals

Experiments were conducted using male Wistar rats weighing 180-200 g, housed 4-5 per cage at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM) with free access to food chow and tap water. All experiments were approved by the institution's ethics committee for research on laboratory animal use and are in accordance with the guidelines set by the U. S. National Institute of Health and Brazilian legislation.

Drugs

Arachidonylethanolamide (Anandamide), arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA), (*R,S*)-(+)-(2-Iodo-5-nitrobenzoyl)-[1-(1-methyl-piperidin-2-ylmethyl)-1*H*-indole-3-yl] methanone (AM1241), N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AM251), 6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1*H*-indole-3-yl[4-metoxiphenyl] methanone (AM630; all purchased from Tocris, Ellisville) and [3-(3-carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate (URB597 Cayman Chemical Co., EUA) (URB597; Cayman Chemical Co., Ann Arbor) were all diluted in saline containing propylene glycol 10% and Tween 80 1%. Capsazepine (CPZ; Sigma Chem. Co., St. Louis) was diluted in saline containing ethanol 20% and cremophor 20%. Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111:B4, Sigma Chem. Co., St. Louis) was diluted in saline.

Intracerebral cannula implantation and microinjections.

Under anaesthesia with sodium pentobarbital (40 mg.kg^{-1} , i.p., Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), a permanent 22-gauge stainless steel guide cannula (0.8 mm outer diameter, 10 mm long) was stereotaxically implanted into the right lateral ventricle at

coordinates: 1.6 mm lateral to the midline, 1.5 mm posterior to bregma and 2.5 mm under the brain surface and the incisor bar was lowered 2.5 mm below the horizontal zero (40). In other rats, for intra-hypothalamic (i.h.) injection, a 24-gauge stainless steel guide cannula (0.55 mm outer diameter, 15 mm long), was stereotaxically unilaterally implanted into to the anterior hypothalamic preoptic area (AH/POA). Its stereotaxic coordinates were: 0.6 mm lateral to the midline, 7.7 mm anterior to the interaural line and 6.5 mm under the brain surface and the incisor bar was lowered 3.0 mm below the horizontal zero (40). Cannulae were fixed to the skull with jeweller's screws embedded in dental acrylic cement. All procedures were conducted under aseptic conditions and the rats were treated with oxytetracycline hydrochloride (400 mg kg⁻¹, i.m.) and allowed to recover for 1 week prior to experimental use.

Pyrogenic stimuli were all injected between 10:00 and 11:00 AM. Microinjections into the lateral ventricle and into the AH/POA were made aseptically. For that purpose, a 30-gauge needle, connected by polyethylene (PE10) tube to a 25 µl or 10 µl Hamilton syringe. The needle protruded 2 mm beyond the cannula tip and a 2 µl (i.c.v.) or 200 nl (i.h.) volume was injected slowly (over 1 min) with Hamilton syringe respectively. For i.h. injections the syringe was coupled to a microinfusion pump (KD Scientific, model KDS101, EUA). After injection, the needle remained in place for 30 seconds before it was withdrawn, to prevent backflow of the injection fluid through the cannula.

After experiments, rats received a microinjection Evan's Blue (2.5%) either into the lateral ventricle (5 µl) or into the POA (500 nl), as appropriate, followed by an overdose of pentobarbital, and was perfused transcardially with 0.9% saline, followed by 4% paraformaldehyde. Each brain was removed, stored in the same fixative for 6 h, kept in 30% sucrose overnight, and cut in 40 µm coronal sections on freezing microtome to assess, under light microscopy, the position of the cannulae and respective sites of

perfusion. Animals showing cannula misplacement or blockage upon injection, or abnormal body weight gain patterns during the post-implantation period were excluded from the study.

Temperature measurements

T_c was measured by inserting a thermistor probe (Yellow Springs Instruments 402, USA) 4 cm into the rectum for 1 min, at 30 min intervals, for up to 6 h. For each measurement, the animals were gently picked up and held manually during the temperature measurements, without removing the animal from its home cage. This procedure was performed at least twice on the day before the experiment to minimize temperature changes secondary to handling. On the day of the experiment, the basal temperature of each animal was estimated four times, at 30 min intervals, before any injection. Only animals displaying a mean basal rectal temperature between 36.8 and 37.2 °C were selected for the study. The experiments were conducted during the light cycle in a temperature-controlled room of 28 ± 1 °C, the thermoneutral zone for rats (37, 41). The skin temperature was measured, without removing the rats from their home cages, by attaching a thermistor probe to the lateral surface of most distal third of the tail for 1 min, at 30 min intervals, up to 6 h. The thermistor probe was fixed and isolated from the changes of ambient temperature by a thermal isolating tape laying over a piece of micropore to avoid tail skin irritation. On the day of the experiment, the basal skin temperature of each animal was determined by four consecutive measurements, carried out at 30 min intervals before any injection. Only animals displaying a basal skin temperature between 32.0 and 33.0 °C were selected for the study.

To indirectly estimate the changes in the peripheral vasomotor tone, the heat loss index (HLI) was calculated to eliminate direct influences of both T_{ambient} and T_{body} on T_{skin} , according to the formula:

$$\text{HLI} = (T_{\text{skin}} - T_{\text{ambient}}) / (T_{\text{body}} - T_{\text{ambient}})$$

The value of HLI can vary from 0 (maximal vasoconstriction) to 1 (maximal vasodilation) (43).

Experimental design

In the first set of experiments we evaluated the effects of anandamide administrated i.c.v. (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) or i.h. (0.1, 1, 10 and 100 ng/0.2 μl) or the same volume of vehicle on body temperature. The animals also received anandamide 1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v. to evaluate the effects of this endocannabinoid simultaneously on body and tail skin temperature and consequently in the heat loss index.

In the next set of experiments, we investigated the effects of the FAAH inhibitor, URB597 (0.001, 0.01, 0.1 and 1 ng/2 μl , i.c.v.), the CB_1 selective agonist, ACEA (0.001, 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.) and the CB_2 selective agonist, AM1241 (0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.) or the same volume on body temperature of rats.

The following experiments were designed to investigate which receptor would be implicated in the febrile response to anandamide and ACEA. The animals were pre-treated with the selective CB_1 receptor antagonist, AM251 (1, 5 and 10 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.), or the same volume of vehicle 30 minutes before the administration of AEA (1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.) or ACEA (0.01 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.). Alternatively, the animals were pre-treated with the selective CB_2 receptor antagonist, AM630 (10 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.), or the same volume of vehicle 30 minutes before AEA (1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, i.c.v.). Another set of animals were pre-treated

with the vanilloid receptor antagonist, capsazepine (1, 3 and 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.), or the same volume of vehicle 30 minutes before AEA (1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.).

The last experiment was designed to investigate the contribution of endocannabinoids to the febrile response induced by LPS. The animals were pre-treated with AM251 (5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v.) or the same volume of vehicle 30 minutes before the administration of LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.).

Statistical analysis

For data analysis of changes in body and skin temperature, the baseline temperature before any treatment was calculated for each animal by averaging the last three temperature (T_c or T_{skin}) measurements before any injection, and all subsequent temperatures were expressed as changes from this averaged basal value (ΔT_c). HLI was calculated as described above. All data are reported as means \pm standard error mean (mean \pm s.e. mean) and were analyzed for statistical significance by two-way analysis of variance followed by Bonferroni's test. The data were analyzed using Prism[®] Software (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). Significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgments:

This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 304627/2007-0) and Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2007/04791-1). Daniel Fraga was the recipient of a CNPq doctoral scholarship.

Figure Legends:

Figure 1: Effect of anandamide (AEA) on core body and tail skin temperature. The animals received AEA intracerebroventricular (i.c.v., 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/2.0 \mu\text{l}$, panel A; 1.0 μg , 2 μl , panel C), intra-hypothalamic (i.h., 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 ng/0.2 μl , panel B) or the same volume of vehicle. In Panel A and B values show the mean \pm s.e.mean of the change in rectal in $^{\circ}\text{C}$ observed in 6-10 rats. In panel C, values show the mean \pm s.e.mean of the change in rectal or tail skin temperature (ΔT) in $^{\circ}\text{C}$ observed in 7-10 rats. Panel D shows the heat loss index (HLI). Basal temperatures (mean \pm SEM; $^{\circ}\text{C}$) were as follows: Panel A: \circ , 37.0 ± 0.1 ; \bullet , 37.1 ± 0.0 ; \square , 37.0 ± 0.1 ; \blacksquare , 36.9 ± 0.1 ; \diamond , 37.0 ± 0.0 . Panel B: \circ , 36.8 ± 0.1 ; \bullet , 37.0 ± 0.1 ; \square , 37.1 ± 0.1 ; \blacksquare , 36.9 ± 0.2 ; \diamond , 36.9 ± 0.1 . Panel C: \circ , 37.1 ± 0.1 ; \square , 37.0 ± 0.2 ; \bullet , 32.6 ± 0.2 ; \blacksquare , 32.7 ± 0.3 ; * $p < 0.05$ compared to vehicle group.

Figure 2: Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 and of selective agonists of CB_1 (ACEA) and CB_2 (AM1241) receptors on body temperature. The animals received URB597 (0.001, 0.01, 0.1 or 1 ng/2 μl , i.c.v. panel A), ACEA (0.001, 0.01, 0.1 or 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v. panel B) or AM1241 (0.01, 0.1 or 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$, i.c.v. panel C), or the same volume of vehicle (2 μl , i.c.v.). Values represent the mean \pm s.e.mean of the change in rectal temperature (ΔT_{c} , in $^{\circ}\text{C}$) observed in 6-9 rats. Basal temperatures (mean \pm SEM; $^{\circ}\text{C}$) were as follows: Panel A: \circ , 37.1 ± 0.1 ; \bullet , 37.0 ± 0.0 ; \square , 37.0 ± 0.1 ; \blacksquare , 36.9 ± 0.1 ; \diamond , 37.1 ± 0.2 ; Panel B: \circ , 37.2 ± 0.2 ; \bullet , 37.1 ± 0.1 ; \square , 37.3 ± 0.2 ; \blacksquare , 36.9 ± 0.2 ; \diamond , 37.0 ± 0.1 ; Panel C: \circ , 37.2 ± 0.1 ; \bullet , 37.0 ± 0.2 ; \square , 37.1 ± 0.1 ; \blacksquare , 37.2 ± 0.0 . * $p < 0.05$ compared to vehicle group.

Figure 3: Effect of treatment with selective antagonists of CB₁ (AM251), CB₂ (AM630) and TRPV1 (Capsazepine - CPZ) receptors on fever induced by AEA and the selective CB₁ receptor agonist ACEA. The animals received AM251 (1, 5 or 10 µg, 2 µl, i.c.v. panel A), AM251 (5 µg, 2 µl, i.c.v. panel B), AM630 (10 µg, 2 µl, i.c.v., panel C), CPZ (1, 3 or 10 µg, 2 µl, i.c.v. panel D) or vehicle (Veh, 2 µl) 30 min before i.c.v. injection of AEA (1 µg, 2 µl i.c.v., Panel A, C and D), ACEA (0.01 µg, 2 µl, i.c.v., Panel B) or vehicle (2 µl). Values represent the mean ± s.e.mean of the change in rectal temperature (ΔT_c , in °C) observed in 6-9 rats. Basal temperatures (mean ± SEM; °C) were as follows: Panel A: ○, 37.0 ± 0.1; ●, 37.1 ± 0.0; □, 37.0 ± 0.1; ■, 36.9 ± 0.1; ◇, 37.2 ± 0.2; ◆, 37.1 ± 0.2; Panel B: ○, 36.9 ± 0.1; □, 37.0 ± 0.2; ■, 37.0 ± 0.1; Panel C: ○, 36.9 ± 0.2; □, 37.1 ± 0.1; ■, 37.2 ± 0.1; Panel D: ○, 37.2 ± 0.1; ●, 37.1 ± 0.1; □, 37.1 ± 0.0; ■, 36.9 ± 0.2; ◇, 37.1 ± 0.2. * p<0.05 compared to AM251/Veh or CPZ/Veh treated group. # p<0.05 compared to Veh/AEA or Veh/ACEA treated group.

Figure 4: Effect of the selective CB₁ receptor antagonist AM251 on the febrile response to LPS. Animals received AM251 (5 µg, 2 µl, i.c.v.) or vehicle (Veh, 2 µl, i.c.v.) 30 min before i.p. injection of LPS (50 µg.kg⁻¹) or saline (1 ml.kg⁻¹). Values represent the mean ± s.e.mean of the change in the rectal temperature (ΔT_c , in °C) observed in 6-7 rats. Basal temperatures (mean ± SEM; in °C) were as follows: ○, 37.0 ± 0.2; □, 37.1 ± 0.1; ■, 36.9 ± 0.1; * p<0.05 compared to Sal/stimulus treated group. # p<0.05 compared to Veh/LPS treated group.

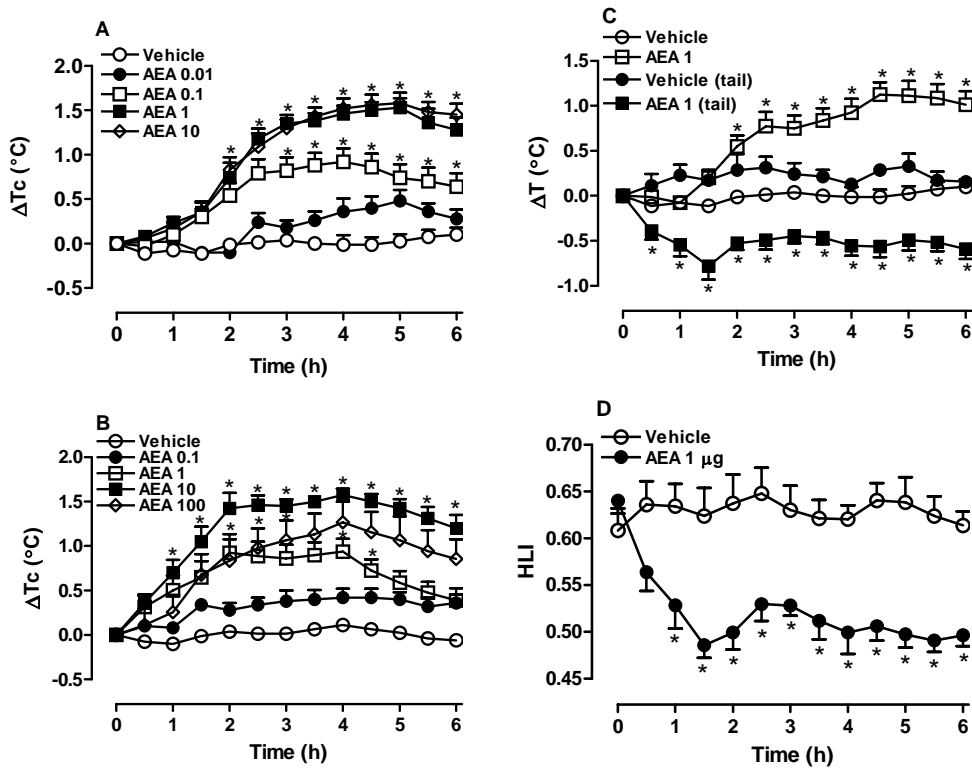


Figure 1

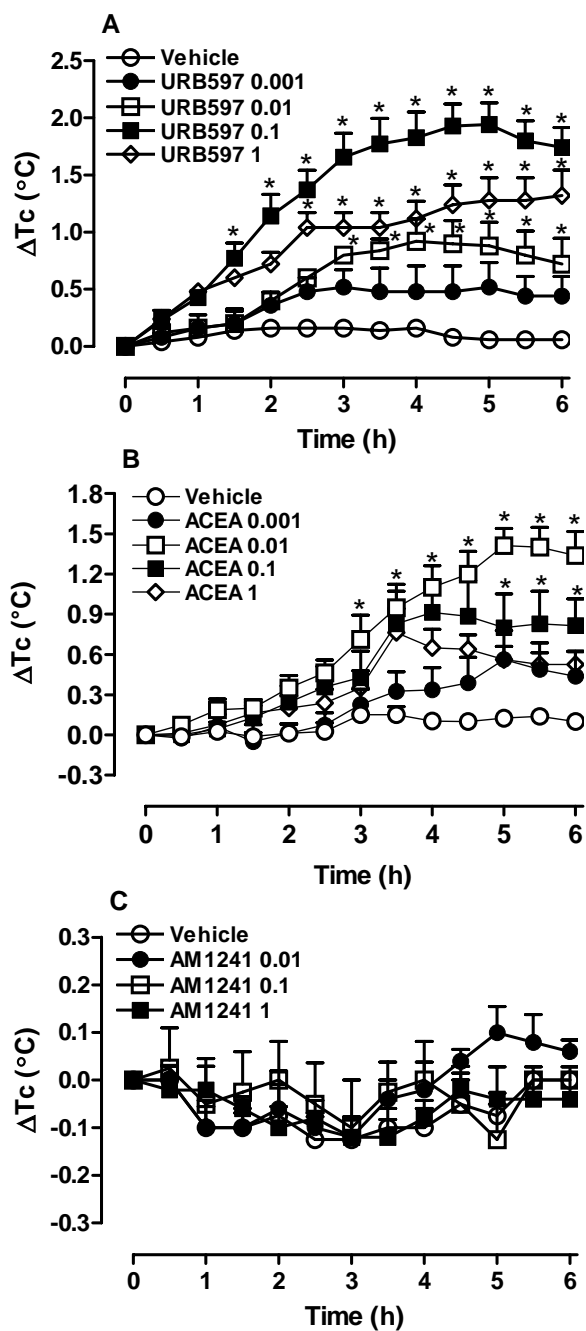


Figure 2

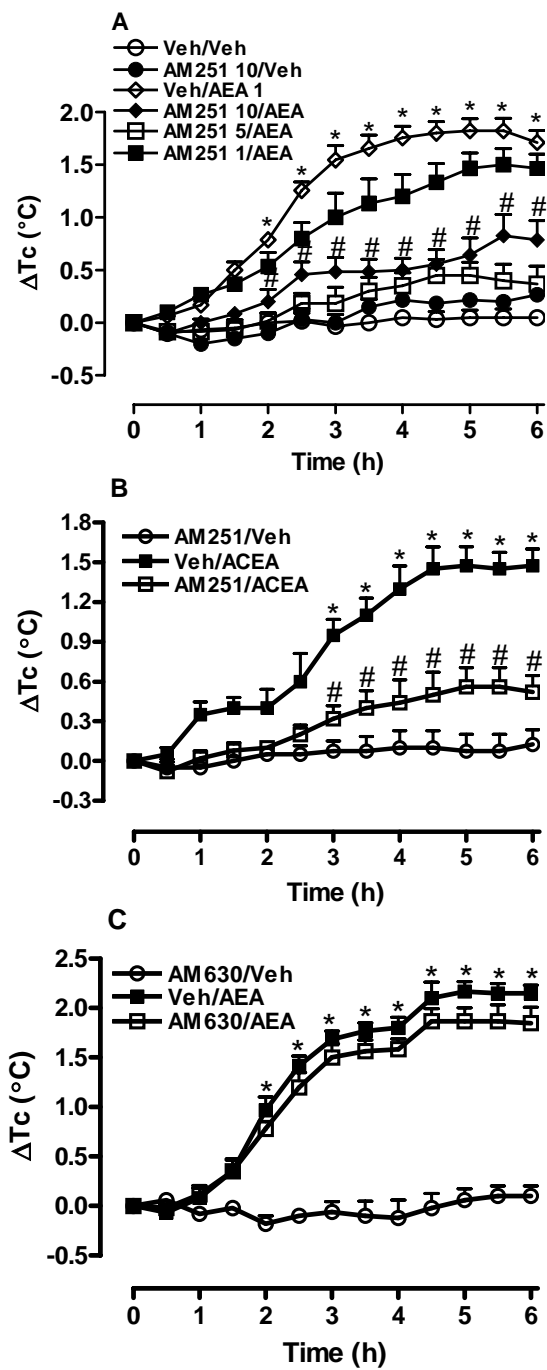


Figure 3

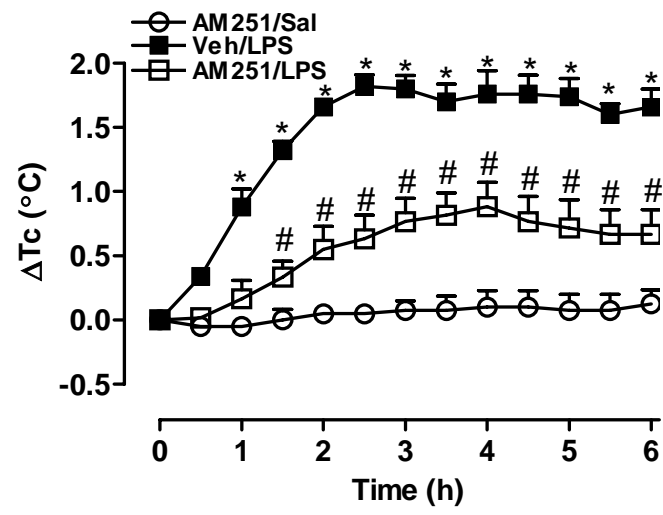


Figure 4

References:

1. Dinarello, C. A. (1984) *Rev Infect Dis* **6**, 51-95.
2. Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr. & O'Connor, J. V. (1986) *J Exp Med* **163**, 1433-50.
3. Fabricio, A. S., Silva, C. A., Rae, G. A., D'Orleans-Juste, P. & Souza, G. E. (1998) *Br J Pharmacol* **125**, 542-8.
4. Helle, M., Brakenhoff, J. P., De Groot, E. R. & Aarden, L. A. (1988) *Eur J Immunol* **18**, 957-9.
5. Rothwell, N. J. (1990) *Horm Metab Res* **22**, 616-8.
6. Fraga, D., Machado, R. R., Fernandes, L. C., Souza, G. E. & Zampronio, A. R. (2008) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R411-20.
7. Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Mancilla, J., Bishai, I., Lees, J. & Cocceani, F. (1991) *Brain Res* **562**, 199-206.
8. Zeisberger, E. (1999) *Jornal of Thermal Biology* **24**, 287-326.
9. Mechoulam, R. & Gaoni, Y. (1965) *J Am Chem Soc* **87**, 3273-5.
10. Mechoulam, R. & Gaoni, Y. (1965) *Tetrahedron* **21**, 1223-9.
11. Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992) *Science* **258**, 1946-9.
12. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R. & et al. (1995) *Biochem Pharmacol* **50**, 83-90.
13. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. (1990) *Nature* **346**, 561-4.
14. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. (1993) *Nature* **365**, 61-5.
15. Pertwee, R. G. (2005) in *Handb Exp Pharmacol*, pp. 1-51.
16. Howlett, A. C. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 619-31.
17. Pertwee, R. G. (1997) *Pharmacol Ther* **74**, 129-80.
18. Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A. & Piomelli, D. (1997) *Science* **277**, 1094-7.
19. Hillard, C. J. & Campbell, W. B. (1997) *J Lipid Res* **38**, 2383-98.
20. Hillard, C. J., Edgemond, W. S., Jarrahan, A. & Campbell, W. B. (1997) *J Neurochem* **69**, 631-8.
21. Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. & Gilula, N. B. (1996) *Nature* **384**, 83-7.
22. Goparaju, S. K., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Ueda, N. & Yamamoto, S. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1441**, 77-84.
23. Goparaju, S. K., Ueda, N., Taniguchi, K. & Yamamoto, S. (1999) *Biochem Pharmacol* **57**, 417-23.
24. Fennessy, M. R. & Taylor, D. A. (1977) *Br J Pharmacol* **60**, 65-71.
25. Sofia, R. D. (1972) *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **4**, 281-8.
26. Chaperon, F. & Thiebot, M. H. (1999) *Crit Rev Neurobiol* **13**, 243-81.
27. Crawley, J. N., Corwin, R. L., Robinson, J. K., Felder, C. C., Devane, W. A. & Axelrod, J. (1993) *Pharmacol Biochem Behav* **46**, 967-72.
28. Rice, A. S., Farquhar-Smith, W. P. & Nagy, I. (2002) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**, 243-56.

29. Holtzman, D., Lovell, R. A., Jaffe, J. H. & Freedman, D. X. (1969) *Science* **163**, 1464-7.
30. Lomax, P. & Campbell, C. (1971) *Experientia* **27**, 1191-2.
31. Rawls, S. M., Cabassa, J., Geller, E. B. & Adler, M. W. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 963-8.
32. Taylor, D. A. & Fennessy, M. R. (1977) *Eur J Pharmacol* **46**, 93-9.
33. Costa, B., Vailati, S. & Colleoni, M. (1999) *Behav Pharmacol* **10**, 327-31.
34. Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K. & Walker, J. M. (1998) *Neuroscience* **83**, 393-411.
35. Moldrich, G. & Wenger, T. (2000) *Peptides* **21**, 1735-42.
36. Boulant, J. A. (2000) *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S157-61.
37. Romanovsky, A. A., Ivanov, A. I. & Shimansky, Y. P. (2002) *J Appl Physiol* **92**, 2667-79.
38. Valenzano, K. J. & Sun, Q. (2004) *Curr Med Chem* **11**, 3185-202.
39. Benamar, K., Yondorf, M., Meissler, J. J., Geller, E. B., Tallarida, R. J., Eisenstein, T. K. & Adler, M. W. (2007) *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 1127-33.
40. Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M. & Topple, A. (1985) *J Neurosci Methods* **13**, 139-43.
41. Gordon, C. J. (1990) *Physiol Behav* **47**, 963-91.

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](#)