

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

**Mediadores envolvidos na resposta febril induzida pela
sepse (CLP) em ratos**

Maria José Figueiredo

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Maria José Figueiredo

**Mediadores envolvidos na resposta febril induzida pela
sepsse (CLP) em ratos**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Figueiredo, Maria José

Mediadores envolvidos na resposta febril induzida pela sepse (CLP) em ratos. Ribeirão Preto, 2008.

161p. Il. 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza

1. sepse, 2. febre, 3. prostaglandina, 4. citocina

DEDICO ESTE TRABALHO

À **Deus**, pelo Dom da vida, por atender meus pedidos e sempre guiar meus passos

Aos **meus Pais, Manoel Alves Figueiredo e Teresa Veroneze Figueiredo** pelo incentivo, amor e por me ensinarem os verdadeiros valores da vida. Se cheguei até aqui, foi graças a vocês e por vocês.

As minhas **irmãs, Rita de Cássia Figueiredo e Carina Figueiredo** minhas melhores amigas. Eu não teria conseguido sem o companheirismo, amor e paciência durante todos esses anos longe de nossos pais.

Vocês são o meu maior tesouro.

AGRADECIMENTOS

A **CAPES e FAPESP** pelo apoio financeiro.

À **Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza**, pela oportunidade de crescimento profissional, pela orientação científica, amizade e carinho.

Aos queridos amigos do Laboratório de inflamação e febre, do Laboratório de Farmacologia da FCFRP-USP: **Andréa Carla Pessini, Daniela Longhi, Denis Melo Soares, Juliano Manvailer Martins, Renes Resende Machado, David Malvar, Alexandre Kanashiro, Lívia Harumi Yamashiro, Michele Thomaz, Veridiana Pansiera, Fernando Armani, Maria Carolina**, por proporcionar momentos que me fizeram sentir em família, além das ótimas discussões científicas. Vocês são minha segunda família!

A todos os **Pós-graduandos e alunos de iniciação científica** do Laboratório de Farmacologia agradeço o companheirismo, e apoio nos momentos difíceis.

À **Miriam C. C. Melo, Rubens F. de Melo, Juliana A. Vercesi, Mayara S. Gomes, Marlene R. Silva, Maria Aparecida Rosa da Silva** por todo o apoio profissional e principalmente por me proporcionarem tanta alegria no cotidiano.

Às **Professoras** da disciplina de farmacologia **Dra. Lusiane Maria Bendhac, Dra. Ana Maria de Oliveira, Dra. Sâmia Joca, e Dra. Valquiria Camin de Bortoli** por todo convívio, apoio e pelas discussões no laboratório.

Aos membros da Comissão examinadora: **Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, Prof. Dr. Fernando Q. Cunha, Prof. Dr. Jamil Assurey, Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior**, pelo aceite e pela atenção a mim dispensada.

A **todos os docentes** do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP pela contribuição para com a minha formação científica, meu muito obrigado pelo exemplo de dedicação à ciência e à docência;

A **todos os alunos** do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: **Fátima Helena Petean, José Valdik Ramon e Sônia M. Stefanelli**, por todo apoio e carinho.

Ao **Reinaldo**, funcionário do Biotério da FCFRP-USP, pelo companheirismo, profissionalismo e atenção.

A toda a **minha família** que sempre me apoiou e torceu por meu sucesso.

A **todos** que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse concluído.

Índice

Lista de abreviaturas	8
1-Introdução	10
1.1 Resposta de fase aguda e resposta febril.....	11
1.2 Regulação da temperatura corporal	12
1.3 Mediadores da resposta febril e a comunicação com o sistema nervoso central.....	14
1.4 Criogênios endógenos.....	23
1.5 Modelos experimentais de febre	23
1.6 Sepsis (histórico)	24
1.6.1 Sepsis e o modelo de CLP	25
2-Objetivos.....	29
2.1 Estratégias.....	30
3-Materiais e métodos.....	31
3.1 Animais	32
3.2 Soluções	32
3.3 Drogas e reagentes	32
3.4 Vias de administração das drogas.....	33
3.5 Cirurgia para implante de cânulas no ventrículo lateral e microinjeção de corante para controle do sítio de injeção	34
3.6 Indução da sepsis	35
3.7 Cirurgia para implante do transmissor de temperatura na cavidade abdominal	35
3.8 Determinação da variação de temperatura corporal por radiotelemetria	36
3.9 Determinação da temperatura retal por telemetria.....	36
3.10 Contagem do número de bactérias no lavado peritoneal e sangue	37
3.11 Coleta do Soro	37
3.12 Coleta do lavado	38
3.13 Coleta do fluido cerebrospinal (CSF)	38
3.14 Dosagem da concentração de PGs no CSF	40
3.15 Detecção de citocinas por Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)	41
3.16 Análise estatística	41

4-Resultados	43
4.1 Aumento da temperatura corporal e da mortalidade induzida pela sepse (CLP) em ratos.....	44
4.2 Contagem do número de bactérias no lavado peritoneal e sangue	47
4.3 O Ibuprofeno não modifica a febre e nem a sobrevida dos animais sépticos	49
4.4 Indometacina diminui a febre e não modifica a sobrevida dos animais submetidos a CLP	52
4.5 Celecoxibe diminui a febre e não altera a sobrevida dos animais sépticos	55
4.6 A Dipirona e o Paracetamol diminuem a febre, entretanto somente o paracetamol aumenta a sobrevida dos animais sépticos	58
4.7 CLP induz aumento nas concentrações de prostaglandinas (PGE ₂) no CSF dos animais submetidos a CLP	65
4.8 Efeito do celecoxibe, paracetamol e da dipirona sobre as concentrações de PGE ₂ no CSF durante a febre induzida pela CLP.....	67
4.9 IL-1ra não modifica a febre, mas aumenta a sobrevida dos animais sépticos	71
4.10 rsTNF não modifica a febre e a sobrevida dos animais sépticos	75
4.11 Anticorpo monoclonal anti-IL-6 não altera a febre e aumenta a sobrevida dos animais sépticos.....	79
4.12 CLP induz aumento nas concentrações de citocinas no lavado peritoneal e soro dos animais submetidos a CLP	83
4.13 Efeito do ibuprofeno, celecoxibe, paracetamol e da dipirona sobre as concentrações de citocinas no lavado peritoneal e soro nos animais submetidos a CLP	87
5-Discussão	91
6-Resumo	109
7-Summary	111
8-Referências Bibliográficas	113
9-Manuscrito	132

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AA	Ácido araquidônico
APO/HÁ	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
AP-1	proteína ativadora 1
AVP	Arginina vasopressina
CSF	Fluido cerebrospinal artificial
CLP	Ligação e perfuração cecal
COX	Ciclooxigenase
CINC	Citocina quimioatraente para neutrófilos
CRF	Fator liberador de corticotropina
ET	Endotelina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
i.c.v	Intracerebroventricular
IFN	Intérferon
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista de receptor de IL-1
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenosa
LPS	Lipopolissacarídeo
MALP	Lipopeptídeo ativador de macrófagos
MDP	Muramil-dipeptídeo
MIP-1	Proteína inflamatória derivada de macrófago

NF-AT	Fator nuclear ativador de células T
NF-κB	Fator nuclear κB
OVLT	<i>Organum vasculosum da laminae terminalis</i>
PFPF	Fator pirogênico pré-formado em macrófagos estimulados com LPS
PG	Prostaglandina
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por céls T normais
rsTNF	Receptor solúvel tipo I de TNF
SNC	Sistema nervoso central
SAL	Salina
Sham	Falso operado
TX	Tromboxano
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TLR	Receptor Toll-like
v.o	Via oral

1 INTRODUÇÃO

1.1- Resposta de fase aguda e resposta febril

A resposta de fase aguda representa uma reação altamente complexa de defesa do organismo animal contra uma variedade de injúrias, como infecções, traumas mecânicos ou térmicos, necrose isquêmica e crescimento de tumores (para revisão ver KOJ, 1996). Neste tipo de resposta a reação local, quando ocorre, manifesta-se como inflamação aguda (acompanhada dos sinais característicos, ou seja, dor, calor, rubor e tumor, que podem vir acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado), enquanto a reação sistêmica inclui uma variedade de respostas fisiopatológicas, tais como o aumento do número de leucócitos circulantes (leucocitose), aumento da produção de proteínas da fase aguda (PFA) pelo fígado, ativação do sistema complemento, ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas, diminuição da concentração plasmática de ferro e zinco, aumento da concentração de cobre, aumento da produção de proteínas de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa, ceruloplasmina e outras), aumento das ondas lentas do sono, astenia, anorexia e a **febre** que é o sinal característico de infecção (KUSHNER, 1988; ZEISBERGER, 1999, revisado por BLATTEIS, 2006).

A febre é uma resposta complexa que envolve vários componentes como o sistema endócrino e metabólico, autonômico e comportamental (SAPER & BREDER, 1994). Ela tem sido definida como elevação da temperatura corporal que ocorre em defesa à entrada de patógenos no hospedeiro (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001)

Esta resposta ocorre em todos os grupos de vertebrados, ou seja: mamíferos, pássaros, lagartos, cobras, tartarugas, salamandras, peixes e em alguns invertebrados.

Esta ampla ocorrência indica que a febre tem uma história filogenética e está envolvida como meio de aumentar a resposta de defesa do hospedeiro frente a uma infecção (revisado por BICEGO et al., 2006)

Estudos demonstram que quando o organismo se encontra em temperaturas acima dos níveis normais ocorre aumento da fagocitose, proliferação de linfócitos T, aceleração da quimiotaxia de neutrófilos, secreção de substâncias antibacterianas e potencialização das ações do interferon, o que limita a proliferação bacteriana (revisado por KLUGER, 1991).

1.2- Regulação da temperatura corporal

A regulação da temperatura corporal está sob o controle de uma hierarquia de estruturas neurais (entre elas o hipotálamo, o sistema límbico, o tronco cerebral, a formação reticular, a medula espinhal e os gânglios simpáticos – BOULANT, 2000) as quais são responsáveis por integrar as informações térmicas aferentes e centrais, antes de estimular a ativação de respostas fisiológicas e comportamentais apropriadas.

Embora a estimulação de áreas do tronco cerebral e da medula espinhal possa evocar mecanismos termorregulatórios específicos, estudos realizados *in vivo* demonstram que a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA) desempenha importante papel na regulação precisa da temperatura corporal (revisado por GRIFFIN, 2004)

Nesta área são encontrados neurônios termosensíveis (sensíveis ao frio, ao calor e insensíveis) cuja frequência de disparo é afetada tanto por variações da temperatura sanguínea na área adjacente, como por influência de conexões diretas com termorreceptores distribuídos na pele e 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 (GORDON, 1990).

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

A regulação da temperatura corporal observada nos animais homeotérmicos pode ser explicada por uma teoria baseada na existência de um mecanismo similar a um termostato, denominado de ponto de regulação térmica. O ponto de regulação térmica é definido como “o valor de uma variável, que um organismo saudável busca estabelecer pelo processo de regulação” (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001). Esse valor é encontrado por meio da integração de informações térmicas centrais e aferentes pelos neurônios hipotalâmicos (BOULANT, 1998).

Portanto a febre pode ser definida como uma elevação controlada da temperatura corporal acima dos níveis normais, resultante de uma alteração do ponto de regulação hipotalâmico (“*set point*”, DINARELLO et al., 1988). Os mecanismos envolvidos nesse aumento do ponto de regulação consistem de alterações na frequência de disparos dos neurônios termorregulatórios do hipotálamo anterior, promovidas por substâncias, que

são mediadores da resposta febril, denominadas de pirogênicos (THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001)

É importante ressaltar que febre é um processo distinto de hipertermia. Neste caso, o ponto de regulação hipotalâmico não é alterado e o aumento de temperatura corporal observado é decorrente do comprometimento dos mecanismos de dissipação de calor ou de situações em que a dissipação não é suficiente para a manutenção da temperatura em níveis normais, devido a uma produção excessiva de calor ou a temperaturas externas elevadas (DINARELLO et al., 1988, BLATTEIS, 2006; ROTH et al., 2006).

1.3- Mediadores da resposta febril e a comunicação com o sistema nervoso central

Como dito anteriormente, as substâncias que induzem febre são denominadas de pirogênicos. Eles podem ser divididos em exógenos e endógenos. Em geral, a maioria dos pirogênicos exógenos é proveniente de produtos gerados por microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (ZEISBERGER, 1999). Entre os pirogênicos exógenos mais estudados podemos citar o LPS (lipopolissacarídeo de bactérias Gram negativas) e o MDP (Muramil-dipeptídeo, componente da parede celular de bactéria Gram positivas).

Os pirogênicos endógenos compreendem as proteínas termosensíveis e os mediadores lipídicos. Sua produção é geralmente estimulada pelos pirogênicos exógenos e também por lesões, traumas e estresse. Entre os principais pirogênicos endógenos estão as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fator liberador de corticotropina (CRF) e endotelina (revisado por ROTH & SOUZA, 2001; FABRÍCIO et al., 2005).

Atualmente, entretanto, a ação direta de pirogênios exógenos não pode ser descartada, pois existem sítios receptores específicos para componentes da parede celular e material liberado pelos diferentes pirogênios exógenos (DINARELLO, 2004; AKIRA, 2006).

Estudos têm demonstrado que os pirogênios endógenos podem ser produzidos e liberados por diferentes tipos celulares como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e astrócitos (DINARELLO et al., 1988; CEBULA et al., 1979; KLUGER, 1991).

A primeira citocina, descoberta em 1950, foi a IL-1, que na época ficou conhecida pelo nome de pirogênio endógeno; a segunda, interferon, foi descoberta em 1957. O termo citocina surgiu em 1974. O número total de citocinas mantém até hoje, crescimento exponencial (SILVA & VELASCO, 2007).

Entre as citocinas e quimiocinas, podemos citar a interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)- α , TNF β , interferon (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 (MIP-1), quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por linfócitos T normais (RANTES) e quimiocina quimioatraente de neutrófilo (CINC-1) (HELLE et al., 1988; ROTHWELL et al., 1990a; ZAMPRONIO et al., 1994a; DINARELLO et al., 1984; 1986; 1988; DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990; TAVAREZ E MIÑANO, 2000; MACHADO et al., 2007; MELO-SOARES et al., 2006, 2008).

Dentre elas, IL-1, IL-6 e TNF- α são consideradas as principais citocinas envolvidas na resposta febril (Revisado por ROTH et al., 2006).

Vários estudos demonstraram que tanto a IL-1 α como a IL-1 β induzem febre quando administradas por via intravenosa (i.v.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) em coelhos e ratos. Entretanto, demonstrou-se que a febre induzida pela injeção i.v. ou

i.c.v. de IL-1 β é muito mais intensa que aquela induzida pela IL-1 α , em diversas espécies (DASCOMBE et al., 1989; MORIMOTO et al., 1989; DAVIDSON et al., 1990; ROTHWELL et al., 1990b; ZAMPRONIO et al., 1994b). A administração i.v. de soro anti- IL-1 β , bem como a administração intraperitoneal (i.p.) ou i.c.v. de IL-1ra inibe a febre induzida por endotoxina em ratos (LONG et al., 1990; SMITH & KLUGER, 1992; LUHESHI & ROTHWELL, 1996).

A IL-6 também é considerada um importante pirogênio endógeno (OPP et al., 1989; LeMAY et al., 1990a; DINARELLO et al., 1991, XIN & BLATTEIS, 1992). Durante a febre induzida por endotoxina, em ratos e cobaias, foram detectadas concentrações elevadas de IL-6 no plasma, fluido cerebrospinal e perfusatos hipotalâmicos (LeMAY et al., 1990a; ROTH et al., 1993; COELHO et al., 1995; JANSKY et al., 1995; ZAMPRONIO et al., 2000) e a infusão central de IL-6, em uma dose correspondente às concentrações detectadas no hipotálamo de ratos, induz febre nesses animais (KLIR et al., 1993, SOUZA et al., 2002).

Estudos realizados por MILLER et al., (1997) demonstraram que a injeção de LPS na bolha de ar subcutânea em ratos promove aumento na concentração de IL-6 bioativa no plasma e também aumento na temperatura corporal o qual é abolido pelo pré-tratamento com soro anti-IL-6 (CARTMELL et al., 2000).

Outra substância liberada por macrófagos em resposta à endotoxina e também classificada como pirogênio endógeno é o fator de necrose tumoral (TNF). O TNF- α , quando administrado por via periférica ou central, induz resposta febril em coelhos (DINARELLO et al., 1986), ratos (KETTELHUT E GOLDBERG, 1988; ZAMPRONIO et al., 2000a) e humanos (MICHIE et al., 1988). O TNF- β também apresenta atividade pirogênica, pois induziu febre em coelhos após injeção periférica ou central, como demonstrado por Watanabe (1992).

Apesar destas evidências, o papel do TNF na resposta febril ainda é controverso.

KLIR et al (1995) demonstraram que o tratamento de ratos com uma dose não pirogênica de TNF, promove redução da resposta febril em resposta ao LPS; enquanto o tratamento com receptor solúvel de TNF exacerba a febre induzida pelo LPS, evidenciando desta forma, a ação antipirética do TNF (revisado por CONTI et al, 2004).

Embora esteja bem estabelecido que a resposta febril seja desencadeada e regulada no sistema nervoso central (SNC), ainda é controverso o mecanismo pelo qual mediadores pirogênicos produzidos periféricamente alcançam o tecido cerebral e alteram o centro termorregulatório hipotalâmico (revisado por BLATTEIS, 2006)

Evidências demonstram que estes pirogênios podem ser transportados pela corrente sanguínea e/ou serem produzidos centralmente. Uma das hipóteses é que estes mediadores alcancem o sistema nervoso central através de sistemas de transportes saturáveis, específicos para cada citocina (BANKS et al., 1991) ou pela passagem pela barreira hemato-encefálica onde esta é permeável (permitindo contato estreito entre o sangue e as células neuronais), como no *organum vasculosum da laminae terminalis* (OVLT) e no órgão subfornical (CARTMELL et al., 1999).

Assim, pela via humoral de comunicação, a interação de citocinas pirogênicas com os receptores específicos presentes nas células endoteliais destes órgãos circunventriculares promoveria a liberação de mais citocinas e/ou de outros mediadores como as prostaglandinas (STITT, 1985).

Outra hipótese proposta é uma via neuronal de comunicação entre os mediadores periféricos e o cérebro.

WATKINS et al., 1995 demonstraram que a vagotomia subdiafragmática atenua a resposta febril induzida por injeção intraperitoneal de IL-1 β em ratos, enquanto inibe a febre induzida pelo LPS administrado por via intravenosa, em cobaias (SEHIC &

BLATTEIS, 1996; WERNER et al., 2003). Em animais injetados com LPS, por via intraperitoneal, a secção subdiafragmática do nervo vago bloqueia a expressão cerebral de *c-fos* (WAN et al., 1994) assim como a expressão de RNAm de IL-1 β (LAYÉ et al., 1995).

A possibilidade de que o vago possa transmitir sinais pirogênicos para o cérebro é consistente com relatos anteriores nos quais a infusão de IL-1 β no sistema porta hepático de ratos estimulou descargas aferentes (aumentou a atividade elétrica) do nervo vago (NIJIMA et al., 1992).

Em 1996, SEHIC & BLATTEIS levantaram a hipótese de que sinais periféricos, derivados das células inflamatórias, poderiam ser transmitidos via nervo vago até a medula e transportados por meio de um feixe noradrenérgico ventral para a APO/HA, onde a noradrenalina liberada induziria a síntese local de PGE₂ e, conseqüentemente, o início da febre.

Ainda que os mecanismos de transdução de sinal de quaisquer das citocinas no cérebro sejam pouco entendidos, postula-se que a capacidade de muitos pirogênios endógenos em causar febre é dependente da produção intracerebral do fator liberador de corticotropina (CRF), endotelina (ET) e/ou de prostaglandinas (PGs) (MORIMOTO et al., 1992; ROTHWEL; 1989; FABRÍCIO et al., 2005a; RUMMEL et al., 2005).

Em 1971, foi demonstrado por MILTON & WEDLANDT que a prostaglandina (PG) E₁ induz febre quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v.) em gatos. Estudos efetuados por FELDBERG & SAXENA (1971) e STITT (1973) mostraram que microinjeções de PGs na APO/HA induzem febre, em ratos e coelhos, enquanto microinjeções em outras áreas encefálicas falham em induzir esta resposta. Atualmente, a PGE₂ é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril (COCEANI et al., 1988; BLATTEIS e SEHIC, 1997; ENGBLOM et al., 2002), embora outros

derivados do ácido araquidônico, particularmente a $\text{PGF}_{2\alpha}$, também possam induzir febre em animais experimentais (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990; COELHO et al., 1993; SOUZA et al., 2002).

A enzima responsável pela síntese de PGs a partir do ácido araquidônico é a ciclooxigenase (COX). A COX pode existir em duas isoformas, codificadas por genes distintos, referidos como COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tipos celulares, podendo ser induzida em processos patológicos (CRAFFORD et al., 1994; HWANG et al., 1998; SANO et al., 1995). Já a COX-2 não é expressa em condições fisiológicas, exceto nos rins, estômago e sistema nervoso central (KHAN et al., 2002). Contudo, a expressão da COX-2 pode ser induzida em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e em outros tipos celulares, por estímulos fisiológicos e inflamatórios (KUJUBU et al., 1991; ELMQUIST et al. 1997; PARENTE & PERRETI, 2003).

CHANDRASEKHARAM et al. (2002) descreveram uma terceira isoforma de COX, formada a partir do mesmo gene da COX-1, denominada de COX-3, expressa principalmente no córtex cerebral de cães e humano e no coração humano. Entretanto, a participação dessa isoforma em processos fisiológicos e patológicos ainda não foi demonstrada, sendo que até mesmo a existência de uma COX-3 cataliticamente ativa tem sido questionada (DINCHUK et al., 2003).

Diversas evidências demonstram que as prostaglandinas envolvidas na febre são produzidas pela COX-2, pois inibidores seletivos para esta isoforma abolem respostas febris induzidas por LPS, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$ (FUTAKI et al., 1993; CAO et al., 1997, 1998; STEINER et al., 2001; ROTH et al., 2002). Corroborando esses achados demonstrou-se que febres produzidas pela injeção de LPS, IL-1 e IL-6 são bloqueadas em animais deficientes para COX-2, porém não para COX-1 (LI et al., 1999a, 2001,

2003). Em adição, a síntese de COX-2 pode ser induzida no SNC de ratos, tanto por pirogênicos exógenos quanto endógenos (CAO et al., 1995, 1996; INOUE et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

A PGE₂ exerce suas ações biológicas através de quatro subtipos de receptores (EP) acoplados a proteína G, EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. Estudos utilizando agonistas e antagonistas de receptores EP₁, EP₂ e EP₄ e camundongos knock-out para o receptor EP₃ tem sugerido que o receptor EP₂ não participa, enquanto o receptor EP₁ tem pouca participação na resposta febril induzida pela PGE₂ e pelo LPS. Observou-se também que a ativação do receptor EP₄ leva a redução da temperatura de animais febris e que o receptor EP₃ é o principal receptor envolvido na resposta febril induzida pela PGE₂ e pelo LPS (revisado por LAZARUS, 2006).

Apesar de vários mediadores induzirem febre via PGs, o tratamento com indometacina não modificou a resposta febril induzida em ratos por IL-8, MIP-1, PFPF e ET-1 em ratos, sugerindo a existência de um mecanismo adicional de mediação da resposta febril, independente da síntese e/ou liberação das PGs (DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990, 1996; SOARES et al., 2006; ROTHWELL et al., 1990a; ZAMPRONIO et al., 1994b, 2000; VEIGA-SOUZA et al., em análise, FABRÍCIO et al., 1998, 2005 b).

Diversos estudos têm fornecido evidências do envolvimento do fator liberador de corticotropina (CRF), um peptídeo com 41 aminoácidos produzido principalmente por células parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico, na mediação da resposta febril. Esse peptídeo quando injetado i.c.v. em ratos produz aumento da atividade simpática (BROWN et al., 1982), estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (LeFEUVRE et al., 1987) e eleva a temperatura corporal (DIAMANT & DE WIED, 1991).

Corroborando esses dados, foi demonstrado que o aumento da temperatura corporal induzido pela injeção i.c.v. de CRF, é característico de resposta febril e não de hipertermia, pois foi acompanhado por diminuição da temperatura da pele da cauda dos animais, característica de vasoconstrição cutânea, considerada um dos principais mecanismos termorregulatórios para conservação de calor em roedores (FIGUEIREDO, 2004).

Tem sido proposto que o CRF atue no SNC como mediador da resposta febril induzida por IL-1 β , IL-6, IL-8, PFPF, PGF_{2 α} e MIP-1 α pois, a administração de injeções centrais de anticorpos anti-CRF ou do antagonista de receptores para CRF atenuaram as respostas febris induzidas por estes estímulos (ROTHWELL et al., 1990; ROTHWELL et al., 1991; ZAMPRONIO et al., 1994; ZAMPRONIO et al., 2000; SOARES et al, 2006).

Demonstrou-se recentemente, que o aumento da temperatura corporal induzido pelo CRF foi significativamente reduzido pelo tratamento dos animais com BQ-788, um antagonista de receptores ET_B para as endotelinas (FABRÍCIO et al., 2006).

Adicionalmente, como demonstrado por CALDEIRA et al. (1998), a lesão da divisão parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico, principal fonte de CRF no sistema nervoso central, reduziu a resposta febril induzida pelo LPS, permitindo sugerir a participação do CRF nesta resposta.

No entanto, o tratamento de animais com o antagonista de CRF não altera as respostas febris induzidas por IL-1 α , TNF- α e PGE₂ (ROTHWELL, 1989; ROTHWELL, 1991).

Além das citocinas, PGs e do CRF, outras substâncias também parecem estar envolvidas na resposta febril, como por exemplo, substância P (SZELÉNYI et al.,

1997), bradicinina (BK) (SANTOS, 2002) e a endotelina (ET) (FABRÍCIO et al., 1998; 2005).

A injeção i.c.v. de BK promove aumento da temperatura corporal em coelhos e em ratos (ALMEIDA e SILVA & PELÁ, 1978; MOHAN RAO & BHATTACHARYA, 1988; COELHO et al., 1997). Foi demonstrado por SANTOS (2002), que o efeito pirogênico da BK, em ratos, depende da participação das PGs, do CRF e das citocinas pirogênicas IL-1, TNF e IL-6.

A ET-1 é um potente peptídeo vasoconstritor, secretado principalmente por células endoteliais (YANAGISAWA et al., 1988) e que participa, via ativação de receptores ET_B, da febre induzida por LPS em ratos (FABRÍCIO et. al., 1998, 2005). Corroborando esses dados, em 2005 (b), estes mesmos autores demonstraram que a injeção i.v. de LPS, em dose que causa febre de longa duração, promove aumento na produção de endotelina -1 e seu precursor imediato a big-endotelina no CSF de ratos.

Ainda neste trabalho os autores também avaliaram a participação das prostaglandinas na resposta febril induzida pela endotelina. Utilizando os inibidores seletivos para COX-2, o celecoxibe e o lumiracoxibe os autores observaram que o lumiracoxibe foi mais potente em reduzir a resposta induzida pela ET-1 e pelo LPS do que o celecoxibe. Entretanto, esta última droga não foi capaz de reduzir a febre induzida pela endotelina, mas reduziu os níveis de PGs no CSF induzido tanto pela injeção i.c.v. de ET-1, quanto da injeção i.v. de LPS. Desta forma, os autores sugerem que a resposta febril induzida pela ET-1 independe de PGs.

Recentemente LONGHI et al., (*em análise*), demonstraram que os antagonistas dos receptores ET_A e ET_B (BQ-123 e BQ-788, respectivamente) foram capazes de reduzir a febre induzida pela injeção intraperitoneal de *Staphylococcus aureus* (viáveis)

em ratos, sugerindo que o envolvimento das endotelinas também na febre induzida por este agente.

1.4- Criogênios endógenos

Assim como ocorre com a maioria dos processos biológicos, a febre também está sujeita a um sistema de modulação endógena. Tem sido identificada uma variedade de mecanismos inibitórios específicos para a ação das citocinas, incluindo a existência de proteínas ligantes circulantes, de receptores solúveis e, no caso da IL-1, de um antagonista endógeno do seu receptor, o IL-1ra (LUHESHI & ROTHWELL, 1996). Existem ainda substâncias denominadas criogênios endógenos que, ao contrário dos pirogênios endógenos, limitam as elevações na temperatura corporal, impedindo que sejam atingidos valores de temperatura capazes de comprometer as funções vitais do organismo. Entre eles estão os glicocorticóides (COELHO et al., 1992), a arginina vasopressina (AVP) (revisado por KASTING, 1989), o hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH; MARTIN et al., 1991) e a IL-10 (NAVA et al., 1997, LEDEBOER et al., 2002).

1.5- Modelos experimentais de febre

Várias substâncias exógenas de diferentes origens são utilizadas na tentativa de mimetizar infecções em estudos de febre.

O lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, tem sido amplamente empregado como pirogênio exógeno em muitos estudos experimentais e isto se deve ao interesse clínico nas respostas fisiopatológicas envolvidas em infecções causadas por bactérias Gram-negativas.

Embora a incidência de infecções por bactérias Gram-positivas tenha aumentado consideravelmente na última década (BONE, 1994) pouco se sabe sobre a patogênese envolvida nas infecções induzidas por estas bactérias.

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

1.6- Sepses (histórico)

Há muito tempo se reconhece que mulheres no puerpério se encontram sob risco aumentado de infecção. Referências a essa constatação podem ser encontradas até mesmo em textos de Hipócrates, assim como textos hindus datados de antes de 1500 a.C. A primeira epidemia de sepsis puerperal que se tem notícia ocorreu em 1646, no Hôtel de Dieu, em Paris. Diversas teorias absurdas tentaram explicar a origem deste problema. A teoria da causa contagiosa foi aventada pela primeira vez em 1842 por Thomas Watson. Ainda neste período, um médico americano, Oliver Wendell Holmes chegava à mesma conclusão. Em 1843 ele publicou seu clássico livro *The Contagiousness of Puerperal fever*, no qual recomendava, além da lavagem das mãos e da troca de roupas, que médicos que atendessem casos obstétricos não realizassem autópsias. Ambos foram ignorados pela comunidade científica.

Enquanto isso, em Viena, Ignaz Semmelweis um médico húngaro que não tinha domínio do idioma inglês e que desconhecia os trabalhos de Holmes, chegava à mesma conclusão. Em 1844 ele observou a diferença na mortalidade de partos que eram realizados por estudantes de medicina e por parteiras. A mortalidade era maior com os

estudantes. Notou, além disso, que os estudantes de medicina faziam autópsia de pacientes que haviam morrido na véspera, enquanto as parteiras não realizavam este tipo de serviço. Em março de 1847, um amigo de Semmelweiss morreu de sepse após cortar-se acidentalmente durante a realização de uma autópsia. Fazendo a conexão entre a morte do amigo e as mortes por febre puerperal, devido às similaridades dos sintomas, Semmelweiss sugeriu que as mãos dos estudantes e médicos, contaminados pelas autópsias recentes, transmitiriam “agentes invisíveis” para os órgãos genitais das mulheres durante o parto. Assim, ordenou que todos os médicos e estudantes lavassem as mãos com solução anti-séptica antes dos partos. No mesmo ano a sepse puerperal caiu de 18 para 3%. Somente após sua morte a doutrina de Semmelweiss começou a ser largamente aceita pela comunidade médica. Em 1874, Billoth demonstrou estreptococos em lesões traumáticas de pele. Em 1879, Louis Pasteur isolou estreptococos hemolíticos no sangue de uma paciente em sepse puerperal. No fim do século XIX, a importância das técnicas de anti-sepsia, finalmente, já era algo largamente aceito (Texto tirado do livro Sepse, SILVA & VELASCO, 2007).

1.6.1- Sepse e o modelo de CLP

Esta síndrome (sepse) atinge aproximadamente 750.000 pessoas a cada ano nos Estados Unidos e sua incidência continua a aumentar devido ao uso crescente de agentes imunossupressores, de cirurgias modernas de natureza altamente invasiva, a resistência a agentes microbianos, ao número crescente de acidentes graves de trânsito e pacientes com idade avançada (KLOSTERHALPEN & BHARDWAJ, 1998; JACOBI, 2002).

SILVA et al (2004) demonstraram em um recente estudo multicêntrico brasileiro que a incidência de sepse no Brasil é de 57 para cada 1000 pacientes/dia admitidos nas UTIs (unidades de terapia intensiva), sendo comparável aos índices mundiais.

De acordo com o Centro de prevenção e controle para doença, a incidência de sepse aumentou 139% durante um intervalo de 10 anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1990). De acordo com relatos recentes sua incidência está aumentando em uma taxa de 1,5% ao ano (ANGUS et al., 2001).

Os custos hospitalares anuais para o tratamento da sepse são estimados em 16,7 bilhões de dólares (ANGUS, 2001; WOOD & ANGUS 2004).

A sepse tem sido definida como uma resposta sistêmica à infecção (BALK & BONE, 1989; AYRES, 1985, HOTCHKISS et al., 2003; RIEDEMANN et al., 2003), sendo a causa comum de morbidade e mortalidade após uma cirurgia ou trauma. Alterações na temperatura (MCHENRY et al., 1962, ATWOO et al., 1964; HARRIS et al., 1987, BONÉ et al., 1989), inflamação, aumento na produção de eicosanóides (LEFER, 1989), elevada concentração de citocinas (CANNON et al., 1990, HAAK et al., 1989, KLOSTERHALPEN et al., 1992; VILLA et al., 1995) são algumas características da sepse (EBONG et al., 1999).

De qualquer modo, parece que a febre é o mecanismo termorregulatório mais freqüente da sepse e choque enquanto a hipotermia ocorre nos casos mais severos de choque e está relacionado com a piora do prognóstico do paciente (HARRIS et al., 1987; CLEMMER et al., 1992;).

Embora a injeção de LPS seja um modelo razoável de infecção real, a febre induzida pelo LPS não é uma febre típica. Este é usualmente removido da circulação 1 h após a injeção intravenosa e induz uma febre de duração curta. Na maioria dos casos de

sepsis a febre é induzida e mantida por um longo período pela estimulação pirogênica contínua (GOURINE et al., 1998).

Devido à falta de correlação entre a concentração plasmática de LPS e o desenvolvimento de sepsis (ELIN et al., 1975), juntamente com a falha da terapia anti-endotoxina nas triagens clínicas no tratamento de sepsis (AMERICAN COLLEGE OF CHEST OF PHYSICIANS, 1997), sugeriu-se que o LPS é provavelmente somente um dos vários agentes responsáveis pela febre e pelas alterações comportamentais durante a infecção. Estes dados suportam a hipótese que o mecanismo de resposta febril induzida pelo LPS (modelo de febre induzido por pirogênio exógeno) pode ser diferente da febre que ocorre naturalmente.

O CLP, (modelo de ligação e perfuração cecal), primeiramente descrito por CHAUDRY et al (1979, 1980), é amplamente aceito por muitos investigadores como um modelo de sepsis, infecção aguda e peritonite bacteriana (FINK et al., 1990; VILLA et al., 1995), que melhor reflete a complexa resposta desta síndrome em humanos (DE MAIO et al., 2005).

Este modelo em roedores é extremamente simples, amplamente usado (acima de 800 citações no Pubmed) e bem entendido, com a vantagem de ser polimicrobiano e apresentar um foco infeccioso (HUBBARD et al., 2005).

O CLP envolve uma estimulação pirogênica contínua e simula uma infecção real muito melhor que a infusão de quantidades constantes de LPS (infecção simulada). Neste modelo a endotoxina, é detectada no soro por no mínimo 21h após a cirurgia (VILLA et al., 1995). De acordo com os dados de GOURINE et al. (1998), o CLP induz febre por dois dias, sendo dependente de IL-1 β e diferentemente da resposta febril induzida pela endotoxina não é acompanhada da elevação da concentração de IL-6 hipotalâmica.

A questão se a febre é benéfica ou não ao hospedeiro, continua não respondida. Embora a terapia antipirética seja comumente administrada para pacientes sépticos, há poucos dados que suportam esta prática (HASDAY & GARRISON, 2000). Os benefícios ou prejuízos da normalização da temperatura em pacientes hipertérmicos ou hipotérmicos são especulativos (HARRIS et al., 1987).

2 OBJETIVO

Investigar os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta febril durante a sepse induzida por CLP.

2.1- Estratégias

1. Padronizar o modelo de CLP que induz resposta febril em ratos e estabelecer curvas de sobrevida
 - quantificar o número de bactérias presentes no lavado peritoneal e soro dos animais sépticos
2. Investigar o efeito da ibuprofeno, indometacina (inibidores não-seletivos COX-1/COX-2) e do celecoxib (inibidor seletivo de COX-2), bem como de fármacos com reduzida atividade antiinflamatória (paracetamol, dipirona) sobre a febre e a sobrevida dos animais desafiados por peritonite bacteriana aguda (CLP);
3. Investigar se os tratamentos que foram efetivos na inibição da febre e/ou que aumentaram a sobrevida promoveram modificações nas concentrações de PGE₂ no CSF durante a sepse.
4. Investigar a participação das citocinas pirogênicas IL-1 β , IL-6 e TNF- α na resposta febril e na sobrevida dos animais sépticos;
5. Investigar se os tratamentos que foram efetivos na inibição da febre e/ou que aumentaram a sobrevida promoveram modificações nas concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos fluidos destes animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200-250 g provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estes animais foram mantidos à temperatura de 24°C e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº 148/2005).

3.2- Soluções

Solução tampão TRIS-HCl 0,2 M

Tris (hidroximetil)-aminometano P.A. (Serva)	24,22 g
Água destilada q.s.p.	1,00 l

O pH foi ajustado para 8,2 com HCl 1 N e em seguida a solução foi autoclavada por 30 min.

3.3- Drogas e reagentes

- Antagonista de receptores de IL-1 recombinante de rato (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Interleucina-1 β recombinante murina (lote nº. BN024121, R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Celecoxib (Celebra[®], Pfizer, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de cetamina (Ketamina Agener[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil): 58 mg/kg
- Dipirona (Metamizol sódico, Hoechst Laboratórios, São Paulo, Brasil)
- Indometacina (Merck, Sharp & Dohme, São Paulo, Brasil)

- Ibuprofeno (Sigma Chem Co., St. Louis, EUA)
- Interleucina-6 recombinante murina (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Anticorpo anti IL-6 (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Kit de Elisa para dosagem de PGE₂ (Caymam Chemical Co., EUA)
- Kit de Elisa para dosagem de citocinas – IL-1 β , TNF- α , IL-6 (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Paracetamol (Sigma Chem Co., St. Louis, EUA)
- Receptor solúvel tipo I de TNF recombinante murino (sTNFR1, R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- TNF- α (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Xilazina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S/A - Espanha): 20 mg/kg
- Tribromoetanol (Acrós Organics, New Jersey, USA)

3.4- Vias de administração das drogas

a. Intracerebroventricular:

As drogas foram administradas em volume de 3 μ l no ventrículo lateral direito por meio de uma agulha de microinjeção (30 G) conectada a uma seringa Hamilton (25 μ l) por um tubo de polipropileno P20. A agulha excedeu a cânula em 2,5 mm.

b. Intravenosa:

As drogas foram administradas na veia caudal dos animais em volume de 0,2 ml Kg⁻¹, utilizando agulhas 13 x 4,5 e seringas de 1 ml.

c. Via oral:

Foi efetuado o tratamento por via oral (v.o.) em volume de 0.5 ml/animal utilizando-se tubo de polipropileno P20 conectado a uma seringa de 3 ml.

3.5- Cirurgia para implante de cânulas no ventrículo lateral e microinjeção de corante para controle do sítio de injeção

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol a 2,5% via i.p. (250 mg/kg). Após tricotomia e assepsia da pele, as cabeças dos animais foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-USA). Foi administrado, então, subcutaneamente, 0,2 mL de solução injetável de lidocaína a 3%, com norepinefrina, na parte superior da cabeça. Uma incisão, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, foi efetuada no local da injeção, para a exposição da calota craniana. Este procedimento facilita a remoção do periósteo e a implantação das cânulas, por inibir o estímulo doloroso e diminuir o sangramento.

Assumindo o bregma como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e posterior implantação da cânula i.c.v. foram situados a -1,5 mm anteroposterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm.

A cânula esterilizada, constituída de um segmento de agulha hipodérmica BD-7, com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foi conectada por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotáxico.

A cânula foi introduzida no tecido cerebral com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no Atlas de PAXINOS & WATSON (1986).

A fixação da cânula foi feita por meio de uma prótese de acrílico autopolimerizável com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana. No final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de 400 mg/kg de cloridrato de oxitetraciclina. Os animais recém-operados foram mantidos em gaiolas, sem restrição

de água ou ração, em sala com temperatura controlada a 24°C, com ciclos dia-noite (intervalos de 12 horas), por no mínimo 5 dias, para recuperação pós-cirúrgica.

Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com éter e receberam injeção de 3 µl de corante azul de Evans no local correspondente à microinjeção.

Em seguida, os animais foram decaptados para posterior extração do encéfalo. Foi efetuado um corte transversal na região correspondente à localização da cânula e o local da microinjeção foi verificado macroscopicamente. Os animais cujos ventrículos laterais não estavam corados foram desconsiderados durante o cálculo dos resultados.

3.6- Indução da sepse

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol a 2,5% via i.p. (250 mg/kg)

Modelo da sepse: Cecal Ligation Puncture (CLP)

Foi realizada uma incisão mediana de 2 cm no abdômen do rato seguida de exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) na parte distal da válvula íleo-cecal. Posteriormente, foi realizado 4 perfurações do ceco com agulha (16G) na borda antimesentérica.

Grupo falso operado (SHAM): Estes animais foram submetidos à falsa cirurgia, isto é, sem ligadura nem perfuração do ceco, cuja sobrevivência é de 100%. O procedimento cirúrgico inclui laparotomia mediana, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal. Estes animais foram os controles deste modelo.

3.7- Cirurgia para implante do transmissor de temperatura na cavidade abdominal

Os transmissores foram esterilizados em solução de glutaraldeído 2% (v/v; imersão por 18 h). O transmissor foi então lavado com solução salina estéril e inserido

na cavidade peritoneal na mesma operação descrita anteriormente. Após estes dois procedimentos os animais receberam aproximadamente 5 mL de solução salina (s.c.) como líquido de reanimação.

3.8- Determinação da variação de temperatura corporal por radiotelemetria

No processo de leitura da temperatura corporal por radiotelemetria, transmissores operados por bateria (mini-mitter) foram implantados na cavidade abdominal conforme descrito anteriormente e acionados no dia anterior ao experimento. A frequência de saída (Hz) do transmissor foi monitorizada por uma antena montada em uma mesa receptora situada abaixo da caixa de contenção de cada animal e conectada a um processador periférico (Dataquest Sistem LabPro versão 3.1) conectado, por sua vez, a um computador pessoal. As frequências foram amostradas a intervalos de 30 min. e convertidas para graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) pelo processador. Durante o experimento a temperatura ambiente foi controlada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a cirurgia de ligação e perfuração cecal as medidas foram feitas em intervalos de 30 min.

3.9- Determinação da temperatura retal por telemetria

A temperatura retal dos animais foi medida por inserção de sonda (YSI, nº 402, USA) conectada a um teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA), a 4,0 cm de profundidade no reto dos animais, sem que os animais fossem retirados de suas respectivas caixas. Os animais foram adaptados às condições experimentais por meio da realização deste procedimento (duas vezes) no dia anterior ao experimento, a fim de minimizar as variações da temperatura induzidas por estresse decorrente do manuseio.

Durante o experimento a temperatura ambiente foi controlada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. As temperaturas basais foram determinadas por no mínimo 3 medidas, a intervalos de 30 min., antes dos tratamentos. Somente os animais com temperatura estável e na faixa de $36,8$ a $37,4^{\circ}\text{C}$ foram utilizados. Após a administração dos estímulos as medidas foram feitas em intervalos de 30 min. durante 6 horas.

3.10- Contagem do número de bactérias no sangue e lavado peritoneal

A contagem do número de bactérias no sangue e lavado peritoneal foi realizada 3, 6, 12, 24, 48 h após a indução de sepse. Para a obtenção das amostras de sangue para o estudo de bacteremia, os animais foram anestesiados e submetidos a punção cardíaca e para a quantificação do número de bactérias no exsudato, lavou-se a cavidade peritoneal com 10 mL de PBS estéril. O lavado peritoneal foi então diluído (1:10000) em PBS estéril e 10 μL dessa solução semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). O sangue foi semeado sem diluições. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18h a 37°C e o número de colônias contado. Os resultados foram expressos como Log de UFC/ mL para lavado peritoneal e sangue.

3.11- Coleta do Soro

Por ocasião da coleta, os animais foram submetidos às condições descritas acima, quanto à temperatura ambiente e leitura da temperatura basal (3.9). As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca 3, 6 e 24h após a indução da sepse em animais anestesiados. Para isso foram usadas seringas plásticas (10 ml) e agulhas (25 x 10) heparinizadas. Após a coleta, o sangue foi mantido em banho de gelo e em seguida centrifugado a 1300 g, por 15 min., a 4°C , em centrífuga SPIN 6. O soro (sobrenadante)

foi cuidadosamente coletado com o auxílio de uma pipeta automática, acondicionado em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml e congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o dia do experimento. Estas amostras foram utilizadas para a dosagem de IL-1 β , TNF- α e IL-6. Quando os animais foram tratados com os diferentes antipiréticos, estas amostras foram coletadas 3 e 6h após a indução do estímulo.

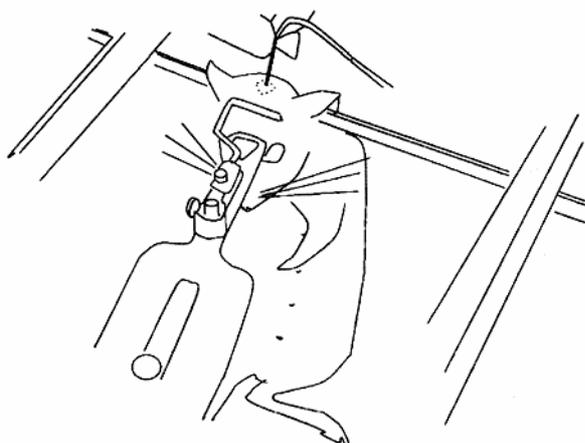
3.12- Coleta do lavado

Nos mesmos animais que coletamos o sangue (descritos acima 3.11), amostras do lavado peritoneal também foram coletadas para a dosagem das mesmas citocinas. Para a obtenção das amostras de lavado, os animais foram sacrificados e então lavou-se a cavidade peritoneal com 10 mL de PBS estéril. O lavado peritoneal foi então coletado e em seguida centrifugado a 1300 g, por 15 min., a 4°C , em centrífuga SPIN 6. O sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma pipeta automática, acondicionado em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml e congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o dia do experimento.

3.13- Coleta do fluido cerebrospinal (CSF)

A técnica de coleta de CSF foi padronizada segundo o método descrito por CONSIGLIO & LUCION (2000). Para investigarmos a cinética da síntese de PGs, este fluido foi coletado 3, 6, 12, 24 e 48h após a indução da sepse. Nos animais tratados com os diferentes fármacos, o tempo selecionado para a coleta deste fluido foi na sexta hora após a indução do estímulo. O animal foi então anestesiado com tribromoetanol a 2,5% via i.p. (250 mg/kg) 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 de forma que o tórax ficou posicionado verticalmente (Desenho página 37). Com o animal nesta

posição, é possível a visualização de uma pequena depressão entre a protuberância occipital e a espina do atlas. Esta depressão torna-se ainda mais visível após a tricotomia e passando-se um algodão embebido em álcool sobre esta superfície. Um “scalp” conectado a uma seringa de 1 ml foi inserido verticalmente e centralmente nesta superfície. Com uma leve aspiração o CSF pode ser coletado no “scalp”. Para a determinação das concentrações de PGs, o CSF coletado foi imediatamente acondicionado em um microtubo contendo 5 µg de indometacina em 2 µL de tampão TRIS pH 8.2, protegido da luz por papel alumínio e mantido em gelo até a centrifugação. Todas as amostras de CSF foram centrifugadas logo após a coleta a 50 g por 10 minutos a 4°C. Quando houve constatação de qualquer traço de contaminação por sangue durante a coleta ou após a centrifugação, a amostra foi prontamente desprezada. As amostras foram conservadas em freezer a -70°C até a realização das dosagens.



Desenho representativo da coleta de fluido cerebrospinal (CSF). Representação esquemática do posicionamento de um rato adulto anestesiado para coleta de CSF da cisterna magna com o auxílio de um “scalp” (Consiglio & Lucion, 2000).

3.14- Dosagem da concentração de PGs no CSF

A concentração de PGE₂ no CSF dos animais (6h após a cirurgia) foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), usando kits comerciais (Cayman Chemical Co., EUA). Após marcar as posições do branco, das soluções de concentrações conhecidas e das amostras na folha de protocolo, as amostras foram retiradas do freezer e deixadas à temperatura ambiente. Foram então preparadas várias soluções, mediante diluição seriada, utilizadas para ser construída a curva de calibração. Em seguida as amostras foram diluídas e vigorosamente agitadas.

Este ensaio foi baseado na competição entre a PG e um conjugado PG-acetilcolinesterase (traçador) por uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal para PG. A concentração do traçador foi mantida constante enquanto a concentração da PG foi variável. Assim, a quantidade do traçador capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal foi inversamente proporcional à concentração de PG presente no poço. Este complexo anticorpo-PG liga-se então ao anticorpo policlonal que foi previamente ligado à placa. A placa foi então lavada para remover traços remanescentes dos reagentes não ligados e o reagente de Ellman (o qual contém o substrato para a acetilcolinesterase) foi adicionado ao poço. O produto desta reação enzimática apresentou uma cor amarela, o que possibilitou a leitura da absorvância a 412 nm, por espectrofotometria. A intensidade desta cor foi proporcional à quantidade do traçador ligado ao poço e, portanto inversamente proporcional à quantidade de PG livre, presente em cada poço, durante o período de incubação. Assim, a concentração de PGE₂ presente nas amostras foi calculada e multiplicada pelo fator de diluição, que foi igual a 3. O nível de detecção foi de 15,6 pg/ml para PGE₂.

3.15- Detecção de citocinas

As concentrações de TNF- α , interleucina (IL) 1 β e IL-6, no lavado peritoneal, soro e CSF dos animais foram determinadas usando kits de Ensaio imunoenzimático (ELISA) de anticorpos específicos (EIA kit, R&D Systems)

Brevemente, 50 μ L do diluente foram acrescentados em cada poço específico para cada citocina, depois 50 μ L do padrão, controle ou amostra foram acrescentados em cada poço. Então, a placa foi coberta com uma tira adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Depois da incubação e lavagem das placas com tampão de lavagem, 100 μ L de TNF- α , IL-1 β e IL-6 Conjugado de rato foram acrescentados em cada poço e novamente incubados por 2h a temperatura ambiente. Depois de lavadas, acrescentamos 100 μ L de solução substrato em cada poço e incubamos por mais 30 min. a temperatura ambiente. Depois da incubação, paramos a reação com a adição de 100 μ L de solução stop. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 450 nm. Assim, as concentrações de cada citocina presente nas amostras foram calculadas e multiplicadas pelo respectivo valor de diluição. O nível de detecção foi de 5 pg/ml para TNF- α , IL-1 β e 21 pg/ml para IL-6. Os resultados foram expressos como picogramas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por mililitro de lavado peritoneal, soro ou CSF. Todas as amostras foram ensaiadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.16- Análise estatística

Todas as variações da temperatura dos animais foram expressas como a média \pm EPM da partir da temperatura corporal em $^{\circ}$ C, a diferentes tempos após a CLP.

As comparações estatísticas dos dados relativos à temperatura foram efetuadas por análise de variância (ANOVA two-way) seguida por teste de Bonferroni (onde houver diferentes tratamentos) ao passo que os dados relativos à concentração de PGE₂

e de citocinas foram submetidos à análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância do erro utilizado foi de 5% ($P < 0,05$). Para realização da análise estatística usou-se o programa Graph Pad Prism 3,0.

Para a análise estatística das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox Iogrank (X^2 “chisquared”). As curvas de sobrevida foram expressas como porcentagem de ratos vivos observados em intervalos de 4 horas durante 48h (período em que a temperatura também foi analisada) e a intervalos de 24 horas, durante os 7 dias avaliados, como é demonstrado a seguir

$$\% \text{ de sobrevida} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de animais vivos até o intervalo de tempo avaliado}}{\text{n}^\circ \text{ de animais no início do experimento}} \times 100$$

4 RESULTADOS

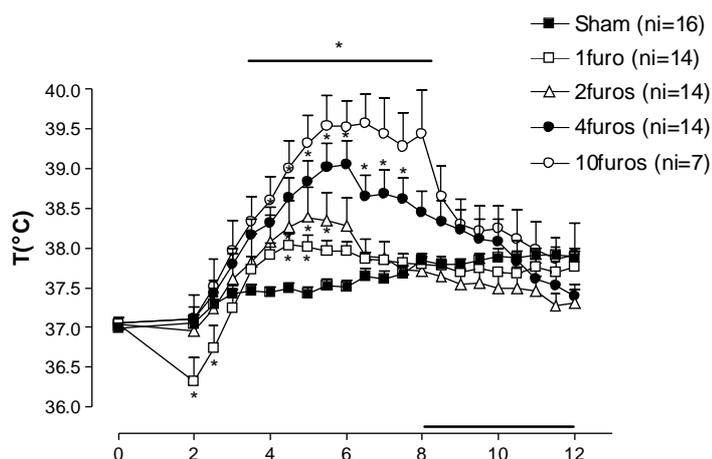
4.1- Aumento da temperatura corporal e da mortalidade induzida pela sepse (CLP) em ratos

Para padronizarmos o modelo de CLP capaz de induzir resposta febril, os animais foram submetidos à CLP com diferentes números de perfurações e calibres de agulhas. Os animais controles (Sham) foram submetidos à falsa cirurgia, isto é, sem ligadura nem perfuração do ceco. Duas horas após as cirurgias, foram iniciadas as medidas de temperatura corporal (durante 48 horas). A avaliação da sobrevivência dos animais foi realizada durante 1 semana.

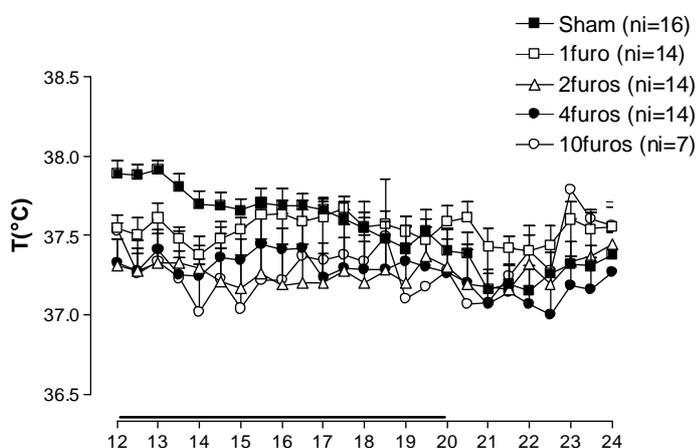
Primeiramente testamos as agulhas 24 (1furo), 20 (1 furo) e 18G (2 furos). Com os diferentes calibres de agulha e número de furos, os animais apresentaram uma pequena hipotermia (provavelmente efeito residual da anestesia, entre 2^a e 3^a h após infecção) seguida de um discreto aumento da temperatura nas primeiras horas, o qual não foi diferente do grupo controle Sham (dados não mostrados). Com relação à curva de sobrevivência, 100% dos animais permaneceram vivos após a indução do estímulo com as agulhas 24 e 20G e 80% com a agulha 18G ao final de uma semana (dados não mostrados).

Posteriormente utilizamos a agulha 16G (1, 2, 4 e 10 furos). Com este calibre de agulha e diferentes números de perfurações observamos aumento de temperatura proporcional ao número de furos, que foi mais evidente nas primeiras horas pós-infecção (Fig 1a). Com relação à curva de sobrevivência, observamos 78,5%, 50%, 42,8% e 0% de sobrevivência, respectivamente (Fig 2b). Uma vez que, 4 furos induziu aumento significativo da temperatura corporal (entre 3,5 e 7,5h após CLP) e sobrevivência de 42,8%, este número de furos foi escolhido para os experimentos subsequentes.

a)



b)



c)

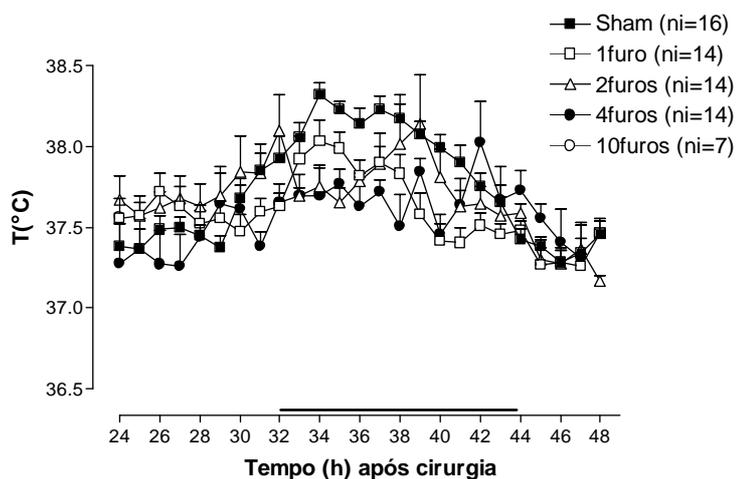
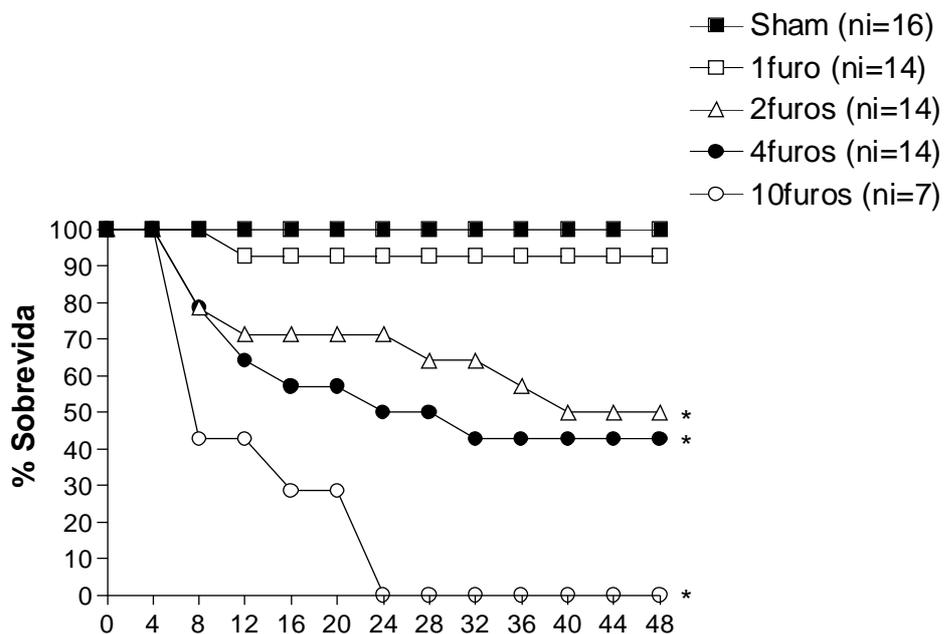


Fig 1. Peritonite infecciosa induzida por CLP aumenta a temperatura corporal de ratos.

Os animais foram submetidos à CLP (com a agulha de calibre 16G) ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais. O painel **a** representa as primeiras 12h, o **b** o intervalo entre 12-24h e o **c** o intervalo entre 24 e 48h. Os valores representam a média da temperatura corporal $^{\circ}\text{C} \pm \text{epm}$ de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo sham

a)



b)

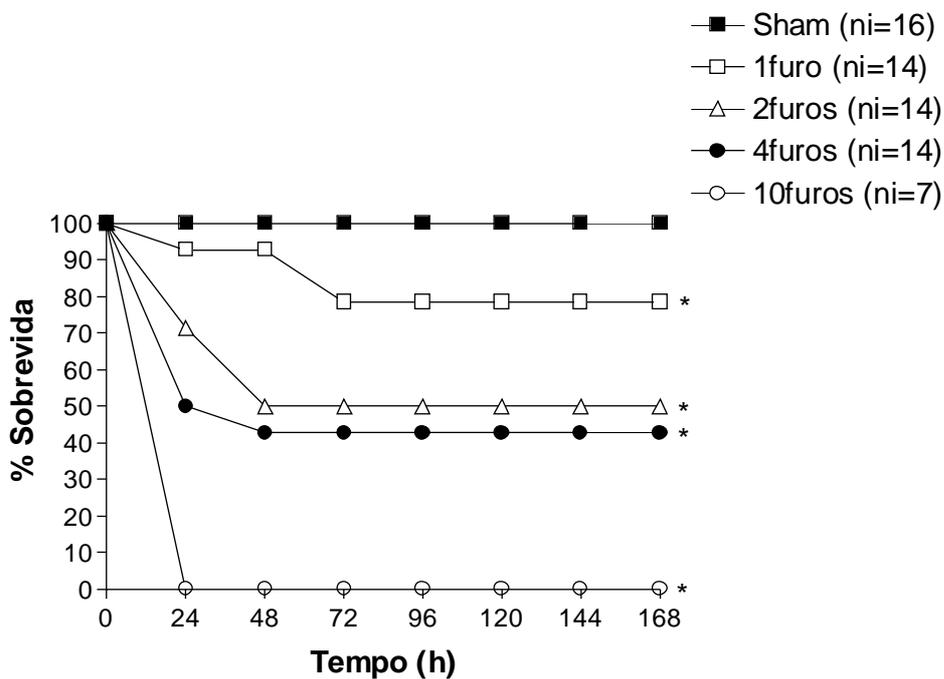


Fig 2. Peritonite infecciosa induzida por CLP diminui a sobrevivência dos animais de maneira estímulo (furo) dependente. A CLP foi realizada com a agulha de calibre 16G. As figuras **a** e **b** representam as porcentagens de sobrevivência para cada estímulo. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel **a** representa as primeiras 48h e o **b** todo o período analisado. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo sham

4.2- Contagem do número de bactérias no lavado peritoneal e sangue dos animais sépticos

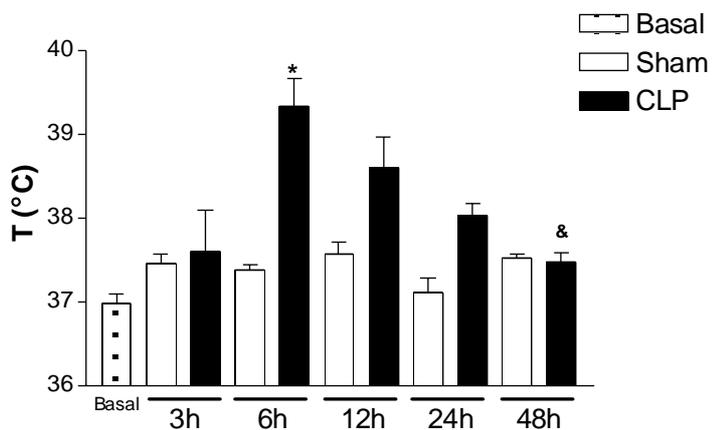
Com o propósito de estabelecer relação entre o aumento de temperatura corporal e a quantidade de bactérias presentes no foco infeccioso e no sangue, nosso próximo passo foi quantificar o número de bactérias no lavado peritoneal e sangue destes animais 3, 6, 12, 24 e 48h após a indução de sepse. Estes tempos foram selecionados baseados no aumento de temperatura induzido neste modelo.

A fig 3a mostra a temperatura corporal dos animais anterior a coleta do lavado e sangue. Observamos aumento significativo da temperatura dos animais somente na 6h após a indução da infecção quando comparados aos animais sham.

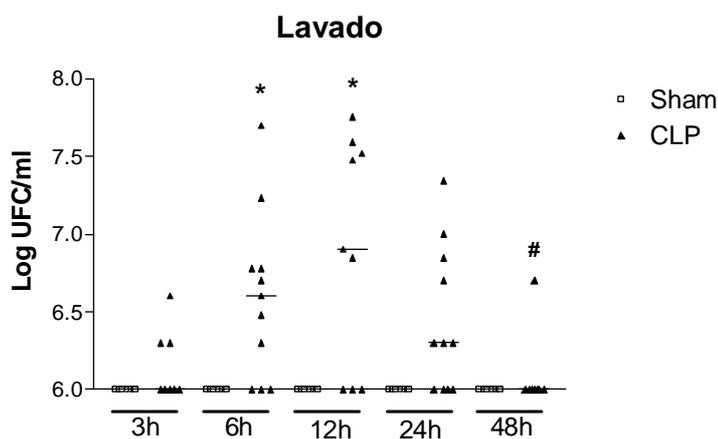
A fig 3b mostra a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal nos diferentes tempos analisados. Houve aumento no número de bactérias 6, 12h após a indução da sepse. Observamos redução do número de bactérias 48h após a infecção.

Ao analisarmos a quantidade de bactérias que extravasam para o sangue (bacteremia) (Fig 3c), observamos aumento na 6^a e 12^a h após a infecção.

a)



b)



c)

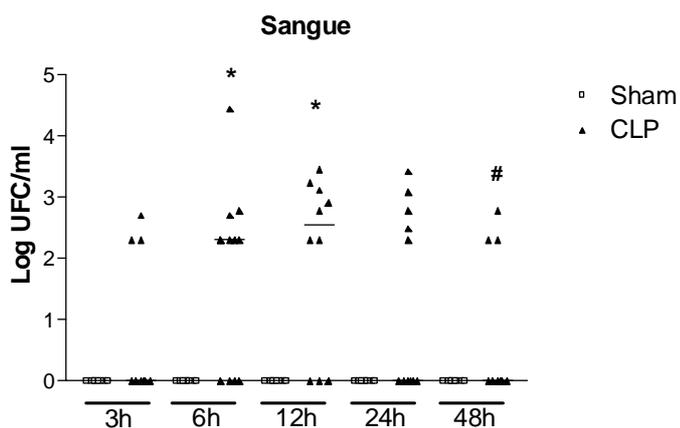


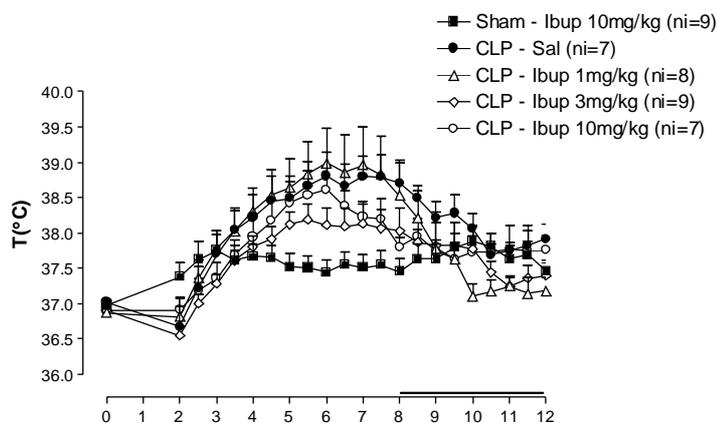
Fig 3a, b, c. Temperatura corporal e número de bactérias no lavado peritoneal e sangue após CLP, respectivamente. No painel **a** está representado a temperatura dos animais antes da coleta do lavado peritoneal e sangue, em **b**, o número de bactérias no lavado peritoneal e em **c** o número de bactérias no sangue, quantificados 3, 6, 12, 24 e 48h após CLP. Nos painéis **b** e **c**, os resultados são expressos como Log de UFC/ml. Os valores representam a média \pm e.p.m. da temperatura corporal de 8 a 11 animais por grupo. A temperatura foi medida por radiotelemetria. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo sham, & quando comparado ao grupo CLP 6h, # quando comparado ao grupo CLP 12h.

4.3- O ibuprofeno não modifica a febre e nem a sobrevida dos animais sépticos

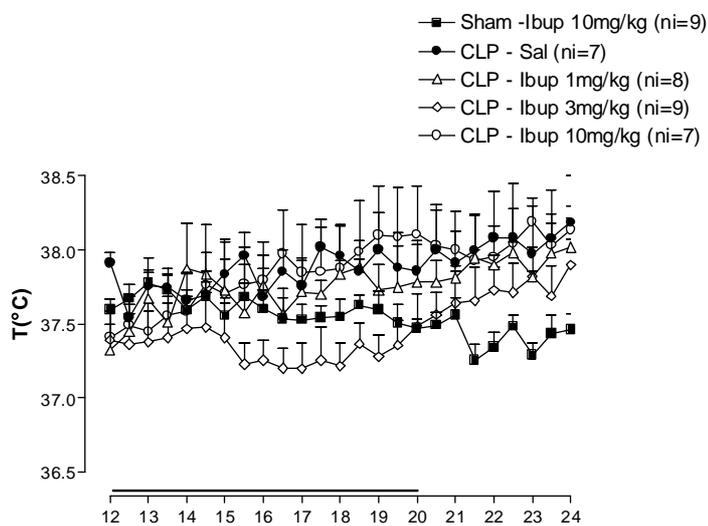
Nosso próximo passo foi investigar o efeito de fármacos sobre a resposta febril e sobrevida destes animais. O ibuprofeno, um inibidor não seletivo das enzimas COX, que é utilizado como antiinflamatório e antipirético foi a primeira droga estudada.

Os animais foram submetidos à CLP ou falsa cirurgia (sham) e 1h após receberam ibuprofeno. Este fármaco administrado nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg i.v. não reduziu o aumento de temperatura promovido pela sepse em nenhuma das doses utilizadas (Fig 4). Com relação a sobrevida, este parâmetro foi de 33.4%, 11.2%, 33.4%, respectivamente (Fig 5b). Os animais Sham tiveram 100% sobrevida e os submetidos à CLP 44.5%. Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos CLP tratados e o não tratado (controle positivo).

a)



b)



c)

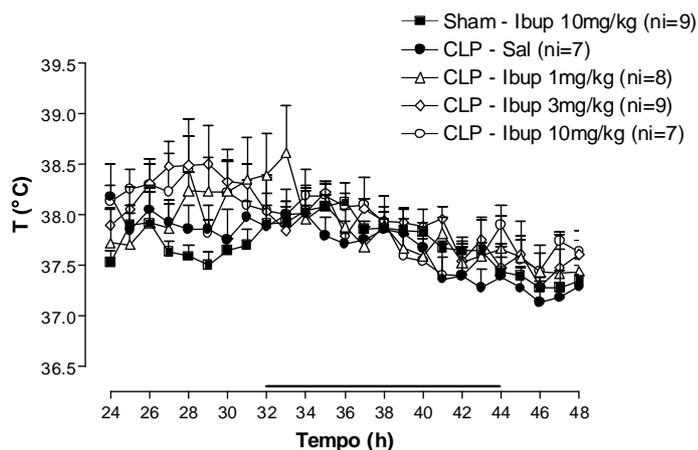
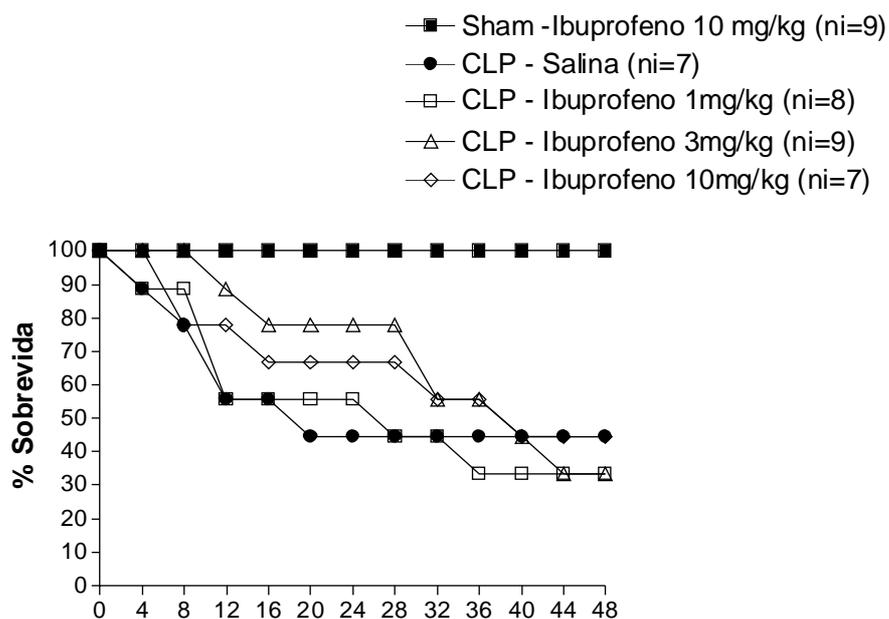


Fig 4. O ibuprofeno não reduz a febre induzida pela sepse

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. Os animais foram tratados com ibuprofeno uma hora após a infecção. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais antes da cirurgia. O painel **a** representa as primeiras 12h, **b** entre 12-24h e **c** entre 24-48h. Os valores representam a média da temperatura corporal $^{\circ}\text{C} \pm \text{epm}$ de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos

a)



b)

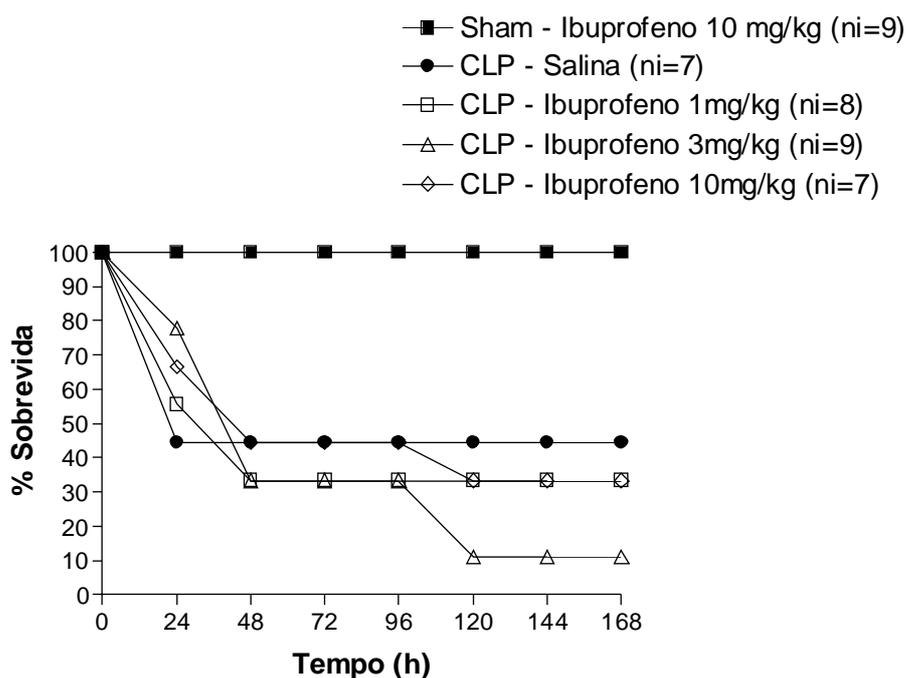


Fig 5. Ibuprofeno não altera a taxa de sobrevivência dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda. As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivência para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.

4.4- Indometacina diminui a febre e não modifica a sobrevivência dos animais submetidos à CLP

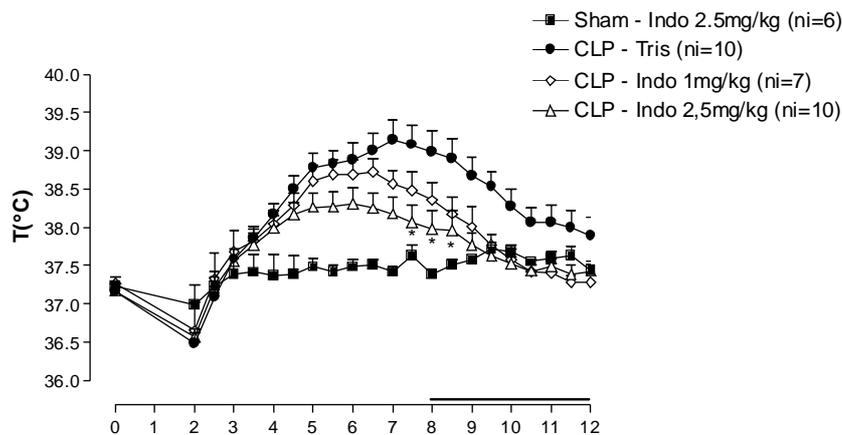
A indometacina é uma droga muito utilizada como ferramenta de pesquisa e é também um inibidor não seletivo das enzimas COXs. Apresenta propriedades analgésica, antiinflamatória e antipirética similar a dos salicilatos. Como pacientes apresentam intolerância a esta droga, seu uso se limita a curtos períodos.

Sua ação antipirética é atribuída também pela atuação sobre o sistema vasopressinérgico, que funciona como um sistema antipirético endógeno (WILKINSON & KASTING, 1991; SOUZA et al., 2002).

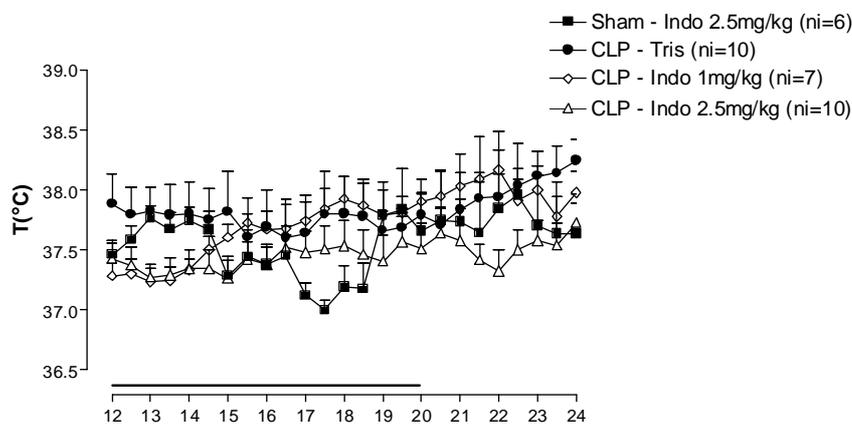
A indometacina por via oral tem excelente biodisponibilidade (Goodman & Gilman's). Neste experimento, os animais foram tratados com 1 ou 2,5 mg/kg por via oral. A dose de 2,5mg/kg não alterou a temperatura corporal dos animais controles. O tratamento com indometacina nas duas doses diminuiu a temperatura corporal dos animais, entretanto somente com a dose de 2,5 foi estatisticamente diferente dos animais CLP entre 7,5 e 8,5h (Fig 6).

Com relação à sobrevivência, este parâmetro foi de 23,7% e 57,2%, para os animais tratados com 2,5mg/kg e 1mg/kg, respectivamente (Fig 7b), entretanto não foi estatisticamente diferente do controle positivo CLP (41,7%).

a)



b)



c)

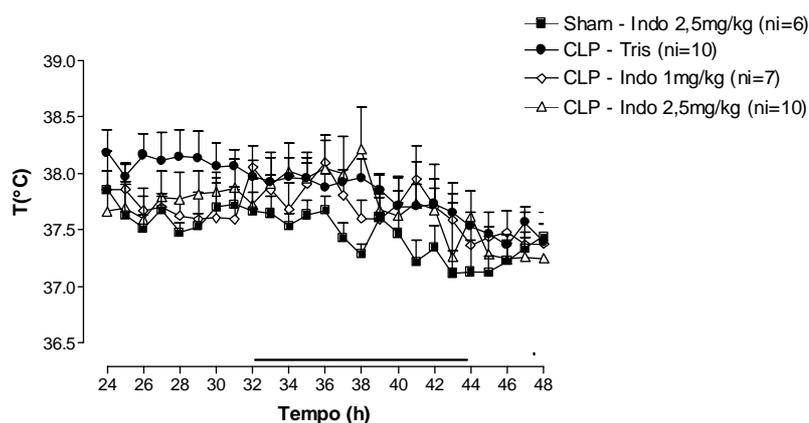
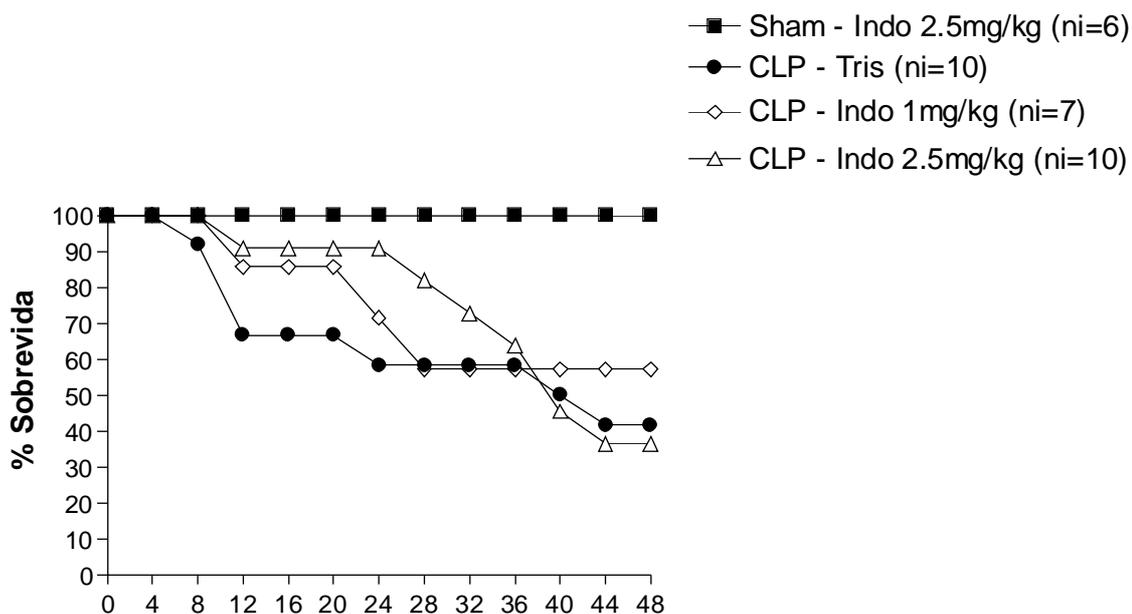


Fig 6. Indometacina diminui a febre induzida pela ligação e perfuração cecal.

Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. Os animais foram tratados com indometacina uma hora após a infecção. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais antes da cirurgia. O painel **a** representa as primeiras 12h, o **b** entre 12-24h e **c** entre 24-48h. Os valores representam a média da temperatura corporal $^{\circ}\text{C} \pm \text{epm}$ de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. * $P < 0,05$ qdo comparado ao grupo CLP.

a)



b)

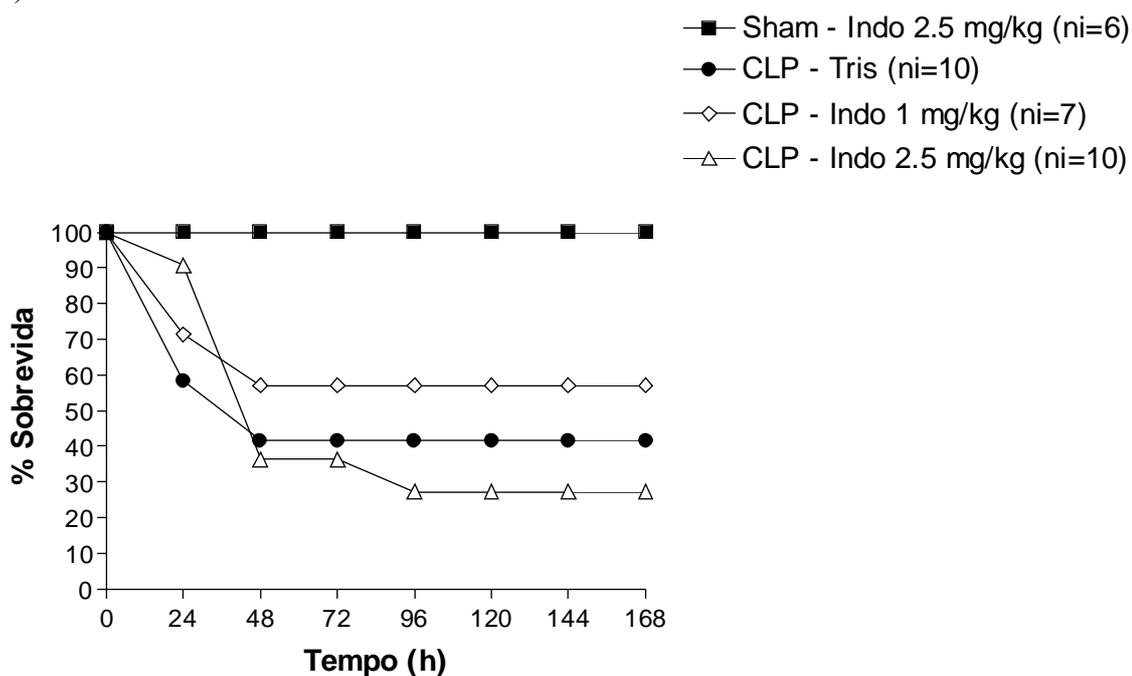


Fig 7. Indometacina não modifica a taxa de sobrevivência dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda (CLP). As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivência para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.

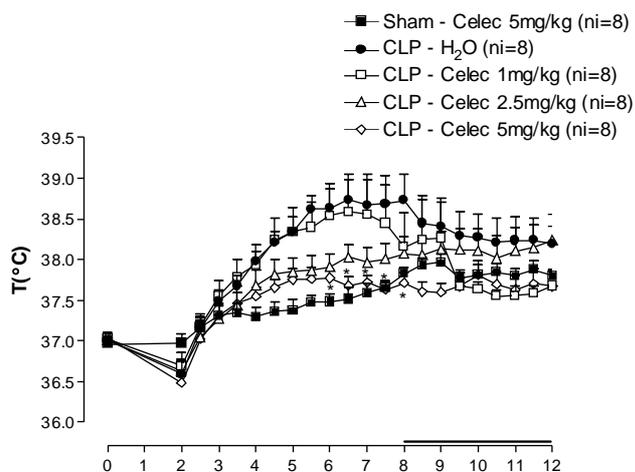
4.5- Celecoxibe diminui a febre e não altera a sobrevivência dos animais sépticos

Os animais experimentais foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia (sham) e 1 hora após receberam celecoxib, um inibidor seletivo COX-2 (nas doses de 1; 2,5; 5mg/kg) ou água por via oral (Fig 8).

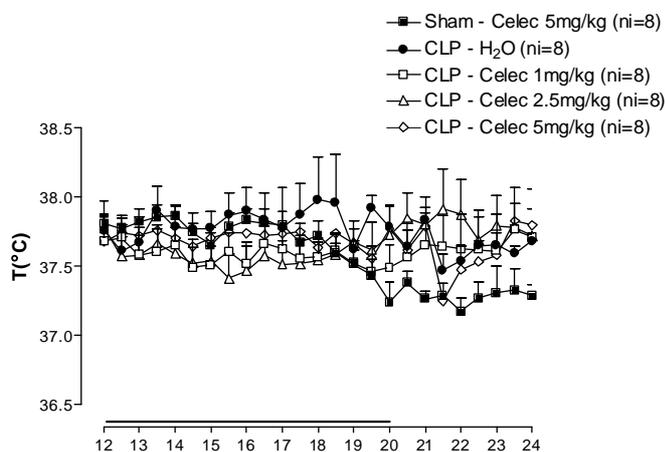
O tratamento com este fármaco nas doses de 1 e 2,5 mg/kg não modificou o aumento de temperatura promovido pela infecção. Por outro lado, a dose de 5 mg/kg reduziu a temperatura entre a 6^a e 9^a h.

Com relação à sobrevivência, este parâmetro foi de 50%, 62.5%, 50%, respectivamente (Fig 9b). Nos animais controle positivo (CLP) este índice foi de 37.5%. Contudo, não há diferença estatística entre estes grupos.

a)



b)



c)

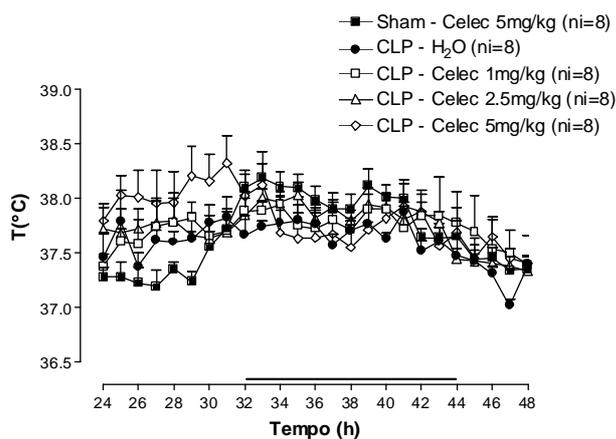


Fig 8. Celecoxib diminui a febre induzida pela sepse

Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. Os animais foram tratados com celecoxib nas doses de 1, 2,5, 5mg/kg 1h após CLP. Os animais sham receberam a maior dose de celecoxib e os controles positivo (CLP) salina. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais antes da cirurgia. O painel **a** representa as primeiras 12h, o **b** entre 12-24h e o **c** entre 24 e 48h. Os valores representam a média da temperatura corporal °C ± epm de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. *P<0.05 qdo comparado ao grupo CLP

a)

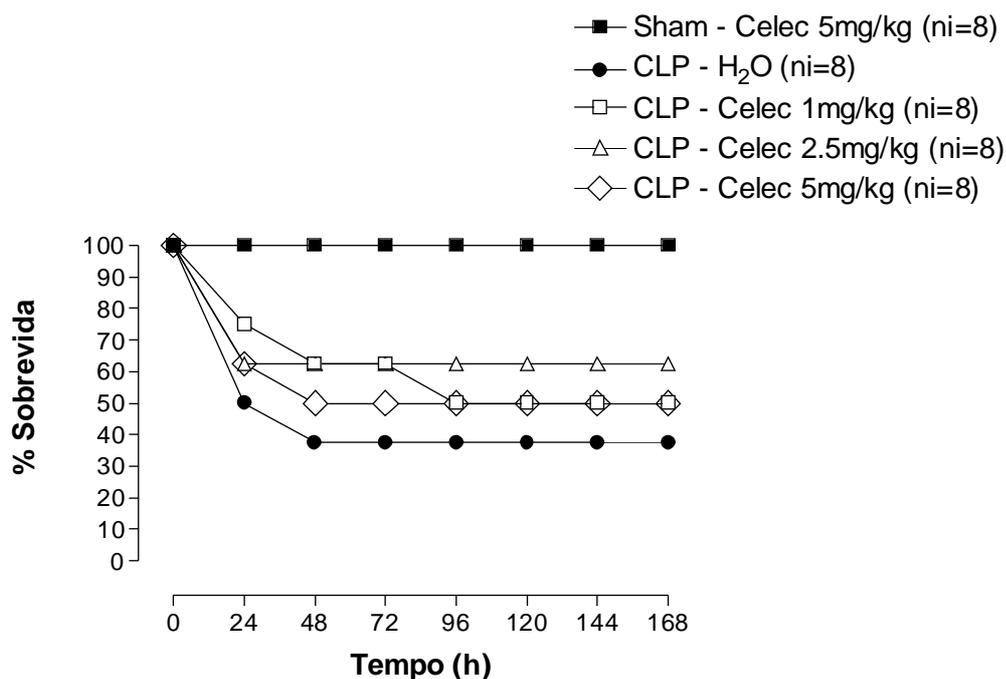
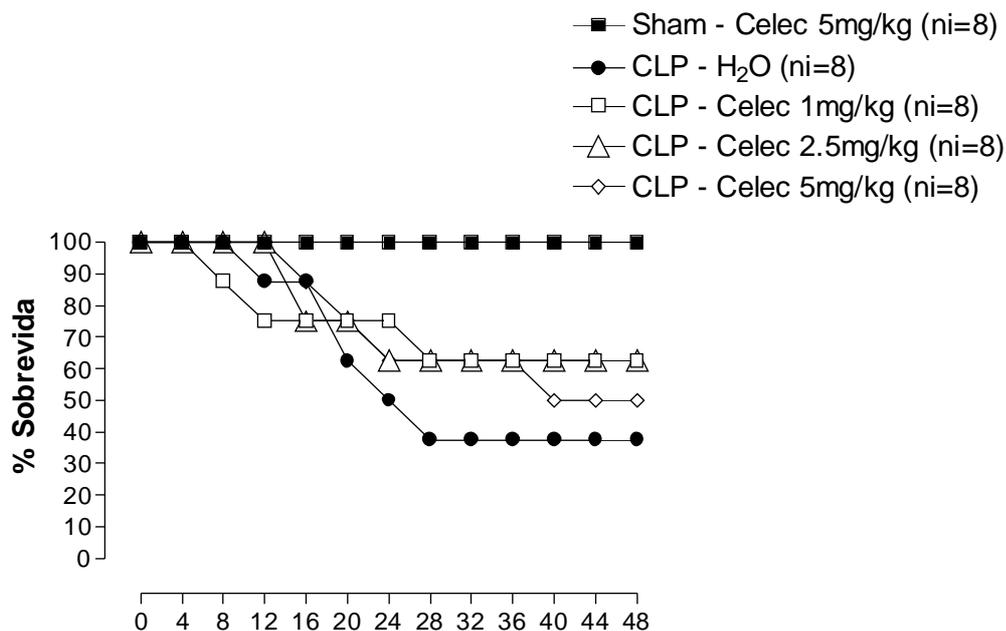


Fig 9. Celecoxib não modifica a taxa de sobrevivida dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda (CLP). As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivida para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivida dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.

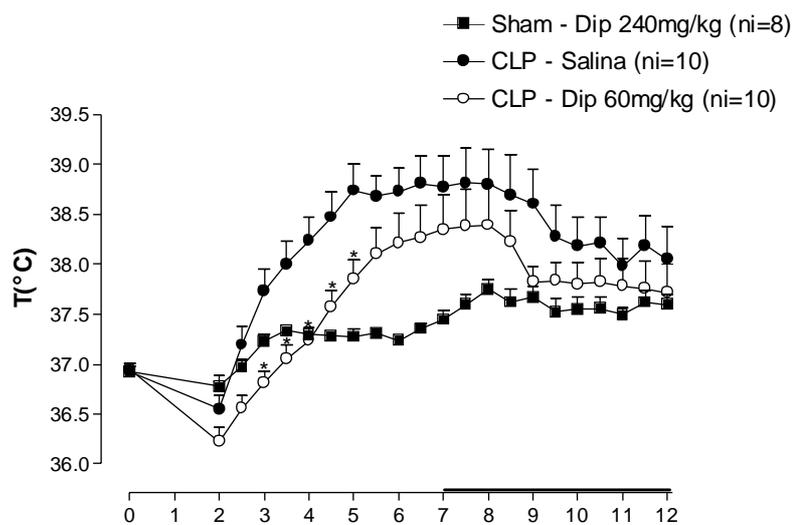
4.6- A dipirina e o paracetamol diminuem a febre, entretanto somente o paracetamol aumenta a sobrevida dos animais sépticos.

Nosso próximo passo foi testar o efeito de fármacos com reduzida atividade antiinflamatória.

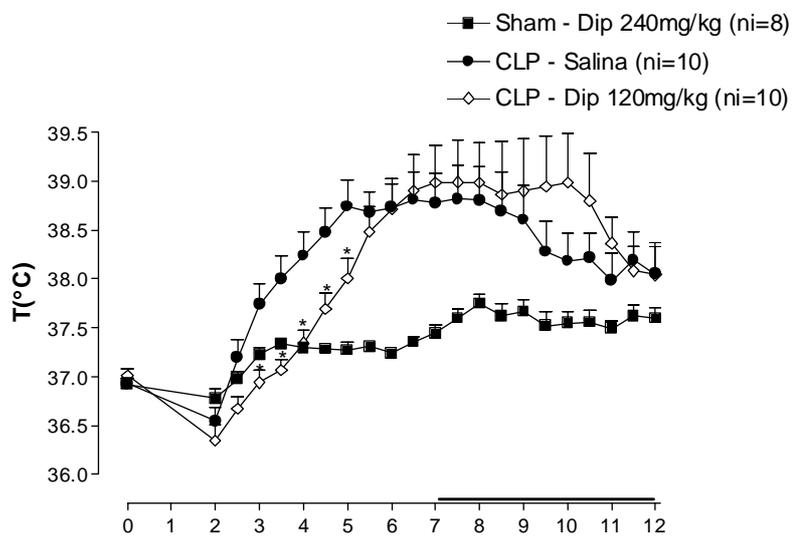
A dipirona foi administrada nas doses de 60, 120 e 240 mg/kg i.v. Este fármaco quando administrado 1h após CLP reduziu o aumento de temperatura induzido pela CLP nas 3 doses utilizadas, sendo a resposta mais evidente na dose de 240 mg/kg (entre 3^a-7^ah; Fig 10 a3). Com relação à sobrevida, este parâmetro foi de 60%, 40% e 20%, respectivamente ao final de uma semana (Fig 11b). Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos CLP tratados e não tratado.

Com relação ao paracetamol, este fármaco também foi administrado 1h após a cirurgia nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg v.o. Esta droga nas 3 doses utilizadas reduziu da temperatura, entretanto, foi estatisticamente diferente somente com a maior dose (Fig 12 a3). Com relação à sobrevida, este parâmetro foi de 50, 80 e 80% para as doses de 75, 150 e 300 mg/kg, respectivamente. O aumento na sobrevida promovido pelas doses de 150 e 300mg/kg foi estatisticamente diferente do grupo CLP (50%), Fig 13b.

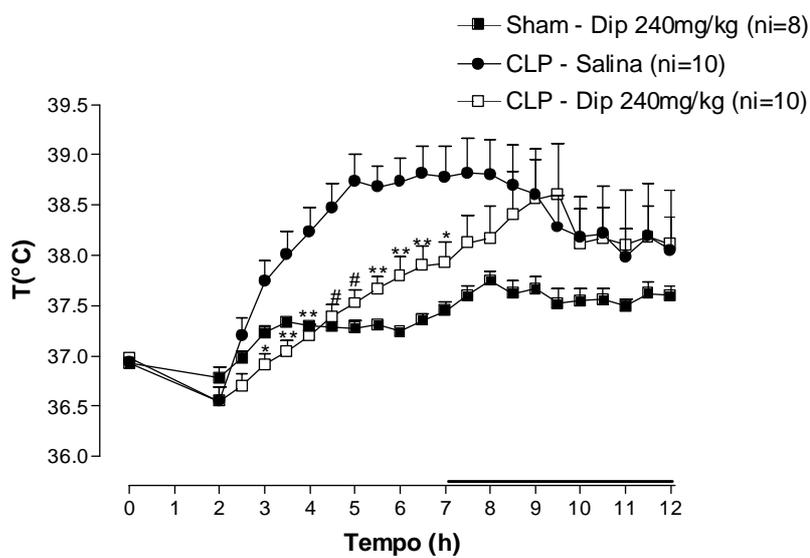
a)1



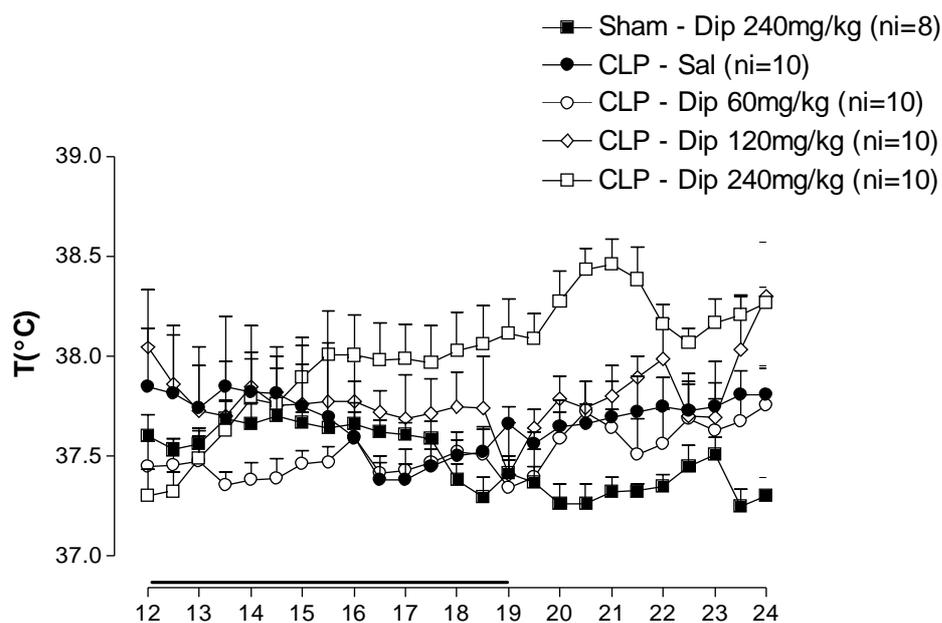
a)2



a)3



b)



c)

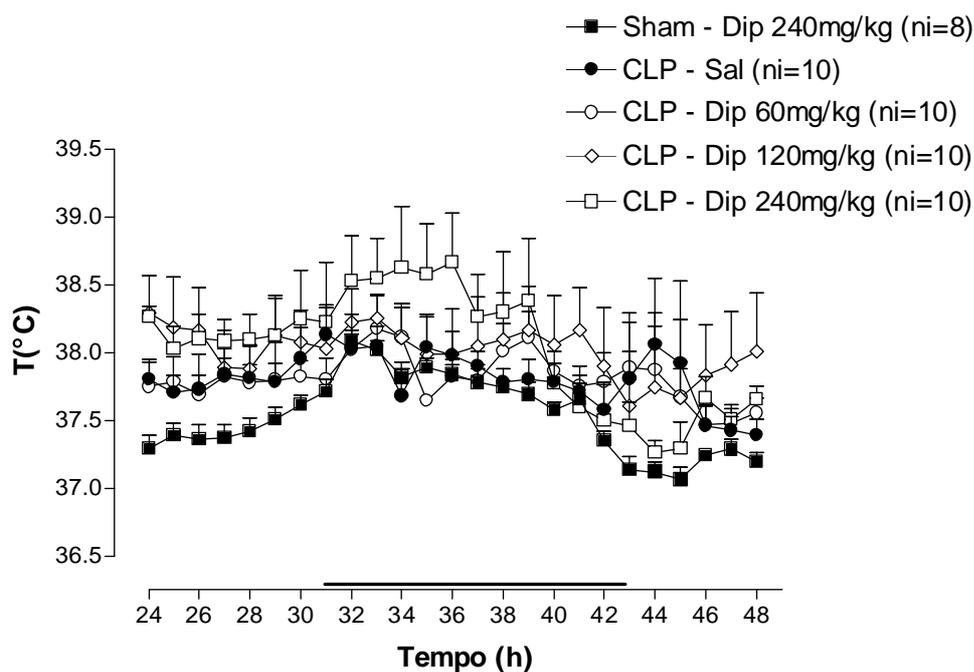
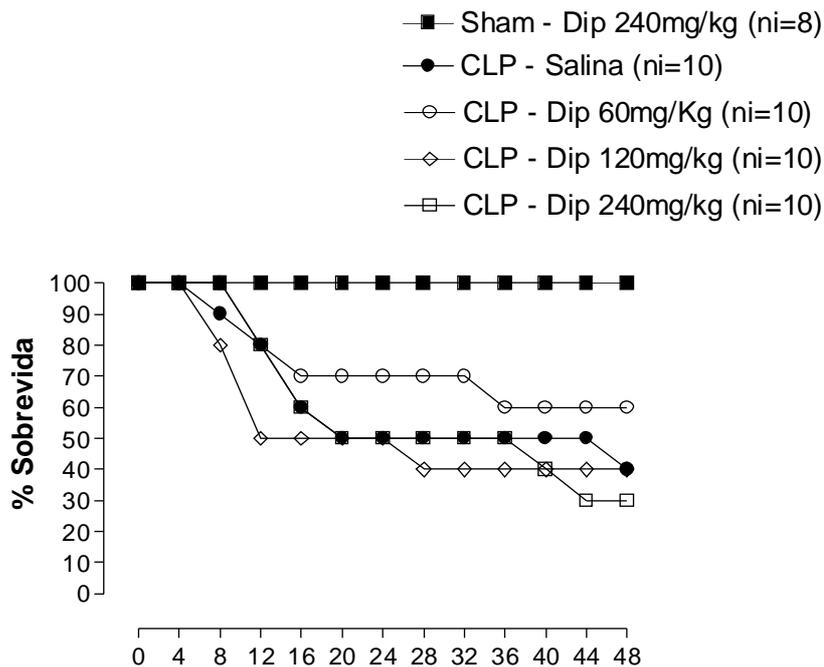


Fig 10. Dipirona diminui a febre induzida pela sepse

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. Os animais foram tratados com dipirona nas doses de 60, 120 e 240mg/kg 1h após CLP. Os animais sham receberam a maior dose de dipirona e os controle positivo (CLP) salina. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais antes da cirurgia. O painel **a** representa as primeiras 12h, **b** o intervalo entre 12 e 24h e **c** o intervalo entre 24 e 48h após a infecção. Os valores representam a média da temperatura corporal $^{\circ}\text{C} \pm \text{epm}$ de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, # $P < 0,001$, quando comparado ao grupo CLP-salina (Two-way ANOVA seguido de Bonferroni)

a)



b)

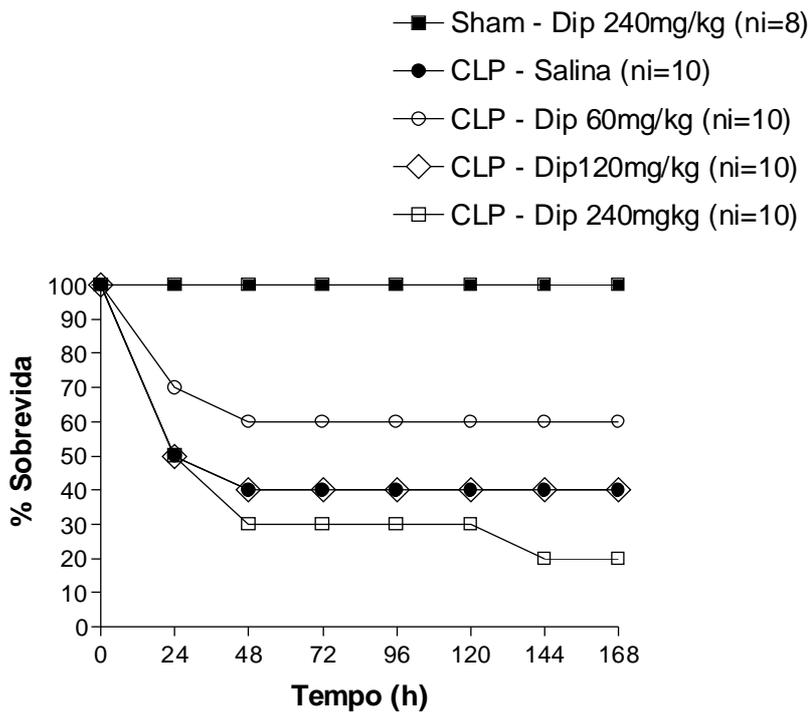
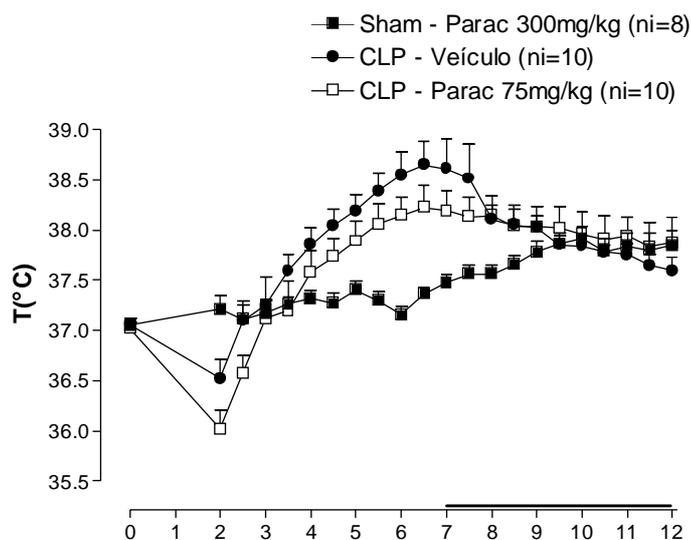
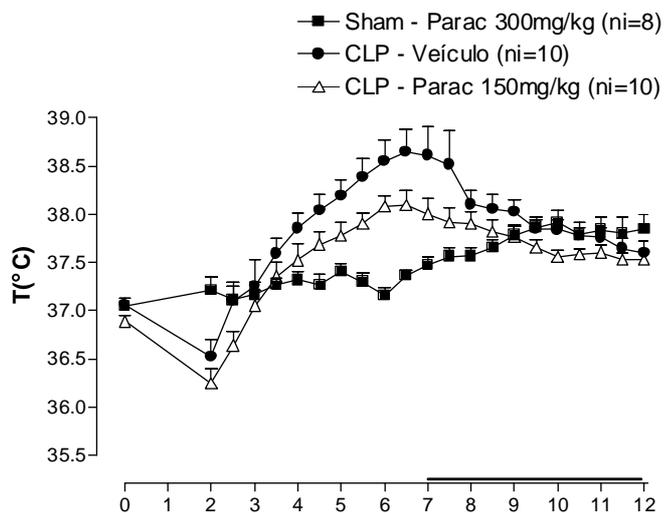


Fig 11. Dipirona não modifica a taxa de sobrevivência dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda. As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivência para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.

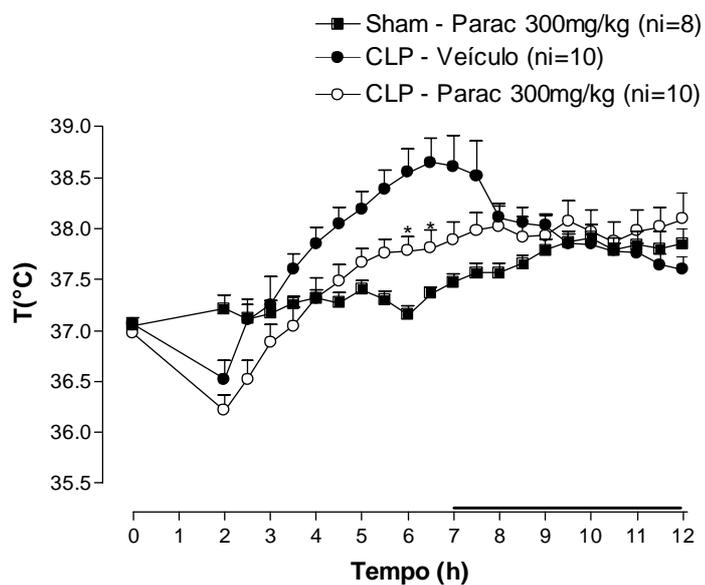
a)1



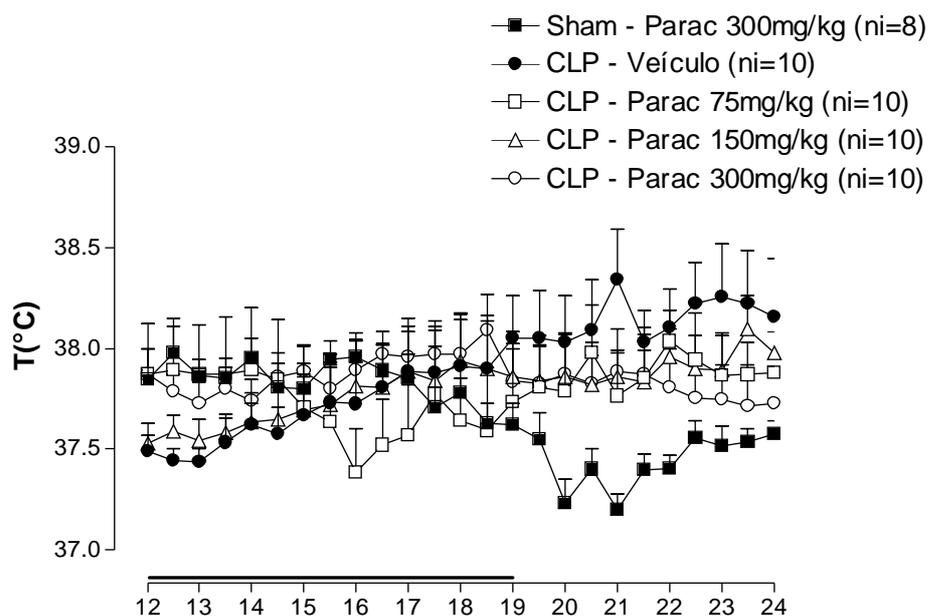
a)2



a)3



b)



c)

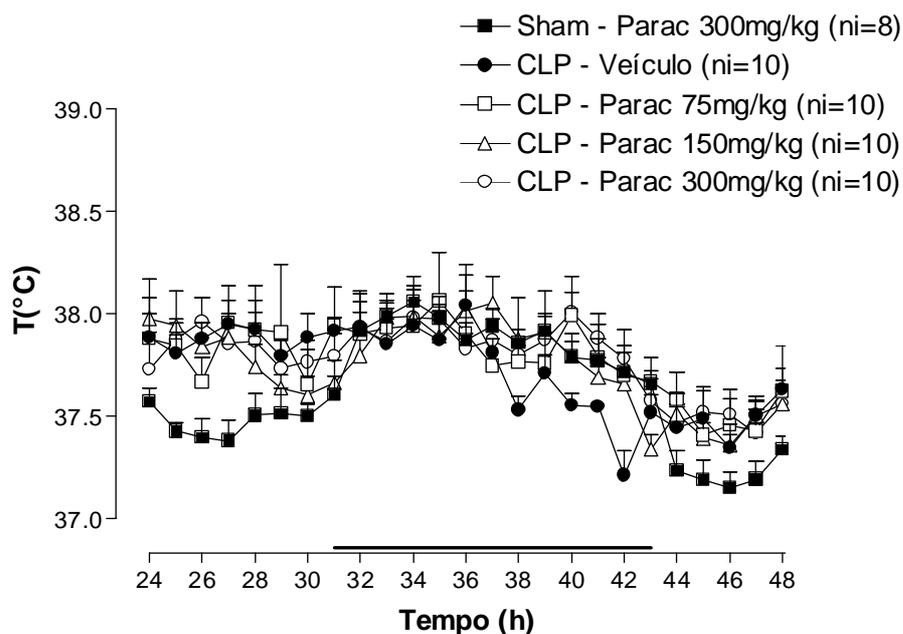
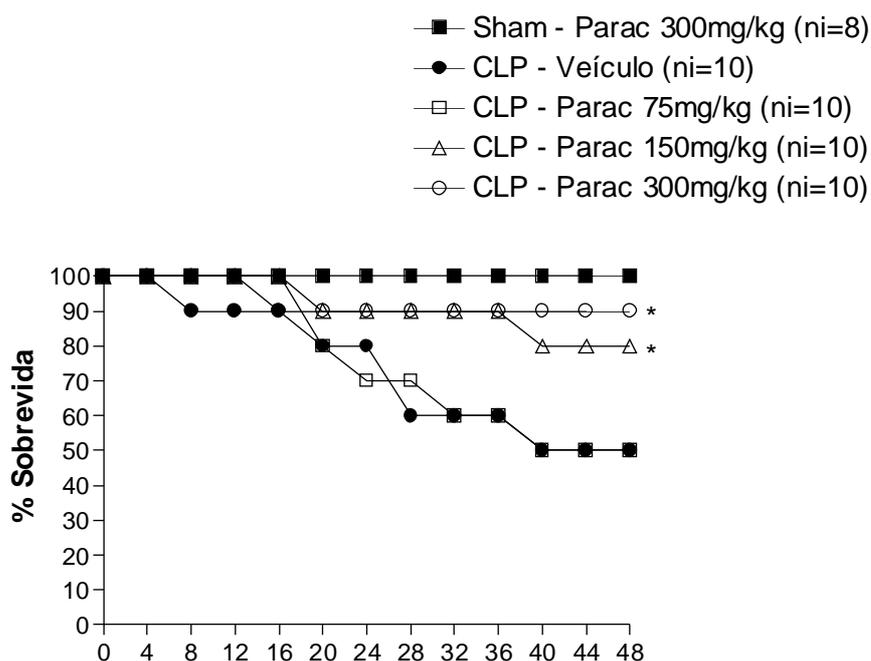


Fig 12. Paracetamol diminui a febre induzida pela CLP

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa-cirurgia (Sham) e logo após foram realizadas as medidas da temperatura. Os animais foram tratados com paracetamol nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg 1h após CLP. Os animais sham receberam a maior dose de paracetamol e os controle positivo (CLP) o respectivo veículo. O tempo zero representa a média da basal de cada grupo de animais antes da cirurgia. O painel **a** representa as primeiras 12h, **b** o intervalo entre 12 e 24h e o **c** o intervalo entre 24 e 48h após a infecção. Os valores representam a média da temperatura corporal $^{\circ}\text{C} \pm \text{epm}$ de cada grupo de animais. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP-veículo (Two-way ANOVA seguido de Bonferroni).

a)



b)

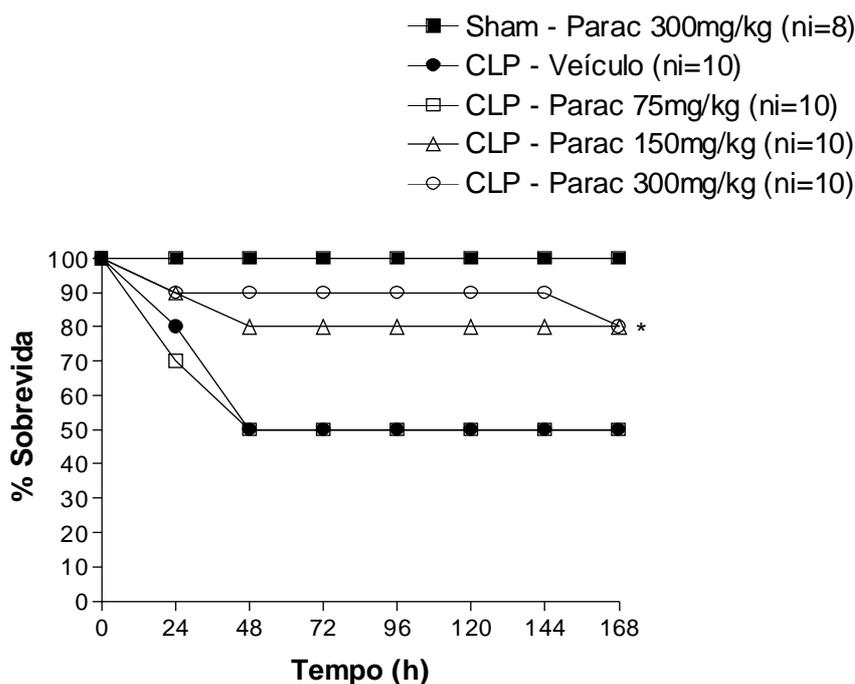


Fig 13. Paracetamol aumenta a sobrevivência dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda. As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivência para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP- veículo (Mantel Cox Logrank – chi squared)

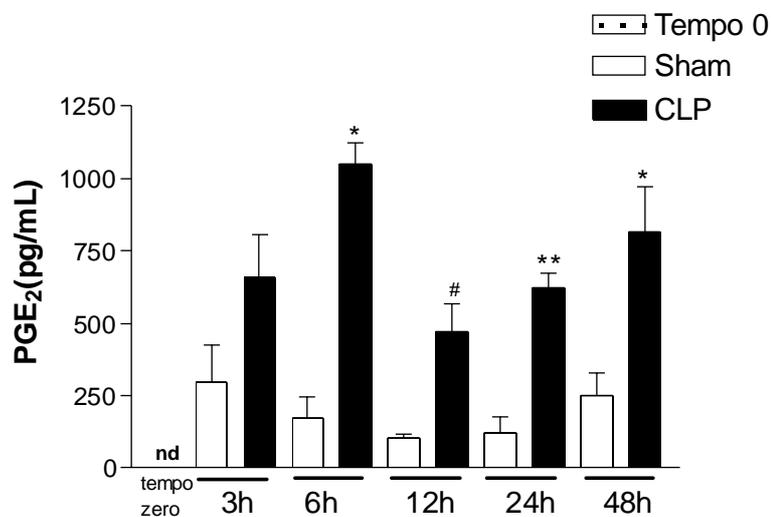
4.7- CLP induz aumento nas concentrações de prostaglandina (PGE₂) no fluido cerebrospinal (CSF) dos animais submetidos a CLP

Com o objetivo de relacionar a atividade antipirética das drogas testadas anteriormente com as concentrações de PGs no CSF durante a sepse, o CSF dos animais foi coletado em diferentes tempos de acordo com o efeito dos antipiréticos testados.

Neste primeiro experimento (Fig 14), amostras de CSF foram coletadas 3, 6, 12, 24 e 48h após a CLP ou a falsa cirurgia (sham) com o objetivo de observar o perfil de liberação deste mediador em resposta a infecção.

Houve um aumento da concentração de PGE₂, 6, 12, 24 e 48h após a indução de sepse (Fig 14a).

a)



b)

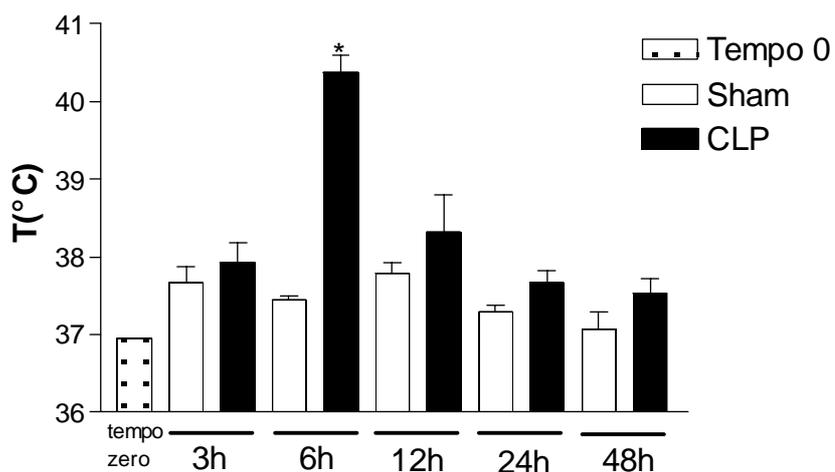


Fig 14. Aumento das concentrações de prostaglandinas no fluido cerebrospinal (CSF) e da temperatura dos animais submetidos à CLP. Concentração de PGE₂ no tempo zero, 3, 6, 12, 24 e 48h após a CLP ou falsa cirurgia. Em **a** *P<0.001, **P<0,01, #P<0,05 quando comparado ao grupo sham. No painel **b** está representada a temperatura dos animais antes da coleta do CSF. Os valores representam a média ± e.p.m. da temperatura corporal de 4 animais por grupo. A temperatura foi medida por radiotelemetria. *P<0.001 quando comparado ao grupo sham.

4.8- Efeito do celecoxibe, paracetamol e da dipirona sobre as concentrações de PGE₂ no fluido cerebrospinal (CSF) durante a febre induzida pela CLP

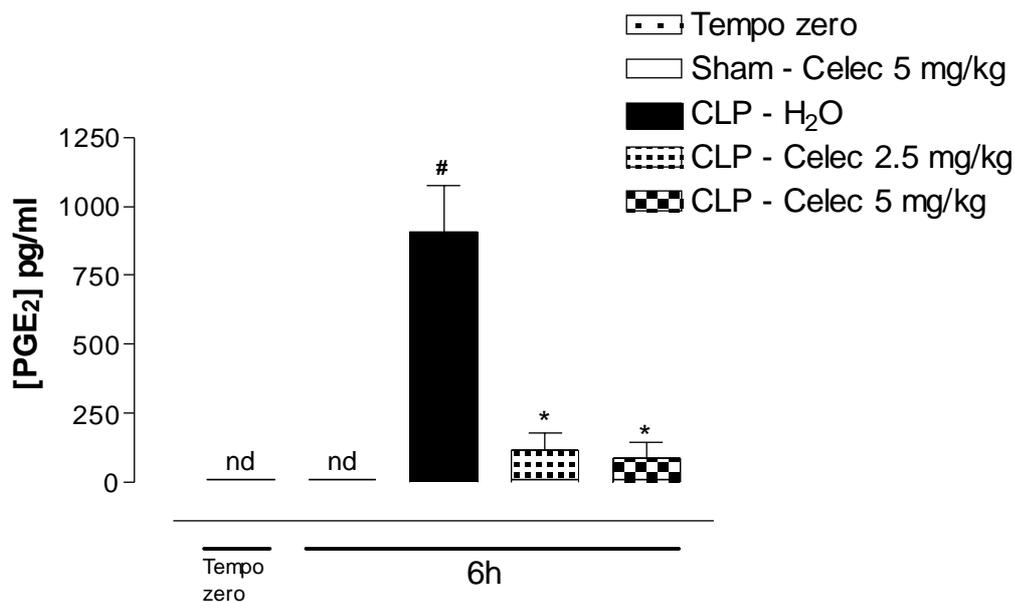
Com o objetivo de relacionar a atividade antipirética das drogas supra-citadas com os níveis de PGs, realizamos a dosagem da concentração de PG (PGE₂) no CSF dos animais tratados com celecoxibe, paracetamol e dipirona 6h após a indução do estímulo.

Com relação ao celecoxibe, as doses de 2,5 e 5mg/kg diminuíram significativamente as concentrações de PGs no CSF dos animais (Fig 15), mas somente a maior dose promoveu antipirese.

O tratamento com paracetamol (300mg/Kg) reduziu a febre (Fig 16b) e as concentrações de prostaglandina no CSF dos animais sépticos (Fig 16a).

O tratamento com dipirona, 60 mg/kg, não reduziu significativamente a temperatura dos animais submetidos a CLP bem como não alterou a concentração de prostaglandina no CSF dos mesmos (Fig 17b) .

a)



b)

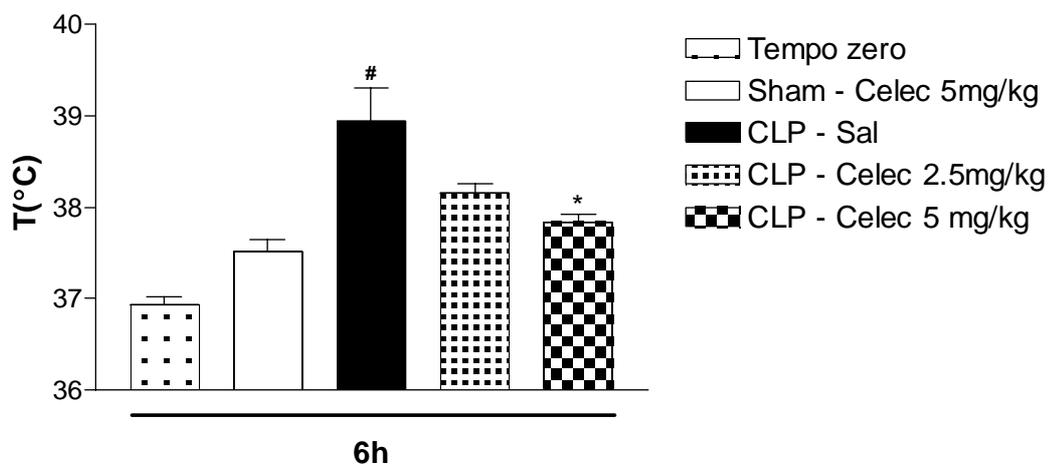


Fig 15. Celecoxibe reduz a febre e o aumento da concentração de PGE₂ no CSF dos animais submetidos à CLP. Em **a** está representada a concentração de PGE₂ de 4 a 6 animais por grupo 6h após a CLP ou falsa cirurgia. No painel **b** está representada a temperatura dos animais tratados com celecoxibe 6h após a CLP ou falsa cirurgia. Os valores representam a média ± e.p.m. da temperatura corporal. A temperatura foi medida por telemetria. # P<0.05 quando comparado ao grupo sham *P<0,05 quando comparado ao grupo CLP-Sal. No gráfico nd = não detectável

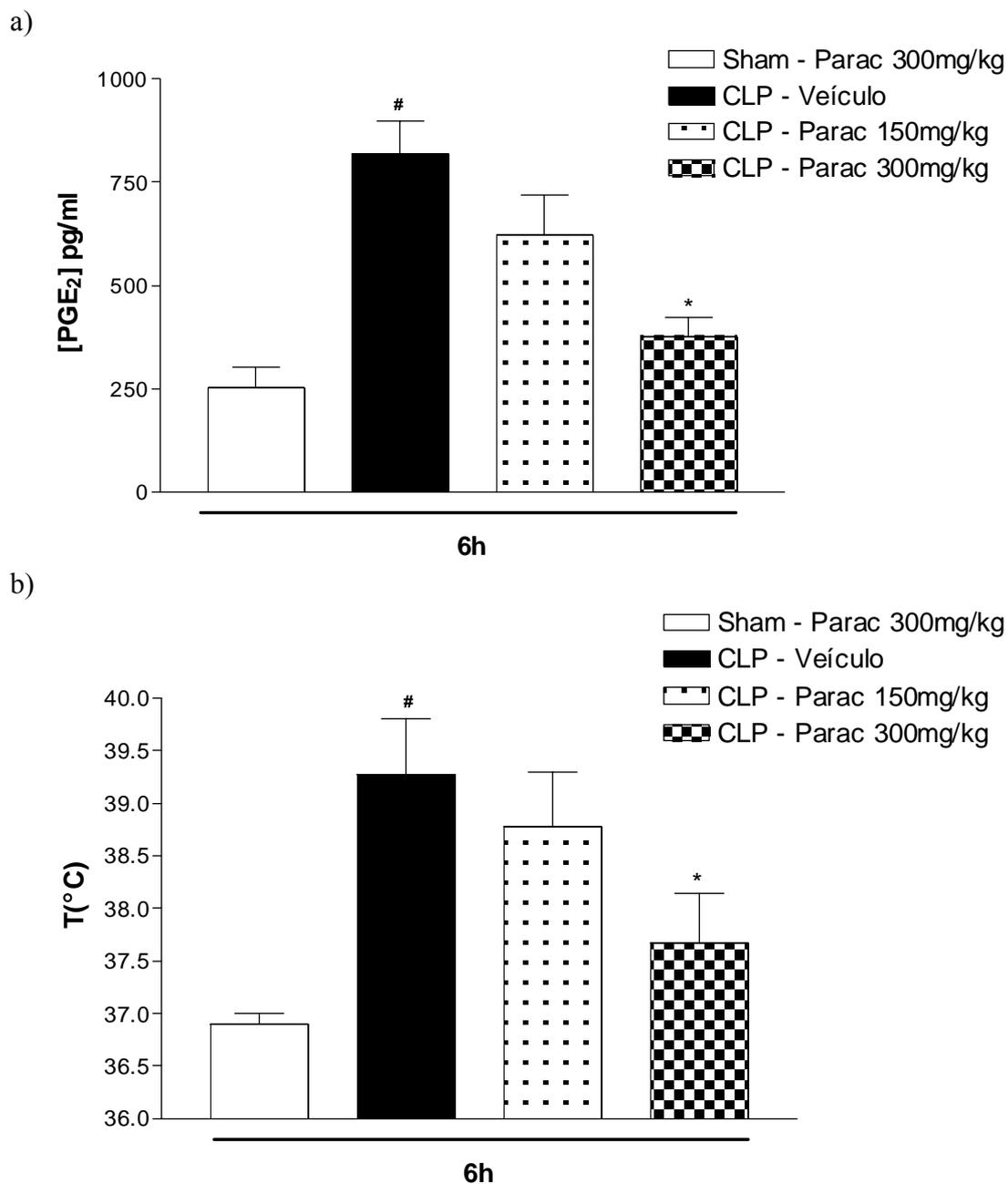
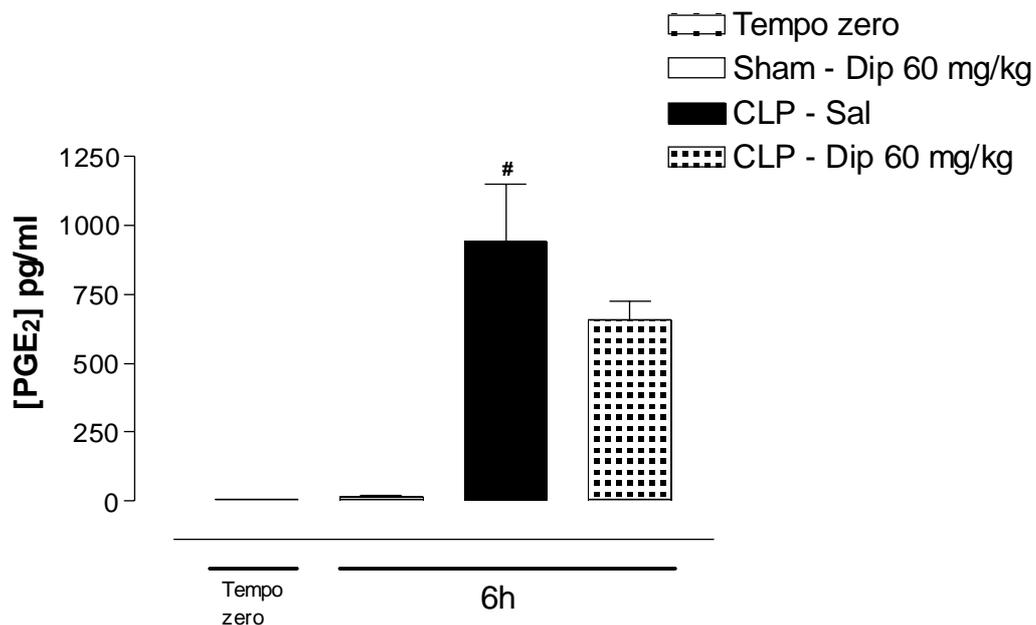


Fig 16. Paracetamol reduz a febre e o aumento da concentração de PGE₂ no CSF dos animais submetidos à CLP. Em **a** está representada a concentração de PGE₂ 6h após a CLP ou falsa cirurgia. No painel **b** está representada a temperatura dos animais tratados com paracetamol 6h após a CLP ou falsa cirurgia. Os valores representam a média ± e.p.m. da temperatura corporal de 4 a 5 animais por grupo. A temperatura foi medida por radiotelemetria. #P<0.05 quando comparado ao grupo sham, *P<0.01, quando comparado ao grupo CLP-Veículo

a)



b)

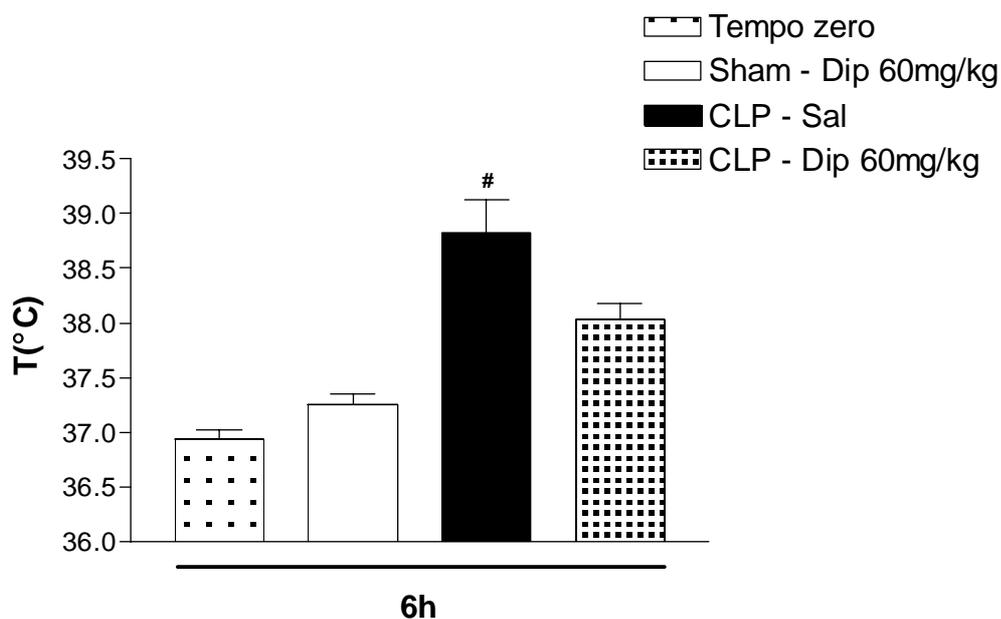


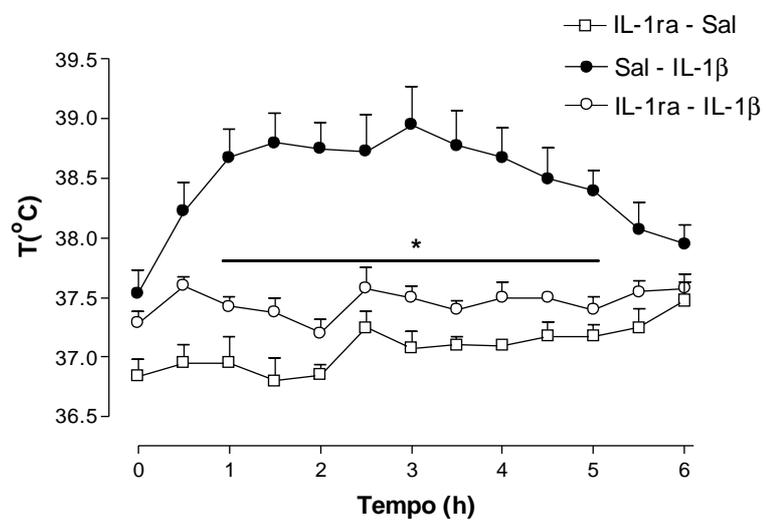
Fig 17. Dipirona não modifica a febre e o aumento da concentração de PGE₂ no CSF dos animais submetidos à CLP. Em **a** está representada a concentração de PGE₂ de 4 a 6 animais por grupo 6h após a CLP ou falsa cirurgia. No painel **b** está representada a temperatura dos animais tratados com dipirona 6h após a CLP ou falsa cirurgia. Os valores representam a média ± e.p.m. da temperatura corporal. A temperatura foi medida por telemetria. No gráfico nd = não detectável #P<0,05 quando comparado ao grupo sham

4.9- O tratamento com o do antagonista de receptores de IL-1, IL-1ra não modifica a febre, mas aumenta a sobrevida dos animais sépticos

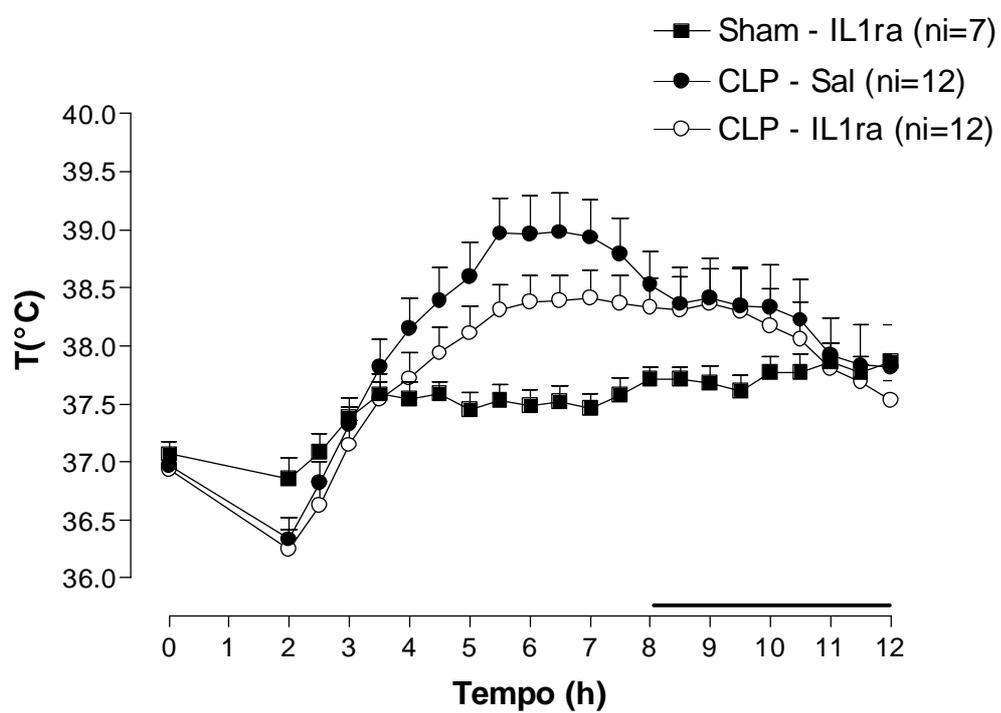
O pré-tratamento dos animais com IL-1ra na dose de 9,1 pmol, (i.c.v., 15 minutos antes), promoveu uma significativa redução da febre induzida pela injeção i.c.v. de IL-1 β (180 fmol, i.c.v; Fig. 18a), mas não alterou a resposta febril induzida pela sepse quando administrado 1h após o estímulo séptico (Fig. 18b). O IL-1ra não promoveu alteração significativa da temperatura basal dos animais controles.

Com relação à sobrevida, o tratamento com este antagonista aumentou significativamente a sobrevida dos animais sépticos (de 41.7 para 58.4%) - Fig 19b.

a)



b)



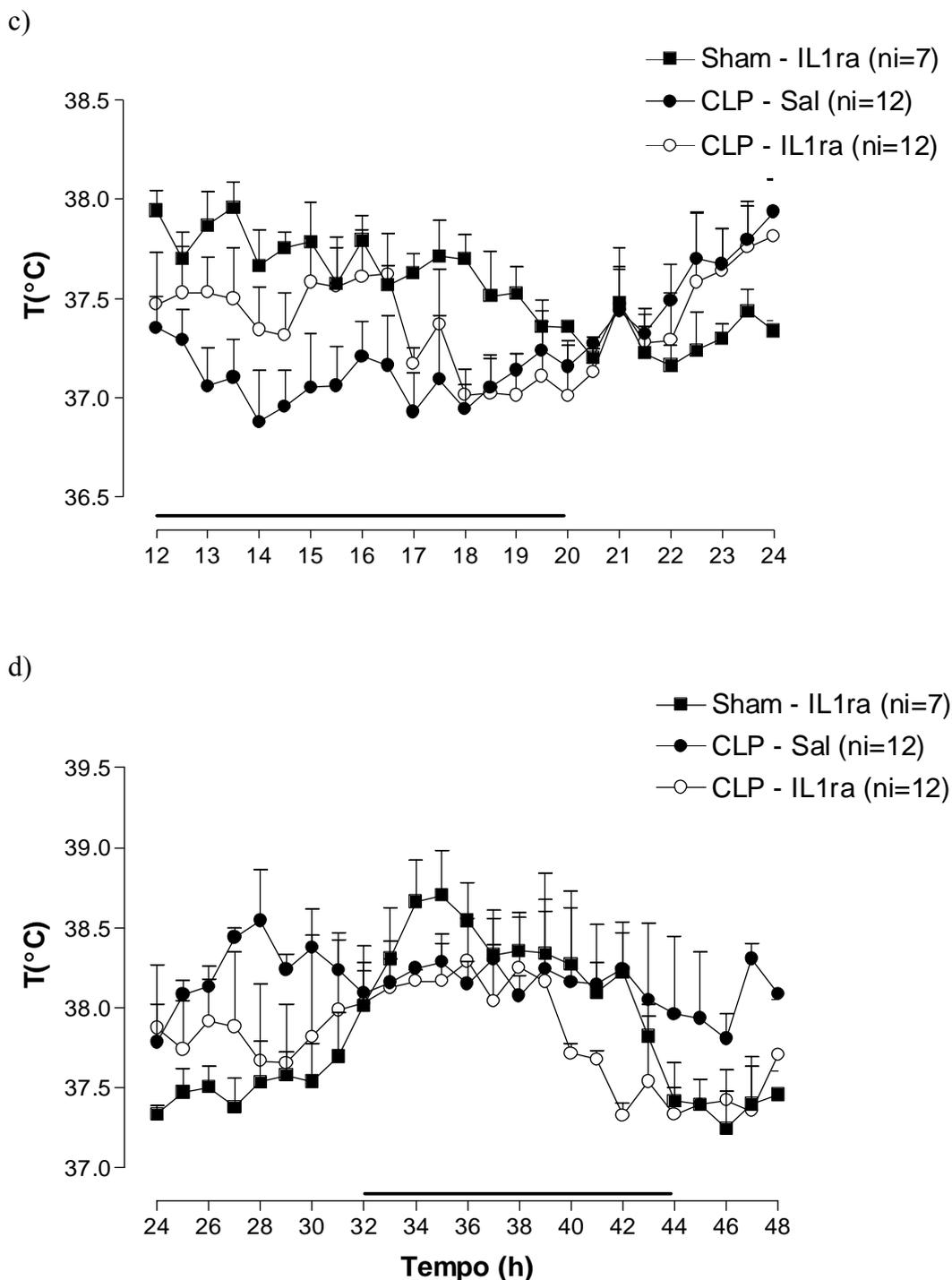


Fig 18. O tratamento com o antagonista de receptores para interleucina-1 (IL-1ra) não modifica a resposta febril induzida pela sepse. Ratos receberam 9,1 pmol de IL-1ra (3 μ l) i.c.v. 15 min antes de 180 fmol de IL-1 β (a) ou 1h após CLP (b, c, d). O painel b representa as primeiras 12h, c o intervalo entre 12 e 24h e o d o intervalo entre 24 e 48h após a infecção. Valores representam a média \pm e.p.m. da temperatura abdominal dos ratos. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo Sal-IL-1 β

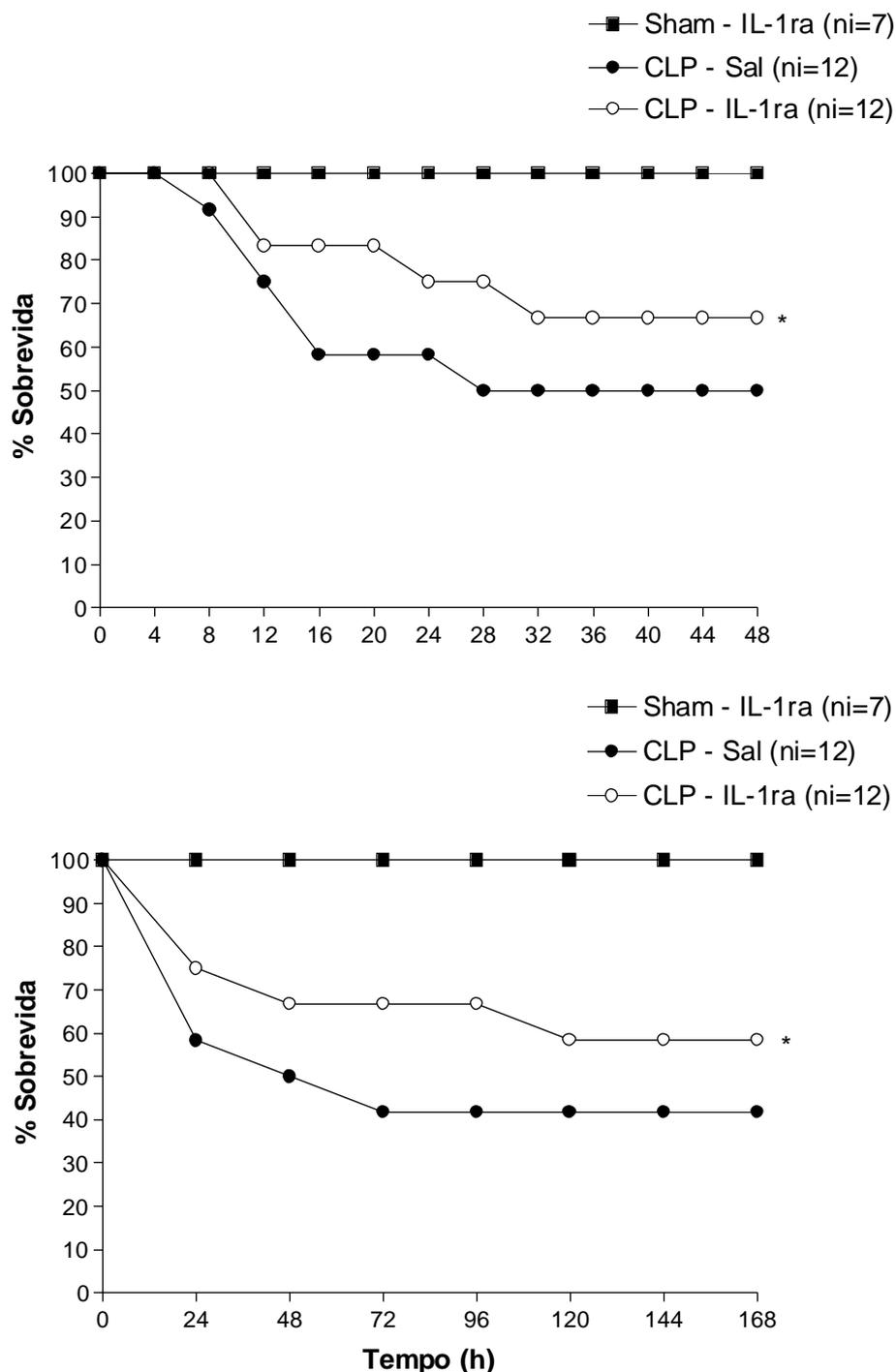


Fig 19. O tratamento com o antagonista de receptores para interleucina-1 (IL-1ra) aumenta a sobrevida dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda. As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevida para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevida dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP- sal (Mantel Cox Logrank – chi squared)

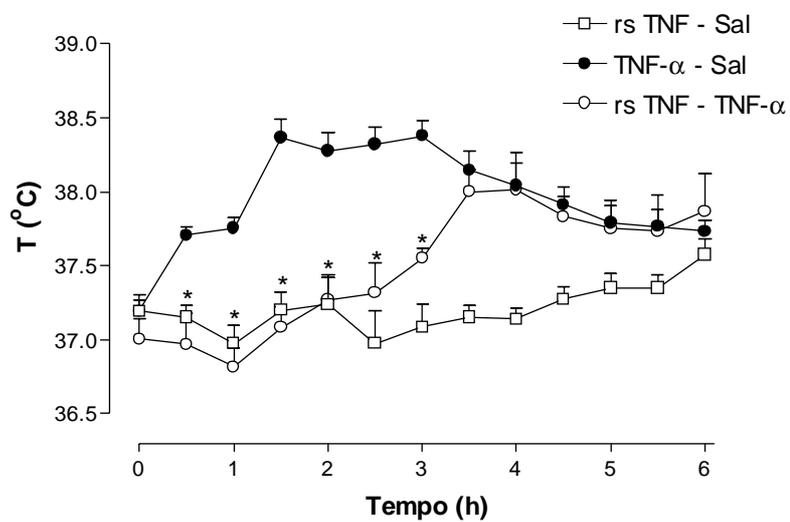
4.10- O tratamento com receptor solúvel de TNF, o rsTNF não modifica a febre e a sobrevida dos animais sépticos.

O pré-tratamento i.c.v. dos animais com 500ng (23,8 pmol) de rsTNF, 15 min antes reduziu significativamente a febre induzida por 250 ng de TNF- α (Fig.20a), entretanto esta mesma dose não alterou a resposta febril induzida pela sepse quando administrada 1h após o estímulo séptico (Fig.20b).

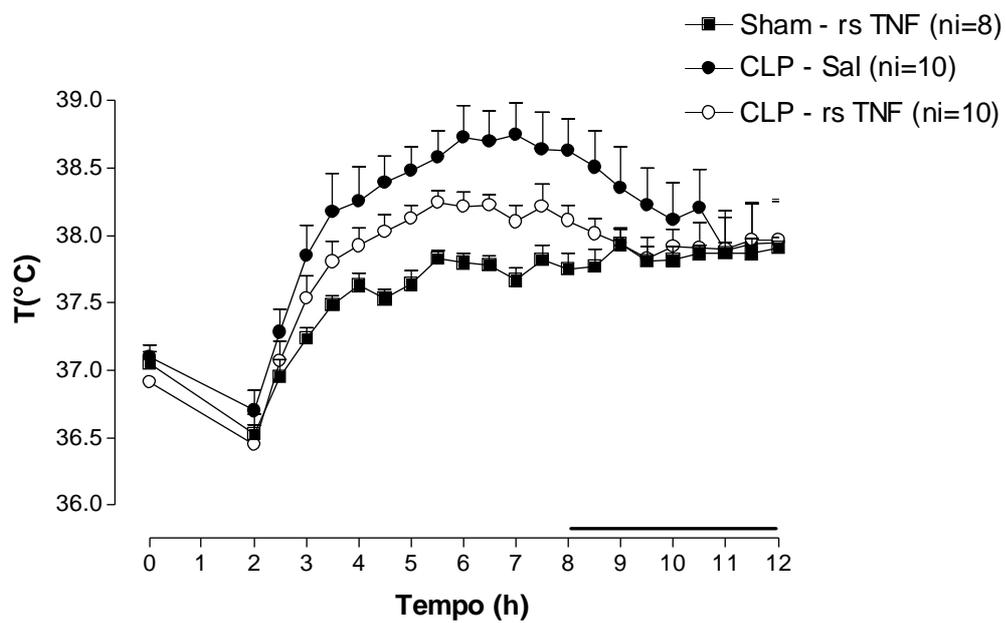
O rsTNF, na dose administrada (23,8 pmol), não promoveu elevação significativa da temperatura retal dos animais controle (Fig.20 a e b).

Com relação à sobrevida, o pós-tratamento com este receptor não alterou este parâmetro nos animais sépticos (Fig 21).

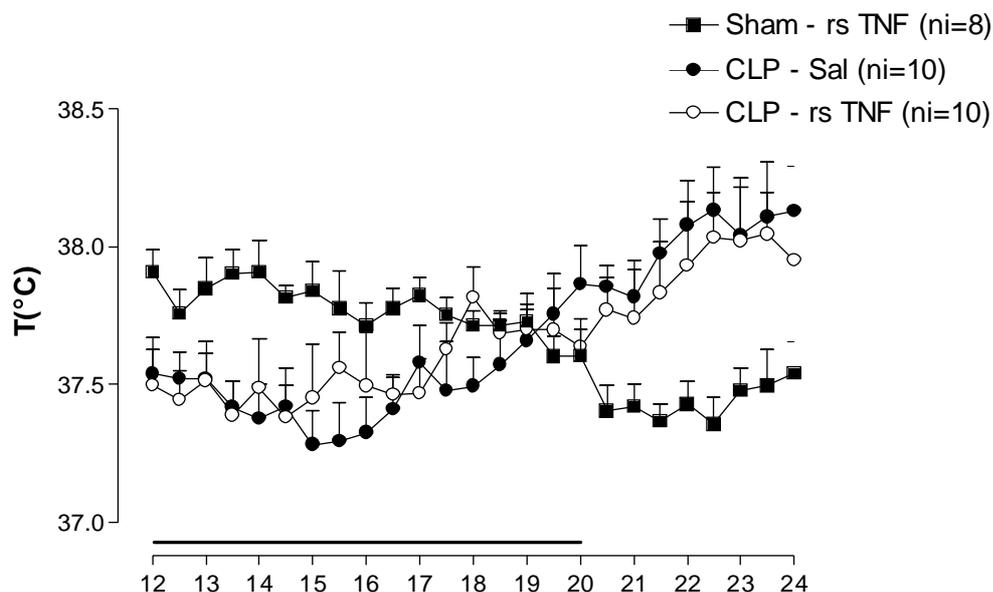
a)



b)



c)



d)

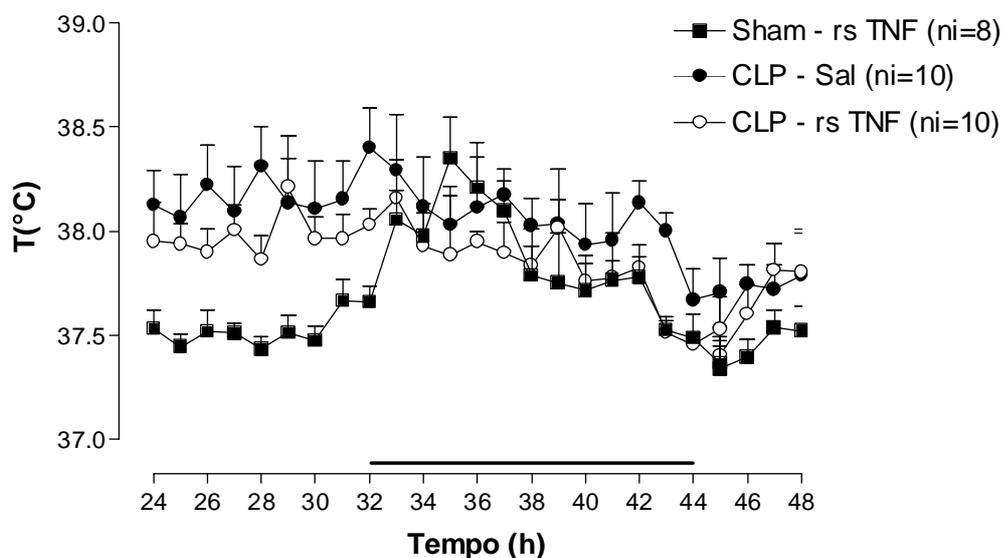


Fig 20. O tratamento com o receptor solúvel de TNF não modifica a resposta febril induzida por CLP. Ratos receberam 500 ng (3 μ l) de rsTNF i.c.v. 15 minutos antes de 250ng (3 μ l) de TNF- α i.c.v (a) ou 1h após CLP (b). O painel b representa as primeiras 12h, c o intervalo entre 12 e 24h e o d o intervalo entre 24 e 48h após a infecção. Valores representam a média \pm E.P.M. da temperatura abdominal dos ratos. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. *P<0,05 quando comparado ao grupo TNF- α -Sal

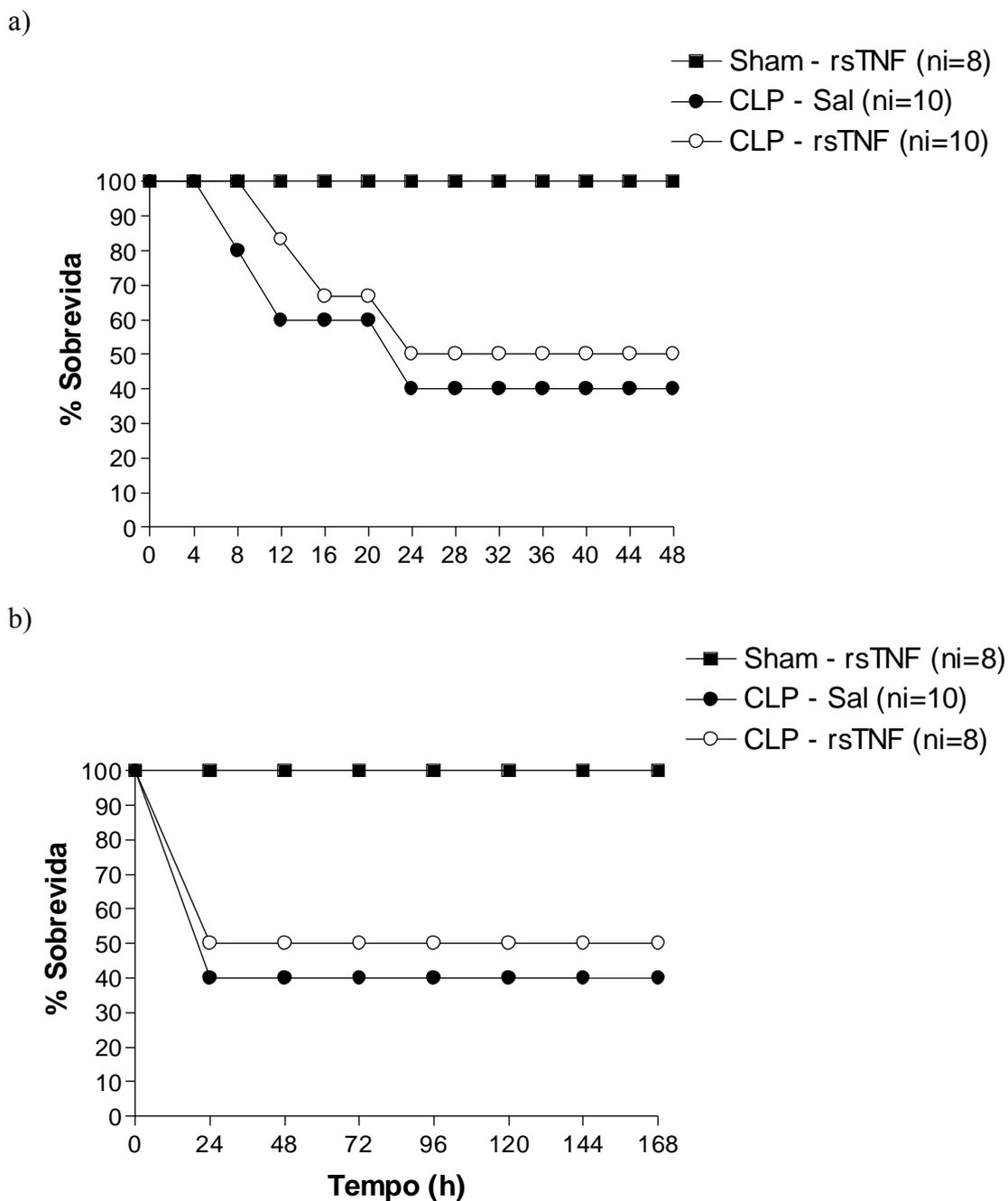


Fig 21. O tratamento com o receptor solúvel de TNF, o rsTNF, não modifica a sobrevivência dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda. As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevivência para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevivência dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.

4.11- O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-6 não altera a febre e aumenta a taxa de sobrevivência dos animais sépticos

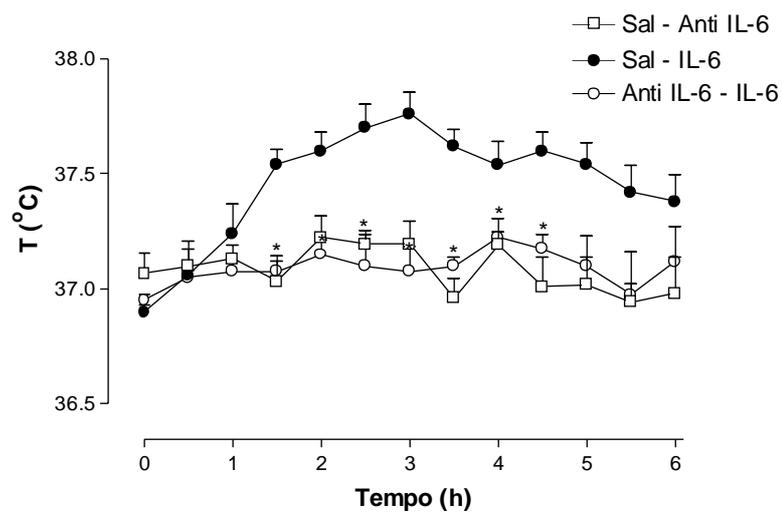
Vários trabalhos têm demonstrado a importância da IL-6 na febre induzida pelo LPS (revisado por ROTH & SOUZA 2001, ROTH, 2006).

Foi observado que o pré-tratamento i.c.v. com 5 µg/2µl de anticorpo anti-IL-6 reduziu a febre induzida pela administração i.c.v. de 300 ng/2µl de IL-6, entretanto não promoveu antipirese nos animais sépticos. (Fig 22).

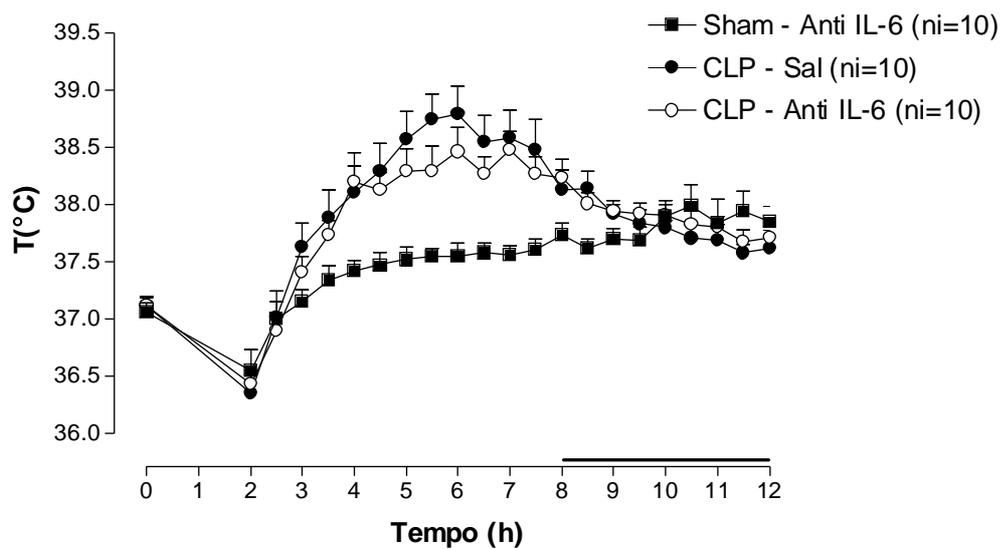
A administração de salina ou do anticorpo (i.c.v.) não alterou a temperatura basal dos animais.

Com relação à sobrevivência, o tratamento com o anticorpo promoveu um aumento significativo deste parâmetro nos animais sépticos ao final de 1 semana de 40 para 70% (Fig 23b).

a)



b)



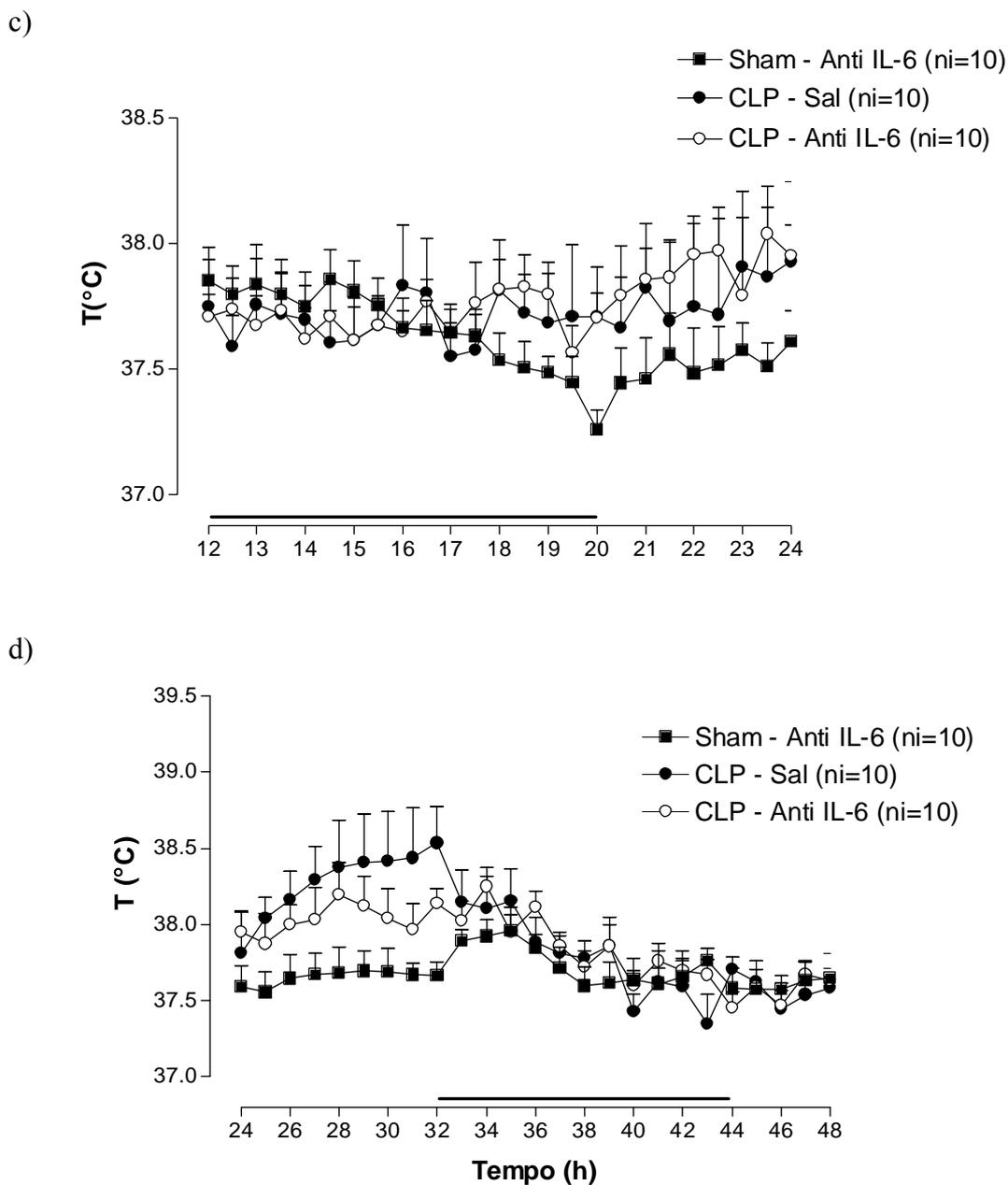
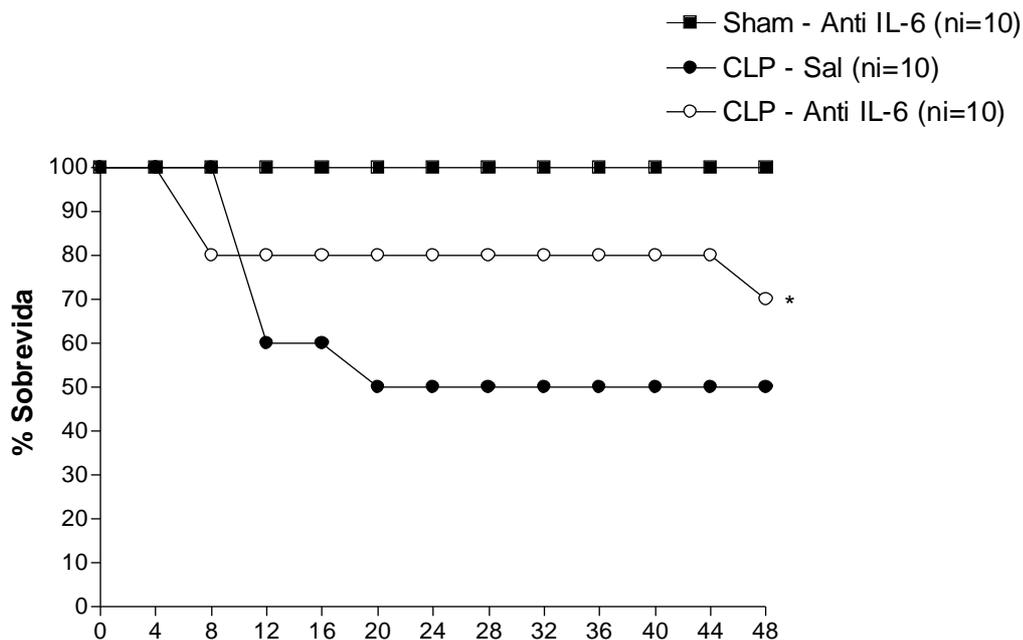


Fig 22. O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-6 não altera a resposta febril induzida pela sepse. Ratos receberam 5 μ g de anticorpo anti-IL-6 (3 μ l) i.c.v. 30 min antes da injeção i.c.v. de 300 ng/2 μ l de IL-6 (a) ou 1h após CLP (b). O painel b representa as primeiras 12h, c o intervalo entre 12 e 24h e d o intervalo entre 24 e 48h após a infecção. Valores representam a média \pm e.p.m. da temperatura abdominal dos ratos. A barra sobre o eixo x (tempo) indica o período noturno. As leituras da temperatura foram realizadas pela biotelemetria. Na legenda a sigla ni = número inicial de ratos. * $P < 0.05$ quando comparado ao Sal-IL-6

a)



b)

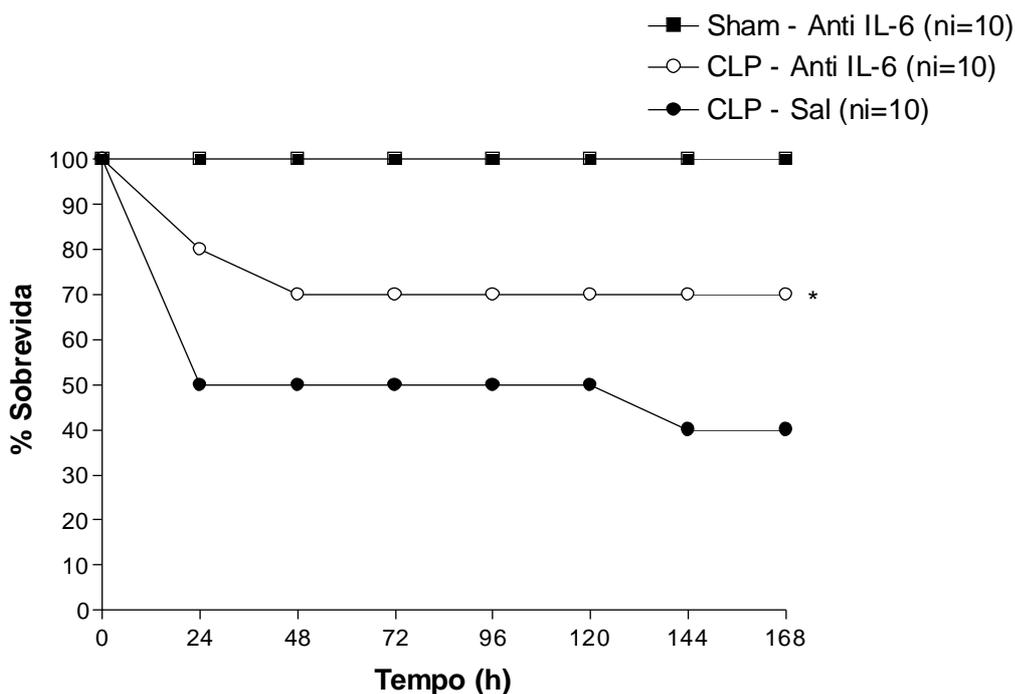


Fig 23 O tratamento com o anticorpo anti IL-6 aumenta a taxa de sobrevida dos animais desafiados com peritonite bacteriana aguda (CLP). As figuras a e b representam as porcentagens de sobrevida para cada grupo experimental. Após a infecção a sobrevida dos animais foi avaliada por 168 h (7 dias). O painel a representa as primeiras 48h e o b todo o período analisado.* $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP-anti IL-6 (Mantel Cox Logrank – chi squared)

4.12- CLP induz aumento nas concentrações de citocinas no lavado peritoneal e soro dos animais submetidos a CLP

A fim de se estabelecer a cinética de síntese de citocinas pró-inflamatórias neste estímulo, realizamos a dosagem da concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no lavado peritoneal, sangue e fluido cérebro-espinhal (CSF) dos animais sépticos. As dosagens foram realizadas 3, 6 e 24h após a CLP.

No lavado peritoneal observamos um aumento nas concentrações destas citocinas 3 e 6h após a infecção (Fig 24) enquanto no soro dos animais quantidades significantes de IL-1 β e IL-6 foram detectadas 3 e 6 horas após a infecção. No soro o aumento de TNF- α só foi estatisticamente diferente do controle 3h após a infecção (Fig 25).

Não detectamos estas citocinas no CSF dos animais controles ou infectados nos três tempos analisados (Fig 26).

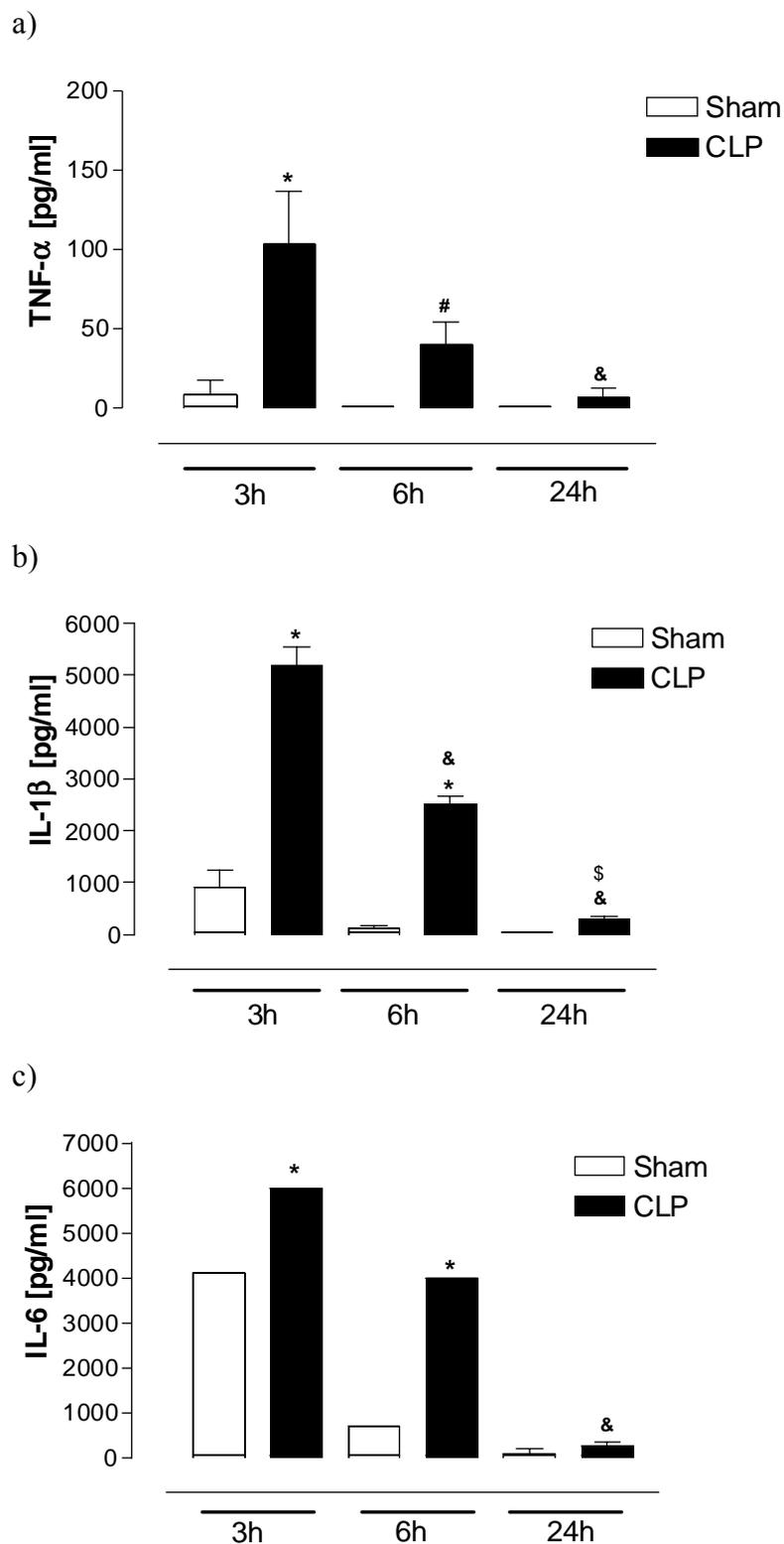
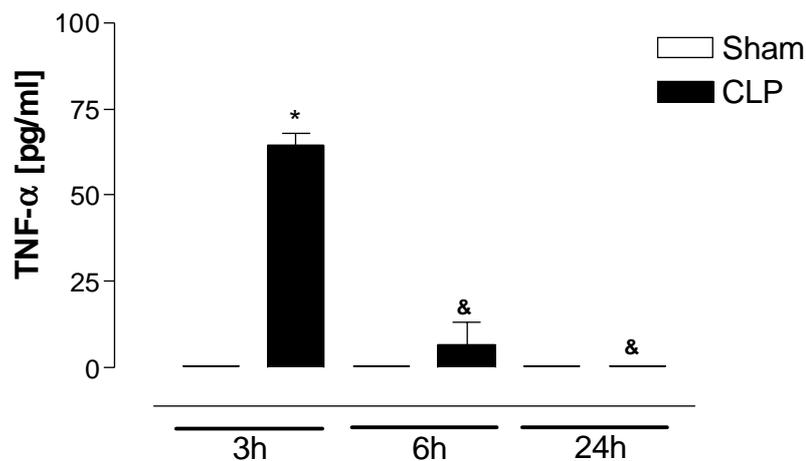
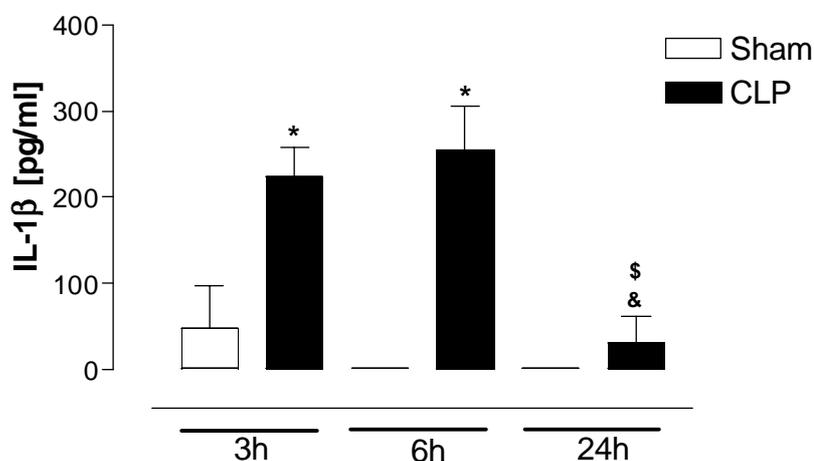


Fig 24. Aumento das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no lavado peritoneal de ratos sépticos Ratos foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia e a coleta do lavado peritoneal foi realizada em diferentes tempos. As dosagens de TNF- α (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) foram realizadas por kit comercial de ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em pg/ml encontrada em 4 ou 5 animais por grupo. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo sham # $P < 0.05$ quando comparado ao CLP 3h, & $P < 0,05$ quando comparado ao CLP 3h \$ $P < 0,05$ quando comparado ao CLP 6h. No gráfico nd = não detectável

a)



b)



c)

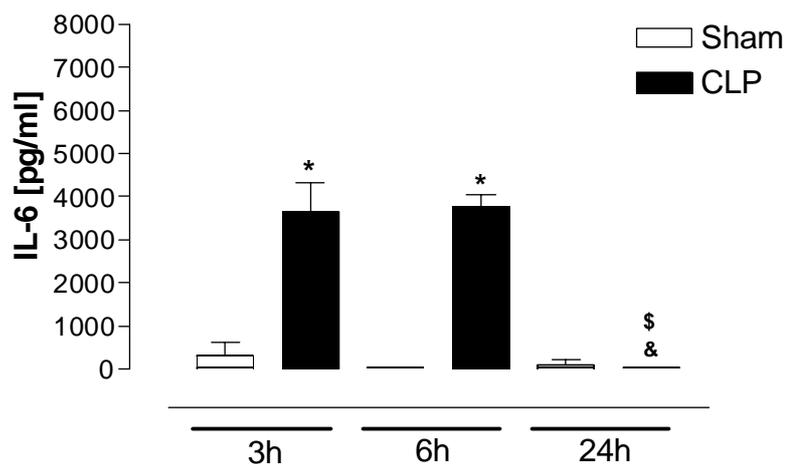


Fig 25. Aumento das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro de ratos sépticos
 Ratos foram submetidos a CLP ou a falsa cirurgia e a coleta do soro foi realizada em diferentes tempos. As dosagens de TNF- α (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) foram realizadas por kit comercial de ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em pg/ml encontrada em 4 ou 5 animais por grupo. *P<0,05 quando comparado ao sham & P<0,05 quando comparado ao CLP 3h, \$ P<0,05 quando comparado ao CLP 6h. No gráfico nd = não detectável.

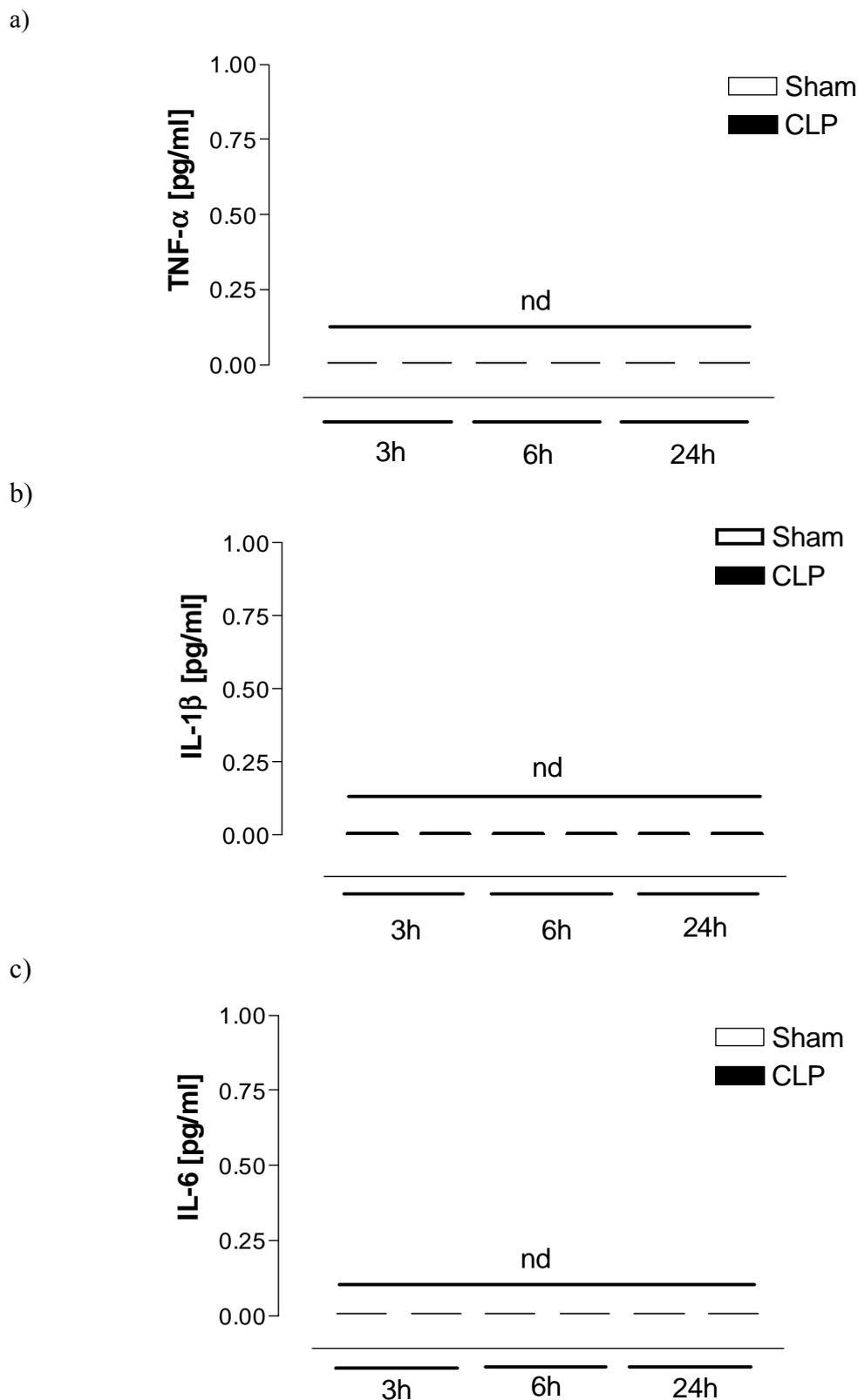


Fig 26. A sepsis por CLP não induziu aumento nas concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no CSF dos animais. Ratos foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia e a coleta do CSF foi realizada em diferentes tempos. As dosagens de TNF- α (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) foram realizadas por kit comercial de ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em pg/ml encontrada em 4 ou 5 animais por grupo. No gráfico nd = não detectável

4.13- Efeito do ibuprofeno, celecoxibe, paracetamol e da dipirona sobre as concentrações de citocinas no lavado peritoneal e soro nos animais submetidos a CLP.

Com o objetivo de analisar o efeito dos diferentes fármacos sobre a concentração das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no local da infecção e sistemicamente, realizamos a dosagem destas citocinas no lavado peritoneal e sangue (soro) dos animais sépticos 3 e 6h após o estímulo.

Os animais foram tratados uma hora após o estímulo (CLP) com 3mg/kg i.v. de ibuprofeno, 5mg/kg v.o. de celecoxibe, 300mg/kg v.o. de paracetamol ou 60mg/kg de dipirona. Também realizamos a dosagem de citocinas em animais sham tratados ou não com celecoxibe, para compararmos o efeito da droga neste grupo.

No lavado peritoneal observamos uma redução das concentrações de TNF- α nos animais tratados com ibuprofeno 3h após o estímulo. Entretanto, esta diminuição não foi mantida até a 6^a h. Uma redução neste período foi observada nos animais tratados com celecoxibe (Fig 27a). Com relação a IL-1, todas as drogas aumentaram significativamente as concentrações desta citocina 6h após o estímulo (Fig 27b). A concentração de IL-6 também foi aumentada nos dois tempos selecionados com todos os fármacos avaliados (Fig 27c).

No soro observamos uma redução das concentrações de TNF- α nos animais tratados com ibuprofeno e dipirona 3h após o estímulo. Dados da literatura indicam que esta citocina apresenta pico de concentração de aproximadamente 1,5h após a infusão de LPS. Observamos que 6h após o CLP os níveis desta citocina são baixos impossibilitando analisar o efeito das drogas neste período (Fig 28a).

Com relação a dosagem de IL-1 β , todas as drogas testadas diminuíram significativamente as concentrações desta citocina nos dois tempos analisados (Fig 28b).

O tratamento com todas as drogas estudadas diminuíram as concentrações de IL-6, 6h após o estímulo, entretanto esta redução foi maior nos animais tratados com celecoxibe e paracetamol (Fig 28c).

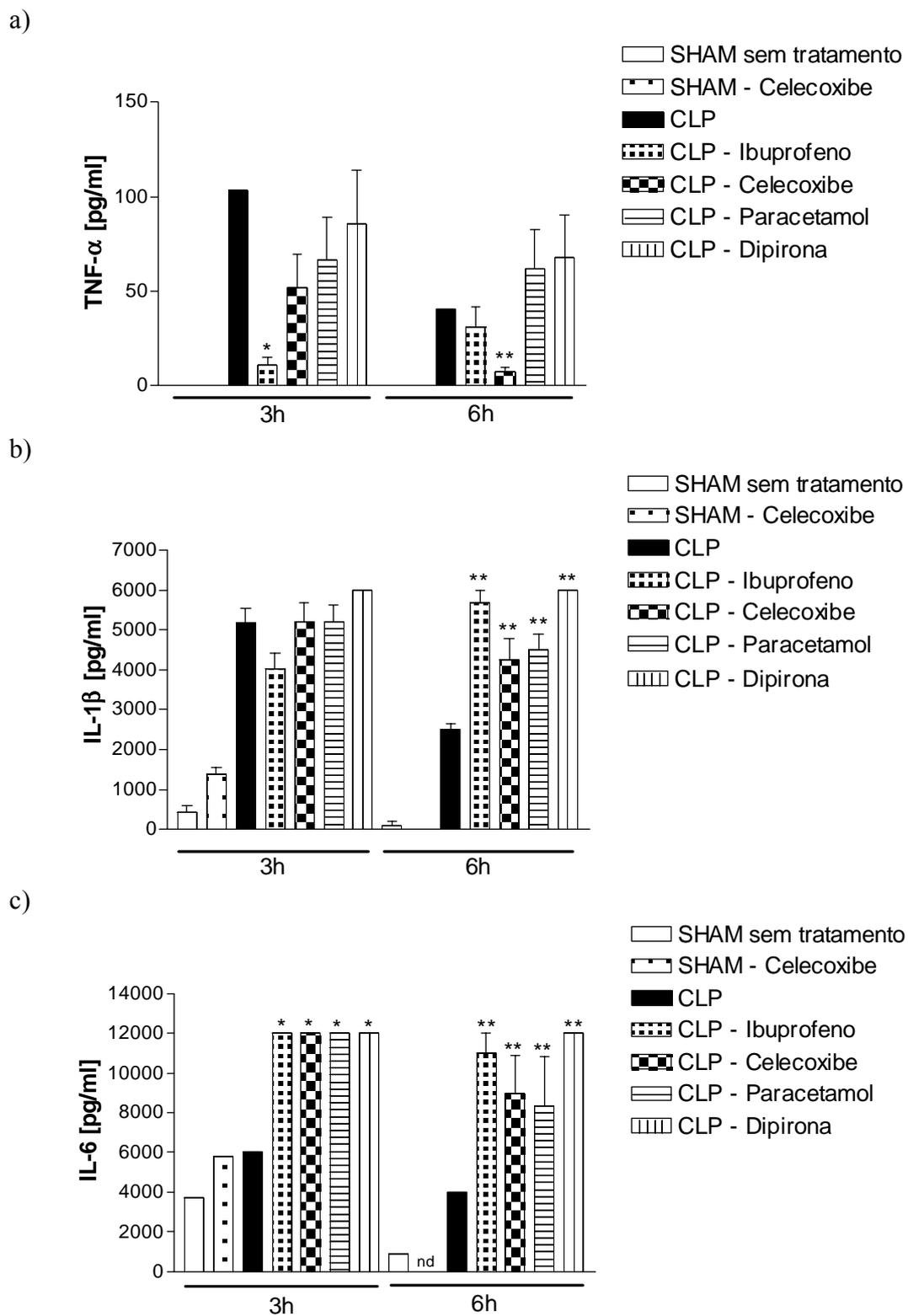


Fig 27. Efeito do tratamento com ibuprofeno, celecoxibe, paracetamol e dipirona sobre o aumento das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no lavado peritoneal de ratos sépticos Ratos foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia, tratados 1h após com diferentes fármacos e 3 e 6h após a indução do estímulo foi realizada a coleta do lavado peritoneal. A dosagem de TNF- α (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) foi realizada por kit comercial de ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em pg/ml encontrada em 4 ou 5 animais por grupo. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP 3h ** $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP 6h. No gráfico nd = não detectável

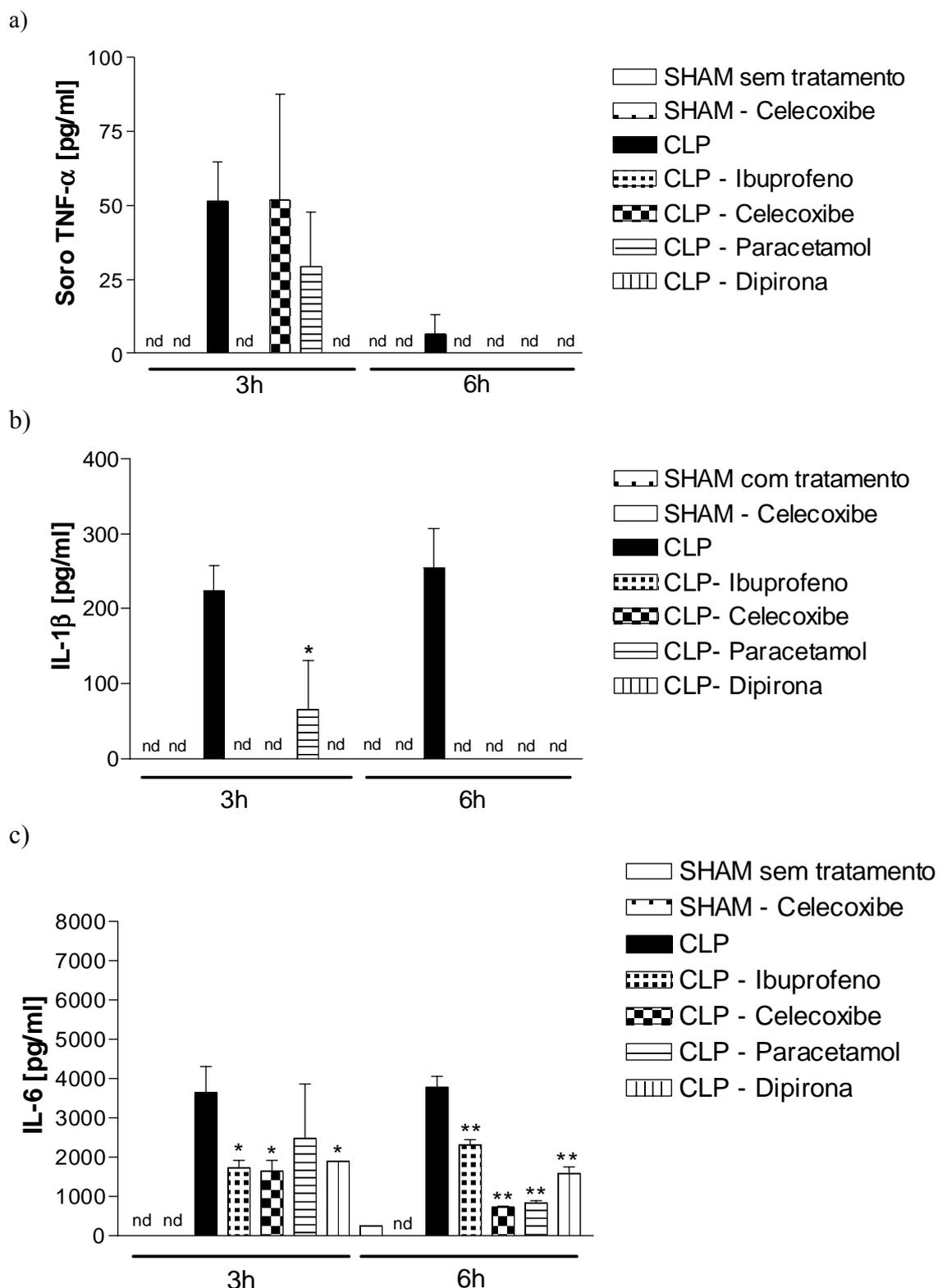


Fig 28. Redução das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro de ratos sépticos tratados com ibuprofeno, celecoxibe, paracetamol e dipirona Ratos foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia, tratados 1h após com os diferentes fármacos e 3 e 6h após a indução do estímulo a coleta do soro foi realizada. A dosagem de TNF- α (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) foi realizada por kit comercial de ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em pg/ml encontrada em 4 ou 5 animais por grupo. *P<0,05 quando comparado ao CLP 3h **P<0,05 quando comparado ao grupo CLP 6h. No gráfico nd = não detectável

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado claramente que a febre é um sintoma comum em pacientes com infecção. Entre os pacientes que apresentam síndrome da resposta inflamatória sistêmica com febre, a infecção é a causa em mais de 80% dos casos (Van DISSEL, et al., 1998). O aumento na temperatura corporal é, geralmente, o primeiro sinal de inflamação sistêmica e costuma coincidir com a liberação de produtos microbiológicos ou bactérias viáveis na circulação (COHEN, 2000).

A febre, provavelmente se desenvolveu evolutivamente há milhões de anos como uma estratégia de aumentar as respostas de defesa do hospedeiro à infecção. Alguns estudos demonstram que em temperaturas acima dos níveis normais ocorre aumento na quimiotaxia de neutrófilos, aumento da fagocitose, secreção de substâncias antibacterianas, potencialização das ações do interferon (efeito antiviral, antitumoral e antibacteriano) e proliferação de linfócitos T (revisado por KLUGER, 1991, ZEISBERGER, 1999).

No entanto, a questão sobre em que condições a febre é benéfica ou maléfica ao hospedeiro ainda permanece uma incógnita, uma vez que existem poucos estudos clínicos a respeito dos efeitos da antipirese sobre a mortalidade e morbidade durante uma infecção. Além disso, os benefícios ou prejuízos da normalização da temperatura em pacientes hipertérmicos ou hipotérmicos são somente especulativos (HARRIS et al., 1987).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar a resposta febril na sepse em ratos bem como os mediadores inflamatórios envolvidos nesta resposta. Além disso, avaliamos o papel da febre na mortalidade dos animais, utilizando para isto diferentes drogas antiinflamatórias e antipiréticas.

O CLP é amplamente aceito por muitos investigadores como um modelo de sepse, infecção aguda e peritonite bacteriana (FINK et al., 1990; VILLA et al., 1995).

Este estímulo simula uma infecção real muito melhor que a infusão de quantidades constantes de LPS (endotoxemia simulada). Com o objetivo de padronizar este modelo de sepse em nosso laboratório para estudar a relação entre a resposta febril e a sobrevivência dos animais, realizamos experimentos no qual variamos o tamanho das agulhas (24, 20, 18 e 16G) e o número de furos (de 1 a 10 furos) conforme descrito nos resultados (Fig 1).

Inicialmente, observamos que com a CLP induzida com as agulhas de menor calibre (24 e 20G) os animais apresentaram discreto aumento na temperatura corporal e 100% de sobrevivência. O próximo passo foi utilizar uma agulha de maior calibre (18G) na tentativa de mimetizar um trabalho de Gourine et al., (1998) em que os autores observaram aumento na temperatura corporal dos animais neste modelo de sepse. Com este tamanho de agulha os animais apresentaram pequeno aumento na temperatura e 80% de sobrevivência (dados não mostrados).

Além de padronizar o modelo de febre induzido por CLP, como o nosso objetivo também era o de estudar o efeito de drogas antipiréticas sobre a febre e a sobrevivência após este estímulo, precisávamos também padronizar esta infecção de tal forma que pudessemos observar uma diminuição da sobrevivência dos animais e aumento significativo na temperatura corporal, fato este não observado com as agulhas de menor calibre. Na sequência, utilizando agulhas 16G com diferentes números de furos (1, 2, 4 e 10) observamos uma curva de aumento de temperatura que foi dependente do número de furos. O aumento de temperatura foi mais evidente nas primeiras 10 horas após a CLP (Fig 1).

Como a infecção promovida pela agulha 16G (4 furos) apresentou aumento significativo da temperatura e uma sobrevivência em torno de 50% (Fig 2b), o que nos proporcionaria visualizar o efeito de drogas antipiréticas sobre este parâmetro, este

tamanho de agulha e número de furos foram selecionados para os experimentos subsequentes. Resumidamente, no presente trabalho, observamos que o aumento na temperatura e a diminuição nas curvas de sobrevivência foram proporcionais ao tamanho das agulhas e ao número de furos.

Nosso próximo passo, então, foi relacionar o aumento de temperatura corporal com a quantidade de bactérias presentes no lavado peritoneal e sangue dos animais sépticos. A determinação dos tempos de coleta foi baseada no aumento de temperatura corporal induzido por este estímulo.

Neste experimento observamos aumento da temperatura corporal que foi significativo na 6^a h ($39,3 \pm 0,330$). Com relação ao número de bactérias no lavado, observamos aumento significativo na 6^a e 12^a h quando comparado ao controle sham (falso operado). Aumento significativo nos mesmos horários também foi observado no sangue (Fig 3 a,b,c). Desta forma, parece que o aumento da temperatura acompanha a presença de bactérias viáveis no foco infeccioso e sangue.

Após 48h, observamos diminuição da temperatura corporal e do número de bactérias no foco infeccioso e sangue o que indica que após este tempo, os animais que sobrevivem conseguem controlar a infecção.

Vale ressaltar que 12h após a infecção (correspondente ao período noturno), apesar de os animais apresentarem bactérias no foco infeccioso e sangue, a temperatura não foi diferente dos animais controles.

Sabe-se que animais de hábitos noturnos como os ratos, exibem variação circadiana na temperatura corporal caracterizado pela elevação da temperatura durante o período noturno (BRIESE, 1986, GORDON, 1993). Isto se relaciona com aumento na função autonômica, resultando em alteração nas respostas fisiológicas e comportamentais destes animais no período da noite. Deste modo, é difícil avaliar

diferenças nas temperaturas destes animais neste período, uma vez que neste caso, principalmente os animais sham estão sob esta influência.

Ainda que os mecanismos de transdução de sinal das citocinas no cérebro para o desenvolvimento de resposta febril não sejam completamente entendidos, alguns dos mediadores das ações cerebrais das citocinas têm sido descrito, entre eles as PGs.

Estudos efetuados por Feldberg e Saxena (1971) e Stitt (1973) mostraram que microinjeções de PGs na APO/HA induzem febre, em ratos e coelhos, enquanto microinjeções em outras áreas do cérebro falham em induzir esta resposta. Atualmente, a PGE₂ é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril, embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a PGF_{2 α} , também possam induzir febre em animais experimentais (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990; COELHO et al., 1993; SOUZA et al., 2002).

Visando investigar a cinética da síntese das PGs durante o aumento de temperatura induzido pela CLP, amostras de CSF foram coletadas 3, 6, 12, 24 e 48h após o estímulo. Observamos aumento significativo deste eicosanóide no CSF dos animais a partir da 6^a h coincidindo com o pico da resposta febril. Entretanto, este aumento permaneceu até a 48^a h quando a resposta febril já havia se extinguido. Assim, podemos sugerir que a exemplo do que ocorre com outros agentes pirogênicos nem sempre existe uma correlação positiva entre resposta febril e aumento da concentração de PGE₂ no CSF (MALVAR, 2008).

Entre os vários mecanismos da imunidade inata do hospedeiro, as citocinas apresentam papel muito importante no processo infeccioso. Citocinas aumentam a atividade microbicida das células fagocitárias, contribuem para o recrutamento de leucócitos no sítio de infecção, aumentam a hematopoiese além de induzirem febre (CAVAILLON et al., 2003).

Diversos compostos bacterianos ativam a produção e a liberação de citocinas pelos leucócitos. Devido a sua exacerbada produção, citocinas proinflamatórias podem ser detectadas em muitos fluidos biológicos, particularmente na corrente sanguínea (CAVAILLON et al., 2003).

Desta forma, amostras de lavado peritoneal, sangue e CSF foram coletados 3, 6 e 24h após a CLP ou a falsa cirurgia (sham) com o objetivo de observar a cinética de liberação destes mediadores neste estímulo.

Observamos aumento na concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no lavado peritoneal dos animais 3 e 6h após a indução da sepse, entretanto, este aumento não foi significativo somente na 6^h da dosagem para TNF- α (Fig 24). Aumentos semelhantes foram observados no soro destes animais (Fig 25) enquanto no CSF a concentração destas citocinas ficou abaixo do limite de detecção (Fig 26).

Segundo dados da literatura, há uma pobre correlação entre as concentrações cerebrais e circulantes de IL-1 e a febre (COCEANI et al., 1988, KLIR et al., 1993, KLUGER 1991).

Entre todas as citocinas implicadas na febre, somente a IL-6 é consistentemente aumentada no plasma e freqüentemente elevada no cérebro na maioria das condições as quais são acompanhadas pela resposta febril. No homem e em animais experimentais, uma excelente correlação tem sido repetidamente observada entre a concentração plasmática de IL-6 e a magnitude da febre (NIJSTEN et al., 1987; LEMAY et al., 1990, ROTH et al., 1993, 1994).

Entretanto, dados de Gourine et al (1998), demonstram que na febre induzida por CLP, diferentemente do que ocorre com a endotoxina, esta não é acompanhada por uma elevação na concentração de IL-6 hipotalâmica.

Da mesma forma, também não há relação entre as concentrações cerebrais e circulantes de TNF- α e a febre (ROTH et al., 2004).

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito de drogas antiinflamatórias não esteroidais (ibuprofeno, indometacina e celecoxibe) e de drogas antipiréticas com baixa atividade antiinflamatória como é o caso do paracetamol e da dipirona sobre a febre e sobrevida, bem como a relação de seus efeitos sobre as concentrações de prostaglandinas e citocinas após a indução do CLP.

Em nossos experimentos, o foco infeccioso se encontra na cavidade peritoneal, dessa forma, todas as drogas foram administradas por outras vias que não a intraperitoneal, para não prejudicar a absorção do fármaco. As doses e vias dos fármacos utilizados foram baseadas em estudos anteriores de nosso laboratório ou da literatura.

Vale lembrar que todos os animais sham foram tratados com cada droga analisada. Uma vez que os resultados obtidos na padronização eram com animais sham sem tratamento, fizemos um experimento piloto para analisar se havia diferença na temperatura desses animais tratados e não tratados. No mesmo experimento analisamos o efeito da cirurgia e da anestesia nestes animais. Observamos que não houve diferença na temperatura dos animais sham tratados e não tratados, entretanto observamos que a dificuldade em aumentar a temperatura nas primeiras horas da primeira noite destes animais estava relacionada com a cirurgia e não com a anestesia (dados não mostrados).

Utilizamos como primeira ferramenta farmacológica o ibuprofeno (inibidor não-seletivo COX-1/COX-2).

Observamos que este fármaco nas doses de 1, 3, 10 mg/kg i.v. administrado 1h após a CLP não reduziu o aumento na temperatura corporal dos animais em nenhuma das doses utilizadas (Fig 4a) e embora, nas 3 doses, tenha promovido uma tendência a

piorar a sobrevida dos animais (33,4%, 11,2%, 33,4%, respectivamente, Fig 5b), este parâmetro não foi estatisticamente diferente do controle positivo (44.5%) ao final de 1 semana.

Bernard et al., (1997) publicaram os dados de um estudo clínico, randomizado, duplo-cego, sobre pacientes com sepse grave que utilizavam uma infusão contínua de ibuprofeno. Estes autores observaram neste estudo que os efeitos mais pronunciados do ibuprofeno foram a diminuição do consumo de oxigênio e do lactato sérico. A taxa de mortalidade e a prevalência de disfunção orgânica não foram alteradas por esta terapia. Estes resultados apontam para uma inefetividade deste antiinflamatório na diminuição da letalidade desta síndrome.

Segundo dados da literatura, o ibuprofeno é capaz de aumentar as concentrações de TNF- α (SIRONI et al., 1992; ENDRES et al., 1996; MANSILLA-ROSELLO et al., 1997), por bloquear um importante mecanismo de feedback negativo sustentado pela PG (MATUSCHAK et al., 1993; SIRONI et al., 1992) e que desta maneira poderia contribuir para a progressão da sepse.

Elevadas concentrações de TNF- α e IL-6 têm sido comumente detectadas no sangue de pacientes que desenvolvem choque séptico (MOVAT et al., 1987; WAAGE et al., 1989) e estes índices predizem mortalidade (HACK et al., 1989; WAAGE et al., 1987). Adicionalmente, outros estudos demonstraram que camundongos knockout para receptores de TNF apresentaram um aumento da sobrevida quando comparados ao grupo controle, demonstrando a importância desta citocina para a letalidade nestes animais (LEON et al., 1998), entretanto, em nosso estudo não observamos um aumento das concentrações desta citocina 3 e 6 h após o estímulo nos animais tratados com 3mg/kg de ibuprofeno, descartando a hipótese que tendência a piora na sobrevida (mortalidade) desses animais seja pelo aumento das concentrações desta citocina.

O segundo fármaco testado foi a indometacina, outro inibidor não seletivo das enzimas COXs.

Este fármaco nas doses de 1 e 2,5mg/kg v.o., não modificou a resposta febril induzida pela sepse e também não alterou significativamente a sobrevida dos animais.

Além de inibirem a formação das prostaglandinas envolvidas na resposta febril (PGE₂ e PGF₂α) os inibidores da COXs como ibuprofeno e indometacina previnem a formação de prostaciclina e tromboxano, que são prostanóides que exercem efeitos vasoativos e hemostáticos opostos. A prostaciclina é um potente vasodilatador e desagregante plaquetário enquanto que o tromboxano é um vasoconstritor e um poderoso indutor da agregação plaquetária (Schirmer et al., 1987).

Schirmer et al., 1987 estudaram o efeito do ibuprofeno, indometacina e imidazol (inibidor seletivo da enzima tromboxano sintetase) sobre a taxa de sobrevida em animais sépticos. Embora a indometacina tenha apresentado uma melhora na sobrevida nas primeiras horas, este efeito não foi observado ao final de 5 dias. Neste estudo o ibuprofeno piorou a sobrevida enquanto que o imidazol, um bloqueador da sintetase de TXA₂, melhorou. Wise et al., 1980, mostraram que a inibição da tromboxano sintetase aumentou o fluxo sanguíneo esplâncnico e preveniu o infarto esplâncnico induzido pela endotoxina em ratos. Nestes animais a produção de tromboxano estava inibida e a quantidade de prostaciclina era maior que em ratos não tratados, sugerindo um desvio da produção de TXA₂ para este último mediador.

Em adição, vários estudos têm demonstrado que certas drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES) como o salicilato de sódio, sulindaco, ibuprofeno, causam efeito antiinflamatório e antiproliferativo independente da atividade da ciclooxigenase e inibição da síntese de PGs. Estes efeitos são mediados através da inibição de certos fatores de transcrição como NF-κB e AP-1. Os respectivos AINES podem interferir

diretamente com os fatores de transcrição, mas seus efeitos são provavelmente mediados predominantemente através de alterações da atividade de quinases celulares como IKKB, Erk, p38, MAPK. Estes efeitos não são mostrados aparentemente por todos NSAIDS, desde que a indometacina falhou para inibir ativação de NF- κ B e AP-1. Em contraste, a indometacina foi capaz de ativar PPAR γ , o qual não foi afetado pelo salicilato de sódio ou aspirina (TEGEDER et al, 2001).

Em seguida, utilizamos também um inibidor seletivo da COX-2, o celecoxibe, uma vez que esta isoforma tem sido apontada como a enzima responsável pela biossíntese de prostanóides durante os processos de inflamação e febre (ARIAS-NEGRETE et al., 1995; CAO et al., 1995; BAKHLE & BOTTING, 1996; CAO et al., 1996, FABRICIO et al., 2005).

O celecoxibe foi administrado nas doses de 1; 2,5 e 5mg/kg v.o. 1h após a CLP. As doses de 2,5 e 5 mg/kg reduziram as concentrações de PGE₂ no CSF destes animais 6h após o estímulo (Fig 15), entretanto, somente a dose de 5mg/kg foi capaz de promover antipirese entre a 5,5^a e 9^a h após a infecção (Fig 8a). Efeito semelhante foi observado anteriormente por Fabricio et al., (2005) sobre a resposta febril induzida pela endotelina-1.

Nos animais tratados com as três diferentes doses de celecoxibe, a sobrevida foi 50%, 62.5% e 50%, respectivamente, enquanto os animais não tratados (controle positivo) apresentaram sobrevida de 37.5% - Fig 9b. Embora o celecoxibe tenha aumentado a sobrevida, estes índices não foram estatisticamente diferentes dos animais controle ao final de uma semana.

Foi demonstrado que o celecoxibe possui um mecanismo de ação adicional para sua ação antiinflamatória. Este fármaco inibe a transmigração dos fatores de transcrição NF- κ B e NF-AT em linfócitos T, inibindo eficientemente a produção de IL-2, TNF- α e

IFN- γ (IÑIGUEZ et al., 1999). Embora necessite melhor investigação, não pode ser descartada a hipótese de que a ação antipirética do celecoxibe possa estar relacionada à inibição da transcrição de outra(s) citocinas. Desta maneira podemos aventar a hipótese que a melhora na sobrevivência também se deva à inibição da transcrição/síntese de citocinas. Entretanto observamos que o tratamento com celecoxibe (5mg/kg, v.o.) aumentou a concentração de IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso e diminuiu no soro, resposta esta que é benéfica ao animal uma vez que a presença destas citocinas no foco infeccioso aumenta a resposta imune do hospedeiro contra microorganismos (TORRES-DUEÑAS et al., 2006). Corroborando os achados de Iñigues et al., (1999) observamos uma diminuição da concentração do TNF- α no soro e lavado dos animais tratados com este fármaco.

O próximo passo foi analisar o efeito da dipirona, um derivado pirazolônico amplamente utilizado em vários países devido a sua eficácia como antipirético e antiálgico. No entanto, esta droga é praticamente desprovida de efeito antiinflamatório (LORENZETTI & FERREIRA, 1985; ABRAMSON & WEISSMANN, 1989; LÜTHY et al., 1983; ELDOR et al., 1984) e é um fraco inibidor, reversível e competitivo, da ciclooxigenases (LÜTHY et al., 1983; ELDOR et al., 1984). Entretanto, recentemente estudos *ex vivo* e *in vitro* demonstraram que a dipirona, em doses altas, inibe tanto a enzima COX-1 quanto a COX-2 (BRUNE et al., 2007) por ação de dois dos seus metabólitos ativos (PIERRE et al., 2007).

A dipirona nas doses de 60, 120 e 240 mg/kg i.v. administrada 1h após a CLP retardou o aumento de temperatura induzido pela CLP, sendo a maior antipirese observada com a dose de 240 mg/kg (entre 3^a-7^ah) – Fig 10. A dose de 60mg/kg não reduziu as concentrações de PGE₂ no CSF dos animais, entretanto vale ressaltar que os animais tratados com esta dose neste horário não apresentavam antipirese.

Embora o tratamento dos animais com esta dose de dipirona tenha promovido uma sobrevida de 60%, esta não foi estatisticamente diferente dos animais do grupo controle (não tratados), cuja sobrevida foi de 40%, Fig 11b.

Nesta mesma dose (60mg/kg) a dipirona, aumentou os níveis de IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso e as diminuiu no soro, resposta semelhante a observada nos animais tratados com celecoxibe.

Em estudo realizado por nosso grupo (SOUZA et al. 2002) demonstrou-se que esta droga não inibe *in vitro* a atividade da COX-1 ou da COX-2 em células COS-7 transfectadas com estas isoformas, porém, reduz a resposta febril induzida pela injeção central de PGF_{2 α} . Ainda, neste estudo, foi verificado que, enquanto a indometacina inibe a febre induzida por ácido araquidônico (AA), substrato da COX-1 constitutiva, assim como aquela decorrente da indução de COX-2 (injeção central de AA em animais pré-tratados com IL-1 β , administrados em doses que não induziram febre quando administradas separadamente), a dipirona não altera estas respostas. Em conjunto estes resultados permitem sugerir que o efeito antipirético da dipirona não esteja relacionado à inibição da COX-1 ou COX-2. Além disso, estes autores verificaram que o antagonista de receptores V₁ da AVP, ao contrário do que foi verificado para a indometacina, não reverte a antipirese da dipirona, o que sugere que o mecanismo de ação desta droga não esteja relacionado ao aumento da produção de AVP. Como foi também demonstrado que a dipirona inibe a febre induzida por mediadores pirogênicos (IL-1 β , IL-6, IL-8) que promovem resposta dependente da ação do CRF e também a liberação deste fator de explantes hipotalâmicos, tem sido proposto que um dos mecanismos antipiréticos exercidos pela dipirona possa estar relacionado à inibição da síntese e/ou liberação do CRF (SOUZA et al., 2002).

Estudos posteriores em nosso laboratório também demonstraram que a dipirona inibe a febre induzida pela quimiocina MIP-1 α , pirogênio este que independe da síntese de prostaglandinas, mas parece depender da síntese de CRF (MELO SOARES, 2008). Em outro estudo do mesmo grupo, a dipirona reduziu a febre induzida pela endotelina (FABRICIO et al., 2002; MALVAR, 2008), um outro mediador da resposta febril que também é independente da inibição das COXs, e que participa da febre induzida pelo CRF.

Além disso, tem sido observado que a dipirona bloqueia a hipernocicepção induzida pelo glutamato em camundongos (BEIRITH et al., 1998). Vários trabalhos têm evidenciado a participação deste neurotransmissor tanto na via de sinalização (KAO et al., 2007; HUANG et al., 2004; HUANG et al., 2006), quanto na via efetora da febre (NAKAMURA et al., 2004; MADDEN & MORRISON, 2004 e 2003; CAO & MORRISON, 2006) e nas vias envolvidas na termorregulação (NAKAMURA & MORRISON, 2008a e 2008b). Assim, é possível que a dipirona também possa reduzir a febre pelo bloqueio do glutamato, como ocorre na hiperalgesia.

Desta forma, o mecanismo antipirético da dipirona pode envolver vários mecanismos aqui mencionados, se existe algum mais preponderante permanece a ser elucidado.

Posteriormente investigamos o efeito do paracetamol (antipirético com fraca atividade antiinflamatória) sobre a febre/sobrevida dos animais sépticos. Esta droga foi administrada nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg v.o. Observamos uma redução significativa da temperatura (Fig12a) e das concentrações de PGE₂ nos animais tratados com a dose de 300mg/kg. Analisando a sobrevida, o tratamento com 150 e 300mg/kg de paracetamol aumentou significativamente este parâmetro ao final de uma semana (Fig 13b).

Nossos resultados demonstraram que o efeito antipirético do paracetamol em altas doses, depende da inibição da síntese de PGs. Entretanto, o mecanismo pelo qual o paracetamol aumenta a sobrevida merece ser investigado.

Em dois estudos retrospectivos, a administração de paracetamol aumentou a sobrevida em pacientes com bacteremia por *E.coli* (KUIKKA et al 1997) e sepse por *Pseudomonas aeruginosa* (KUIKKA et al, 1998), entretanto, nestes estudos o uso do paracetamol e o aumento na sobrevida também não foram relacionados com a redução da temperatura dos pacientes.

Embora os dados existentes acerca do mecanismo de ação do paracetamol sejam pouco conclusivos, há evidências de que esta droga exerça seus efeitos por inibir a síntese de PGs, possivelmente via COX-2 (KIS et al., 2005; LEE et al., 2007). Entretanto, outros estudos questionam o efeito sobre a atividade desta enzima, e sugerem que o mecanismo de ação desta droga envolva fatores de transcrição, em particular o NF-kB. Mancini et al (2003) demonstraram que concentrações terapêuticas de paracetamol induzem uma inibição da translocação do fator nuclear-kB dependente de IL-1 em astrócitos humanos.

Recentemente dois grupos independentes de pesquisadores (ZYGUMUNT et al., 2000 e BERTOLINI et al., 2006) demonstraram que o efeito analgésico do paracetamol está envolvido com a ativação do sistema de canabinóides, abrindo desta forma o leque de possibilidades para o estudo do possível mecanismo de ação desta droga (Bertolini et al, 2006).

Como dito anteriormente, estudos têm mostrado que a severidade da sepse está correlacionada com a liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (WALLEY et al., 1996, EBONG et al, 1999).

Sabe-se que a presença de citocinas pró-inflamatórias no foco infeccioso induz migração de neutrófilo, entretanto sua presença em altas concentrações na circulação inibe o processo de migração dos leucócitos para este local (TORRES-DUEÑAS et al., 2006). Apoiando estes dados, altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias foram observadas em modelos de sepse severa na qual a falência de migração de neutrófilo é observada (BENJAMIN et al., 2002, TORRES DUENÃS et al, 2006) e também em pacientes com sepse severa (TAVARES-MURTA et al., 2002) , podendo desta forma explicar pelo menos em parte este efeito.

Alves-Filho et al, 2006, demonstraram que esta falência de migração de neutrófilos parece ser dependente de receptores toll-like 4 (TLR4- receptores estes que são componentes chaves do sistema imune inato e funcionam como a primeira linha de defesa contra patógenos invasores em mamíferos, plantas e insetos) e mediada por citocinas e quimiciocinas, as quais induzem a produção de óxido nítrico (molécula que participa da vasomotricidade, neurotransmissão, inflamação, imunidade etc) que inibe a adesão do neutrófilo no endotélio venular e também a habilidade quimiotática do neutrófilo.

O tratamento dos animais com 300mg/kg de paracetamol também aumentou as concentrações de IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso e diminuiu no soro, resposta esta que é benéfica ao animal (TORRES-DUEÑAS et al., 2006) e que pode justificar o aumento de sobrevivência dos animais tratados com esta dose de paracetamol.

Contudo, a correlação mais consistente da severidade clínica em doenças inflamatórias, autoimunes ou infecciosas com os níveis plasmáticos de citocinas, são claramente aqueles com IL-6. Como descrito anteriormente, o aumento da concentração de IL-6 plasmática tem sido correlacionado com a severidade da sepse (DAMMAS et al, 1992; CASEY et al,1993; FISHER et al., 1993) e complicações clínicas (BAIGRIE

et al., 1992). Em adição, altas concentrações plasmáticas de IL-6 nas fases iniciais da sepse em modelos experimentais predizem mortalidade precoce (TURNBULL et al., 2004; VIANNA et al., 2004) enquanto em fases mais tardias este parâmetro não é preditivo de morte e os níveis destas citocinas não são tão elevados (XIAO et al., 2006).

Nossos resultados demonstram que o celecoxibe também reduziu a concentração sérica de IL-6 e não alterou a sobrevida, aventando a possibilidade de que outro mecanismo, que não o da redução de IL-6 sérica esteja envolvido no aumento da sobrevida induzido pelo paracetamol.

Em vista deste conjunto de resultados investigamos o envolvimento central da IL-1, IL-6 e TNF- α através do tratamento dos animais com IL-1ra, rsTNF e anticorpo anti IL-6.

Embora a dose utilizada de IL-1ra (200ug i.c.v.) não tenha modificado a febre induzida pela CLP (Fig 18), esta promoveu um aumento significativo (41.7 para 58.3% em uma semana) da sobrevida dos animais sépticos (Fig 19) demonstrando que a IL-1 formada centralmente participa de alguma maneira dos mecanismos que levam os animais a morte. Nossos resultados contrapõem-se aos de Gourine et al, (1998), pois estes investigadores demonstraram que o CLP induz febre dependente de IL-1 β hipotalâmica, uma vez que a microinjeção de anti-IL-1 beta no hipotálamo imediatamente após a cirurgia promoveu uma significativa diminuição na temperatura corporal durante a noite após a cirurgia e uma redução de 48% na febre no dia seguinte. Contudo estes autores não investigaram a sobrevida dos animais.

Alexander et al 1992, observaram uma melhora na sobrevida de animais tratados com IL-1ra por via intravenosa. Neste trabalho os autores sugerem que a melhora nos efeitos hemodinâmicos e hipotérmicos induzidos pela CLP possam explicar o aumento da sobrevida destes animais. Além disso, estes autores aventam a hipótese que a IL-1ra

tenha uma atividade bacteriostática direta por bloquear o crescimento bacteriano induzido pela IL-1, resultando em uma menor proliferação bacteriana no fígado.

Ainda, nossos resultados demonstram que a administração do receptor solúvel de TNF (rsTNF) em dose que reduz a febre induzida pelo TNF não alterou a febre nem tampouco a sobrevida durante a sepse induzida pelo CLP (Figs 20 e 21).

Tem sido demonstrado que a IL-6 exerce um importante papel central na febre induzida pelas toxinas LPS e MALP-2 (ROTH & SOUZA 2001; KNORR et al., 2008 *in press*), no entanto, no presente estudo, o tratamento com anticorpo monoclonal anti IL-6 não reduziu a febre induzida por CLP (Fig 22), mas aumentou a sobrevida destes animais (Fig 23), sugerindo que, centralmente, a IL-6 possui um papel semelhante ao da IL-1 β .

Leon et al., em 1998, estudando a função da IL-6 e TNF na termorregulação e sobrevida durante a sepse em camundongos knockout, demonstraram que a falta de IL-6 não afeta a letalidade, mas sim o aumento de temperatura induzido por este estímulo. Por outro lado o TNF parece ser responsável pela letalidade e hipotermia inicial neste estímulo. Embora estes resultados contrapõem-se aos nossos esta discrepância pode resultar de diferentes metodologias usadas (antagonismo farmacológico versus estudo com gene knockout).

IL-6 e TNF- α são mediadores chaves da sepse, e tem sido difícil estabelecer uma função específica para estas citocinas na regulação do “sickness behaviors” durante a infecção devido a complexa interação das citocinas com coincidentes atividades biológicas.

A sepse, em sua complexa fisiopatologia, destaca-se pelo fato de a própria resposta de defesa do organismo contribuir para o dano ao funcionamento dos órgãos, sendo o grande responsável pelas elevadas taxas de mortalidade. Neste contexto vemos

uma estreita ligação entre o foco infeccioso, a resposta inflamatória e as alterações cardiovasculares. Desta forma, outros parâmetros precisam ser avaliados como, por exemplo, pressão arterial, crescimento bacteriano, etc., para explicarmos a melhora na sobrevida promovida pelo tratamento com IL-1ra, Ac anti IL-6 e paracetamol.

O controle do tônus vascular é um importante mecanismo de termorregulação na instalação da resposta febril, onde ocorre uma vasoconstrição na pele a fim de reduzir a perda de calor e, dessa forma, aumentar a temperatura corporal. As drogas antipiréticas são capazes de interferir na síntese e/ou liberação de mediadores endógenos envolvidos no controle do tônus vascular, podendo promover alterações hemodinâmicas, tais como o aumento da pressão arterial induzido pelos AINES não seletivos (JONHSON et al., 1994) ou seletivos para COX-2 (MUSCARÁ et al., 2000; KRUM et al., 2006) bem como a hipotensão induzida pela dipirona e pelo paracetamol (CRUZ et al., 2002; GOZZOLI et al., 2004; HERSCH et al., 2008). Além disso, entre as mais graves manifestações da sepse, encontram-se os distúrbios hemodinâmicos, caracterizados pelo aumento do débito cardíaco e queda da resistência vascular periférica. Desta forma, fica evidente a necessidade do estudo dos efeitos desses antipiréticos, bem como o efeito do próprio CLP, sobre a pressão arterial em paralelo ao estudo da febre.

Em vista dos resultados aqui apresentados podemos concluir que durante a sepse não existe para todas as drogas antipiréticas uma correlação entre a antipirese e a sobrevida bem como, entre a febre e a concentração de PGs no CSF ou de citocinas circulantes. Nossos resultados sugerem também que IL-1 β e IL-6 presentes no SNC de alguma forma estão envolvidas na morte dos animais durante a sepse induzida pelo CLP.

Desta forma, nosso estudo contribui para um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos na indução da resposta febril induzida por CLP, bem como apontam para algumas perspectivas frente ao tratamento com os diferentes antipiréticos.

6 RESUMO

Embora a injeção de LPS seja um modelo razoável de infecção real, a febre induzida pelo LPS não é uma febre típica. Este é usualmente removido da circulação 1 h após a injeção intravenosa e induz uma febre de duração curta. Na maioria dos casos de sepse a febre é induzida e mantida por um longo período pela estimulação pirogênica contínua (GOURINE et al., 1998). O CLP (modelo de ligação e perfuração cecal) primeiramente descrito por CHAUDRY et al (1979, 1980), é amplamente aceito por muitos investigadores como um modelo de sepse, infecção aguda e peritonite bacteriana (FINK et al., 1990; VILLA et al., 1995), que melhor reflete a complexa resposta desta síndrome em humanos (DE MAIO et al., 2005).

O CLP envolve uma estimulação pirogênica contínua e simula uma infecção real muito melhor que a infusão de quantidades constantes de LPS (infecção simulada).

Desta forma este trabalho objetivou: -padronizar o modelo de CLP capaz de induzir resposta febril, - investigar como a terapia antipirética influencia a mortalidade de animais no modelo de sepse: - investigar quais mediadores estão envolvidos na estimulação pirogênica contínua, induzida pelo CLP, bem como relacionar os níveis de mediadores pirogênicos no fluido cerebrospinal (CSF) com a febre e com a sobrevida.

Para indução do modelo, utilizamos vários calibres de agulha e diferentes números de perfurações. Os animais que receberam 4 furos com a agulha 16G no ceco, apresentaram aumento significativo da temperatura e índice de sobrevida de aproximadamente 50%. Então este estímulo foi escolhido para avaliar o efeito dos antipiréticos na resposta febril

O tratamento com os antipiréticos promoveu diferentes efeitos sobre o aumento da temperatura e taxa de sobrevida dos animais sépticos. Sendo que a antipirese foi mais evidente nos animais tratados com o celecoxibe e dipirona e a melhora significativa da sobrevida nos animais tratados com paracetamol.

O CLP induziu aumento na concentração de PGE₂ no CSF 6; 12; 24 e 48 horas após o estímulo, sendo que o pico deste aumento coincidiu com o pico da resposta febril (6h). Este estímulo também promoveu aumento significativo dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso e soro, mas não no CSF dos animais sépticos. Estas citocinas parecem não participar centralmente na resposta febril induzida por CLP, uma vez que o tratamento com o antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra), com o receptor solúvel de TNF (sTNFr) e com o anticorpo anti IL-6 não alteraram a febre induzida por CLP.

O tratamento com os antipiréticos aumentou os níveis de IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso e diminuiu no soro. Entretanto a maior diminuição foi vista no soro dos animais tratados com celecoxibe e paracetamol.

Com base nos achados descritos acima, é possível concluir que o modelo de febre induzido por CLP reproduz bem um quadro infeccioso, os mediadores diferem daqueles envolvidos na febre do LPS. A melhora na sobrevida nos animais tratados com paracetamol deve envolver outro mecanismo que a inibição sérica de IL-6. Entretanto, mais estudos são necessários para entendermos melhor os mecanismos envolvidos na indução desta resposta, bem como o mecanismo de ação evocado pelos antipiréticos.

7 SUMMARY

Although injection of LPS is a reasonable model of real infection, LPS- induced fever is not a “typical” fever. LPS is usually cleared from the circulation within 1h after intravenous injection and induces relatively short-lasting fever. However, in most cases fever is induced and maintained for long periods of time by continuous pyrogenic stimulation (GOURINE et al., 1998). CLP was first described by CHAUDRY et al (1979, 1980) and is widely accepted by many investigators as a model of sepsis, acute infection, and bacterial peritonitis (FINK et al., 1990; VILLA et al., 1995) that better reflect this complex syndrome in human (DE MAIO et al., 2005).

Furthermore, CLP involves continuous pyrogenic stimulation and stimulates a real infection much better than infusion of constant amounts of LPS (simulated infection).

The purpose of the present study was to investigate how the antipyretic therapy affects the survival of animals in this model and investigate the mediators involved in this response.

Punctures with 16 gauge needle induced long-lasting and abdominal temperature increases that were puncture dependent. Four punctures have been chosen for the remaining experiments. This stimulus induced 43% survival of animals.

Antipyretic treatments with ibuprofen and indomethacin not reduced the fever response. In addition, celecoxib, dipyron and acetaminophen reduced CLP induced fever. The survival rate of animals was not modified by celecoxib, dipyron, indomethacin and ibuprofen and was increased by acetaminophen (150 and 300mg kg⁻¹ per os).

CLP increased the level of PGE₂ at the same time of the peak of febrile. The raise on CSF PGE₂ levels induced by CLP was inhibited by celecoxib (2,5 and 5 mg kg⁻¹, per os) and reduced by acetaminophen (300 mg kg⁻¹ per os). Furthermore, this surgery increased the levels of TNF- α , IL-1 β e IL-6 in the peritoneal cavity and serum of septic animals. In addition, antipyretic treatments increased the levels of IL-1 β e IL-6 peritoneal cavity and decreased in the serum.

However, antipyretic treatments with IL-1 receptor antagonist, soluble receptor of TNF(R1) and antibody anti IL-6 were not capable of reducing the febrile response induced by CLP but the treatment with IL-1ra and antibody anti IL-6 increased the survival.

In conclusion, it has been shown here that CLP induces increase in core temperature that was puncture dependent. This response is dependent on PGE₂ generation and different antipyretic treatments can result in improve or aggravation of the infectious state. The central mediators of LPS induced fever seems to be different on this model. Nonetheless, further studies are necessary to understand the mechanisms involved in the induction of this response and the action mechanisms evoked by antipyretics.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, S.R.; WEISSMANN, G. The mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.*, v. 32, p.1-9, 1989.
- ALEXANDER, H.R.; DOHERTY, G.M.; VENZON, D.J. et al. *Surgery*, v.112, n2, 1992.
- ALMEIDA E SILVA, T. C. & PELÁ, I.R. Changes in rectal temperature of the rabbit by intracerebroventricular injection of bradykinin and related kinins. *Agents Actions*, v.8, p.102-107, 1978.
- ALVES-FILHO JC, TAVARES-MURTA BM, BARJA-FIDALGO C, BENJAMIM CF, BASILE-FILHO A,ARRAES SM, CUNHA FQ. Neutrophil function in severe sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Jun;6(2):151-8.
- AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIONS DISEASE, AND NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. From the bench to the bedside: the future of sepsis research. *Chest*, v.111, p.744-753, 1997.
- ANGUS, D.C.LINDE-ZWIRBLE, W.T, LIDICKER, J. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit Care Med*, v.29, p. 1303-10, 2001.
- AKIRA S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:1-16. Review.
- ARIAS-NEGRETE, S.; KELLER, K.; CHADEE, K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.208, p.582-589, 1995.
- ATWOOD, R.P.; KASS, E.H.: Relationship of body temperature to the lethal action of bacterial endotoxin. *J. Clin Invest*, v.43 (2), p.151-159, 1964.
- AYRES, S.M.: SCCM's new horizons conference on sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, v.13, p.864-866, 1985.
- BAIGRIE RJ, LAMONT PM, KWIATKOWSKI D, DALLMAN MJ, MORRIS PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg*. 1992 Aug;79(8):757-60
- BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediators Inflamm*. 1996;5(5):305-23.
- BALK, R.A. & BONE, R.C. The septic syndrome: Definition and clinical implications. *Crit Care Clin*, v.5, p.1-8, 1989.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Blood to brain transport of interleukin in links the immune and central nervous systems. *Life Sci.*, v.48, p. PL 117-1121, 1991.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; RODRIGUEZ, A.L.; CRECZYNSK-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B.. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in

- formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* v. 345, n.3, p. 233-245, 1998.
- BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ: Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70(7):3602Y3610, 2002.
- BERNARD G.R., WHEELER A.P., RUSSEL J.A., SCHEIN R. et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 912-8.
- BERTOLINI A, FERRARI A, OTTANI A, GUERZONI S, TACCHI R, LEONE S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 2006 Fall-Winter;12(3-4):250-75.
- BICEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comp. Bioch. Physiol.*, 2006 in press.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & Therapeutics*, v.111, p.194-223, 2006.
- BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Fever. How many circulating pyrogens signal the brain? *News Physiol. Sci.*, v. 12, p. 1-9, 1997.
- BONE, R.C.; FISHER, C.J.; CLEMMER, T.D.; SLOTMAN, G.J.; METZ, C.A. and BALK, R.A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med*, v.17, p.389-393, 1989.
- BONE, R.C. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch. Intem. Me.*, v.154, p. 26-34, 1994.
- BOULANT, J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin. Infect. Dis.*, v.31, p.S157-S161, 2000.
- BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Sep 29;856:108-15. Review.
- BRIESE, E. Circadian body temperature rhythm and behavior of rats in thermoclines. *Physiol Behav.*, v.37(6), p.839-847, 1986.
- BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; RIVIER, J.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. *Life Sci.*, v.30, p.207-10, 1982.
- BRUNE, HINZ B, CHEREMINA O, BACHMAKOV J, RENNER B, ZOLK O, FROMM MF, BRUNE K. Dipyrene elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J.* 2007 Aug;21(10):2343-51.

- CALDEIRA, J.C.; FRANCI, C.R.; PELÁ, I.R. Bilateral lesion of hypothalamic paraventricular nucleus abolishes fever induced by endotoxin and bradykinin in rats. Ann. N. Y. Acad. Sci., v.856, p.294-297, 1998.
- CANNON, J.G.; TOMPKINS, R.G., GELFAND, J.A.MICHIE, H.R.; STANFORD, G.G.; VAN DER MEER J.W.M.; ENDRES, S.; LONNEMANN, G.; CORSETI, J.; CHERNOW, B.; WILMORE, D.W.; WOLFF, S.M.; BURKE, J.F. AND DINARELLO, C.A. Circulating interlekin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. J. Infec. Dis., v.161, p.79-84, 1990.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; WATANABE, Y. Induction of cyclooxygenase-2 in the brain by cytokines. Ann. N. Y. Acad. Sci., v.813, p.307-9, 1997.
- CAO, W.H.; MORRISON, S.F. Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. Neuropharmacology. v. 51, n. 3, p. 426-437, 2006.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; WATANABE, Y. Induction by lipopolysaccharide of COX-2 mRNA in the brain: its possible role in the febrile response. Brain Res., v. 697, p. 187-96, 1995.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 β : a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. Brain Res., v.733, p.263-72, 1996.
- CARTMELL, T.; LUHESHI, G. N.; ROTHWELL, N. J. Brain sites of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. J. Physiol., 519.2, p. 585-594, 1999.
- CARTMELL, T.; MITCHELL, D., LAMOND, F.J.D., LABURN, H.P. Route of administration differentially affects fevers induced by gram-negative and gram positive. Exp. Physiol., v.83, p. 391-399, 2002.
- CARTMELL, T.; POOLE, S.; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. J Physiol. v. 526 (Pt 3), p. 653-61, 2000.
- CASEY LC, BALK RA, BONE RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993 Oct 15;119(8):771-8.
- CAVAILLON, J.M.; ADIB-CONQUY, M., FITTING, C. et al. Scand J Infect Dis, v.35, 535-544, 2003.
- CEBULA, T.A.; HANSON, D.F.; MOORE, D.M.; MURPHY, P.A. Synthesis of four endogenous pyrogens by rabbit macrophages. J. Lab. Clin. Med., v.94, p.95-105, 1979.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia-United States, 1979-87. MMWR, v.39, p.31-4, 1990.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROSS, K.L.T.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.99, p.13926-13931, 2002.
- CHAUDRY, I.H., WICHTERMAN, K.A., BAUE, A.E.: Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. Surgery, v.85, P.205-11, 1979
- CHAUDRY, I.H., HIRASAWA, H., BAUE, A.E.: Effect of adenosine triphosphate-glucose administration following sepsis. J Surg Res, v.29, p.348-56, 1980
- CHIDA D, IWAKURA Y. Peripheral TNFalpha, but not peripheral IL-1, requires endogenous IL-1 or TNFalpha induction in the brain for the febrile response. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Dec 28;364(4):765-70. Epub 2007 Oct 15.
- CLEMMER, T.P.; FISHER, C.J.; BONE, R.C.; SLOTMAN, G.J.; METS, C.A.; THOMAS, F.O.; THE METHYLPREDNISOLONE SEVERE SEPSIS STUDY GROUP. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. Crit Care Med, v.20, p.1395-1401, 1992.
- COCEANI, F.; LEES, J.; BISHAI, I. Further evidence implicating prostaglandin E₂ in the genesis of pyrogen fever. Am. J. Physiol., v. 254, p. R 463-469, 1988.
- COELHO, M.M.; PELA, I.R.; ROTHWELL, N.J. Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F₂ alpha, but not prostaglandin E₂. Eur. J. Pharmacol., v.238, p.391-394, 1993.
- COELHO, M.M.; OLIVEIRA, C.R.; PAJOLLA, G.P.; CALIXTO, J.B.; PELÁ, I.R. Central involvement of kinin B₁ and B₂ receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. Br.J. Pharmacol. v.121, p.296-302, 1997.
- COELHO, M.M.; LUHESHI, G.; HOPKINS, S.J.; PELÁ, I.R.; ROTHWELL, N.J. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. Am. J. Physiol., v.269, p.R527-R535, 1995.
- COELHO, M.M.; SOUZA, G.E.P.; PELÁ, I.R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. Am. J. Physiol., v.263, p.R423-R427, 1992.
- COHEN, J. The detection and interpretation of endotoxaemia. Intensive Care Med 2000; 26 Suppl 1:S51-S56.
- CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. Front Biosci. v. 9, p. 1433-1449, 2004.

- CONSIGLIO AR, LUCION AB. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. Brain Res Protoc. Feb;5(1):109-14, 2000.
- CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L.; RISTIMAKI, A. P.; SANO, H.; REMMERS, E. F.; EPPS, H. R.; et al..Cyclooxygenases-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. J. Clin. Invest. V. 93, p. 1095-1101, 1994.
- CRUZ, P; GARUTTI, I; DIAZ, S.et al. Rev Esp Anesthesiol Reanim v.49, p.391-6, 2002
- DAMAS P, LEDOUX D, NYS M, VRINDTS Y, DE GROOTE D, FRANCHIMONT P, LAMY M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. Ann Surg. 1992 Apr;215(4):356-62
- DASCOMBE, M.J.; ROTHWELL, N.J.; SAGAY, B.O.; STOCK, M.J. Pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 α in the rat. Am. J. Physiol., v. 256, p. E7-E11, 1989.
- DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; DAYER, J.-M.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. Science, v.243, p.1066-8, 1989.
- DAVIDSON, J.; MILTON, A.S.; ROTONDO, D. A study of the pyrogenic actions of interleukin-1 α and interleukin-1 β : interactions with a steroidal and a non-steroidal anti-inflammatory agent. Br. J. Pharmacol., v. 100, p. 542-546, 1990.
- DE MAIO, A.; TORRES, M.B.; REEVES, R.H. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. Shock, v.23, n. 1, p.11-17, 2005
- DIAMANT, M.; De WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. Endocrinology, v. 129, n.1, p.466-54, 1991.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. Rev. Infect. Dis., v.10, n.1, p.168-89, 1988.
- DINARELLO, C.A.; BERNHEIN, H.A.; DUFF, G.W.; HHLE, H.V.; NAGABHUSHAN, T.L.; HAMILTON, N.C.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. J. Clin. Invest., v.74, p.906-13, 1984.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.; BEAUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, S.I.; PALLADINO, M.A.Jr.; O CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J. Exp. Med., v.163, p.1433-50, 1986.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. Brain Res., v.562, p.199-206, 1991.

- DINARELLO CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res.* 2004;10(4):201-22.
- DINCHUK , J. E.; LIU, R.Q.; TRZASKOS, J. M. *Immunology Letters* v. 86, p.121, 2003.
- DUNN, A J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res.* 2006 August ; 6(1-2): 52–68.
- EBONG, S.; CALL, D.; NEMZEK, J.; BOLGOS, G.; NEWCOMB, D.; REMICK, D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infection and Immunity*, v.67 (12), p.6603-6610, 1999.
- ELDOR, A.; ZYLBER-KATZ, E.; LEVY, M. The effect of oral administration of dipyron on the capacity of blood platelets to synthesize thromboxane A2 in man. *Eur J Clin Pharmacol.* v. 26, n. 2, p. 171-176, 1984.
- ELIN, R.J.; ROBINSON, R.A.; LEVINE, A.S.; WOLFF, S.M. Lack of clinical usefulness of the limulus test and the diagnosis of endotoxemia. *N. Engl. J. Med.*, v.293, p.521-524, 1975.
- ELMQUIST, J. K.; BREDER, C. D.; SHERIN, J.E.; SCAMMELL, T. E.; HICKEY, W. F.; DEWITT, D.; SAPER, C. B. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2- like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J. Comp. Neurol.*, v. 381, p. 119-129, 1997.
- ENDRES S, WHITAKER RE, GHORBANI R, MEYDANI SN, DINARELLO CA. Oral aspirin and ibuprofen increase cytokine-induced synthesis of IL-1 beta and of tumour necrosis factor-alpha ex vivo. *Immunology.* 1996 Feb;87(2):264-70.
- ENGBLOM, D.; SAHA, S.; ENGSTROM, L.; WESTMAN, M.; AUDOLY, L. P.; JAKOBSON, P. J.; et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nature Neurosc.*, v. 6, p. 1137-8, 2003.
- FABRÍCIO, A.S.C.; RAE, G.A.; D ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. *Brain Research*, v.1066, p.92-100, 2005.
- FABRÍCIO, A.S.C. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Farmacologia da FMRP-USP. 2002
- FABRÍCIO, A.S.C. ; VEIGA, F.H.; CRISTOFOLETTI, R, et al. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, v.288: R671-677, 2005.
- FABRÍCIO, A.S.C.; ZAMPRONIO, A.R.; D ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G.A.; SOUZA, G.E.P. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by pre-formed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.290, p.R164-R171, 2006.

- FABRÍCIO, A.S.C.; SILVA, C.A.A.; RAE, G.A.; D ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Essential role for endothelin ET_B receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. Br. J. Pharmacology, v.128, p.1-7, 1998.
- FELDBERG, W.; SAXENA, P.N. Fever produced by prostaglandin E₂. J. Physiol., v.217, p.547-556, 1971.
- FIGUEIREDO, M.J. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Elevação da temperatura corporal induzida pelo CRF e UCN: um estudo comparativo.
- FINK, M.P.; FACS, M.D.; HEARD, S.O. Current research review: laboratory models of sepsis and septic shock. J. Surg. Res., v.49, p. 186-196, 1990.
- Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. Crit Care Med. 1993 Mar;21(3):318-27.
- FUTAKI, N., YOSHIKAWA, K.; HAMASAKA, Y.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; IIZUKA, H.; OTOMO, S. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. Gen. Pharmacol., v. 339, p. 469-476, 1993.
- GOURINE, A.V.; RUDOLPH. K.; TESFAIGZI, J.; KLUGER, M.J. Role of hypothalamic interleukin-1 β in fever induced by cecal ligation and puncture in rats. Am. J. Physiol., v.275, p.754-761, 1998.
- GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. Physiol Behav., v.47 (5), p.963-991,1990
- GORDON, C.J. Twenty-four hour rhythms of selected ambient temperature in rat and hamster. Physiol Behav., v.53 (2), p.257-263, 1993.
- GOELST, K.; LABURN, H.P. Response of body temperature and serum iron concentration to repeated pyrogen injection in rabbits. Pflugers Arch., v.417, p.558-561, 1991.
- GOZZOLI, V.; TRIGGIARI, M.M. et al Intensive Care Med, v..30, p.401-407, 2004.
- GRIFFIN, J. D. Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons. J. Thermal Biol., v. 29, p. 327-331, 2004.
- HACK, C.E.; DE GROOT E.R.; FELT BORSMA, J.R.; et al. Increase plasma levels of interleukin-6 in sepsis. Blood, v.74, p.1704-1710, 1989.
- HARRIS, R.L.; MUSER, D.M.; BLOOM, K.; GATHE, J.; et al. Manifestations of sepsis. Review. Arch Intern Med, v.147, p.1895-1906, 1987.

- HASDAY, J.D.; GARRISON, J. D. Antipyretic therapy in patients with sepsis. Clinical Infectious diseases, v.31, p. S234-41, 2000.
- HELLE, M.; BRAKENHOFF, J.P.J.; De GROOT, E.R.; AARDEN, L.A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. Eur.J.Ummunol., v.18, p. 957-9, 1988.
- HERSCH, M.; RAVEH, D; IZBICKI, G. Pharmacotherapy, v.28(10), p.1205-1210, 2008.
- HOTCHKISS R.S.; KARL I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med, v. 348, p.138-50, 2003
- HUBBARD, W.J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M.G.; KERBY, J.D.; et al. Cecal ligation and puncture. Shock, v.24, S.1, p.52-57, 2005.
- HUANG, W.T.; WANG, J.J.; LIN, M.T. Antipyretic effect of acetaminophen by inhibition of glutamate release after staphylococcal enterotoxin A fever in rabbits. Neurosci Lett. v. 355, n. 1-2, p. 33-36, 2004.
- HUANG, W.T.; LIN, M.T.; CHANG, C.P. An NMDA receptor-dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever. Neuropharmacology. v. 50, n. 4, p. 504-511, 2006.
- HWANG, D.; SCOLLARD, D.; BYRNE, J.; LEVINE, E. Expression of cyclooxygenases-1 and -2 in human breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. v. 90, p. 465-460, 1998.
- INOUE W, KIYOSHI MATSUMURA, KANATO YAMAGATA, TAKAKO TAKEMIYA, TAKUMA SHIRAKI, SHIGEO KOBAYASHI. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E2 synthesis enzymes and its temporal relation to fever. Neuroscience Research v.44 (2002) p.51-61
- IÑIGUEZ MA, PUNZÓN C, FRESNO M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. J Immunol. 1999 Jul 1;163(1):111-9
- JACOBI, J. Am J. Health-Syst Pharm, v. 59, 2002
- JANSKÝ L, VYBÍRAL S, POSPÍŠILOVÁ D, ROTH J, DORNAND J, ZEISBERGER E, KAMÍNKOVÁ J. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. Neuroendocrinology. 1995 Jul;62(1):55-61
- JOHNSON, A.G.; NGUYEN, T.V.; DAY, R.O. Ann Intern Med, v.121, p.289-300, 1994
- KAO, C.H.; KAO, T.Y.; HUANG, W.T.; LIN, M.T. Lipopolysaccharide- and glutamate-induced hypothalamic hydroxyl radical elevation and fever can be suppressed by N-methyl-D-aspartate-receptor antagonists. J Pharmacol Sci. v. 104, n. 2, p. 130-136, 2007.

- KASTING NW. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in thermoregulation during fever and antipyresis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1989 Apr-Jun;14(2):143-53.
- KETTELHUT, I.C.; GOLDBERG, A.L. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. *J Clin Invest.* v. 81, n. 5, p. 1384-1389, 1988.
- KIS B, SNIPES JA, SIMANDLE SA, BUSIJA DW. Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Apr;288(4):R897-902, 2005.
- KHAN, K. N.; PAULSON, S. K.; VRBURG, K. M.; LEFKOWITH, J. B.; MAZIASZ, T. J. Pharmacology of cyclooxygenases-2 inhibition in the kidney. *Kidney Int.*, v. 61, p. 1210-1219, 2002.
- KLIR JJ, ROTH J, SZELÉNYI Z, MCCLELLAN JL, KLUGER MJ. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am J Physiol.* 1993 Sep;265(3 Pt 2):R512-7.
- KLIR, J.J.; MCCLELLAN, J.L.; KOZAK, W.; SZELÉNYI, Z.; WONG, G.H.; KLUGER, M.J. Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol.* v. 268(2 Pt 2), p. R480-486, 1995.
- KLOSTERHALPEN, B.; HÖRSTMANN-JUNGEMANN K.; et al. Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochem. Pharmac.*, v.43, p.2103-2109, 1992.
- KLOSTERHALPEN, B. & BHARDWAJ S. Septic Shock. *Gen Pharmacol*, v.31, p.25-32, 1998.
- KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, v.71, n.1, p.93-127, 1991.
- KNORR C, HÜBSCHLE T, MURGOTT J, MÜHLRADT P, GERSTBERGER R, ROTH J. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Res.* 2008 Apr 18;1205:36-46.
- KOJ, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Bioch Bioph Acta*, Mini-Review. v.1317, p.84-94, 1996.
- KRUM, H; LIEW, D. J. *Cardiovasc Pharmacol.* V.47, p.S43-48, 2006
- KUIKKA A, SIVONEN A, EMELIANOVA A, VALTONEN VV. Prognostic factors associated with improved outcome of *Escherichia coli* bacteremia in a Finnish university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997 Feb; 16(2):125-34.

- KUIKKA A, VALTONEN VV. Factors associated with improved outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Finnish university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Oct; 17(10): 701-8.
- KUJUBU, D. A.; FLETCHER, B. S.; VARNUM, B. C.; LIM, R. W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 12866-72, 1991.
- KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. *Methods Enzimol.*, v.163, p. 373-83, Academic Press, 1988.
- LAYÉ S, BLUTHÉ RM, KENT S, COMBE C, MÉDINA C, PARNET P, KELLEY K, DANTZER R. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 2):R1327-31.
- LAZARUS M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res*. v. 50, n. 4-5, p. 451-5. 2006.
- LEE YS, KIM H, BRAHIM JS, ROWAN J, LEE G, DIONNE RA. Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation. *Pain*. Jun;129(3):279-86, 2007.
- LEDEBOER A, BREVÉ JJ, WIERINCKX A, VAN DER JAGT S, BRISTOW AF, LEYSEN JE, TILDERS FJ, VAN DAM AM. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci*. 2002 Oct;16(7):1175-85.
- LEFER, A.M. Significance of lipid mediators in shock states. *Circ. Shock*, v.27, p.3-12, 1989.
- LeFEUVRE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. *Neuropharmacology*, v.26, n.8, p.1217-21, 1987.
- LEMAY LG, VANDER AJ, KLUGER MJ. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol*. 1990 Mar;258(3 Pt 2):R798-803.
- LEON LR, WHITE AA, KLUGER MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):R269-77.
- LI, S.; WANG, Y.; MATSUMURA, K., BALLOU, L.R.; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M.. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2^{-/-} mice. *Brain Res.*, v.25, p.86-94, 1999a
- LI, S.; BALLOU, L.R. ; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin (IL)- β . *Brain Res.*, v. 910, p.163-73, 2001.

- LI, S.; GOORHA, S.; BALLOU, L.R.; BLATTEIS, C.M. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 β and IL-18: pyrogenic and PGE₂ mediated? Brain. Res., v.992, p.76-84, 2003.
- LONG, N.C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S.L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Roles of interleukin 1 β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. Am. J.Physiol., v. 259, p. R724-R728, 1990.
- LONGHI D. T., SOARES D M., FIGUEIREDO M J, ALVES-FILHO J C. CUNHA F Q., RAE G A., SOUZA G E. P. Fever induced by Staphylococcus aureus infection in rats: effect of antipyretic drugs and endothelin receptor antagonists.
- LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. Eur. J. Pharmacol., v. 114, p. 375-381, 1985.
- LUHESHI, G.; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. Int. Arch. Allergy Immunol., v. 109, p. 301-307, 1996.
- LÜTHY, C.; MULTHAUPT, M.; OETLIKER, O.; PERISIC, M. Differential effect of acetylsalicylic acid and dipyron on prostaglandin production in human fibroblast cultures. Br J Pharmacol. v. 79, n. 4, p. 849-54. 1983
- MACHADO, R.R.; SOARES, D.M.; PROUDFOOT, A.E.; SOUZA, G.E.P. CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (*E. coli*) and RANTES in rats Brain Res. Aug 3;1161:21-31, 2007.
- MADDEN, C.J.; MORRISON, S.F. Excitatory amino acid receptor activation in the raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis. Neuroscience. v. 122, n. 1, p. 5-15, 2003.
- MADDEN, C.J.; MORRISON, S.F. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus mediate prostaglandin-evoked thermogenesis in brown adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v. 286, n. 2, p. R320-325, 2004.
- MALVAR, D.C. Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de Farmacologia da FMRP-USP. Estudo do envolvimento da PGE₂ na resposta febril induzida por LPS, Endotelina-1 e veneno de *Tityus serrulatus*”.
- MARTIN, J. H. Neuroanatomia: Texto e Atlas, 2 ed, edn. Artes Médicas, Porto Alegre, 1998, p.133-4.
- MANCINI et al., Neurosc. Letters, v.353, p.79-82, 2003.
- MANSILLA-ROSELLÓ A, FERRÓN-ORIHUELA JA, RUIZ-CABELLO F, GARROTE-LARA D, FERNÁNDEZ-MONDÉJAR E, DELGADO-CARRASCO ML. Differential effects of IL-1 beta and ibuprofen after endotoxic challenge in mice. J Surg Res. 1997 Feb 1;67(2):199-204

- MARTIN LW, CATANIA A, HILTZ ME, LIPTON JM. Neuropeptide alpha-MSH antagonizes IL-6- and TNF-induced fever. *Peptides*. 1991 Mar-Apr;12(2):297-9.
- MCHENRY, M.C.; MARTIN, W.J.; WELLMAN, W.E. Bacteremia due to gram negative bacilli: Review of 113 cases encountered in the five-year period 1955 through 1959. *Ann Intern Med*, v. 56 (2), p.207-219, 1962.
- MELO SOARES, D.; HIRATSUKA VEIGA-SOUZA, F.; SUELI COELHO FABRICIO, A.; JAVIER MINANO, F.; PETTO SOUZA, G.E. CCL3/Macrophage inflammatory protein-1 α induces fever and increases prostaglandin E(2) in cerebrospinal fluid of rats: Effect of antipyretic drugs. *Brain Res.*, v.1109, p.83-92, 2006.
- MELO SOARES D, MACHADO RR, YAMASHIRO LH, MELO MC, SOUZA GE. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. *Brain Res.*, v.1233, p.79-88, 2008.
- MELO SOARES, D.; Mip-1 α na resposta febril induzida pelo LPS, em preparação, 2008
- MICHIE HR, SPRIGGS DR, MANOGUE KR, SHERMAN ML, REVHAUG A, O'DWYER ST, ARTHUR K, DINARELLO CA, CERAMI A, WOLFF SM. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery*. 1988 Aug;104(2):280-6.
- MILLER AJ, LUHESHI GN, ROTHWELL NJ, HOPKINS SJ. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am J Physiol*. 1997 Mar;272(3 Pt 2):R857-61.
- MILTON, A.S.; WEDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanesthetized cats and rabbits. *J. Physiol.*, v.218, p.325-336, 1971.
- MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SSERRY, B.; CERAMI.; MTERS, R.D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. *Brain Res. Bull.*, v.24, p.849-52, 1990.
- MIÑANO, F.J.; FERNANDEZ-ALONSO, A.; BENAMAR, K.; MYERS, R.K.; SANCIBRIAN, M.; RUIZ, R.M.; ARMENGOL, J.A. Macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 β) produced endogenously in brain during E.coli fever in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v.8, p.424-428, 1996.
- MOHAN RAO, P.J.R.; BHATTACHARYA, S.K. Hyperthermic effect of centrally administered bradykinin in the rat: role of prostaglandins and serotonin. *J. Int. Hyperthermia*, v.4, p.183-189, 1988.
- MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. *Am. J. Physiol.*, v.254, p. R633-R640, 1988.

- MORIMOTO, A.; MORIMOTO, K.; WATANABE, T.; SAKATA, Y.; MURAKAMI, N. Does an increase in prostaglandin E2 in the blood circulation contribute to a febrile response in rabbits? Brain Res Bull., v.29 (2), p.189-92, 1992.
- MUSCARÁ, M.N.; VERGNOLLE, N et al. British J. Pharmacol. V.129, p.1423-30, 2000.
- NAKAMURA. K.; MATSUMURA, K.; HÜBSCHLE, T.; NAKAMURA, Y.; HIOKI, H.; FUJIYAMA, F.; BOLDOGKÖI, Z.; KÖNIG, M.; THIEL, H.J.; GERSTBERGER, R.; KOBAYASHI, S.; KANEKO, T. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. J Neurosci. v. 24, n. 23, p. 5370-5380, 2004
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. A thermosensory pathway that controls body temperature. Nat Neurosci. v. 11, n. 1, p. 62-71, 2008a.
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. J Physiol. v. 586, n. 10, p. 2611-2620, 2008b.
- NAVA F, CALAPAI G, FACCIOLÁ G, CUZZOCREA S, MARCIANO MC, DE SARRO A, CAPUTI AP. Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. Int J Immunopharmacol. 1997 Jan;19(1):31-8.
- NIJSTEN MW, DE GROOT ER, TEN DUIS HJ, KLASSEN HJ, HACK CE, AARDEN LA. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. Lancet. 1987 Oct 17;2(8564):921.
- OPP M, OBAL F JR, CADY AB, JOHANNSEN L, KRUEGER JM. Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic. Physiol Behav. 1989 May;45(5):1069-72.
- PARENTE , L.; PERRETI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. Biochem. Pharmacol., v. 65, p. 153-159, 2003.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York Academic Press, 1986.
- PIERRE SC, SCHMIDT R, BRENNEIS C, MICHAELIS M, GEISSLINGER G, SCHOLICH K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. Br J Pharmacol. 2007 Jun;151(4):494-503
- RIEDEMANN N. C.; GUO, R.F.; WARD, P.A. The enigma of sepsis. J. Clin Invest. v.112, p.460-67, 2003.
- ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. Neurol. Clin., v.24, p.421-439, 2006
- ROTH J, HÜBSCHLE T, PEHL U, ROSS G, GERSTBERGER R. Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced

- fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflügers Arch.* 2002 Jan;443(3):411-7.
- ROTH J. [Fever in acute illness: beneficial or harmful?] *Wien Klin Wochenschr.* 2002 Feb 15;114(3):82-8
- ROTH, J.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J.; ZEISBERGER, E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am. J. Physiol.*, v.265, p.R653-R638, 1993.
- ROTH J, MCCLELLAN JL, KLUGER MJ, ZEISBERGER E. Changes in body temperature and circulating levels of interleukin-6 after intra-arterial injections or infusions of tumor necrosis factor alpha in guinea pigs. *Experientia.* 1994 Sep 15;50(9):815-20.
- ROTH, J.; SOUZA, G.E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.
- ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. *Am. J. Physiol.*, v.256, p. E111-E115, 1989.
- ROTHWELL, N.J. Central action of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. *Horm. Metab. Res.*, v.22, p.616-8, 1990a.
- ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; HUMPHRAY, H.; HISSEY, P. Central action of interleukin-1 β on fever and thermogenesis. In: *Physiological and Pathological Effects Cytokines.* Wiley-Liss, Inc., p. 307-311, 1990b.
- ROTHWELL, N.J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. *Horm. Metab. Res.*, v.22, p.595-596, 1990a.
- ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; LEFEUVRE, R.A.; HARDWICK, A.J.; GALDIE, J.; HOPKINS, S J. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.69, p.1465-69, 1991.
- RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; VOSS, T.; KORTE, S.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T.; ROTH, J. Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.289, p.R340-R347, 2005.
- SANO, H.; KAWAHITO, Y.; WILDER, R. L.; HASHIRAMOTO, A.; MUKAI, S.; ASAI, K.; et al. Expression of cyclooxygenases-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* v. 55, p. 3785-3789, 1995.
- SANTOS, D.R. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Evidências da participação cininérgica no desenvolvimento da resposta febril em ratos, 2002

- SAPER, B.; BREDER, C. The neurologic basis of fever. *The Journal of Medicine.*, v. 330, (26), p. 1880-1886, 1994.
- SEHIC, E.; SZÉKELY, M.; UNGAR, A.L.; OLADEHIN, A.; BLATTEIS, C.M. Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull.* v. 39, n. 6, p. 391-399, 1996.
- SILVA & VELASCO, Fabiano Pinheiro da Silva, Irineu Tadeu Velasco. Livro SEPSE, editora Manole, 2007.
- SCHIRMER WJ, SCHIRMER JM, TOWNSEND MC, FRY DE. Effects of ibuprofen, indomethacin, and imidazole on survival in sepsis. *Curr Surg.* 1987 Mar-Apr;44(2):102-5.
- SIRONI M, GADINA M, KANKOVA M, RIGANTI F, MANTOVANI A, ZANDALASINI M, GHEZZI P. Differential sensitivity of in vivo TNF and IL-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice. *Int J Immunopharmacol.* 1992 Aug;14(6):1045-50.
- SMITH, B.K.; KLUGER, M.J. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. *Am J Physiol.* v. 263 (3 Pt 2), p. R653-5. 1992
- SOUZA, G.E.P.; CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.C.; FABRICIO, A.S.C.; SILVA, V.M.S.; LORA, M.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; FERREIRA, S.H.; ZAMPRONIO, A.R. A comparative study of antipyretic profiles of indomethacin and dipyrrone in rats. *Inflam. Res.*, v.51, p.24-32, 2002.
- STITT, J.T. Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J. Physiol.*, v.368, p.501-511, 1985.
- STEINER, A. A.; LI, S.; LLANOS-Q, J.; BLATTEIS, C. M. Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation*, v. 232, p. 163-79, 2001.
- STITT, J.T. Prostaglandin E₁ fever induced in rabbits. *J. Physiol. Lond.*, v.232, p.163-179, 1973.
- SZELÉNYI, Z.; SZÉKELY, M.; MALASKÓ, M. Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; v.813, p.316-23, 1997.
- SILVA E, PEDRO MDE A, SOGAYAR AC, MOHOVIC T, SILVA CL, JANISZEWSKI M, CAL RG, DE SOUSA EF, ABE TP, DE ANDRADE J, DE MATOS JD, REZENDE E, ASSUNÇÃO M, AVEZUM A, ROCHA PC, DE MATOS GF, BENTO AM, CORRÊA AD, VIEIRA PC, KNOBEL E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study.(BASES study). *Crit Care.* Aug;8(4):R251-60, 2004

- TAVARES-MURTA BM, ZAPAROLI M, FERREIRA RB, SILVA-VERGARA ML, OLIVEIRA CH, MURTA EF, FERREIRA SH, CUNHA FQ: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 30(5):1056Y1061, 2002.
- TAVARES, E. & MIÑANO, F.J. RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. *Neuropharmacology*, v.39 (12), p.2505-13, 2000.
- TEGEDER I, PFEILSCHIFTER J, GEISLINGER G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* 2001 Oct;15(12):2057-72.Review
- THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCE (IUPS THERMAL COMISSION). Glossary of Therms fot Thermal Physiology. *Jpn. J. Physiol.*, v. 51, p. 245-280, 2001.
- Torres-Dueñas D, C.F. Benjamim, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha. FAILURE OF NEUTROPHIL MIGRATION TO INFECTIOUS FOCUS AND CARDIOVASCULAR CHANGES ON SEPSIS IN RATS: EFFECTS OF THE INHIBITION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION, REMOVAL OF INFECTIOUS FOCUS, AND ANTIMICROBIAL TREATMENT. *SHOCK*, Vol. 25, No. 3, pp. 267Y276, 2006
- TURNBULL IR, JAVADI P, BUCHMAN TG, HOTCHKISS RS, KARL IE, COOPERSMITH CM. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock*. 2004 Feb;21(2):121-5.
- VAN DISSEL JT, VAN LANGEVELDE P, WESTENDORP RG, KWAPPENBERG K, FROLICH M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998; 351(9107):950-953.
- VEIGA-SOUZA, F.H.; FABRICIO, A.S.C.; CRISTOFOLETTI, R.; SOARES, D.M.; MELO, M.C.C.; ZAMPONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P. Prostaglandins are not essential for fever induced by pre-formed pyrogenic factor. *Am. J. Physiology* (em análise).
- VIANNA RC, GOMES RN, BOZZA FA, AMÂNCIO RT, BOZZA PT, DAVID CM, CASTRO-FARIA-NETO HC. Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. *Shock*. 2004 Feb;21(2):115-20.
- VILLA, P.; SARTOR, G.; ANGELINI, M.; SIRONI, M.; CONNI, M.; GNOCCHI, P.; ISETTA, A.M.; GRAU, G.; BUURMAN,W.; VAN TITS, L.J.H.; GHEZZI, P. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.2, p.549-553, 1995.
- XIAO H, SIDDIQUI J, REMICK DG. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun.* 2006 Sep;74(9):5227-35.

- XIN, L.; BLATTEIS, C.M. Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. **Brain Res Bull.** v. 29, n. 1, p. 27-35, 1992.
- WAAGE A, BRANDTZAEG P, HALSTENSEN A, KIERULF P, ESPEVIK T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):333-8.
- WALLEY KR, LUKACS NW, STANDIFORD TJ, STRIETER RM, KUNKEL SL: Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 64:4733Y4738, 1996.
- WAN W, WETMORE L, SORENSEN CM, GREENBERG AH, NANCE DM. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull.* 1994;34(1):7-14.
- WATANABE, M. Characteristics of TNF alpha- and TNF beta-induced fever in rabbit. *Jpn. J. Physiol.*, v.42, p.101-116, 1992.
- WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.K.; TARTAGLIA, N.; GILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S.F. Blockade of interleukin-1-induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci. Lett.*, v.183, p.22-31, 1995.
- WERNER MF, FRAGA D, MELO MC, SOUZA GE, ZAMPRONIO AR. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. *Inflamm Res.* 2003 Jun;52(7):291-6.
- WISE WC, COOK JA, HALUSHKA PV, KNAPP DR. Protective effects of thromboxane synthetase inhibitors in rats in endotoxic shock. *Circ Res.* 1980 Jun;46(6):854-9.
- WOOD, K.A. & ANGUS, D.C. Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis. Pharmacoeconomic, v.22 (14), p. 895-906, 2004.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO,K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, v. 332, p. 441-445, 1988.
- ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C.A.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin- independent mechanism. Am. J. Physiol.; v.266, p.1670-4, 1994a.
- ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. Mediat. Inflamm., v.3, p.365-73, 1994b.

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

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

ZYGMUNT, P.M.; CHUANG, H. et al Eur J Pharmacol, v.396, p.39-42, 2000

9 MANUSCRITO

Effect of antipyretic drugs on fever/survival induced by cecal ligation and puncture in rats.

Maria José Figueiredo¹, Denis M. Soares¹, Alexandre Kanashiro¹, Renes Resende Machado¹, Andréa Carla Pessini¹, Juliano M. Martins¹, David do Carmo Malvar¹; Diego Torres Dueñas², Fernando de Q. Cunha², Glória E. Petto de Souza¹

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

² Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-903, São Paulo, Brazil

Running head: CLP induces fever in rats

Keywords: Temperature, prostaglandin, acetaminophen, celecoxib, CLP

Number of text pages: 39

Number of figures: 6

Address for correspondence:

Glória E.P.Souza

Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903, Campus Universitário, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, FAX + (5516) 36332960. E-mail: gepsouza@fcfrp.usp.br

Abstract

Although injection of LPS is a reasonable model of real infection, LPS- induced fever is not a “typical” fever. Cecal ligation and puncture surgery is widely accepted as a model of sepsis, acute infection, and bacterial peritonitis and could be used as a fever model since it involves a continuous pyrogenic stimulation and stimulates a real infection much better than a simple administration of LPS (simulated infection). Thus, the purpose of the present study was to investigate the mediators involved in this response as well as the effect of antipyretic therapy on fever and survival during sepsis induced by CLP.

Herein, we observed that CLP increased the level of PGE₂ at the same time of the peak of febrile response. Therefore, CLP also increased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the peritoneal cavity and serum of septic animals. In addition, we observed that the antipyretic therapy with acetaminophen (300 mg/kg) reduced the CLP-induced fever but 150 and 300mg kg⁻¹ per os increased the survival rate equally. Only 5 mg/kg of celecoxib promoted antipyresis but any dose used modified the survival rate. The raise on PGE₂ cerebrospinal fluid (CSF) levels induced by CLP was inhibited by celecoxib (2,5 and 5 mg kg⁻¹, per os) and reduced by acetaminophen (300 mg kg⁻¹ per os). Finally, we observed that the treatment with both drugs increased the levels of IL-1 β e IL-6 into the peritoneal cavity but decreased them in the serum. In conclusion, it was showed here that, in our experimental conditions, CLP induces increase in core temperature, which is highly dependent on PGE₂ generation, and that the treatment with acetaminophen can improve the state infectious. Nonetheless, further studies are necessary to understand the mechanisms involved in the induction of this response and the mechanisms action evoked by antipyretics.

Introduction

Fever is the hallmark among the defense mechanisms evoked by the entry into the body of such pathogens. The conventional view of the steps that lead to endotoxic fever production is that they begin with the biosynthesis of pyrogenic cytokines by mononuclear phagocytes stimulated by the pathogens, their release into the circulation and transport to the thermoregulatory center in the preoptic area (POA) of the anterior hypothalamus, and their induction there of cyclooxygenase (COX)-2-dependent PGE₂, the putative final mediator of the febrile response (for review see Blatteis, 2005). But recently, this classical concept have gradually been challenged (Blatteis, 2006).

For many decades, the administration of bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) has been using widely as an excellent animal model to study the mediators involved in the febrile response. Nevertheless, LPS-induced fever has not been considering the typical febrile response for many reasons. First, LPS is usually cleared from the circulation within 1h and induces relatively a short-lasting fever after its intravenous injection. Second, during an infection, a febrile response is induced and maintained for long periods of time by continuous pyrogenic stimulation (Gourine et al., 1998). Third, intraperitoneal injection of LPS promotes a rapid and exaggerated stimulation of circulating cytokines release (Johnson et al., 2002, 2003) that could be masking the contribution of neural pathways.

On the other hand, there are little clinical evidences that LPS plasma levels correlate with the development of sepsis (Elin et al 1976) and the failure of the antiendotoxin approach in clinical trials of sepsis treatment (American College of Chest Physicians...1997) also suggest that LPS is probably only one of several agents responsible for fever and sickness behaviour during infections. These data support the hypothesis that the mechanisms of LPS- induced febrile response may be different from that of naturally occurring fever.

The model of cecal ligation and puncture (CLP) is a well-described model of sepsis with features similar to those of clinical peritonitis, including polymicrobial infection (Wichterman et al., 1980; Baker et al., 1983; Hubbard et al., 2005). It is extremely simple, widely used, and well understood (Hubbard et al., 2005). In addition, it is possible to adjust the microbial dose by altering the number and size punctures, enabling modeling of moderate to severe sepsis (Wichterman et al., 1980).

In view of these evidences, the purpose of this study was to investigate the fever induced by CLP. For this we examined: 1) the relationship between fever and bacterial count in the infectious focus and blood, 2) the effect of antipyretic drugs on both fever and survival rate 3) the effect of antipyretic drugs on both CSF PGE₂ levels and cytokines levels in the infectious focus and serum.

Materials and Methods

Animals

Experiments were conducted using male Wistar rats weighing 180-200 g, housed at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 06:00 AM), with free access to rat chow and tap water until the day of the experiment, when only water became available. Each animal, including the controls, was used for experimental procedures only once. The experiments were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations in conscious animals set by the Ethical Committee of University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, SP, protocol number 148/2005.

CLP surgery

The animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg^{-1} , intraperitoneally (i.p.)). A 2-cm midline abdominal incision was made to expose the cecum. The base of the cecum was ligated with 3-0 silk just below the ileocecal valve to permit intestinal continuity. Then the antimesenteric cecal surface was punctured four times with an 16-gauge needle, the cecum was placed back into the abdominal cavity, and the incision was sutured. All animals received 5 ml of sterile isotonic saline subcutaneously (s.c.) immediately after the surgery. The control sham-operated rats had their cecum exposed but not ligated and punctured.

Thermistor implantation

In the same day of CLP surgery, under anaesthesia induced by tribromoethanol, battery-operated biotelemetry transmitters (Data Science, St. Paul, MN, USA) were aseptically implanted into the peritoneal cavity for the measurement of body temperature of rats.

Body temperature measurement

Body temperature was measured in conscious and unrestrained rats using battery-operated biotelemetry transmitters (Data Science, St. Paul, MN, USA) implanted in the peritoneal cavity. Experimental measurements were conducted in rats housed individually in a room maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (i.e. within the thermoneutral range for rats; Gordon, 1990; Romanovsky et al., 2002). Each animal was allowed to adapt to this environment for at least 1 h before any measurements. Baseline temperature was then determined 3 times, at 30 min intervals, prior to any treatments and CLP surgery, and only animals displaying mean basal temperatures between 36.8 and 37.4°C were selected for the study. Moreover, mean basal temperatures of each group have been included in the corresponding figure legends. Body temperature was recorded every 30 min for up to 48 hours after CLP surgery.

Number of bacteria in the peritoneal exudates and blood

At given times (3, 6, 12, 24 and 48h after CLP), the animals were deeply anaesthetized, the animals were exsanguinated through cardiac puncture under sterile conditions, $10\mu\text{l}$ of blood was plated on Mueller-Hinton agar dishes (Difco Laboratories). CFUs were counted after 24h incubation at 37°C , and the results were expressed as log of CFUs per milliliter of blood. Besides, the remaining collected blood was centrifuged and the serum was stored at 20°C for the following cytokine measurement. Also, the peritoneal cavities were washed with PBS. For peritoneal lavage, the skin of the abdomen was opened along the middle after thorough disinfection and without injury to the muscle. Sterile PBS (10 mL) was injected into and aspirated out of the peritoneal cavity. Aliquots of serial dilution of the peritoneal lavage fluid were plated on Mueller-Hinton agar dishes (Difco Laboratories, Detroit, Mich). Colony forming units (CFUs) were counted after 24h incubation at 37°C , and the results were expressed as log of CFUs per milliliter of peritoneal fluid. The remaining

peritoneal lavage was centrifuged stored at 20 °C for the following cytokine measurement.

CSF sampling and determination of PG levels in the CSF

A single sample of CSF was collected from each animal according to the method described by Consiglio and Lucion (2000) in different time points groups (3, 6, 12, 24 and 48 hours after CLP surgery for PGs levels and 3, 6 and 24 hours for cytokines levels). Briefly, each rat was anesthetized with ketamin (58 mg kg⁻¹) and xilazin (20 mg kg⁻¹) and fixed to the stereotaxic apparatus, with its body flexed downward. The skin covering the base of the skull and back of the neck was trichotomized and moistened with a cotton swab soaked in ethanol to reveal a small depression between the occipital protuberance and the atlas. A scalp cannula connected to a syringe was then inserted through this depression into the cistern magna, to collect 60- to 100- μ l samples that were next placed in Eppendorf tubings containing indomethacin (250 μ g/100 μ l TRIS), to stop PGs production only determination of PG levels. Samples were maintained in the dark under ice until centrifugation (1300 g, during 15 min) and immediately frozen to -20° C until analyzed. PGE₂ content in the CSF samples was determined using an enzyme immunoassay kit of specific antibodies (EIA kit, Cayman, Ann Arbor, MI, USA), having a lower limit of detection of 15pg/ml. Cross-reactivity data were as follows: 43% with PGE₃, 18.7% with PGE₁, 1% with 6-keto-PGF_{1 α} , 0.25% with 8-iso-PGF_{2 α} , less than 0.01% with all other prostanoids tested. Intra- and inter-assay coefficients of variation were \leq 10%. All samples were assayed at optimal concentrations and according to the manufacturer's instructions.

Cytokine measurements

The concentrations of TNF- α , interleukin (IL) 1 β and IL-6, in the peritoneal exudates, blood and CSF were determined using an enzyme immunoassay kit of specific antibodies (EIA kit, R&D Systems)

Briefly, 50 μ L of Assay Diluent was added to each well specific to each cytokine, after 50 μ L of standard, Control or sample was added to each well. The plate was covered with the adhesive strip and incubated for 2 hours at room temperature. After incubation and washing the plates in assay buffer, 100 μ L of rat TNF- α , IL-1 β or IL-6 Conjugate was added to each well and incubated for 2 hours at room temperature. After washing again the plates, 100 μ L of Substrate Solution was added to each and

incubated for 30 minutes at room temperature. After incubation, the reaction was stopped by the addition 100 μ L of stop solution. The optical density was read at 450 nm. The results were expressed as picograms of TNF- α , IL-1 β and IL-6 per cavity or milliliter of the peritoneal cavity, blood, and CSF respectively. All samples were assayed according to the manufacturer's instructions.

Reagents

The following drugs were employed: acetaminophen, from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; oxytetracycline hydrochloride (Terramicina[®]) and celecoxib (Celebra[®]) from Pfizer Laboratories, São Paulo, Brazil; Ketamine (Ketamina Agener[®]) from União Química Farmacêutica Nacional S.A., Brazil; Xylazine (Dopaser[®]) from Calier Laboratories S.A., Barcelona, Spain. Tribromoethanol from ACRÓS Organics, New Jersey USA, EIA Kit PGE₂ from Cayman, Arbour, MI, USA; EIA Kits of IL-1 β , IL-6 and TNF- α from R&D systems, Minneapolis USA.

Experimental protocols

In a first set of experiments, we investigated the increase of core temperature induced by different numbers of punctures. Then, rats were punctured with 1, 2, 4 or 10 times with a 16- gauge needle. Control animals (sham) had their cecum exposed but neither ligated nor punctured. Body temperature was monitored by radiotelemetry at 30-min intervals, for up to 12h after infection and the survival was evaluated during one week. The surgery was done at the same time of day (9:30-11:30 A.M.) so the circadian rhythms of the animals were identical across studies. The 4 punctures stimulation was selected for the next experiments. In addition we also evaluated the relationship between bacterial count in the peritoneal exudates and blood with abdominal temperature, at the given time points (3, 6, 12, 24 and 48 hours after CLP surgery), the CSF PGE₂ measurement (in the same points) and the cytokines levels in the CSF, peritoneal exudates and blood 3, 6 and 24 hours after stimulus.

In another series of experiments we investigated the effects the antipyretic drugs in this response. Then, the celecoxib (1, 2.5 and 5 mg kg⁻¹, *per os* [p.o.], diluted in sterile water), the acetaminophen (75, 150 and 300 mg kg⁻¹, *per os* [p.o.], diluted in sterile saline plus ethanol 10%) or their vehicles were administrated 1h after CLP. We analysed the effects of these drugs on the fever/survival or raise on CSF PGE₂ levels

induced by CLP. Rats treated with either celecoxib or acetaminophen had their CSF collected 6h after CLP.

Finally, we investigated the effect of those antipyretic drugs on cytokines levels increase induced by CLP in the peritoneal exudates and blood. For cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) measurement, rats treated with either celecoxib or acetaminophen had their samples (peritoneal exudates and blood) collected 3 and 6h after CLP.

Statistical analysis

For data analysis, the baseline temperature prior surgery was determined for each animal and all subsequent temperatures expressed as abdominal temperature. Values are presented as means \pm standard error of the mean (SEM).

Levels of PGs and cytokines were statistically analysed by ANOVA one way followed by Turkey's test. Body temperatures were compared across treatments and time points by a two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's test, by using GraphPad PRISM[®] software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences in all experiments were considered significant when $P < 0.05$. Survival rates were expressed as percentages, and a log-rank test (chi-squared test) was used to examine differences between survival curves.

Results

Effect of CLP on abdominal temperature and survival rates.

In the present study, we observed that the CLP induced long lasting increases in abdominal temperature that was stimulus dependent (Fig 1A). While 1 and 2 punctures induced modest changes in body temperature, 4 and 10 punctures caused significant increases from 3.5 to 7.5 and 8 h after infection, respectively peaking at 6 h. Probably, due to the effect of surgery sham rats did not showed the marked circadian elevation in body temperature seen after the onset of the dark period and values of temperature of CLP rats did not differ significantly from them.

Concerning the survival rates, 1, 2, 4 and 10 punctures induced 0, 42.8, 50 and 78.5%, respectively, after 7 days (Fig 1B). As 4 punctures increased the peritoneal temperature that was not different from 10 punctures and promoted a survival rate of

approximately half of animals. This stimulus was chosen for all subsequent experiments.

Bacterial count in the peritoneal exudate and blood of rats after CLP surgery

The number of bacteria was evaluated in the peritoneal exudate and blood at 3, 6, 12, 24 and 48h after CLP in order to establish the relationship between abdominal temperature and bacterial number in the infectious focus and blood. These times were selected based on the increase in the body temperature induced by this stimulus (Fig.1A). Figures 2B and C show that 6 and 12h after CLP occurred an increase in the number of bacteria in the peritoneal exudates and blood which was followed by a gradual decrease on the subsequent hours (24 and 48h).

The increase in core temperature seems to accompany the increase in the number of bacteria in the peritoneal exudates and blood.

Effect of CLP on CSF PGE₂ levels and on CSF, peritoneal exudate and blood cytokines levels

Cisternal CSF of the animals was collected 3, 6, 12, 24 and 48h after CLP. CLP significantly increased this eicosanoid 6, 12, 24 and 48h after surgery (Fig 3B) however seems not to have a relationship between the increase of abdominal temperature and CSF PGE₂ concentration.

Figs 4 A, B, C, D, E e F show cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) concentration in peritoneal exudates, sera, respectively quantified 3, 6 and 24h after CLP. In the peritoneal exudates and sera, the concentrations these cytokines were significantly increased 3 and 6h after surgery when compared with the sham group with exception TNF- α concentration in the sera (6h). CLP surgery failed to cause any detectable increase in CSF levels of these cytokines, which were all below the limit of detection of the assays (5 pg/mL for TNF- α and IL-1 β , 21 pg/mL for IL-6).

Effect of celecoxib and acetaminophen on fever/survival induced by CLP

The pos-treatment of rats with celecoxib (selective COX-2 inhibitor) reduced in a dose-dependent manner the CLP-induced fever. As shown in Fig. 5A celecoxib at 1 mg kg⁻¹ p.o. did not modified, at 2.5 mg kg⁻¹ reduced but not statistically significant

while at 5 mg kg⁻¹ reduced from 5.5 to 9 h this response. The treatment with celecoxib did not alter the survival of animals after CLP (Fig 5 B).

Figure 6A shows that acetaminophen at 300 mg kg⁻¹, p.o reduced the CLP induced fever for only 30 minutes (from 6 to 6.5h) while at 75 and 150 mg/kg⁻¹ did not modified this response. At doses of 150 and 300mg/kg acetaminophen increased 30% the survival rates of animals after CLP (Fig 6B). Neither acetaminophen (300 mg kg⁻¹) nor celecoxib (5 mg kg⁻¹) altered either the survival (100%) or basal temperature of sham animals.

Effect of celecoxib or acetaminophen on changes in CSF PGE₂ concentration

Six hours after CLP, both celecoxib (2.5 and 5mg/kg⁻¹; Fig 5C) and acetaminophen (300 mg/kg⁻¹; Fig 6C) reduced de CSF PGE₂ concentration (from 908.46 ± 167.28 to 116.66 ± 62.73, to 88.32 ± 57.03, and 818.31 ± 79,50 to 377.03 ± 45,71 respectively).

Effect of celecoxib and acetaminophen on changes in peritoneal exudate and blood cytokines concentration

Concentration of TNF-α, IL-1β and IL-6 in the peritoneal exudates and sera were significantly increased 3 and 6h after surgery when compared with the sham group with exception TNF-α concentration in the sera (6h).

Six hours after CLP the concentration of IL-1β and IL-6 were increased in the peritoneal exudates and decreased in sera in rats treated with either celecoxib (5mg/kg⁻¹) or acetaminophen (300mg/kg⁻¹) (Figs 5D and 6D respectively)

Concentration of TNF-α were decreased in the peritoneal exudates 6h after surgery in the rats treated with celecoxib. At the same time, concentration this cytokine in the sera was very low in the animals without treatment.

Discussion

The question of whether or not fever, which is also frequently known as “hallmark of infection” (BLATTEIS, 2003), is a beneficial host response remains unanswered. Many studies suggest that fever’s effect is beneficial and, by extrapolation, that suppression of fever might be detrimental in infected patients. However, both

potentially beneficial and detrimental effects of fever on components of the immune response and microorganisms have been reported (KLUGER et al., 1996; HASDAY, 1996; JIANG et al., 2000, SU et al., 2005).

The known beneficial effects of fever include impaired bacterial growth (MACKOWIAK, 1981), reduced virus replication, enhanced host response by increasing natural killer cell activity (ROWSEY, 1997), T cell activation, and mononuclear cell production of cytokines (JAMPEL et al 1983; ROBERTS & SANDBERG, 1979). However, there are a few clinical studies that address the role of fever or the effect of antipyresis on morbidity and mortality during infectious process (KLASTERSKY et al., 1970; BERNARD et al., 1997; HASDAY et al 2000).

The sepsis syndrome is characterized by such pathophysiological changes as hypotension, hypothermia or fever, metabolic acidosis, pulmonary hemorrhage and death within several minutes to hours (BONE et al 1989). In the present study, we used a clinically relevant model of sepsis, cecal ligation and puncture (CLP) surgery, which is a known model of polybacterial peritonitis, to study the mediators involved in this response as well as the effect of antipyretic therapy on fever and survival during sepsis induced by CLP. This model involves a continuous pyrogenic stimulation and simulates a real infection much better than infusion of constant amounts of LPS.

The current study shows clearly that CLP induces long lasting increases in abdominal temperature that was dependent of the number of punctures. Furthermore, it was demonstrated that the increase in the body temperature due CLP was not related with bacterial count in the infectious focus (peritoneal exudate) and blood. However 48h after infection occurred both reduction in fever and bacterial proliferation suggesting that after this time the animals that survive were able to control the infection. In addition, this raise on abdominal temperature was accompanied by both raise on CSF PGE₂ levels and on peritoneal exudates/blood cytokines levels.

The ability of cyclooxygenase (COX) inhibitors, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, to prevent the febrile response was understood clinically long before their mechanism of inhibiting prostaglandin (PG) synthesis was known, or it was shown that they could inhibit experimental fever (FELDBERG & SAXENA, 1975). Furthermore, COX-2-derived PGE₂ has been thought to be the key eicosanoid involved in fever response (YAMAGATA et al, 2001; INOUE et al., 2002) Besides COX-2

inhibition, other mechanisms may be involved on the antipyretic/antiinflammatory activity of celecoxib.

Recently, studies have demonstrated that celecoxib is able to suppress the activity of NF-kB, p38 MAP kinase and AP-1, nuclear transcription factors responsible by expression of several pro-inflammatory mediators, including cytokines and COX-2 (SHISCHODIA et al, 2004 a e b). Nonetheless, according to our knowledge, there are no studies showing the effects of antipyretic drugs about both PGE₂ or cytokines levels and survival rate during the fever induced by CLP.

In the present study, treatment with celecoxib, a selective inhibitor of COX-2, reduced in a dose-dependent manner (1, 2.5, 5 mg kg⁻¹) the CLP-induced fever, but only 5mg/kg was significant. However, 2.5 and 5 mg kg⁻¹ reduced equally CSF PGE₂ levels. On the other hand, the treatment with this drug increases the survival rate, but not significantly.

Another drug used in this study was acetaminophen, which is one of the most popular and widely used drugs for the treatment of pain and fever. In the present study, we observed that the treatment with acetaminophen (75, 150 mg kg⁻¹) did not reduce the CLP-induced fever; however, 300 mg kg⁻¹ reduced both the fever and the CSF PGE₂ levels. On the other hand, the treatment with 150 and 300 mg kg⁻¹ increases equally the survival rate.

In agreement with our results, two retrospective studies, administration of acetaminophen was an independent predictor of survival in patients with *Escherichia coli* bacteremia (KUIKKA et al., 1997) and *Pseudomonas aeruginosa* sepsis (KUIKKA & VALTONEN 1998). Interestingly, both studies, also demonstrated that use of acetaminophen and improvement in survival were not correlated with reduction in core temperature.

Beside of the effects of both drugs on CLP-induced fever, other mechanisms than inhibition of PGE₂ synthesis appear to be involved. Cytokines play a major role in orchestrating the anti-infectious process. They can improve the microbicidal activities of phagocytosing cells and the recruitment of leucocytes towards the site of infection as well as inducing a febrile response.

A great number of bacterial compounds activate the production and release of cytokines by leucocytes and neurons. Because of their exacerbated production, proinflammatory cytokines can be detected in many biological fluids, particularly in the bloodstream.

In the present study, the CLP increased the cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) levels in the exudate peritoneal and serum, but failed to cause any detectable increase in CSF, which were all below the limit of detection of the assay. Among all cytokines which are implicated in fever, only IL-6 is consistently increased in plasma and frequently elevated in the brain under most conditions which are accompanied by a febrile response (ROTH et al., 2004).

Gourine et al., 1998 shown that fever due to bacterial sepsis, unlike endotoxin-induced fever, is not accompanied by elevation in the hypothalamic concentration of IL-6. The absence of CSF IL-6 levels in our results corroborates this work.

Finally, we investigated the effects of celecoxibe and acetaminophen on cytokines levels in peritoneal exudate and serum. The treatment with celecoxib and acetaminophen increased IL-1 β and IL-6 levels in the exudate peritoneal and decreased in the serum 6h after CLP. With relation TNF- α level, the treatment with celecoxib and acetaminophen decreased and increase respectively this parameter on peritoneal exudates, but both reduced in the serum 6h after CLP.

Studies have also shown that the severity of sepsis correlates with systemic release of proinflammatory cytokines (WALLEY et al., 1996, EBONG et al, 1999). It is important to mention that although the proinflammatory cytokines when present in the inflammatory site induce neutrophil migration, their presence in high concentrations in the circulation inhibits the leukocyte migration process to infectious focus. Similarly, high serum concentrations of proinflammatory cytokines were observed in models of severe sepsis, in which FNM (failure of neutrophil migration) is observed (BENJAMIN et al., 2002, TORRES DUENÁS et al, 2006), and also in patients with severe sepsis (TAVARES-MURTA et al., 2002).

The most consistent correlations of clinical severity in inflammatory, autoimmune or infectious disease with plasma cytokine levels are clearly those with IL-6. Increasing concentrations of IL-6 have been shown to correlate with severity of

sepsis (DAMMAS et al, 1992; CASEY et al., 1993; FISHER et al., 1993) and clinical complications (BAIGRIE et al., 1992). Furthermore, multiple other reports demonstrated that high levels of IL-6 in the early phases of sepsis in experimental animal models predict early mortality (TURNBULL et al., 2004; VIANNA et al., 2004; REMICK et al., 2002). However, the plasma levels of IL-6 in the late phase of sepsis were not as predictive and also were not as elevated (XIAO et al., 2006).

Our results show that celecoxibe also reduced the serum concentration of IL-6 and did not alter the survival, suggests the possibility that another mechanism, other than the reduction of serum IL-6 is involved in raising the survival induced by paracetamol.

Fever is probably one of most common adaptive response to infection or injury. This study contributes understanding of fever induced by CLP, a complex infection process, and suggests that it can be used as a animal model for studying the fever response. Herein, we demonstrated clearly that during sepsis does not exist for antipyretics drugs a correlation between survival and antipyresis well as between the fever and the concentration of PGs in CSF or cytokines circulating. In our experimental conditions, the importance of fever on the survival as well as the use of antipyretic therapy as a strategy to improve survival in sepsis was discussed. However, our results cannot be overestimated due to the fact that they are highly influenced by a great number of limitations, including the time course of drug administration, the animal species, the experimental model of sepsis as well as the severity of sepsis (number of punctures). Finally, further studies are necessary to elucidate (1) additional chemical mediators involved in this response, including endothelins (FABRICIO et al 1998), chemokines (MACHADO et al, 2007, MELO SOARES, 2006) and hormones, (2) The effect of surgery and antipyretics drugs on another parameters (blood pressure) and (3) other mechanisms of action by which these antipyretics drugs widely used on whole world influenced in the CLP-induced fever.

Acknowledgements: We are grateful to Miriam Cristina Contin de Melo, Juliana Aparecida Vercesi for their technical assistance. We also thank the CAPES and FAPESP for financial support.

Figure legends

Figure 1 – Effect of CLP on abdominal temperature and survival rate of rats. The cecum of animals was punctured 1, 2, 4 or 10 times with a 16-gauge needle. Sham-operated animals were used as controls. Body temperature was recorded during 12 hours after infection. Solid bar on x-axis indicates the dark phase (active phase) of light-dark cycle. Basal temperatures (mean \pm SEM; °C) were the following: (■) 37.0 ± 0.03 (n = 16); (□) 37.2 ± 0.05 (n = 14); (Δ) 37.20 ± 0.06 (n = 14); (●) 37.10 ± 0.07 (n = 14); (○) 37.2 ± 0.06 (n = 7). Values represent the means \pm SEM of body temperature of 7 to 16 animals per group. (A) *P < 0.05 when compared to control group (Two way ANOVA, followed by Bonferroni's test). Survival was monitored during one week after CLP (B). Results are expressed as percent survival (*P < 0.05 compared with sham group, Mantel-Cox log-rank test).

Figure 2 – Determination of colony forming units (CFU) of bacteria in the peritoneal exudates and blood after CLP. In A the mean of body temperature of animals before the collection of peritoneal exudates and blood. Values represent the means \pm SEM of body temperature of 8 to 12 animals per group. Basal temperatures (mean \pm SEM; °C) were the following: Zero time, 37.0 ± 0.05 ; Sham: (3h) 37.5 ± 0.11 ; (6h) 37.4 ± 0.06 ; (12h) 37.6 ± 0.15 ; (24h) 37.2 ± 0.19 ; (48h) 37.4 ± 0.02 ; CLP (3h) 37.6 ± 0.3 ; (6h) 39.3 ± 0.19 ; (12h) 38.6 ± 0.2 ; (24h) 38.2 ± 0.09 ; (48h) 37.5 ± 0.05 . *P < 0,05 when compared to control group (Two way ANOVA, followed by Bonferroni's test). The CFU was determined in the peritoneal exudates (B) and blood (C) collected at 3, 6, 12, 24 and 48h after CLP. In B e C results are expressed as Log de CFU/ml in exudates and blood respectively; * P < 0.05 when compared control group; ** P < 0.01 when compared control group; # P < 0.05 when compared 12h group.

Figure 3 – Effect of CLP on CSF PGE₂ levels

In B the raise on CSF PGE₂ levels induced by CLP in different times. In A, mean of body temperature of animals before the collection of CSF. Values represent the means \pm SEM of body temperature of 4 to 5 animals per group. Basal temperatures (mean \pm SEM; °C) were the following: Zero time, 36.9 ± 0.05 ; Sham: (3h) 37.6 ± 0.25 ; (6h) 37.4 ± 0.06 ; (12h) 37.7 ± 0.15 ; (24h) 37.3 ± 0.19 ; (48h) 37.2 ± 0.02 ; CLP (3h) 37.8 ± 0.3 ;

(6h) 40.1 ± 0.19 ; (12h) 38.4 ± 0.2 ; (24h) 37.7 ± 0.09 ; (48h) 37.5 ± 0.12 . * $P < 0.05$ when compared sham group.

Figure 4- Effect of CLP on peritoneal exudate and blood cytokines levels

In A and B the raise on peritoneal exudates and serum cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) levels, respectively induced in different times after CLP.

Figure 5 - Effect of treatment with celecoxib on fever/survival, CSF PGE₂ levels and peritoneal exudate and sera cytokines levels induced by CLP.

Animals were treated with celecoxib (Celec, 1; 2.5 e 5 mg kg⁻¹) or sterile water (H₂O, 0.5 ml animal) by oral gavage 1h after CLP. Control animals received celecoxib (5 mg kg⁻¹, p.o). Abdominal temperature was recorded during 12h hours after infection. Solid bar on x-axis indicates the dark phase (active phase) of light-dark cycle. In A, values represent the means \pm SEM of abdominal temperature of 8 animals per group. Basal temperatures (mean \pm SEM; °C) were the following: (■) 36.9 ± 0.05 ; (●) 37.0 ± 0.05 ; (□) 37.0 ± 0.08 ; (△) 37.0 ± 0.05 ; (◇) 37.0 ± 0.05 * $P < 0.05$ when compared CLP group (Two way ANOVA, followed by Bonferroni's test). In B, Survival was monitored during one week after CLP. Results are expressed as percent survival. In C the effect of celecoxib (2.5 and 5 mg/kg) on changes in CSF PGE₂ levels induced by CLP in rats. CSF was harvested 6h after CLP. PGE₂ levels were determined by ELISA. Values represent means \pm SEM of the concentration pg ml⁻¹ of PGE₂ in the CSF of 4 to 6 animals. * $P < 0.05$ when compared CLP group. In D, the effect of celecoxib (5mg/kg⁻¹) on exudates peritoneal cytokines levels and serum cytokines levels. Cytokines levels were determined by ELISA. Values represent means \pm SEM of the concentration pg ml⁻¹ of cytokines in the peritoneal exudates and serum of 4 to 5 animals. * $P < 0.05$ when compared CLP group.

Figure 6 – Effect of acetaminophen on fever/survival, CSF PGE₂ levels and peritoneal exudate and sera cytokines levels induced by CLP.

In A, Rats were treated with acetaminophen (75, 150 or 300 mg kg⁻¹, p.o) 1h after CLP. Control animals received acetaminophen (300 mg kg⁻¹, p.o). Body temperature was recorded during 12 hours after infection. Solid bar on x-axis indicates the dark phase (active phase) of light-dark cycle. Values represent the means \pm SEM of body temperature of 8 to 10 animals per group. Basal temperatures (mean \pm SEM; °C) were the following: (■) 37.0 ± 0.04 ; (●) 37.0 ± 0.06 ; (□) 37.0 ± 0.06 ; (△) 36.8 ± 0.05 ; (○) 36.9 ± 0.03 . * $P < 0.05$ when

compared CLP group (Two way ANOVA, followed by Bonferroni's test). In B, survival was monitored during one week after CLP. Results are expressed as percent survival (* $P < 0.05$ compared with CLP group, Mantel-Cox log-rank test).

In C the effect of acetaminophen (150 and 300 mg/kg) respectively on changes in CSF PGE₂ levels induced by CLP in rats. The CSF was harvested from cistern magna of the rats 6h after CLP. PGE₂ levels were determined by ELISA. Values represent means \pm SEM of the concentration pg ml⁻¹ of PGE₂ in the CSF of 4 to 6 animals. * $P < 0.05$ when compared CLP group. In D, the effect of acetaminophen (300 mg/kg⁻¹) on exudates peritoneal cytokines levels and serum cytokines levels. Cytokines levels were determined by ELISA. Values represent means \pm SEM of the concentration pg ml⁻¹ of cytokines in the peritoneal exudates and serum of 4 to 5 animals. * $P < 0.05$ when compared CLP group.

Figure 1

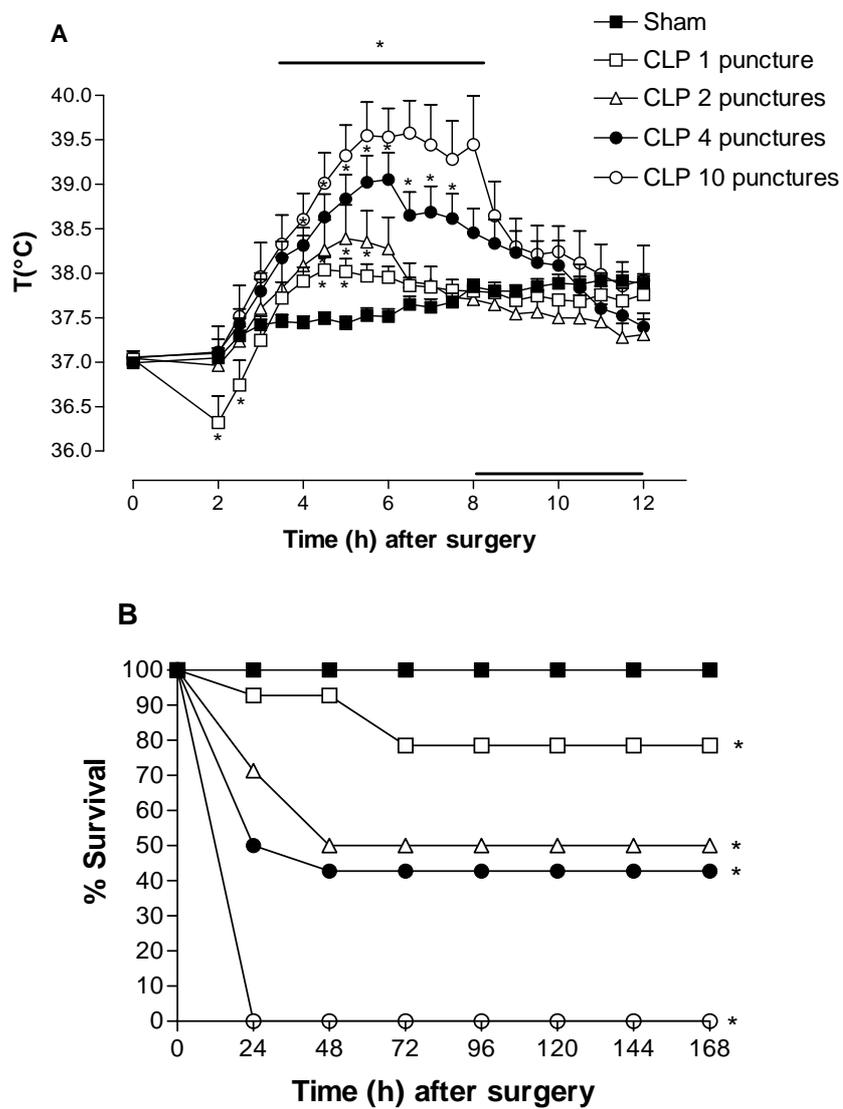


Figure 2

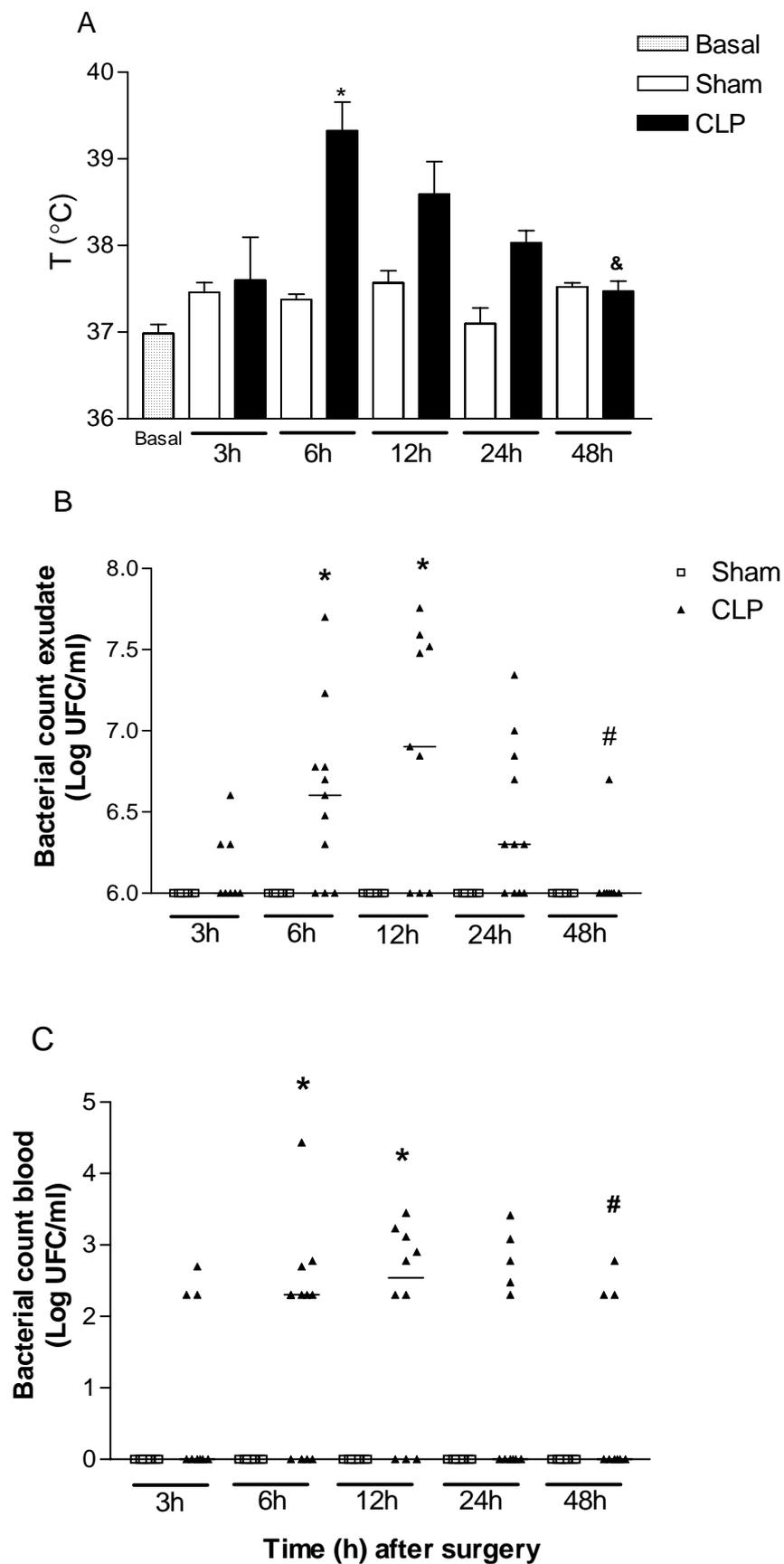


Figure 3

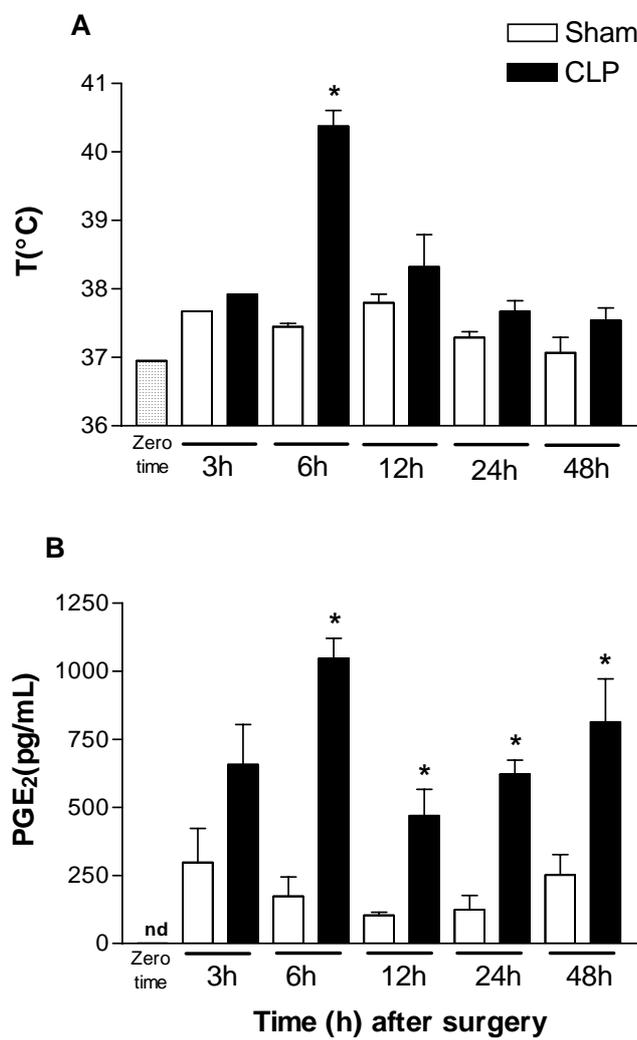


Figure 4

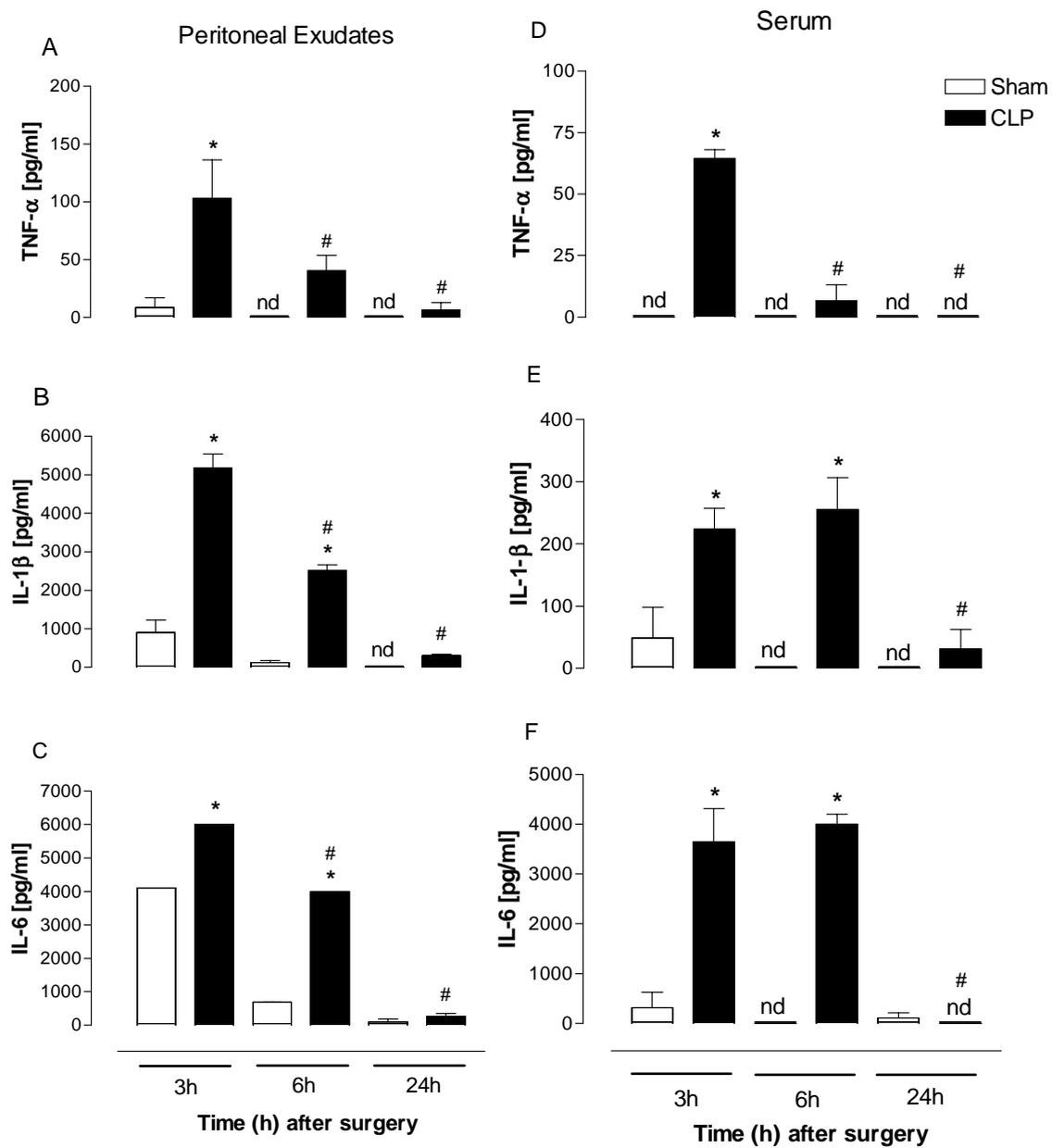
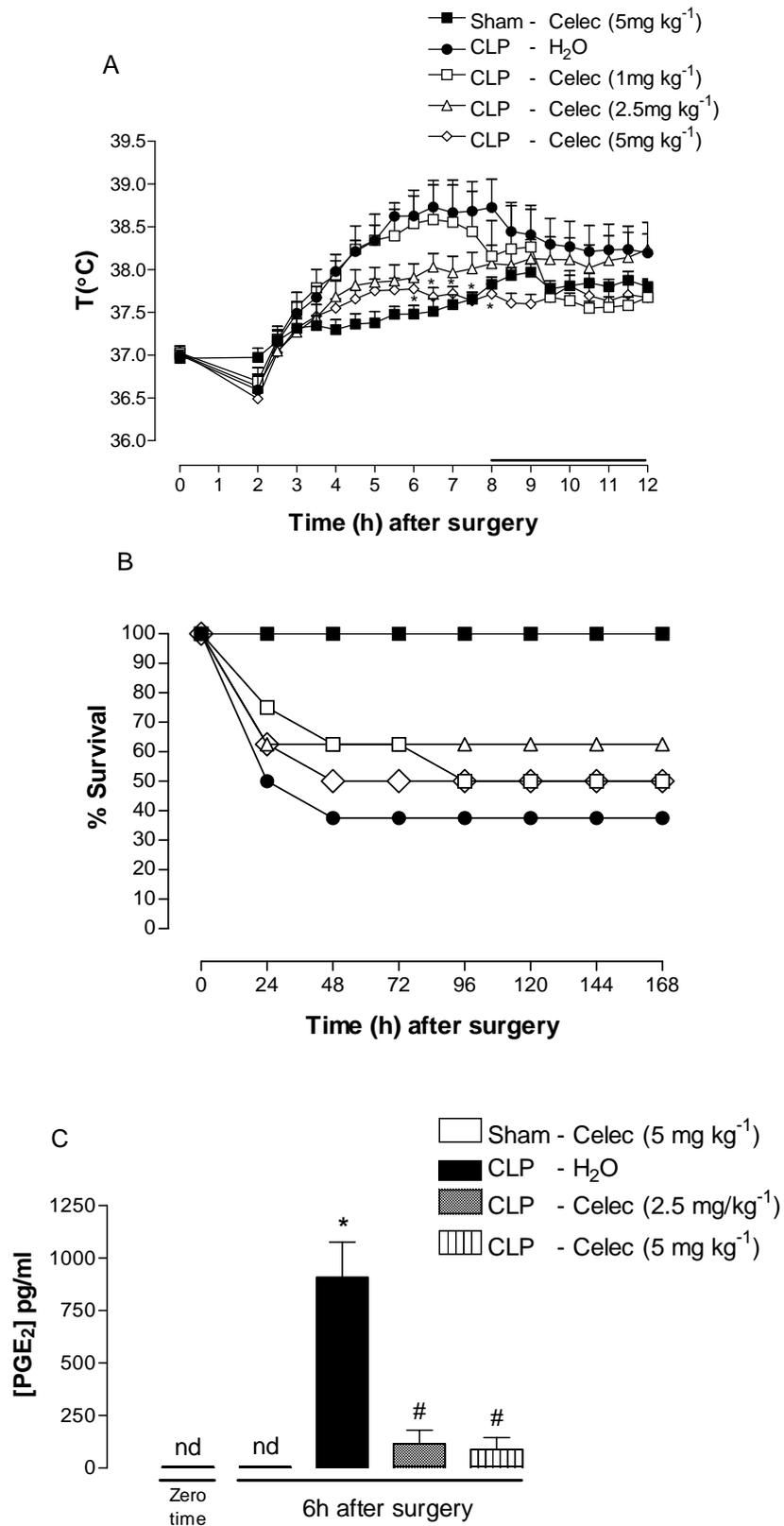


Figure 5



D

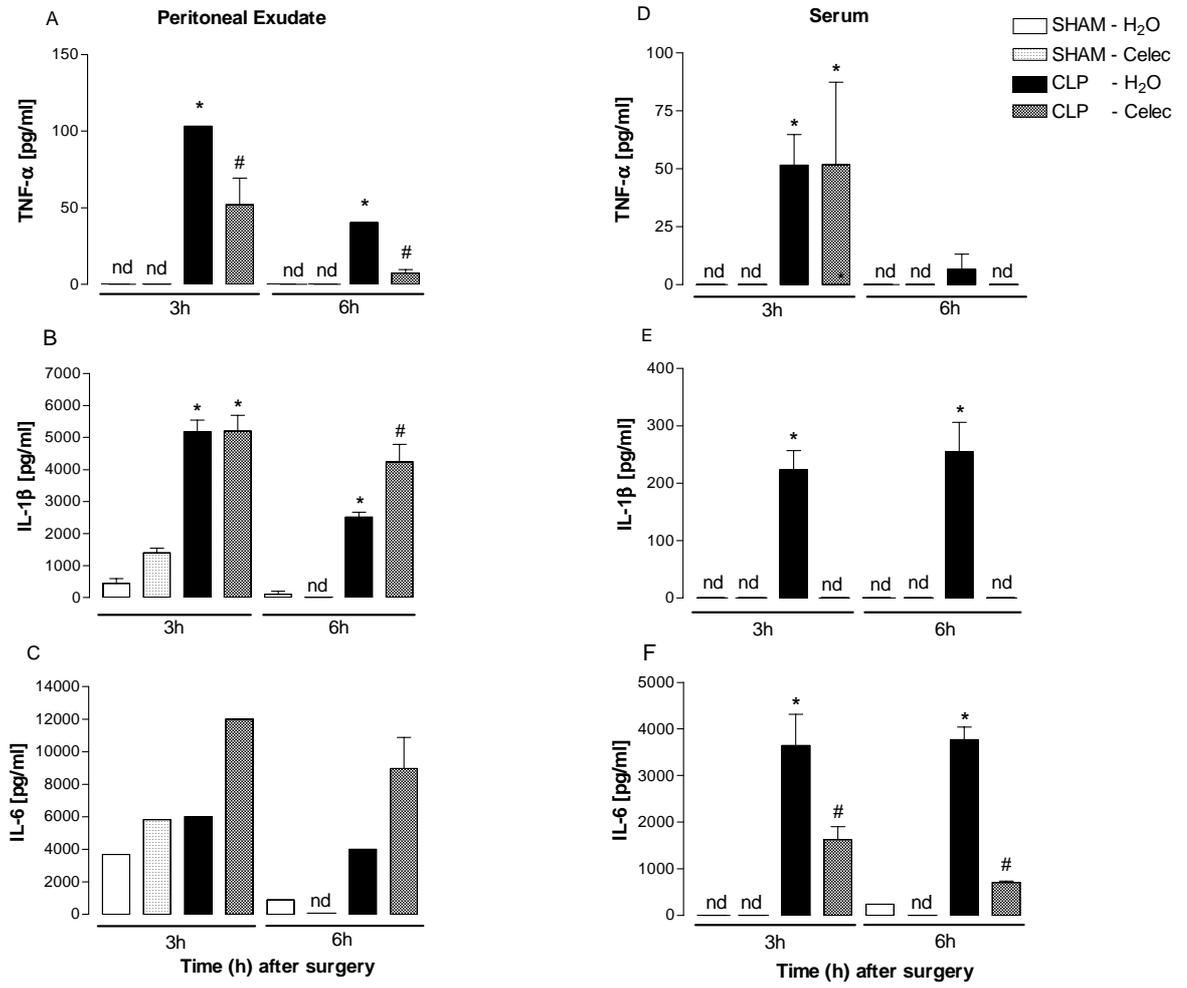
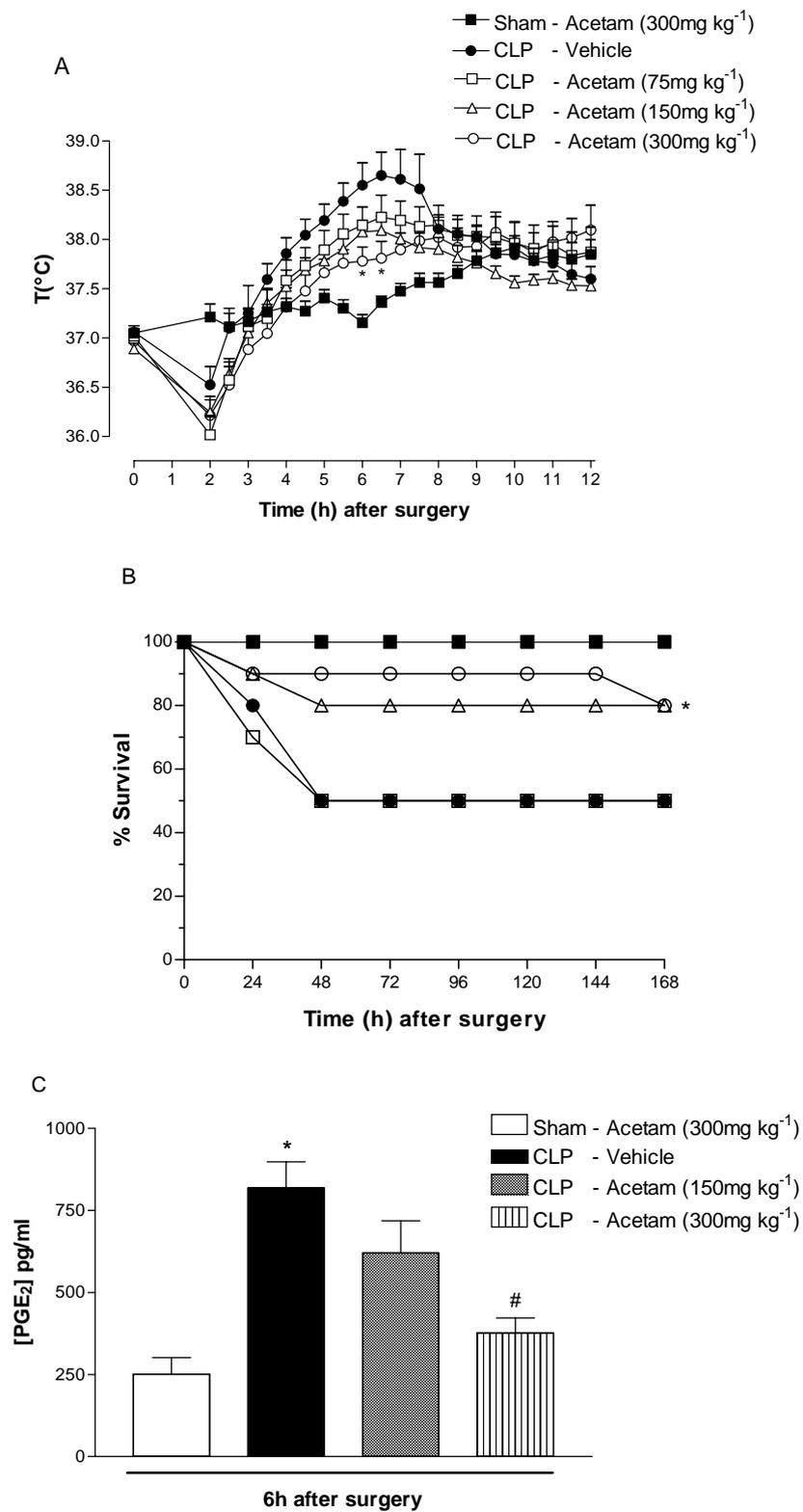
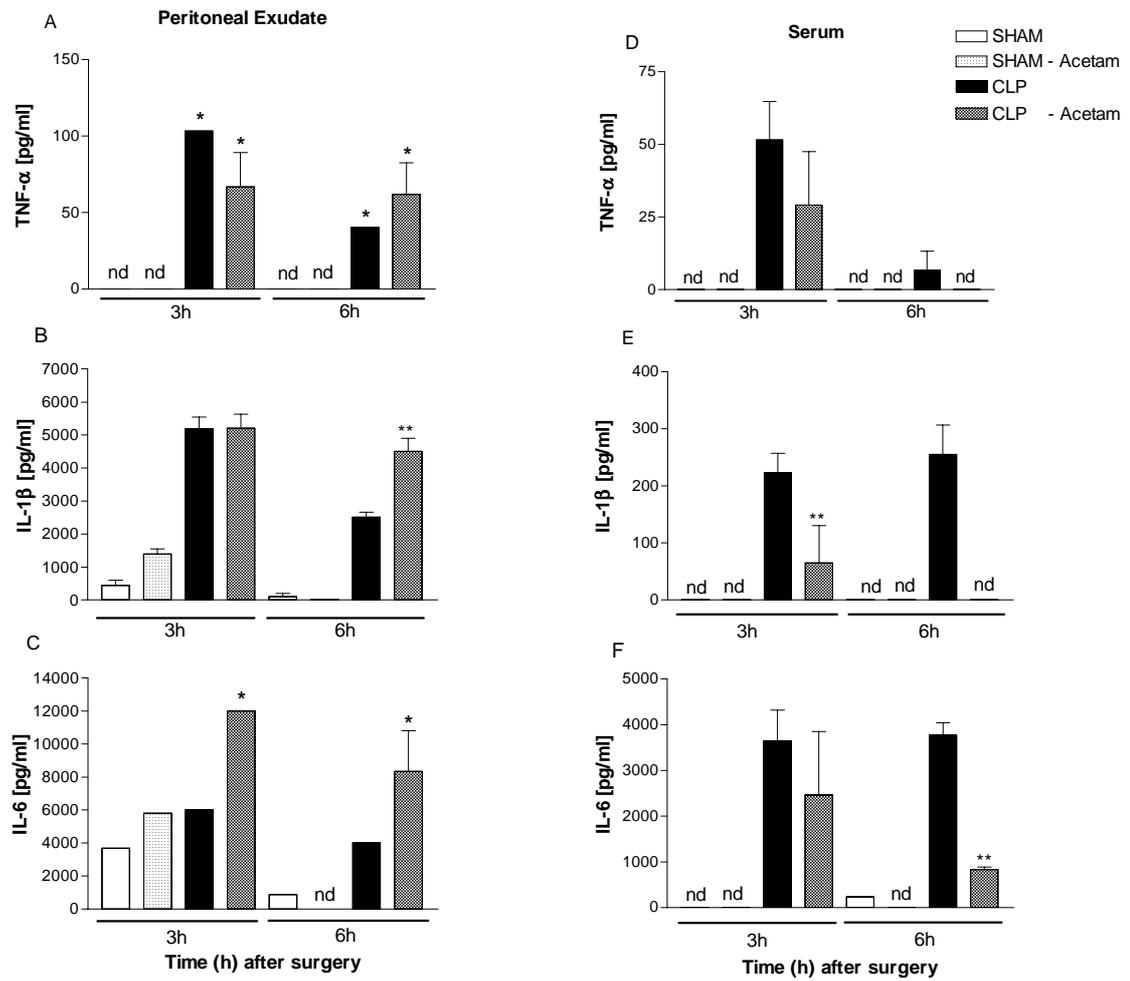


Figure 6



D



References

- AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIONS DISEASE, AND NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. From the bench to the bedside: the future of sepsis research. Chest, v.111, p.744-753, 1997.
- BAIGRIE RJ, LAMONT PM, KWIATKOWSKI D, DALLMAN MJ, MORRIS PJ. Systemic cytokine response after major surgery. Br J Surg. 1992 Aug;79(8):757-60
- BAKER CC, CHAUDRY IH, GAINES HO, BAUE AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. Surgery. 1983 Aug;94(2):331-5.
- BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ:Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. Infect Immun 70(7):3602Y3610, 2002.
- BERNARD G.R., WHEELER A.P., RUSSEL J.A., SCHEIN R. et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The New England Journal of Medicine 1997; 336: 912-8.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. Pharmacology & Therapeutics, v.111, p.194-223, 2006.
- BLATTEIS, C.M., LI, S., LI, Z., FELEDER, C., AND PERLIK, V. Cytokines, PGE₂ and endotoxic fever: a re-assessment. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005, v.76, p.1-18, 2005
- BLATTEIS, C.M. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? J. Therm Biol 2003, 28:1-13.
- BONE, R.C.; FISHER, C.J.; CLEMMER, T.D.; SLOTMAN, G.J.; METZ, C.A. and BALK, R.A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Crit Care Med, v.17, p.389-393, 1989.
- CASEY LC, BALK RA, BONE RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993 Oct 15;119(8):771-8.
- CONSIGLIO AR, LUCION AB. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. Brain Res Protoc. Feb;5(1):109-14, 2000.
- DAMAS P, LEDOUX D, NYS M, VRINDTS Y, DE GROOTE D, FRANCHIMONT P, LAMY M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. Ann Surg. 1992 Apr;215(4):356-62
- D. TORRES-DUEÑAS, C.F. BENJAMIM, S.H. FERREIRA, AND F.Q. CUNHA. FAILURE OF NEUTROPHIL MIGRATION TO INFECTIOUS FOCUS AND CARDIOVASCULAR CHANGES ON SEPSIS IN RATS: EFFECTS OF THE INHIBITION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION, REMOVAL OF INFECTIOUS FOCUS, AND ANTIMICROBIAL TREATMENT. SHOCK, Vol. 25, No. 3, pp. 267Y276, 2006

- EBONG, S.; CALL, D.; NEMZEK, J.; BOLGOS, G.; NEWCOMB, D.; REMICK, D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. Infection and Immunity, v.67 (12), p.6603-6610, 1999.
- ELIN, R.J.; ROBINSON, R.A.; LEVINE, A.S.; WOLFF, S.M. Lack of clinical usefulness of the limulus test and the diagnosis of endotoxemia. N. Engl. J. Med., v.293, p.521-524, 1975. 1976
- ENGBLOM, D.; SAHA, S.; ENGSTROM, L.; WESTMAN, M.; AUDOLY, L. P.; JAKOBSON, P. J.; et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. Nature Neurosc., v. 6, p. 1137-8, 2003. 2004
- FABRÍCIO, A.S.C.; SILVA, C.A.A.; RAE, G.A.; D ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.P. Essential role for endothelin ET_B receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. Br. J. Pharmacology, v.128, p.1-7, 1998.
- FELDBERG W, SAXENA PN. Effects on body temperature of rats produced by prostaglandins, endotoxin, lipid A and antipyretics. J Physiol. 1975 Feb;245(2):101P-102P.
- FISHER CJ JR, OPAL SM, DHAINAUT JF, STEPHENS S, ZIMMERMAN JL, NIGHTINGALE P, HARRIS SJ, SCHEIN RM, PANACEK EA, VINCENT JL, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. Crit Care Med. 1993 Mar;21(3):318-27.
- GOURINE, A.V.; RUDOLPH. K.; TESFAIGZI, J.; KLUGER, M.J. Role of hypothalamic interleukin-1 β in fever induced by cecal ligation and puncture in rats. Am. J. Physiol, v.275, p.754-761, 1998.
- HASDAY, J.D.; GARRISON, J. D. Antipyretic therapy in patients with sepsis. Clinical Infectious diseases, v.31, p. S234-41, 2000.
- HASDAY JD. The influence of temperature on host defenses. In: Mackowiak PA, ed. Fever: Basic mechanisms and management. 2ed. New York: Raven Press, 1996: 87-116.
- HUBBARD, W.J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M.G.; KERBY, J.D.; et al. Cecal ligation and puncture. Shock, v.24, S.1, p.52-57, 2005.
- INOUE, W; MATSUMURA K; YAMAGATA K; TAKEMIYA T; SHIRAKI T; KOBAYASHI S. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E2 synthesis enzymes and its temporal relation to fever. Neuroscience Research v.44 (2002) p.51-61
- JAMPEL HD, DUFF GW, GERSHON RK, ATKINS E, DURUM SK. Fever and immunoregulation. III. Hyperthermia augments the primary in vitro humoral immune response. J Exp Med. 1983 Apr 1;157(4):1229-38.
- JIANG Q, CROSS AS, SINGH IS, CHEN TT, VISCARDI RM, HASDAY JD. Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis. Infect Immun. 2000 Mar;68(3):1265-70

- JOHNSON JD, O' CONNOR KA, DEAK T, STARK M, WATKINS LR, AND MAIER SF. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* 16: 461-476, 2002.
- JOHNSON JD, O' CONNOR KA, HANSEN MK, WATKINS LR, AND MAIER SF. Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R422-R432, 2003.
- KLASTERSKY J, KASS EH. Is suppression of fever or hypothermia useful in experimental and clinical infectious diseases? *J Infect Dis.* 1970 Jan;121(1):81-6.
- KLUGER MJ, KOZAK W, CONN CA, LEON LR, SOSZYNSKI D. The adaptive value of fever. *Infect Dis Clin North Am.* 1996 Mar;10(1):1-20.
- KUIKKA A, SIVONEN A, EMELIANOVA A, VALTONEN VV. Prognostic factors associated with improved outcome of *Escherichia coli* bacteremia in a Finnish university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997 Feb; 16(2):125-34.
- KUIKKA A, VALTONEN VV. Factors associated with improved outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Finnish university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998 Oct; 17(10): 701-8.
- MACHADO, R.R.; SOARES, D.M.; PROUDFOOT, A.E.; SOUZA, G.E.P. CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (*E. coli*) and RANTES in rats *Brain Res.* Aug 3;1161:21-31, 2007.
- MACKOWIAK PA. Direct effects of hyperthermia on pathogenic microorganisms: Teleologic implications with regard to fever. *Rev Infect Dis.* 1981 May-Jun;3(3):508-20
- MELO SOARES, D.; HIRATSUKA VEIGA-SOUZA, F.; SUELI COELHO FABRICIO, A.; JAVIER MINANO, F.; PETTO SOUZA, G.E. CCL3/Macrophage inflammatory protein-1alpha induces fever and increases prostaglandin E(2) in cerebrospinal fluid of rats: Effect of antipyretic drugs. *Brain Res.*, v.1109, p.83-92, 2006.
- REMICK DG, BOLGOS GR, SIDDIQUI J, SHIN J, NEMZEK JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock.* 2002 Jun;17(6):463-7.
- ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol. Clin.*, v.24, p.421-439, 2006
- ROBERTS NJ JR, SANDBERG K. Hyperthermia and human leukocyte function. II. Enhanced production of and response to leukocyte migration inhibition factor (LIF). *J Immunol.* 1979 May;122(5):1990-3.
- ROWSEY PJ. Pathophysiology of fever. Part 2: Relooking at cooling interventions. *Dimens Crit Care Nurs.* 1997 Sep-Oct;16(5):251-6.
- SHISHODIA S, AGGARWAL BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-KappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung

- carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res.* 2004 Jul 15; 64(14):5004-12.
- SHISHODIA S, KOUL D, AGGARWAL BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase and Akt in human non small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol.* 2004 Aug 1; 173(3):2011-22.
- SU F, NGUYEN ND, WANG Z, CAI Y, ROGIERS P, VINCENT JL. Fever control in septic shock: beneficial or harmful? *Shock.* 2005 Jun;23(6):516-20.
- TAVARES-MURTA BM, ZAPAROLI M, FERREIRA RB, SILVA-VERGARA ML, OLIVEIRA CH, MURTA EF, FERREIRA SH, CUNHA FQ: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 30(5):1056Y1061, 2002.
- TURNBULL IR, JAVADI P, BUCHMAN TG, HOTCHKISS RS, KARL IE, COOPERSMITH CM. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock.* 2004 Feb;21(2):121-5.
- VIANNA RC, GOMES RN, BOZZA FA, AMÂNCIO RT, BOZZA PT, DAVID CM, CASTRO-FARIA-NETO HC. Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. *Shock.* 2004 Feb;21(2):115-20.
- YAMAGATA K, MATSUMURA K, INOUE W, SHIRAKI T, SUZUKI K, YASUDA S, SUGIURA H, CAO C, WATANABE Y, KOBAYASHI S. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci.* 2001 Apr 15;21(8):2669-77
- WALLEY KR, LUKACS NW, STANDIFORD TJ, STRIETER RM, KUNKEL SL: Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 64:4733Y4738, 1996.
- WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980 Aug;29(2):189-201
- XIAO H, SIDDIQUI J, REMICK DG. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun.* 2006 Sep;74(9):5227-35.

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](#)