

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
TOXICOLÓGICA**

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO  
MODELO DE FEBRE INDUZIDA PELA INJEÇÃO  
INTRATECAL DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM RATOS  
JOVENS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Viviane Ratzlaff**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2006**

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO MODELO  
DE FEBRE INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM RATOS JOVENS**

**por**

**Viviane Ratzlaff**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE FEBRE  
INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>  
EM RATOS JOVENS**

elaborada por  
**Viviane Ratzlaff**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Comissão Examinadora:**

---

**Dr. Carlos Fernando de Mello  
(Presidente/Orientador)**

---

**Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC)**

---

**Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)**

**Santa Maria, 07 de dezembro de 2006.**

*Dedico esta dissertação à  
minha família,  
pelo apoio em todos os  
momentos de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre junto de mim, iluminando meu caminho, fazendo com que eu tomasse as decisões certas e não desistisse diante dos desafios e insucessos.

Aos meus pais, Valdir e Nelci, pelo incentivo ao estudo, pelo carinho, amor, palavras de estímulo e pelo exemplo de vida que representam para mim. A minha avó Helga, por encher minha vida de alegria. A minha irmã Fabiana, pela companhia, pelos conselhos, por estar sempre pronta para ouvir minhas lamentações e vibrar pelas minhas conquistas. Aos meus tios, Sadi e Maria Cristina, por torcerem sempre pelo meu sucesso. Amo muito todos vocês!

Ao meu amor, Rafael, que foi quem acompanhou mais de perto minha trajetória na realização deste trabalho, agradeço pelo incentivo, companheirismo, amor, paciência e compreensão em todos os momentos. Você é muito importante para mim!

Agradeço ao meu orientador, professor Carlos Mello, por acolher-me no seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, momentos de descontração, pela compreensão quanto ao meu tempo reduzido para ficar no laboratório. Sentimos sua falta durante o Pós-Doutorado, mas a sua “ausência” contribuiu para que aprendêssemos a tomar decisões e resolver os problemas sozinhos. Obrigada por tudo, de coração!

Aos queridos colegas do grupo da Pirexia, Jú, Aninha, André e Rosália, agradeço pela infinita disponibilidade, pela amizade, pela dedicação e responsabilidade. A realização deste trabalho só foi possível graças a todos vocês! Faço um agradecimento especial a Jú, pela “mão abençoada”, que aprendeu a injeção intratecal tão rápido e com tanta perfeição.

Aos demais colegas de laboratório, pela convivência agradável, pela ajuda, pelos momentos de alegria e por compartilharem comigo angústias e dúvidas. Descobri em vocês grandes amigos!

Aos meus colegas do DACT, pelo incentivo e as palavras amigas. Em especial, agradeço ao professor José Édson, por me conceder a flexibilidade de horários necessária para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao professor Juliano Ferreira, pela atenção e disponibilidade para discutir os resultados dos experimentos. Obrigada pelas sugestões e conhecimentos compartilhados!

Aos demais professores do curso, pelos importantes ensinamentos.

Agradeço a ajuda técnica dos funcionários Srs. Florindo e Paulino.

E a todos os meus amigos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste sonho.

*O que for a profundezza do teu ser,  
assim será teu desejo.  
O que for teu desejo,  
assim será tua vontade.  
O que for a tua vontade,  
assim serão teus atos.  
O que forem teus atos,  
assim será teu destino.*

Brihadaranyaka Upanishad IV, 4.5

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE FEBRE INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM RATOS JOVENS**

AUTORA: Viviane Ratzlaff

ORIENTADOR: Carlos Fernando de Mello

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de dezembro de 2006.

A febre, apesar de fazer parte da resposta de defesa do hospedeiro à infecção ou inflamação, está associada com desconforto e ansiedade, além de representar um risco iminente de convulsões febris em crianças. Por isso, terapia antipirética é rotineiramente prescrita a pacientes febris. Os modelos animais de febre empregando a injeção sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) e fermento de padeiro, descritos na literatura, são úteis para a triagem de novos antipiréticos, mas não fornecem informações a respeito do mecanismo de ação desses compostos. Diante disso, o presente estudo objetivou padronizar e validar um modelo de indução de febre por prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>, o mediador final da resposta febril no sistema nervoso central, em ratos machos jovens da raça Wistar (25-30 dias). Neste protocolo, a PGE<sub>2</sub> foi injetada pela via intratecal (i.t.), não necessitando a implantação de cânula. A temperatura retal (T<sub>R</sub>) foi registrada a cada trinta minutos durante três horas após a injeção da PGE<sub>2</sub> (08:00-11:00 h). A injeção i.t. de PGE<sub>2</sub> 10 ng em 100 µL/animal induziu febre nos animais, a qual foi prevenida pela administração de antagonistas dos receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub>, mas não por antagonista do receptor EP<sub>4</sub>. Além disso, os antipiréticos clássicos dipirona e paracetamol, em doses que não tiveram efeito *per se* na T<sub>R</sub> dos animais, não reverteram a febre induzida por PGE<sub>2</sub> i.t. Este modelo parece útil para investigar se a ação dos antipiréticos ocorre antes ou depois da ligação da PGE<sub>2</sub> em seus receptores EP. Além disso, este protocolo é vantajoso do ponto de vista técnico, ético e econômico em relação aos outros protocolos de indução de febre por PGE<sub>2</sub> descritos na literatura, porque a trepanação para implantação de cânula não é necessária, reduzindo a resposta inflamatória, o sofrimento dos animais e os custos experimentais.

Palavras-chave: febre; prostaglandina E<sub>2</sub>; modelo animal; injeção intratecal; antagonistas de receptores EP; antipiréticos; ratos jovens.



## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### CHARACTERIZATION AND VALIDATION OF A NEW FEVER MODEL INDUCED BY THE INTRATHECAL INJECTION OF PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> IN YOUNG RATS

AUTHOR: Viviane Ratzlaff

ADVISOR: Carlos Fernando de Mello

Date and place of dissertation: Santa Maria, December 7<sup>th</sup>, 2006.

The fever response, besides being part of host defense response to infection or inflammation, is associated with discomfort and anxiety and may constitute a risk for febrile seizures in children. Therefore, antipyretic therapy is routinely prescribed for febrile patients. The animal models of fever using the systemic injection of lipopolysaccharide (LPS) and Baker yeast, described in the literature, are suitable for screening of novel antipyretics, but they do not provide information regarding the mechanism of action of these compounds. Therefore, the present study aimed to describe and validate a model of fever induction by prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, the final mediator of febrile response in the central nervous system, in young male Wistar rats (25-30 days of age). In this protocol, PGE<sub>2</sub> was injected intrathecally without implantation of cannula. Rectal temperature (T<sub>R</sub>) was recorded every thirty minutes for three hours after PGE<sub>2</sub> injection (08:00 – 11:00 h). The intrathecal (i.t.) injection of PGE<sub>2</sub> 10 ng in 100 µL/animal induced fever in the animals, which was prevented by administration of EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors antagonists, but did not by antagonist of EP<sub>4</sub> receptor. In addition, the classic antipyretics dipyrone and acetaminophen, at doses that had no effect *per se* on T<sub>R</sub> of animals, did not revert the fever induced by i.t. injection of PGE<sub>2</sub>. This model seems suitable to investigate whether the action of antipyretics occurs upstream or downstream the prostaglandin coupling in EP receptors. In addition, this protocol is advantageous from the technical, ethical and economical point of view compared to others PGE<sub>2</sub>-induced fever protocols described in the literature, because trepanation for cannula implantation is not required, reducing the inflammatory response, animals suffering and experimental costs.

Keywords: fever; prostaglandin E<sub>2</sub>; animal model; intrathecal injection; EP receptors antagonists; antipyretics; young rats.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mecanismo da febre de origem infecciosa..... 17
- Figura 2** – Vias neuronais eferentes envolvidas na febre induzida por PGE<sub>2</sub> na POHA..... 23
- Figura 3** – Síntese de prostaglandinas..... 25
- Figura 4** – Ausência de efeito da administração intratecal de volumes crescentes de NaCl 0,9% (10, 50 ou 100 µL/animal) sobre a variação da temperatura retal de ratos jovens ao longo do tempo..... 49
- Figura 5** – Efeito da administração intratecal de veículo (NaCl 0,9%, 100 µL) ou prostaglandina E<sub>2</sub> (3, 10 ou 30 ng em 100 µL) sobre a variação da temperatura retal de ratos jovens ao longo do tempo..... 50
- Figura 6** – Efeito da administração intratecal de (A) veículo (DMSO 1%) ou 60 nmol de SC-19220 (antagonista EP<sub>1</sub>); (B) veículo (etanol 0,015%) ou 150 pmol de L-826266 (antagonista EP<sub>3</sub>); e (C) veículo (NaCl 0,9%) ou 75 pmol de L-161982 (antagonista EP<sub>4</sub>) na febre induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (10 ng, intratecal) em ratos jovens..... 51
- Figura 7** – Ausência de efeito da administração subcutânea de (A) veículo (NaCl 0,9%) ou dipirona (0,10 mmol/kg) e (B) veículo (Tween 80 a 5%) ou paracetamol (0,42 mmol/kg) na febre induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (10 ng, intratecal) em ratos jovens..... 52

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHE -	Barreira hematoencefálica
cK -	Células de Kupffer
COX -	Enzima ciclooxigenase
C5a -	Componente 5a do complemento
DAINES -	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais
HDM -	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
i.c.v. -	Intracerebroventricular
IFN -	Interferon
IL -	Interleucina
IML -	Coluna de células intermediolateral
i.p. -	Intraperitoneal
i.t. -	Intratecal
i.v. -	Intravenosa
LBP -	Proteína ligante de LPS
LPS -	Lipopolissacarídeo bacteriano
NFκB -	Fator de transcrição kappa B
NPSs -	Neurônios pré-ganglionares simpáticos
NTS -	Núcleo do trato solitário
OVLTL -	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
PG -	Prostaglandina
PGES -	Prostaglandina E sintase
PI -	Fosfoinositóis de membrana
PI-PLC -	Fosfolipase C específica para fosfoinositóis
PLA <sub>2</sub> -	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC -	Fosfolipase C
POHA -	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
RMg -	Núcleo magno da rafe

rRPa -	Porção rostral do núcleo pálido da rafe
s.c. -	Subcutâneo
SNC -	Sistema nervoso central
TAM -	Tecido adiposo marrom
Tc -	Temperatura corporal
TLR4 -	Receptor "Toll-like" 4
TNF -	Fator de necrose tumoral
T <sub>R</sub> -	Temperatura retal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Regulação da temperatura corporal.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Mecanismo de indução da febre.....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Visão clássica.....	15
1.2.2 Novas descobertas.....	18
1.2.3 Vias neuronais simpáticas eferentes.....	21
1.2.4 Prostaglandina E <sub>2</sub> .....	24
<b>1.3 Importância clínica da febre.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Antipiréticos endógenos e exógenos.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5 Modelos experimentais.....</b>	<b>32</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>38</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

---

## 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Regulação da temperatura corporal

A temperatura corporal ( $T_c$ ) normal, em humanos, possui uma variação circadiana, oscilando aproximadamente entre  $36,4^{\circ}\text{C}$ , pela manhã, e  $36,9^{\circ}\text{C}$ , no final da tarde (Mackowiak, 1997). A termorregulação se dá por um sistema complexo, que envolve várias estruturas cerebrais (Boulant, 1997), incluindo a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POHA), onde se localiza o centro termorregulatório (Beutler e Beutler, 1992; Blatteis et al., 2005). Os neurônios termossensíveis dessa região integram sinais aferentes da  $T_c$  central e periférica e induzem respostas comportamentais e fisiológicas, controlando a produção ou dissipação de calor (Boulant, 1997).

Diversos mecanismos termorreguladores garantem a manutenção da  $T_c$  normal. De um lado estão os mecanismos de conservação e produção de calor, ou seja, a vasoconstrição na região da derme, a piloereção e a geração de energia na forma de calor pelos tecidos vivos (por meio de calafrios, excitação simpática da produção de calor e secreção de tiroxina), que é chamada de termogênese. Por outro lado, existem os mecanismos de dissipação de calor para o meio ambiente, que incluem a sudorese e a vasodilatação cutânea (Beutler e Beutler, 2001). Há ainda, em humanos, um sistema isolante térmico do corpo, que constitui um meio eficaz para manter a temperatura interna normal, embora permita que a temperatura da pele se aproxime da do meio ambiente. Esse isolamento entre as porções centrais do organismo e a superfície cutânea é realizado pela pele, tecidos subcutâneos e, em particular, pela gordura destes últimos (Guyton e Hall, 2002).

Além dos mecanismos subconscientes para o controle da  $T_c$ , o organismo ainda apresenta o controle comportamental da temperatura. Dessa forma, toda vez que a  $T_c$  interna fica excessivamente alta ou baixa, gerando uma sensação de desconforto, o indivíduo pode fazer adaptações ambientais apropriadas para restabelecer sua sensação de bem-estar, como procurar uma sala aquecida ou

resfriada, usar mais ou menos roupas, conforme a sensação for de frio ou calor, respectivamente (Guyton e Hall, 2002).

Para que todos esses mecanismos de controle da Tc possam operar é necessária a presença de detectores de temperatura para determinar quando ela está se tornando excessivamente alta ou baixa. Essa função é exercida pelos receptores térmicos da pele e de alguns tecidos profundos específicos, como vísceras abdominais e grandes veias na parte superior do abdômen e no tórax (Guyton e Hall, 2002). São esses receptores que enviam os sinais aferentes a respeito da Tc periférica e central para o centro termorregulador no hipotálamo.

A febre ou pirexia é uma elevação regulada na Tc central, resultante de uma alteração no termostato endógeno (Kluger, 1991). Sob a influência do hipotálamo, os mecanismos termorreguladores são estimulados, favorecendo a produção e a conservação de calor, até o organismo alcançar a temperatura elevada estabelecida pelo termostato central na febre (Saper e Breder, 1994; Boulant, 1997; Dinarello et al., 1999). Diante desse conceito, é importante salientar que a febre não é equivalente a uma temperatura central elevada, e sim a um ponto de ajuste elevado. Isso porque, em muitas circunstâncias, que vão desde o esforço físico intenso até a imersão em líquidos quentes, a temperatura central pode estar elevada e, no entanto, não há febre (Beutler e Beutler, 2001).

## **1.2 Mecanismo de indução da febre**

### **1.2.1 Visão clássica**

De acordo com a visão clássica, a febre é induzida por mediadores inflamatórios predominantemente sintetizados e liberados por fagócitos mononucleares periféricos e outras células do sistema imunológico (Roth, 2006), que são ativadas em resposta à invasão do hospedeiro por patógenos infecciosos e/ou seus produtos. Estes mediadores são membros de uma classe de



imunopolipeptídeos, chamados de citocinas (Blatteis, 2003; 2004). O fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$ , a interleucina (IL)-1 $\beta$  e a IL-6 são considerados os principais mediadores da resposta pirogênica a infecções bacterianas Gram-negativas; enquanto o interferon (IFN)  $\gamma$  é adicionalmente liberado em resposta aos estímulos virais (Dinarello e Bunn, 1997; Netea et al., 1999; 2000). Tendo em vista que a Tc central é regulada na POHA, as citocinas, que são liberadas periféricamente na corrente sanguínea, precisam ser transportadas até o centro termorregulatório hipotalâmico (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005).

Devido ao seu tamanho relativamente grande e às suas propriedades hidrofílicas, as citocinas não atravessam livremente a barreira hematoencefálica (BHE) (Blatteis et al., 2005; Roth, 2006). Foi sugerido, então, que as citocinas seriam transportadas pela corrente circulatória e se difundiriam para o cérebro através do *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), um extenso plexo de capilares fenestrados localizados nos órgãos circunventriculares (Blatteis et al., 1989; Hunter et al., 1994; Watkins et al., 1995a; Roth et al., 2004). Existem indícios, também, de um transporte ativo, saturável e específico de certas citocinas através da BHE, realizado por carreadores (Banks et al., 1995; Banks e Kastin, 1997). E há, ainda, uma terceira possibilidade segundo a qual a transmissão do sinal pirogênico desses mediadores se daria pela produção secundária de citocinas na BHE (Blatteis et al., 1989).

As citocinas que penetrassem no sistema nervoso central (SNC) poderiam, assim, ativar diretamente neurônios sensoriais locais que se projetam para a POHA, transmitindo a mensagem pirogênica (Blatteis et al., 2005). Está claro que as citocinas estão elevadas no fluido cerebrospinal e no cérebro, incluindo a POHA, após uma infecção, e também que a microinjeção de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 intracerebroventricular (i.c.v.) ou intra-POHA causa um aumento na Tc dose-dependente (Conti et al., 2004). Contudo, ainda não está definido se as citocinas que se encontram elevadas no SNC durante a febre são produzidas *in loco* ou são oriundas do sangue.

Há evidências, porém, de que as citocinas periféricas não penetram no SNC, mas exercem seus efeitos estimulando a produção de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>. Assim, a PGE<sub>2</sub> seria liberada no parênquima cerebral (Saper e Breder, 1994; Saper,

1998) como resultado da interação das citocinas circulantes com seus receptores específicos nas células endoteliais cerebrais (Matsumura e Kobayashi, 2004) ou perivasculares (Schiltz e Sawchenko, 2003). De fato, a hipótese mais aceita é a de que a  $PGE_2$ , e não as citocinas, atua nos neurônios reativos da POHA na resposta febril (Gelfand, 1997; Saper, 1998) (Figura 1).

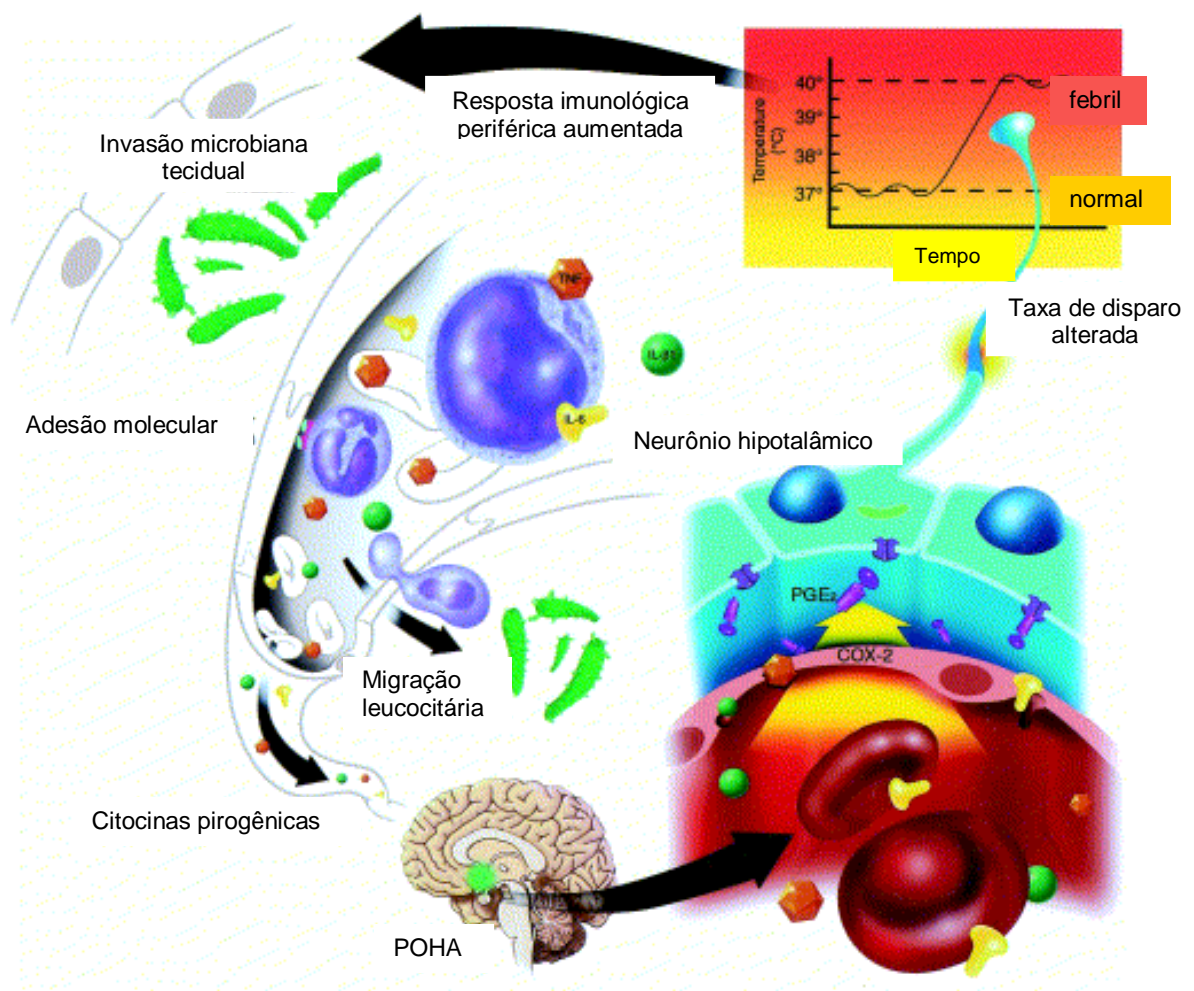


Figura 1 - Mecanismo da febre de origem infecciosa. A invasão microbiana periférica aciona a resposta imunológica não específica, ativando os leucócitos e fazendo com que os mesmos liberem substâncias pró-inflamatórias, tais como as citocinas pirogênicas, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Estas, por sua vez, estimulam a produção de  $PGE_2$  dentro da POHA. Os neurônios situados nessa região orquestram a resposta febril após a  $PGE_2$  ligar-se aos seus receptores. COX, enzima ciclooxigenase. [Adaptado de Aronoff e Neilson (2001)].

Acredita-se que a PGE<sub>2</sub> seja o mediador final da febre (Milton, 1996; Blatteis e Sehic, 1997; Coceani e Akarsu, 1998; Engblom et al., 2002; Ivanov e Romanovsky, 2004; Oka, 2004), pois ela altera a taxa de disparo de neurônios pré-ópticos, provocando uma elevação no termostato endógeno (Aronoff e Neilson, 2001). Como resultado, ocorre a inibição de neurônios sensíveis ao calor (promovendo as respostas de conservação de calor) e a excitação de neurônios termoinsensíveis (estimulando a produção de calor), culminando assim com o aumento da T<sub>c</sub> (Hammel, 1965; Blatteis, 2004).

### 1.2.2 Novas descobertas

Dados acumulados nos últimos anos têm gradualmente modificado este conceito clássico de indução de febre, devido principalmente à incompatibilidade temporal dos novos achados com a seqüência de eventos descrita até então (Blatteis et al., 2005).

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é um pirógeno exógeno, freqüentemente utilizado em modelos experimentais de febre por ser um potente indutor da cascata de citocinas pró-inflamatórias (Roth, 2006). A resposta febril característica da maioria das espécies à administração intravenosa (i.v.) de LPS é bi- ou multifásica (Romanovsky et al., 1998). Um fato interessante é que a primeira destas fases febris parece ser iniciada antes do aparecimento de quantidades suficientes de citocinas pirogênicas no sangue (Hesse et al., 1988; Cannon et al., 1993; Jansky et al., 1995; Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2004a). De fato, não existe um “pool” de citocinas disponível para liberação imediata pelos fagócitos mononucleares [exceto nos mastócitos, que possuem TNF $\alpha$  e IL-6 armazenados em pequenas quantidades (Malaviya e Georges, 2002)]. Portanto, as citocinas precisam ser sintetizadas e secretadas por estas células em resposta ao estímulo patogênico (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). Alguns dados experimentais reforçam a idéia de que as citocinas não estão envolvidas na resposta pirética inicial induzida pelo LPS. Kluger (1991), por exemplo, relatou que a administração sistêmica de anticorpos contra

citocinas reduz predominantemente a segunda fase da febre induzida por LPS e não a primeira.

Na verdade, a resposta febril ao LPS i.v. tem uma latência muito curta, o que implica uma via neuronal de transmissão do sinal pirogênico periférico para a POHA (Blatteis et al., 2005). Dentro deste contexto, vários pesquisadores investigaram a participação do nervo vago no mecanismo de indução da febre. Verificou-se, então, que a vagotomia subdiafragmática bilateral (Watkins et al., 1995b; Sehic e Blatteis, 1996; Romanovsky et al., 1997; Ek et al., 1998) e, mais particularmente, a vagotomia hepática seletiva (Simons et al., 1998) inibem os aumentos da Tc e da PGE<sub>2</sub> pré-óptica, provocados pelo LPS i.v. em porcos-da-índia e ratos. Diante desses resultados, foi sugerido que as citocinas periféricas poderiam ativar aferentes vagais hepáticos, transmitindo rapidamente a mensagem pirogênica à POHA (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). De fato, foram encontrados receptores para IL-1 $\beta$  no paraglânglio abdominal do nervo vago (Goehler et al., 1999). No entanto, deve haver um outro sinalizador que inicie a resposta febril mais rapidamente que as citocinas.

Considerando estes estudos recentes, uma nova via de indução de febre pode ser proposta. Esses estudos indicam que o LPS, independente da sua via de entrada no organismo, chega pela corrente sangüínea ao fígado, onde ele interage imediatamente com os macrófagos hepáticos, chamados de células de Kupffer (cK) (Li e Blatteis, 2004). Esta interação se dá por meio da proteína ligante de LPS (LBP) (Elsbach, 2000). O complexo LPS-LBP formado se liga a receptores do tipo CD-14 e/ou TLR4 (receptor "Toll like" 4), ativando as cK (Beutler, 2000). O componente 5a do complemento (C5a) é conseqüentemente ativado, estimulando as cK a liberar imediatamente PGE<sub>2</sub> (Schieferdecker et al., 2001; Schlaf et al., 2003) pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) -1 e/ou COX-2. De fato, as cK expressam constitutivamente ambas as isoformas da enzima e podem utilizar uma na ausência da outra (Kirtikara et al., 1998; Zhang et al., 2002; Perlik et al., 2004). Finalmente, essa PGE<sub>2</sub> periférica estimularia aferentes vagais hepáticos, os quais possuem receptores para PGE<sub>2</sub> (Engblom et al., 2002; Oka, 2004). A mensagem pirogênica seria então transmitida à POHA por via vagal. Esta transmissão de sinal se daria provavelmente através do núcleo do trato solitário (NTS) [área de projeção primária do nervo vago (Wan et al., 1994; Gaykema et al., 1995)], prosseguiria por projeções

noradrenérgicas que se originam nas regiões A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> do bulbo e chegaria na POHA pelo feixe noradrenérgico ventral (Palkovits et al., 1980). Como resultado, haveria o estímulo do sistema noradrenérgico hipotalâmico, mediado pela ativação de adrenocetores- $\alpha_1$  (Blatteis, 2004), localizados nos neurônios termorregulatórios da POHA (Blatteis et al., 2005).

Portanto, a PGE<sub>2</sub> dependente da COX-1 seria o ativador periférico da resposta febril, responsável pelo aumento inicial da Tc. Já a PGE<sub>2</sub> dependente da COX-2, liberada mais tarde na POHA (em resposta aos sinais do LPS e/ou citocinas pirogênicas circulantes ou aos sinais da PGE<sub>2</sub> transmitidos vagalmente) seria o mediador central que sustenta a resposta febril (Blatteis, 2004). Esta resposta tardia é seletivamente mediada pela COX-2, que é ativada pelo estímulo noradrenérgico de receptores  $\alpha_2$  (Feleder et al., 2004; Blatteis et al., 2004b), localizados nos astrócitos (Blatteis et al., 2005).

Na verdade, o estímulo do sistema noradrenérgico hipotalâmico por pirógenos exógenos e endógenos já havia sido bem documentado antes da publicação desse novo mecanismo de indução da resposta febril (Dunn e Wang, 1995; Linthorst et al., 1995; Dunn e Hall, 1999; Dunn, 2001). Também já estava estabelecido que a ativação de neurônios noradrenérgicos induz a síntese de PGE<sub>2</sub> (Bergstrom et al., 1973; Hedqvist, 1977; Hori et al., 1987; Malik e Sehic, 1990; Sehic et al., 1996). Já o envolvimento dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos foi determinado em experimentos onde a noradrenalina ou agonistas  $\alpha$  foram microdializados na POHA de porcos-da-índia conscientes ou injetados i.c.v. em camundongos conscientes. Os resultados obtidos foram dois aumentos distintos da Tc: um mediado por receptores  $\alpha_1$ , de início rápido e independente de PGE<sub>2</sub>, e o outro mediado por receptores  $\alpha_2$ , tardio e dependente da COX-2 e PGE<sub>2</sub> (Feleder et al., 2004).

É interessante salientar que os níveis de PGE<sub>2</sub> pré-óptica sofrem um pequeno aumento coincidente com o início da febre. A PGE<sub>2</sub> produzida periféricamente, sendo lipofílica, poderia atravessar a BHE ou se difundir para a POHA através do OVLT (Dascombe e Milton, 1979; Rotondo et al., 1988; Abul et al., 1997; Romanovsky et al., 1999; Davidson et al., 2001). No entanto, é mais provável que a PGE<sub>2</sub> central seja gerada dentro da BHE. Assim, como esse aumento inicial da PGE<sub>2</sub> pré-óptica não é suprimido pela microdiálise intra-POHA de inibidores da COX,

mas é prevenido por um antioxidante (Blatteis et al., 2005), parece que esta  $PGE_2$  é produzida independentemente das enzimas COX, talvez pela peroxidação de lipídios de membrana, induzida por radicais livres (Montuschi et al., 2004). Porém, tendo em vista que a primeira fase da febre induzida por LPS é independente da ação da  $PGE_2$  na POHA e é mediada por receptores  $\alpha_1$ , essa  $PGE_2$  central inicial pode ser irrelevante para a iniciação do processo febril; contudo isto ainda precisa ser determinado (Blatteis et al., 2005).

É importante ressaltar ainda que, em adição a este novo mecanismo proposto, a fase tardia da febre é também sustentada pelas citocinas periféricas que podem: 1) estimular aferentes vagais hepáticos (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005); 2) ser liberadas na corrente sangüínea e atravessar a BHE para ativar diretamente a POHA (Blatteis et al., 1989; Hunter et al., 1994; Watkins et al., 1995a; Banks e Kastin, 1997); e/ou 3) estimular células endoteliais e perivasculares cerebrais a sintetizar  $PGE_2$  (Elmqvist et al., 1997a; Matsumura et al., 1998; Yamagata et al., 2001), como proposto originalmente na “visão clássica” da pirogênese (Blatteis et al., 2005).

### 1.2.3 Vias neuronais simpáticas eferentes

A  $PGE_2$ , liberada dentro do parênquima cerebral, ativa receptores localizados nos neurônios e estimula o circuito neuronal da febre (Elmqvist et al., 1997a; Matsumura et al., 1998; Yamagata et al., 2001). O sistema nervoso simpático participa desse circuito já que ele regula a  $T_c$ , controlando a termogênese e a dissipação de calor nos órgãos efetores periféricos (Nakamura et al., 2005). Em roedores, o tecido adiposo marrom (TAM) é o principal órgão de termogênese sem tremor (Rothwell, 1992) e a cauda funciona como um órgão de conservação de calor através da regulação do fluxo sangüíneo por vasoconstrição (Gordon, 1990), sendo esses dois órgãos controlados pelo sistema simpático.

Vários estudos têm sugerido que a porção rostral do núcleo pálido da rafe (rRPa) e o núcleo magno da rafe (RMg) contêm um grupo de neurônios que

medeiam a transmissão dos sinais pirogênicos, causados pela  $PGE_2$ , da POHA para os neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPSs) (Nakamura et al., 2002; Morrison, 2003), os quais, por sua vez, enviam as informações para os órgãos efetores termorregulatórios, através dos neurônios pós-ganglionares simpáticos (Nakamura, 2004). Portanto, estes neurônios da rafe são os neurônios pré-motores simpáticos para indução de febre e seus terminais axonais estão distribuídos na coluna de células intermediolateral (IML) da medula espinhal torácica, onde se localizam os NPSs (Nakamura et al., 2005). O glutamato é o neurotransmissor envolvido na sinapse excitatória entre os neurônios da rafe e os NPSs, participando não somente na indução da febre, mas também na regulação da Tc normotérmica (Nakamura et al., 2004).

Os neurônios termorregulatórios da rafe recebem, tonicamente, sinais inibitórios GABAérgicos oriundos da POHA, conferindo ao sistema GABAérgico um papel na regulação da Tc. Assim, antagonistas GABAérgicos provocam a desinibição do rRPa e do RMg e aumentam a atividade nervosa simpática no TAM interescapular (Morrison et al., 1999), vasos sanguíneos da cauda (Blessing e Nalivaiko, 2001) e coração (Cao e Morrison, 2003) de ratos.

Estudos recentes também têm investigado o papel do núcleo hipotalâmico dorsomedial (HDM) na termorregulação (Zaretskaia et al., 2002; Cao et al., 2004). Estes estudos sugerem que o HDM contém neurônios termogênicos e que a atividade destes neurônios também é controlada por inibição tônica GABAérgica [talvez também pelos neurônios da POHA (Morrison et al., 2004)] (Nakamura, 2004; Nakamura et al., 2005). Além disso, é possível que os neurônios do HDM sejam desinibidos, em situações cujo a termogênese é requerida, e enviem sinais excitatórios para os neurônios da rafe para aumentar a atividade no TAM (Madden e Morrison, 2003; Zaretskaia et al., 2003).

Neurônios da POHA expressando receptor  $EP_3$  (principal subtipo de receptor da  $PGE_2$  envolvido na resposta febril) projetam-se diretamente ao rRPa e ao RMg e são positivos para um marcador neuronal GABAérgico (Nakamura et al., 2002; Yoshida et al., 2003). Estes neurônios são os candidatos para a origem dos sinais GABAérgicos tônicos às regiões da rafe e também ao HDM (Nakamura, 2004; Nakamura et al., 2005). Portanto, a  $PGE_2$ , ao se ligar nos seus receptores  $EP_3$  na

POHA, eliminaria a inibição GABAérgica tônica dos neurônios da rafe (desta forma, ativando-os diretamente) e/ou dos neurônios do HDM e estes, por sua vez, enviariam sinais excitatórios para o rRPa e o RMg. De fato, o receptor EP<sub>3</sub> é considerado um receptor supressor por estar acoplado com proteínas ligadas ao GTP inibitórias (Gi) (Nakamura, 2004). Apesar desses resultados, que permitem propor possíveis rotas da POHA às regiões da rafe (Figura 2), mais estudos são necessários para caracterizar essas vias (Nakamura, 2004).

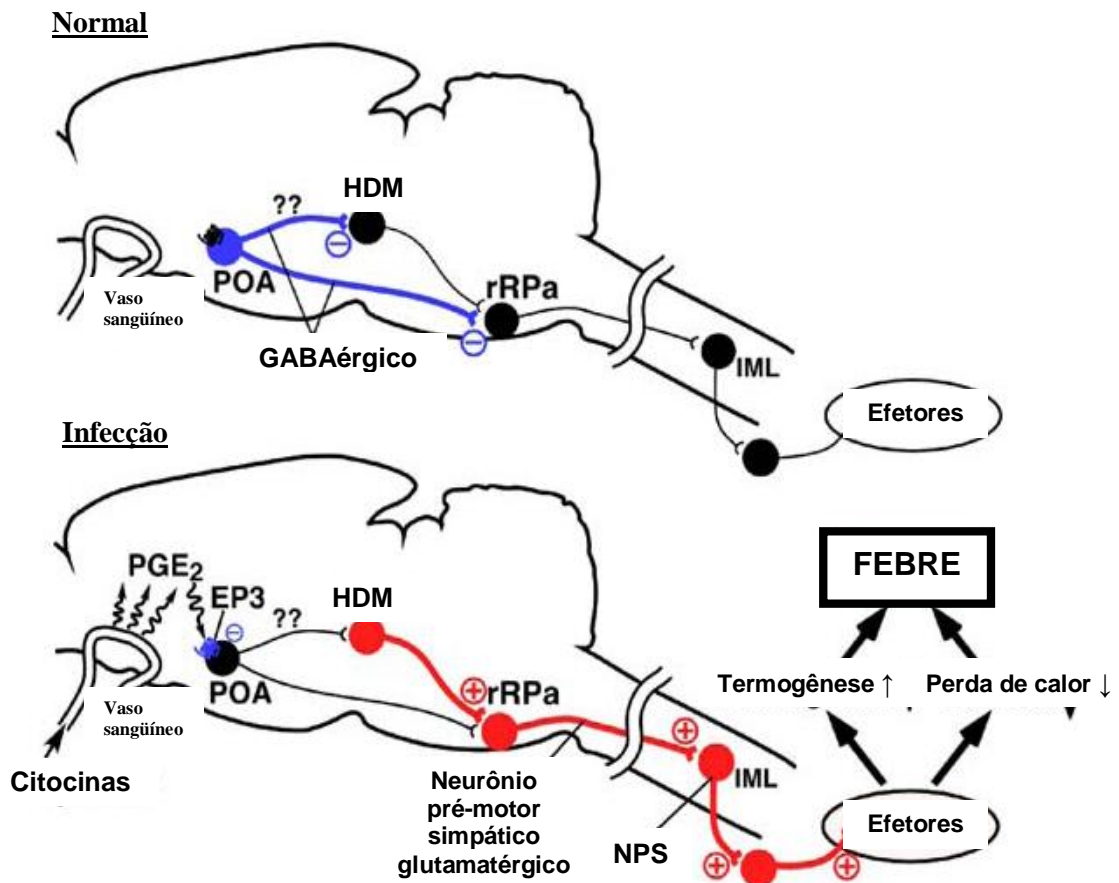


Figura 2 - Vias neuronais eferentes envolvidas na febre induzida por PGE<sub>2</sub> na POHA. Na ausência de PGE<sub>2</sub> (Normal), os neurônios do rRPa e do HDM estão tonicamente inibidos por sinais dos neurônios pré-ópticos exibindo receptores EP<sub>3</sub>, os quais podem ser GABAérgicos; a PGE<sub>2</sub>, que é produzida centralmente na infecção (Infecção), suprime o sinal tônico dos neurônios da POHA, ligando-se ao receptor EP<sub>3</sub>, e desinibe os neurônios do rRPa e do HDM. A desinibição dos neurônios do HDM poderia ativar os neurônios do rRPa, os quais por sua vez estimulam o sistema nervoso simpático e finalmente desenvolvem febre. O receptor EP<sub>3</sub> é geralmente considerado um receptor supressor porque está acoplado a uma proteína ligada ao GTP inibitória. Note que a projeção dos neurônios da POHA expressando receptor EP<sub>3</sub> ao HDM ainda não foi determinada. Os círculos azuis, vermelhos e pretos denotam corpos celulares de neurônios inibitórios ativados, neurônios excitatórios ativados e neurônios suprimidos, respectivamente. [Modificado de Nakamura et al. (2002)].



#### 1.2.4 Prostaglandina E<sub>2</sub>

Como mencionado anteriormente, a PGE<sub>2</sub> é considerada o mediador final da resposta febril no SNC (Milton e Wendlandt, 1971; Blatteis e Sehic, 1997; Zeisberger, 1999; Aronoff e Neilson, 2001; Ivanov e Romanovsky, 2004; Matsumura e Kobayashi, 2004), segundo a “hipótese humoral de indução de febre”, proposta classicamente (Roth, 2006). Agora, porém, sabe-se que ela pode exercer dois papéis, em pontos distintos na via de indução da febre: o de mediador neuronal periférico, causador do aumento inicial da T<sub>c</sub>, e o de mediador secundário intra-POHA, que mantém a resposta febril (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005).

A PGE<sub>2</sub> é um derivado do ácido araquidônico, o qual é clivado de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Aronoff e Neilson, 2001; Roth, 2006). Em um segundo passo, o ácido araquidônico é convertido a PGH<sub>2</sub> por enzimas chamadas ciclooxigenases (COXs) (Roth, 2006). Finalmente, a PGH<sub>2</sub> é isomerizada a PGE<sub>2</sub> pela prostaglandina E sintase (PGES) (Blatteis, 2004; Ivanov e Romanovsky, 2004; Matsumura e Kobayashi, 2004) (Figura 3).

A metabolização do ácido araquidônico pode ser realizada pelas duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2 (Aronoff e Neilson, 2001). A COX-1 é usualmente expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 é induzida pelos sinais inflamatórios, tais como as citocinas pirogênicas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e o LPS bacteriano (Simon, 1999). A isoforma induzida é responsável pela produção hipotalâmica de PGE<sub>2</sub> durante a resposta febril, o que foi comprovado em experimentos com camundongos geneticamente modificados, carecendo dos genes para COX-1 ou COX-2 (Li et al., 1999). As células endoteliais microvasculares e as células microgliais perivasculares são responsáveis pela produção de PGE<sub>2</sub> no SNC, pois expressam grandes quantidades de COX-2 (Cao et al., 1996; Elmquist et al., 1997b; Matsumura et al., 1998; Li et al., 1999; Ek et al., 2001; Yamagata et al., 2001; Schiltz e Sawchenko, 2002).

Na produção de PGE<sub>2</sub> no SNC, além da COX-2, também há a participação da PGES-1 microsomal (mPGES-1). Assim como a COX-2, a mPGES-1 também é uma enzima induzida, e ambas são reguladas pelo NF $\kappa$ B, um fator de transcrição

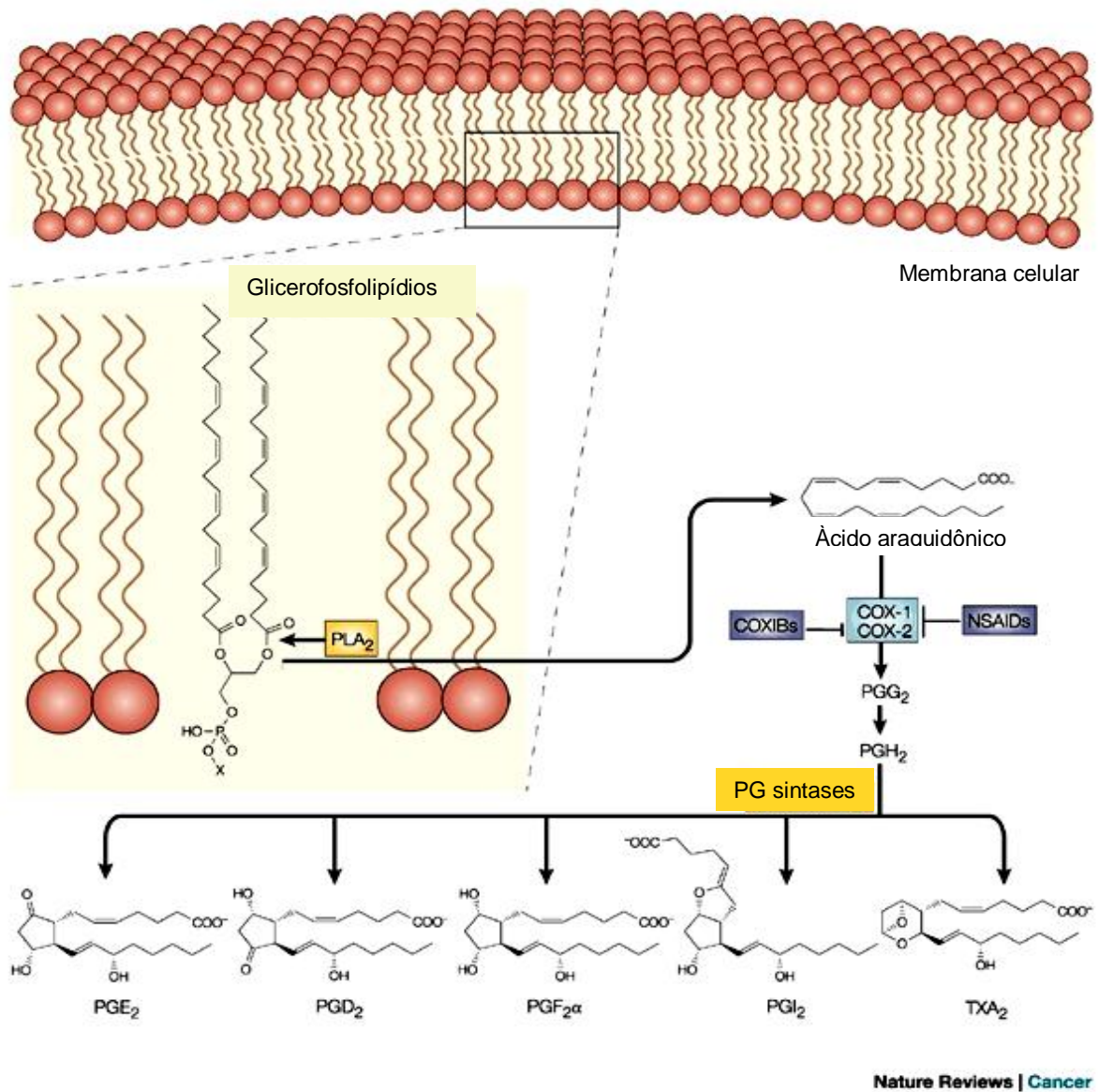


Figura 3 - Síntese de prostaglandinas. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). As enzimas COX-1 ou -2 catalisam a biossíntese de endoperóxidos bicíclicos (PGG<sub>2</sub>) reduzindo-os até PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> é convertido até prostaglandina subtipo E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina subtipo D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina subtipo F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), prostaglandina subtipo I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), pela atividade de prostaglandina sintases específicas. [Adaptado de Gupta e Dubois, 2001].

que é ativado por vários estímulos pirogênicos da resposta imunológica inata e pelas citocinas indutoras de febre (Roth, 2006). Este processo de indução enzimática é consideravelmente lento (Breder e Saper, 1996; Quan et al., 1998; Inoue et al., 2002; Ivanov et al., 2002), por isso a PGE<sub>2</sub> sintetizada centralmente participa da manutenção da resposta febril e não da sua indução (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005).

Periféricamente, a PGE<sub>2</sub> é rapidamente produzida pela COX-1, expressa constitutivamente pelas cK e ativada pelo componente C5a do complemento (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). Nessa via de síntese periférica, o ácido araquidônico que serve de substrato para a COX-1 é gerado a partir da hidrólise de fosfoinositóis de membrana (PI) pela fosfolipase C específica para PI (PI-PLC), sendo que a liberação do ácido araquidônico por esta enzima é dez vezes mais rápida que àquela mediada pela PLA<sub>2</sub> (Rhur, 1994). Além disso, a PI-PLC é comprovadamente ativada pelo complemento, mas não pelo LPS ou IL-1 $\beta$ , e a conseqüente conversão do ácido araquidônico, produzido pela PI-PLC, a PGE<sub>2</sub> é catalisada pela COX-1 e PGES citosólica (cPGES) (Schütze e Krönki, 1994). Portanto, esta PGE<sub>2</sub> liberada pelas cK pode ser o mediador inicial periférico da resposta febril, ligando-se a receptores específicos nas fibras vagais hepáticas aferentes (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005).

A PGE<sub>2</sub> exerce suas ações através da interação com receptores de membrana específicos, que podem ser divididos em quatro subtipos: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> (Coleman et al., 1994; Ushikubi et al., 1998; Narumiya et al., 1999; Sugimoto et al., 2000) e são codificados por genes distintos (Negishi et al., 1995). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (com sete domínios transmembrana) e ativam a adenilato ciclase ou a fosfolipase C (PLC) (Machwate et al., 2001). Em relação à ligação da PGE<sub>2</sub> nos receptores EP, ela apresenta maior afinidade pelos receptores EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> do que por EP<sub>1</sub> e EP<sub>2</sub>, em ratos (Boie et al., 1997).

Há estudos mostrando que o subtipo EP<sub>3</sub> está envolvido na pirogênese, pois camundongos “nocauteados” para esse receptor falharam completamente em apresentar resposta febril tanto à administração de pirógenos endógenos como à de pirógenos exógenos; enquanto camundongos deficientes dos outros subtipos de

receptor (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub>) foram ainda capazes de desenvolver febre (Ushikubi et al., 1998). Em um trabalho posterior, no entanto, camundongos deficientes do receptor EP<sub>1</sub> também exibiram uma atenuação parcial da febre induzida por endotoxina (Oka et al., 2003a). Estudos farmacológicos (com agonistas e antagonistas dos receptores EP) utilizando ratos sugeriram o envolvimento de receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> na febre, enquanto agonistas EP<sub>4</sub> causaram somente hipotermia (Oka e Hori, 1994; Oka et al., 1997; Oka et al., 1998; Oka et al., 2003b). Já em porcos, estudos farmacológicos sugeriram o envolvimento dos receptores EP<sub>2</sub> na produção de febre (Parrott e Vellucci, 1996). Diante desses resultados conflitantes, conclui-se que a função dos receptores EP na resposta febril difere dependendo da espécie animal estudada.

Os receptores EP são expressos por uma grande variedade de células e tecidos (Narumiya et al., 1999; Sugimoto et al., 2000). Na POHA de ratos foram encontrados três subtipos de receptores: EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> (Nakamura et al., 1999; Zhang e Rivest, 1999; Ek et al., 2000; Oka et al., 2000). O subtipo EP<sub>3</sub> está localizado no soma e nos dendritos dos neurônios na POHA (Nakamura et al., 1999; Nakamura et al., 2000) e é considerado o principal alvo da PGE<sub>2</sub> para sua ação pirogênica (Blatteis, 2004; Nakamura, 2004) em ratos. O aumento inicial da T<sub>c</sub>, mediado pela PGE<sub>2</sub> periférica, também pode ser devido a sua ação sobre receptores EP<sub>3</sub> em neurônios sensoriais (Blatteis et al., 2005). O receptor EP<sub>3</sub> está acoplado a uma proteína Gi, inibindo a atividade da adenilato ciclase e assim reduzindo os níveis de AMPcíclico (Toh et al., 1995), redução esta que pode ser responsável pela gênese da febre (Steiner et al., 2002). Já o receptor EP<sub>1</sub>, também envolvido na resposta febril, relaciona-se ao metabolismo dos fosfoinositóis (Ushikubi et al., 1995; Narumiya et al., 1999) e à mobilização de cálcio intracelular através da ativação da PLC via proteína Gq (Kobayashi e Narumiya, 2002). EP<sub>4</sub>, um receptor criógeno, e EP<sub>2</sub> ativam a adenilato ciclase via proteína Gs (Machwate et al., 2001; Claudino et al., 2006).

### **1.3 Importância clínica da febre**

A febre, um sinal de doença infecciosa manifestado pelo organismo, é uma resposta de defesa do hospedeiro a patógenos invasores, pertencente a um conjunto de respostas denominado reação de fase aguda (Blatteis, 2003). Embora acompanhe muitas doenças infecciosas, a febre não está presente em todos os processos infecciosos e sua magnitude e duração também não estão consistentemente correlacionadas com a gravidade da infecção (Atkins and Bodel, 1979; Atkins, 1982). Além disso, ela também pode ocorrer durante doenças não-infecciosas, como em certas doenças autoimunes, neoplásicas e granulomatosas, na trombose vascular e infarto, no estresse etc. (Blatteis, 2003). Isso porque várias citocinas, os mediadores endógenos da febre infecciosa, também são induzidas no curso dessas doenças (Holtzclaw, 1992; Dinarello, 1996; Cannon, 2000; Dinarello e Pomerantz, 2001; Sirvent, 2001).

Por milhares de anos, a febre foi considerada uma resposta protetora e era até mesmo induzida pelos médicos para combater certas infecções. Muitos estudos a respeito dos efeitos da Tc sobre a morbidade e a mortalidade mostraram que a febre é benéfica (Kluger et al., 1998). Ela está associada a um melhor prognóstico durante infecções bacterianas (Bryant et al., 1971; Weinstein et al., 1978; Hoefs et al., 1980; Mackowiak et al., 1980) e também pode levar à inativação de alguns vírus (Toms et al., 1977); isso porque Tc febris podem inibir o crescimento de determinados microorganismos, desnaturar suas proteínas e destruir suas atividades infecciosas (Rodbard et al., 1980; Mackowiak, 1991). Temperaturas febris também limitam uma grande variedade de bactérias Gram-negativas de sintetizar seus lipopolissacarídeos protetores e, desse modo, habilitam o complemento a perfurar e matar os patógenos invasores (Green e Vermeulen, 1994). Além disso, o aumento da morbidade e da mortalidade em trabalhos usando drogas antipiréticas para atenuar a febre também suporta a hipótese de que ela apresenta um papel protetor (Bernheim e Kluger, 1976; Vaughn et al., 1980; Hussein et al., 1982; Small et al., 1986). Estes investigadores concluíram que a hipotermia é claramente prejudicial ao hospedeiro infectado e que o desenvolvimento de febre acentua os mecanismos de defesa (Kluger et al., 1998).

No entanto, embora a febre possa matar alguns micróbios patogênicos, este não parece ser o seu principal papel, até mesmo porque Tc letais aos

microorganismos invasores raramente são alcançadas no curso natural da doença. Na verdade, a febre parece servir como um importante adjuvante, acentuando a eficácia da resposta imunológica e ajudando a compartimentalizar a resposta de fase aguda ao local infectado (Blatteis, 2003). Entre os benefícios imunológicos da febre é interessante citar o aumento da motilidade e da migração de leucócitos da circulação sanguínea para o local da inflamação. Nesse contexto, ao estimular o direcionamento da L-selectina e da  $\alpha 4\beta 7$ -integrina dos linfócitos para as moléculas de adesão correspondentes no endotélio, a febre contribui para focalizar a resposta imunológica aos locais infectados e tecidos linfóides associados, enquanto previne a migração dos linfócitos para outros tecidos não inflamados (Blatteis, 2003).

Em animais endotérmicos, tais como pássaros e mamíferos, a manutenção da  $T_c$  em 2 ou 3°C acima dos níveis normais freqüentemente resulta em um aumento no seu consumo de energia de aproximadamente 20%. Este acentuado custo energético para o organismo é mais uma evidência de que, se não tivesse uma função adaptativa, a febre não teria persistido por milhões de anos em muitos grupos de seres vivos (Kluger et al., 1998).

No entanto, embora febres moderadas sejam benéficas no combate à infecção, febres altas podem ser mal-adaptativas, devido à superprodução de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Kluger et al., 1998), com efeitos potencialmente prejudiciais (Blatteis, 2003). Por exemplo, embora o  $TNF\alpha$  seja um ativador inicial e essencial dos mecanismos de defesa do hospedeiro e a falha em expressá-lo resulte em inflamação sistêmica potente e potencialmente letal (Beutler, 1999; Marino et al., 1997), sua expressão inapropriada, elevada ou prolongada, especialmente na presença concomitante de  $IL-1\beta$  ou  $IFN\gamma$ , pode levar à injúria tecidual, falência de múltiplos órgãos, choque séptico e, até mesmo, à morte (Tracey e Cerami, 1994). Diante disso, mecanismos contra-regulatórios que limitem essa expressão adicional de citocinas são vitalmente importantes. A própria febre parece exercer uma modulação temporal na geração de  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$  durante a resposta imunológica inata, desse modo, reduzindo o risco dos efeitos potencialmente prejudiciais que poderiam resultar de sua co-expressão desregulada (Blatteis, 2003).

#### 1.4 Antipiréticos endógenos e exógenos

Devido à observação antiga de que a febre em humanos raramente excede 41°C (DuBois, 1949) e parece assim ter um limite superior, tem sido postulado que existem mecanismos emergenciais no hospedeiro infectado que previnem aumentos da Tc a níveis que ameacem a vida (Roth, 2006), limitando a resposta febril em intensidade e duração. Estes mecanismos, mediados pelas moléculas antipiréticas endógenas, na maioria dos casos, atuam inibindo a formação ou a ação dos pirógenos endógenos, ou interferindo nos circuitos neuronais que são ativados durante a febre. Dessa forma, antipiréticos endógenos podem ser definidos como moléculas que reduzem a temperatura febril ou que previnem o desenvolvimento da febre, mas não influenciam a Tc normal (Roth, 2006). Como exemplo dessas moléculas pode-se citar os glicocorticóides, neuropeptídeos (como a arginina vasopressina e o hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócitos), algumas citocinas (IL-10 e TNF $\alpha$ ), eicosanóides, óxido nítrico (no SNC) e alguns hormônios (Kozak et al., 2000; Roth, 2006).

No entanto, embora a febre possa encurtar a duração da doença e melhorar a sobrevivência dos pacientes (Blatteis, 2003), e ainda que existam substâncias antipiréticas endógenas para prevenir um aumento excessivo da Tc na resposta febril (Roth, 2006), ela é rotineiramente suprimida com terapia antipirética (Aronoff e Neilson, 2001) para evitar que atinja níveis perigosos.

Apesar do uso indiscriminado de antipiréticos pela população como automedicação, existem certos grupos de pacientes para os quais o controle da febre é muito importante, por ela apresentar mais riscos do que benefícios. Um desses grupos são as crianças (Aronoff e Neilson, 2001). As convulsões febris ocorrem com uma frequência de 2 a 5% em crianças de 6 a 36 meses de idade, sendo que durante os episódios convulsivos a maioria delas atinge Tc acima de 39°C (Rosman, 1997). Outro grupo de risco para os efeitos deletérios da febre são os pacientes com doenças cardiopulmonares, pois o custo metabólico da resposta febril é muito elevado (Mackowiak e Plaisance, 1998), podendo levar à sobrecarga e à isquemia tecidual (Schumacker et al., 1987).

A popularidade dos medicamentos antipiréticos, no entanto, advém dos seus efeitos moderadores do desconforto e do conseqüente alívio da ansiedade dos pacientes acometidos pela doença e/ou de seus familiares (Blatteis, 2003). Estes efeitos, porém, não são oriundos apenas da ação antipirética dos fármacos, mas também, e talvez principalmente, das propriedades analgésicas e antiinflamatórias que a maioria deles apresenta (Aronoff e Neilson, 2001).

Um medicamento antipirético efetivo pode interromper a pirogênese em qualquer passo que conecta a inflamação periférica com a produção central de PGE<sub>2</sub> (Aronoff e Neilson, 2001) e a sua ligação a receptores específicos. A principal ação da maioria dos antipiréticos é inibir a enzima COX e assim, interromper a síntese de prostaglandinas inflamatórias (Flower e Vane, 1972; Weissmann, 1991). Hoje já se sabe, porém, que muitas ações dos antipiréticos, úteis clinicamente, podem também ser independentes da COX (Cronstein et al., 1999). Como exemplos pode-se citar a diminuição das interações entre leucócitos e células endoteliais (Pierce et al., 1996), a redução da produção de citocinas pirogênicas (Shackelford et al., 1997), o aumento da expressão de moléculas antiinflamatórias (Serhan, 1997; Cronstein et al., 1999) ou ainda o aumento da produção ou da atividade de antipiréticos endógenos (Wilkinson e Kasting, 1990).

Os fármacos mais utilizados atualmente incluem a dipirona [na Europa e países em desenvolvimento (Arellano e Sacristan, 1990)], paracetamol, aspirina e outras drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) (Aronoff e Neilson, 2001).

Uma das desvantagens de suprimir a resposta febril está na remoção de um indicador da eficácia terapêutica no tratamento das doenças, importante clinicamente no ajuste da antibioticoterapia, por exemplo (Done, 1983). Outro efeito adverso dos antipiréticos é a depressão da resposta imunológica a infecções bacterianas, virais e parasitárias (Aronoff e Neilson, 2001).

Além disso, assim como muitos outros fármacos, os antipiréticos também apresentam toxicidades direta e indireta (Aronoff e Neilson, 2001). A dipirona, por exemplo, teve seu uso clínico proibido nos Estados Unidos devido a relatos de agranulocitose fatal e anemia aplástica associados ao seu uso (Borne, 1995; Insel, 1996). O ácido acetilsalicílico e o paracetamol podem causar a síndrome de Reye (em crianças) e falência hepática aguda, respectivamente (Adam e Stankov, 1994).



Os efeitos hepatotóxicos do paracetamol (na verdade de seu metabólito N-acetilimidoquinona) ocorrem quando os pacientes ingerem concomitantemente outras hepatotoxinas, como o etanol, ou medicamentos que aumentam o seu metabolismo, como a fenitoína (Aronoff e Neilson, 2001). As DAINEs, principalmente aquelas não-seletivas com efeito inibitório sobre a COX-1, são prejudiciais aos rins e trato gastrointestinal (Rainsford, 1999). Já os inibidores seletivos da COX-2, além de causar dano renal, podem aumentar os riscos de problemas cardiovasculares (Bombardier et al., 2000).

Diante disso, é importante pesquisar novos compostos antipiréticos mais seletivos (Aronoff e Neilson, 2001) e que apresentem menos efeitos colaterais (Souza et al., 2002).

### **1.5 Modelos experimentais**

Tentativas de simular o calor da febre para testar seus riscos e benefícios têm sido feitas em muitos estudos, com resultados ambíguos (Blatteis, 2003). Além disso, modelos experimentais também têm sido padronizados para possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos de termorregulação e da resposta febril, assim como para a pesquisa de novos agentes antipiréticos.

Há, na literatura, modelos de indução de febre pela injeção de pirógenos endógenos, tais como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE $_2$ , e de pirógenos exógenos, como o LPS, que é um constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas. As espécies animais utilizadas são variadas, assim como as vias de administração dos pirógenos.

Existe certa dificuldade na interpretação dos resultados de experimentos *in vivo*, porque é impossível isolar a Tc como uma única variável manipulada (Blatteis, 2003). Diversos fatores interferem na resposta febril, podendo-se destacar a espécie e a idade dos animais em estudo, a natureza e a dose do estímulo pirogênico, o estado global do hospedeiro e o estresse (Kluger et al., 1998; Blatteis, 2003).

De fato, tem sido mostrado que coelhos desenvolvem febre em resposta ao LPS mais facilmente que ratos (Stitt et al., 1985; Morimoto et al., 1990), e que camundongos dificilmente expressam este sinal (Kluger, 1991). Ainda em relação ao LPS, a febre resultante da sua administração depende do sorotipo de sua fonte (Dogan et al., 2000), da dose [doses mais baixas (ng/kg) provocam uma febre dose-dependente em coelhos, enquanto doses muito altas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) são hipotérmicas] (Kluger et al., 1998) e da via de administração (o aumento inicial da Tc provocado pela administração i.v. de LPS ocorre mais rapidamente que o aumento único induzido por outras rotas) (Blatteis, 2004).

No que diz respeito à idade, muitos animais velhos exibem resposta febril reduzida (Bender e Scarpace, 1997; Roghmann et al., 2001) e os recém-nascidos da maioria das espécies geralmente não desenvolvem febre nos primeiros dias de vida (Blatteis, 1989; Bonadio et al., 1990; McCarthy, 1997). Sugere-se que a deficiência de ratos velhos em desenvolver febre, após injeções periféricas de LPS ou IL-1 $\beta$  por exemplo, se deva a não-liberação de quantidades suficientes de PGE<sub>2</sub> central, já que eles apresentam níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias após injeções de LPS (Foster et al., 1992) e seus neurônios termossensíveis respondem tão bem quanto os de ratos mais jovens à PGE<sub>2</sub> microinfundida i.c.v. (Satinoff et al., 1999). Além de proporcionar uma melhor resposta pirética, o emprego de animais jovens nos experimentos reduz a quantidade de droga necessária para os testes, já que a quantidade injetada aumenta de maneira proporcional ao tamanho do animal. Além disso, a criação de animais adultos também implica em maior espaço para acomodá-los e maiores custos de manutenção (Tomazetti et al., 2005).

Outro fator que pode interferir nos modelos experimentais de febre é o estresse. Um animal estressado pode não desenvolver febre devido aos efeitos supressores dos glicocorticóides, que estão elevados nessas condições (Kluger et al., 1998) e que apresentam ação antipirética. Paradoxalmente, o fenômeno da “hipertermia induzida pelo estresse” também é observado (Kluger et al., 1987; Endo e Shiraki, 2000; Thompson et al., 2003) e freqüentemente mascara a febre induzida pelos pirógenos, pois aumenta os valores da Tc do grupo controle (Briese e Cabanac, 1991). Em ratos, por exemplo, a exposição a ambientes novos ou a manipulação produzem aumentos na Tc de até 2°C (Kluger, 1991). Dessa forma, se

a Tc já estivesse elevada como resultado de algum aspecto do modelo experimental, se tornaria impossível demonstrar a febre em resposta a injeção de algum pirógeno (Kluger et al., 1998).

Nosso grupo de estudo padronizou um modelo de febre, em ratos jovens, induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de fermento de padeiro. Atento a todos os fatores que interferem na resposta febril, o grupo obteve um método seguro e adequado para a pesquisa de novos antipiréticos, vantajoso do ponto de vista econômico e técnico e, além disso, condizente com as preocupações éticas no uso de animais de laboratório (Tomazetti et al., 2005). Esse modelo, porém, assim como aqueles que empregam o LPS, parece desencadear o processo febril no seu âmbito global (promovendo a ativação completa dos eventos neurohumorais envolvidos no desenvolvimento da febre), o que permite verificar o efeito antipirético de um composto, mas não concluir algo sobre seu mecanismo de ação.

Um modelo de pirogênese interessante foi proposto para identificar o papel da COX na ação antipirética da dipirona, no qual a febre foi induzida pela injeção de PGE<sub>1</sub> no OVLT ou pela injeção sistêmica de IL-1 $\beta$  (Shimada et al., 1994). Baseados na falta de efeito da dipirona na febre induzida por PGE<sub>1</sub>, mas não na febre induzida por IL-1 $\beta$ , os autores concluíram que a dipirona causa antipirese atuando em um passo anterior à ligação da PGE aos receptores EP, tal como na produção de PGE.

Portanto, para facilitar a descoberta de novos agentes antipiréticos, mais seletivos, com mecanismos de ação que não a inibição da COX, é importante que se padronizem modelos de febre envolvendo a PGE<sub>2</sub> (o mediador final da febre). Sabe-se que ela induz febre quando injetada i.c.v. em ratos, resultando em um aumento da Tc rápido e de curta duração (Fernandez-Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b).

No entanto, para a realização de injeções i.c.v. é necessária a implantação de cânula nos animais, processo este que gera uma reação inflamatória que pode interferir na resposta febril. De fato, a canulação na cisterna magna para obtenção de amostras múltiplas de fluido cerebrospinal, por exemplo, está inevitavelmente associada à lesão do tecido nervoso e da BHE (Huang et al., 1995). O dano neuronal produz a ativação da microglia, a qual então libera vários compostos citotóxicos, tais como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico ou proteases, bem

como citocinas inflamatórias, como IL-1, INF $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998).

Além disso, a utilização de animais jovens, com o propósito principalmente de reduzir os custos do experimento, dificulta a implantação de cânulas. De fato, os experimentos empregando injeções i.c.v. de PGE<sub>2</sub> utilizam animais adultos, pesando entre 230 e 350 gramas (Fernandez- Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b).

Diante disso, com o objetivo de obter uma resposta febril induzida por PGE<sub>2</sub> centralmente, porém eliminando o componente inflamatório gerado pela implantação de cânulas nos animais, investigaremos o efeito pirogênico da injeção intratecal (i.t.) de PGE<sub>2</sub> em ratos jovens. Assim, pretendemos montar um protocolo no qual a PGE<sub>2</sub> atinja o hipotálamo por difusão caudal-cefálica, não necessitando a implantação de cânulas.

---

## 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral padronizar e validar um novo modelo de indução de febre pela injeção intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub> em ratos jovens.

## 2.2 Objetivos específicos

1) Determinar um volume de injeção intratecal em ratos jovens que permita a um composto atingir a base do crânio em 5 minutos após a injeção e que não altere a temperatura retal dos animais.

2) Avaliar o efeito da injeção intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub>, em doses crescentes, sobre a temperatura retal de ratos jovens (curva dose-efeito).

3) Investigar o efeito de antagonistas seletivos dos receptores EP sobre a febre induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> intratecal em ratos jovens.

4) Investigar o efeito da injeção subcutânea de antipiréticos clássicos (dipirona e paracetamol) na febre induzida pela administração intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub> em ratos jovens.



**Characterization and validation of an animal model to investigate  
the role of prostaglandins in the action of antipyretics**

Viviane Ratzlaff<sup>a</sup>, Juliana Saibt Martins Pasin<sup>a</sup>, Ana Paula Oliveira Ferreira<sup>a</sup>, André  
Luis Lopes Saraiva<sup>a</sup>, Rosália Andrighetto<sup>a</sup>, Juliano Ferreira<sup>b</sup>,  
João Batista Calixto<sup>c</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde,

<sup>b</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina, 88015-420 Florianópolis, SC, Brasil.

\*Corresponding author: [cf.mello@smail.ufsm.br](mailto:cf.mello@smail.ufsm.br)

Phone +55 55 3220 9378

FAX: +55 55 3220 8241



**Abstract**

The animal models of fever using the systemic injection of lipopolysaccharide (LPS) and Baker yeast, described in the literature, are suitable for identifying novel antipyretics, but they do not provide information regarding the mechanisms of action of the compounds. In this study we describe and validate a protocol of fever induction by the intrathecal injection of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in young male Wistar rats (25-30 days of age, 70-90 g), which seems suitable to investigate the role of prostaglandins in the action of antipyretics. Rectal temperature (T<sub>R</sub>) was recorded every thirty minutes for three hours (08:00-11:00 h) with a lubricated thermistor probe. The direct intrathecal injection of PGE<sub>2</sub> 10 ng in 100 µL/animal (at 8:00 h) induced fever, which was antagonized by EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptor antagonists. In addition, the classic antipyretics dipyrone and acetaminophen, at doses that had no effect *per se*, did not revert the fever induced by the intrathecal injection of PGE<sub>2</sub>. This protocol is particularly advantageous from the technical, ethical and economical point of view because trepanation for cannula implantation is not required, reducing inflammatory response, animal suffering and experimental costs.

Keywords: Fever; Prostaglandin E<sub>2</sub>; Animal model; Antipyretics mechanisms of action; Young rats; Intrathecal injection; EP receptor antagonists

## 1. Introduction

One limitation for the study of antipyretics, such as screening and mechanisms of action, is the relative paucity of suitable animal models (Tomazetti et al., 2005). The most common method of inducing fever in experimental animals is by the systemic injection of lipopolysaccharide (LPS) or Baker yeast in rabbits and rats (Stitt et al., 1985; Morimoto et al., 1990; Tomazetti et al., 2005), since mice barely express this sign (Kluger, 1991; Souza et al., 2002). The animal models using the systemic injection of LPS and Baker yeast allowed the development and screening of antipyretic compounds because both LPS and Baker yeast induce fever by challenging the immune system, promoting a full activation of the neurohumoral events involved in fever development (Roth, 2006). These events include the activation of the vagus nerve and production of cytokines and prostaglandins at the periphery and in the central nervous system (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). Consequently, while the LPS and Baker yeast models of pyrogenesis are suitable for identifying novel antipyretics, they do not provide information regarding the putative mechanism of action of the compounds.

One interesting model of pyrogenesis was proposed to identify the role of cyclooxygenase in the antipyretic action of dipyrrone, in which fever was induced by the injection of PGE<sub>1</sub> into the *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) or by the systemic injection of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Shimada et al., 1994). Based on the lack of effect of dipyrrone against PGE<sub>1</sub><sup>-</sup>, but not against IL-1-induced fever, the authors concluded that dipyrrone caused antipyresis by acting in a step before prostaglandin binding to the EP receptor, such as PGE production.

However, cannula implantation in the central nervous system produces inflammatory reaction and can interfere in febrile response. Actually, the cisterna magna cannulation, for example, inevitably becomes associated with injury to the nervous tissue and to the blood-brain barrier (BBB) (Huang et al., 1995). With the neuronal injury, microglia is activated, releasing cytotoxic compounds, such as reactive oxygen intermediates, nitric oxide or proteases, as well as inflammatory cytokines, such as IL-1, interferon (IFN)  $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  (Haus-Wegrzyniak et al., 1998).

Therefore, in this study we describe and validate a protocol of fever induction by PGE<sub>2</sub> in young rats in which no implantation of cannula is required. The currently validated protocol is advantageous from the technical and economical point of view because trepanation is not required and small animals are used. In addition, this protocol also bears ethical concerns, since it significantly minimizes animal suffering.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Drugs**

Coomassie blue (Sigma, Steinheim, Germany) was solubilized in 10% ethanol. PGE<sub>2</sub> 98% was purchased from Akros Organics (New Jersey, USA) and was dissolved in pyrogen-free 0.9% NaCl, aliquoted under aseptic conditions and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. On the day before the experiment, PGE<sub>2</sub> was diluted to 3, 10, 30, 50 or 100  $\eta\text{g}/100\ \mu\text{L}$  of 0.9% NaCl. Dipyrone (Hoechst, São Paulo, Brazil) was diluted in 0.9% NaCl. Acetaminophen (Sigma, Saint Louis, MO) was suspended in a

solution containing 5% Tween 80 and 0.9% NaCl. SC-19220 (an EP<sub>1</sub> antagonist) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). L-826266 (an EP<sub>3</sub> antagonist) and L-161982 (an EP<sub>4</sub> antagonist) were generously donated by Merck Froost (Kirkland, Quebec, Canada). SC-19220 was dissolved in a solution containing 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.9% NaCl. L-826266 was prepared in absolute ethanol and then diluted to a final concentration of 0.015% with 0.9% NaCl. L-161982 was solubilized in 0.9% NaCl. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

## 2.2 Animals

Male Wistar rats (25-30 days of age, 70–90 g) bred in our animal house were used. The animals were housed in groups of 8 to a cage at controlled temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light/ dark cycle (lights on at 7:00) and with standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were transferred to the experimental room one day before the experiments, for acclimation to the environment. All temperature measures were taken between 8:00 and 11:00 h and room temperature was kept at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Each animal was used only once, and no more than one animal per litter was assigned to each group. The Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University approved all experiments.

## 2.3 Rectal temperature measurement

Rectal temperature ( $T_R$ ) was measured by inserting a lubricated thermistor probe (external diameter: 3 mm) into the rectum of the animal, for 50 seconds. The probe was linked to a digital device, which displayed the temperature at the tip of the

probe with a 0.1°C precision. The values displayed were manually recorded. In order to minimize the effects of the stress associated with handling and injecting on rectal temperature, all rats were habituated to the measuring procedure for two consecutive days (Tomazetti et al., 2005). In these sessions, the animals were subjected to the same temperature measuring procedure described above and were injected subcutaneously (s.c.) with 0.9% NaCl (5 mL/kg).

#### 2.4 Determination of the volume of intrathecal injection

The volume of intrathecal (i.t.) injection was determined by injecting Coomassie blue (1 mg/mL) in different volumes (10, 50, 100 or 150 µL). Rats were slightly anesthetized with halothane and intrathecally injected with the dye, according to Mestre et al. (1994). Briefly, the injections were performed by holding the rat securely in one hand by the pelvic girdle and inserting a 30 G x 0.5" (0.30 x 13 mm) needle, connected to a 50 µL Hamilton syringe or to a 1 mL insulin syringe, into the tissues between the dorsal aspects of L5 and L6, perpendicular to the vertebral column or slightly inclined (~75° towards the tail tip), to avoid spinous processes. The needle was carefully inserted with the bevel facing the cranial structures, in order to facilitate cranial diffusion. When the needle entered the subarachnoid space, a sudden lateral movement of the tail was observed. This reflex was used as an indicator of a successful puncture. The needle was held in position for a few seconds and progressively removed to avoid any outflow of the drug. After 5 minutes animals were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and sacrificed by decapitation. Immediately thereafter the brain and spinal cord were dissected to identify stained structures. The volume of 100 µL was determined as the minimal

injected volume that stained cranial base 5 min after dye injection, and this volume was selected for subsequent experiments.

We also assessed whether the i.t. injection altered  $T_R$ . The animals were injected with pyrogen-free 0.9% NaCl (10, 50 or 100  $\mu$ L, i.t.), after measuring basal  $T_R$  under light anesthesia.  $T_R$  changes were recorded every thirty minutes up to three hours, and expressed as the difference from the basal value ( $\Delta T_R$ ). In this set of experiments we included a sham (group subjected to i.t. puncture, but not injected) and an experimentally naive group (not punctured), as controls.

## 2.5 Effect of PGE<sub>2</sub> on rectal temperature

Immediately after measuring basal  $T_R$  and slightly anesthetizing the animals, they were injected with PGE<sub>2</sub> (3, 10 or 30  $\eta$ g in 100  $\mu$ L/animal, i.t.) or vehicle (0.9% NaCl, 100  $\mu$ L, i.t.).  $T_R$  measures were done according to the protocol described above. PGE<sub>2</sub> doses (i.t.) higher than 30  $\eta$ g were tested (50 and 100  $\eta$ g/animal), but they were not effective to induce fever compared to lower doses. For the sake of clarity, these data were omitted in the graphics.

## 2.6 Effect of EP receptor antagonists on PGE<sub>2</sub>-induced fever

The initial  $T_R$  was measured and, immediately thereafter, PGE<sub>2</sub> (10  $\eta$ g/animal, i.t.) or vehicle (0.9% NaCl, i.t.) was co-administered with SC-19220 (60  $\eta$ mol/animal), L-826266 (150 pmol/animal), L-161982 (75 pmol/animal) or with their respective vehicles (1% DMSO in 0.9% NaCl; 0.015% ethanol in 0.9% NaCl or 0.9% NaCl). The final volume of the i.t. injection was 100  $\mu$ L, regardless the pharmacological treatment and  $T_R$  measures were done according to the protocol described above (section 2.3

and 2.4). SC-19220 dose was selected based on Oka et al. (1997), but proportionally adjusted for the amount of PGE<sub>2</sub> injected. L-826266 and L-161982 doses were selected based on Claudino et al. (2006) and were also proportionally adjusted for the amount of PGE<sub>2</sub> injected. To our knowledge, the co-injected compounds were chemically stable and probably do not react in aqueous medium. Solutions were prepared 30 min before the experiment (twice working concentrations) and mixed for co-injection immediately before use aiming to attenuate any possible, but improbable, chemical interaction between the injected compounds.

## 2.7 Effect of classic antipyretics on PGE<sub>2</sub>-induced fever

The animals had their basal T<sub>R</sub> measured and were injected with a pyrogenic dose of PGE<sub>2</sub> (10 ng in 100 µL/animal, i.t.) or vehicle (0.9% NaCl, 100 µL, i.t.). Sixty minutes after the PGE<sub>2</sub> administration, the rats were subcutaneously (s.c.) injected with dipyrone (0.10 mmol/kg), acetaminophen (0.42 mmol/kg) or their vehicles (0.9% NaCl or 5% Tween 80 in 0.9% NaCl, respectively; 5 mL/kg). The T<sub>R</sub> measures were done according to same measuring protocol described above. Antipyretics doses were determined as the maximal dose that had no effect *per se* on T<sub>R</sub>, in pilot studies.

## 2.8. Statistical analysis

Basal rectal temperature and changes in rectal temperature were expressed as means ± S.E.M. of the differences from T<sub>R</sub> at 8:00 h. Data were analyzed by two- or three-way analysis of variance (ANOVA), with time treated as within subject factor, depending on the experimental design. *Post hoc* analysis was carried out by the F

test for simple effects and by the Student-Newman-Keuls test, when appropriate. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Effect of intrathecal injection on rectal temperature

Figure 4 shows that the injection of increasing volumes (10, 50 or 100  $\mu\text{L}$ ) of physiological saline does not alter  $T_R$  along time compared to naive or sham injected controls [ $F(20,145)=0.90$ ;  $P>0.05$ ].

#### 3.2 Effect of increasing prostaglandin $E_2$ doses (i.t.) on rectal temperature

Figure 5 shows the effect of increasing amounts of prostaglandin  $E_2$  (3, 10 or 30  $\text{ng}$  in 100  $\mu\text{L}$ /animal or 0.9% NaCl, i.t.) on the  $T_R$  of young rats. Statistical analysis (two-way ANOVA with the time factor treated as a within-subject factor) revealed only a significant effect of  $\text{PGE}_2$  dose [ $F(3,40)=3.27$ ;  $P<0.05$ ]. Post hoc analysis (Student-Newman-Keuls test of pooled means along time) revealed that  $\text{PGE}_2$  (10  $\text{ng}$ ) increased  $T_R$  compared to saline-treated animals.

#### 3.3 Effect of EP receptor antagonists on prostaglandin $E_2$ -induced fever

The effect of EP receptor antagonists on  $\text{PGE}_2$ -induced fever in young rats is shown in Figure 6A-C. SC-19220 (60  $\text{nmol}$ /animal), an  $\text{EP}_1$  antagonist, and L-826266 (150  $\text{pmol}$ /animal), an  $\text{EP}_3$  antagonist, prevented  $\text{PGE}_2$ -induced fever [ $F(5,90)=3.19$ ;  $P<0.05$  and  $F(1,21)=6.42$ ;  $P<0.05$ , respectively]. On the other hand, L-161982 (75



pmol/animal), an EP<sub>4</sub> antagonist, did not affect PGE<sub>2</sub>-induced fever [ $F(5,120)=0.91$ ;  $P>0.05$ ].

### 3.4 Effect of classic antipyretics on prostaglandin E<sub>2</sub>-induced fever

Figure 7A and B show the effect of dipyrrone (0.10 mmol/kg, s.c.) and acetaminophen (0.42 mmol/kg, s.c.) on PGE<sub>2</sub>-induced fever in young rats. Statistical analysis of T<sub>R</sub> (three-way ANOVA) showed that neither dipyrrone nor acetaminophen reverted PGE<sub>2</sub>-induced fever [ $F(3,96)=1.16$ ;  $P>0.05$ ;  $F(3,117)=0.20$ ;  $P>0.05$ , for dipyrrone and acetaminophen, respectively].

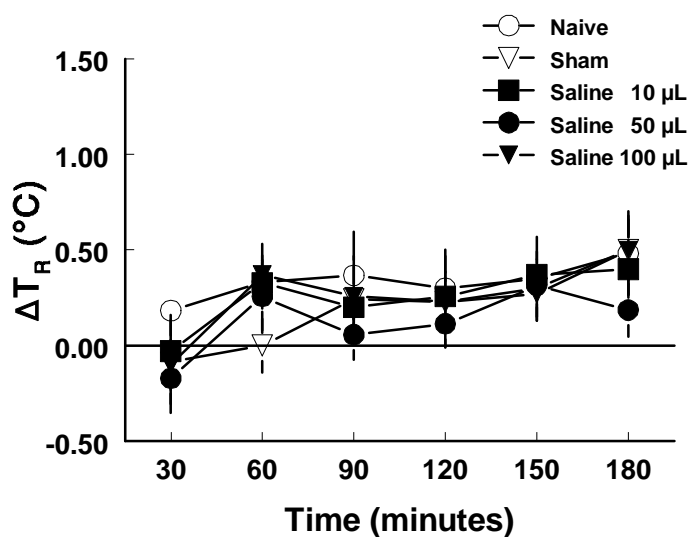


Figure 4 - Intrathecal administration of increasing volumes of 0.9% NaCl (10, 50 or 100  $\mu$ L/animal) has no effect on rectal temperature change ( $\Delta T_R$ ) along time. The injections were performed at 0 minutes. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. change from baseline rectal temperature (n = 6-7 animals per group). F values are given in the text.

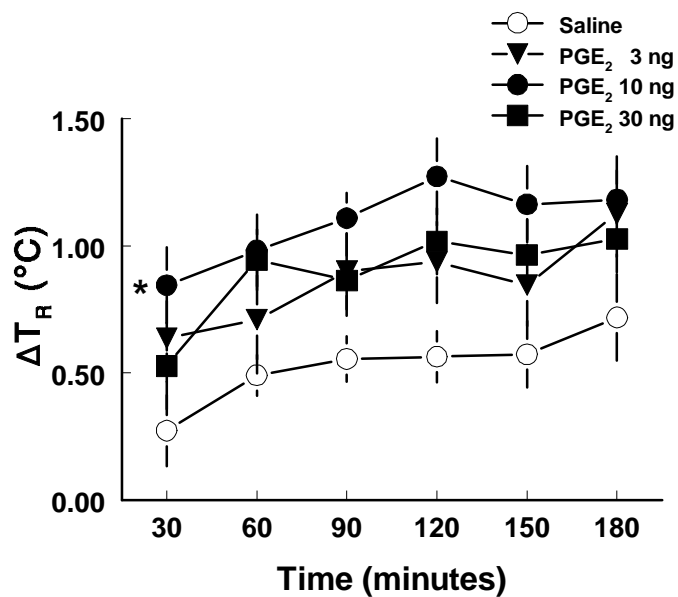


Figure 5 - Effect of the intrathecal administration of vehicle (0.9% NaCl, 100  $\mu$ L) or 3, 10 or 30 ng prostaglandin E<sub>2</sub> (100  $\mu$ L) on rectal temperature change ( $\Delta T_R$ ) along time. The injections were performed at 0 minutes. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. change from baseline rectal temperature (n = 11 per group). \*  $P < 0.05$  compared with vehicle (F values in the text).

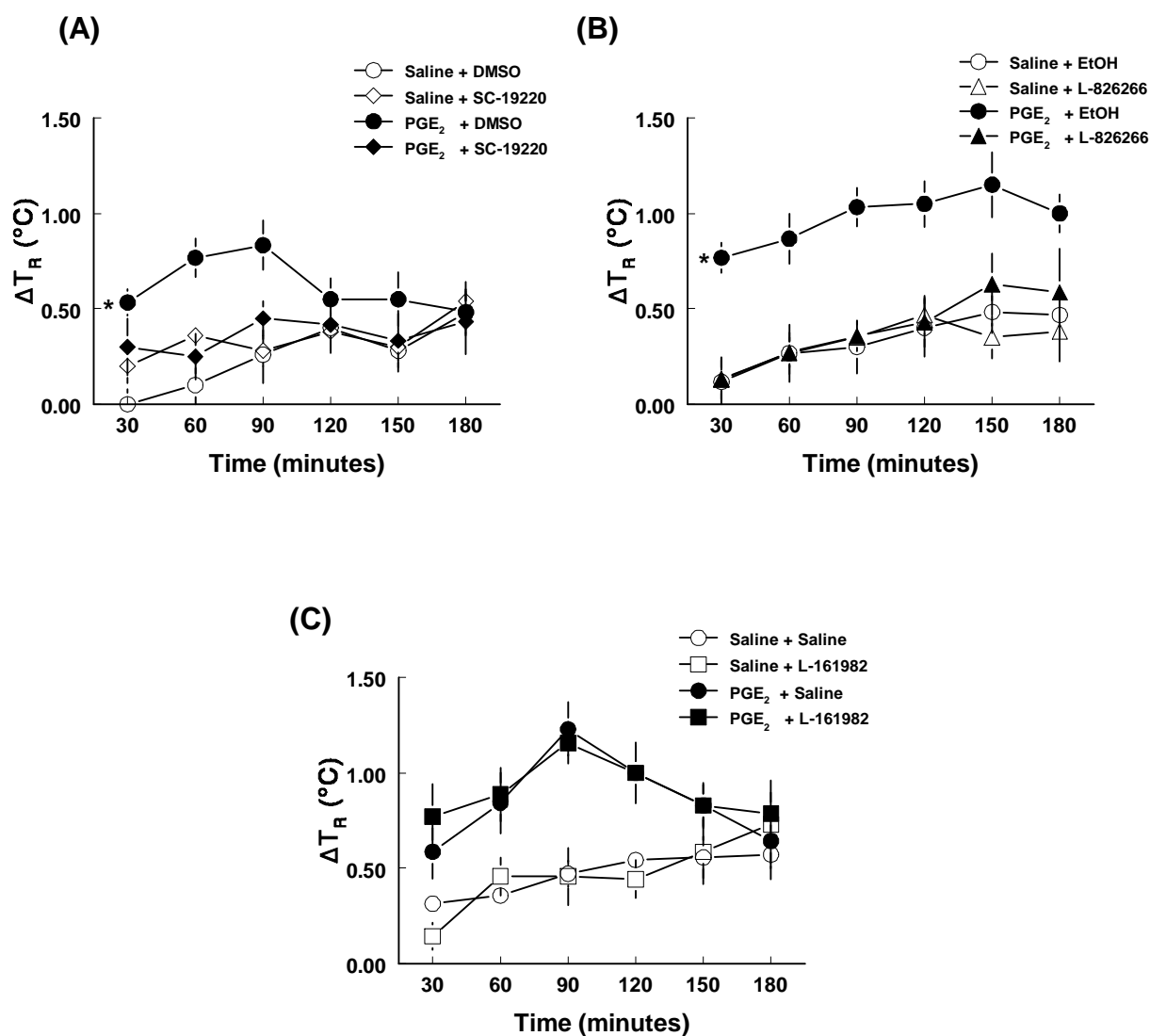


Figure 6 - Effect of the intrathecal administration of (A) vehicle (1% DMSO) or 60  $\eta$ mol of SC-19220 (antagonist EP<sub>1</sub>) (n = 5-6 per group); (B) vehicle (0.015% ethanol [EtOH]) or 150 pmol of L-826266 (antagonist EP<sub>3</sub>) (n = 6-7 per group); and (C) vehicle (0.9% NaCl) or 75 pmol of L-161982 (antagonist EP<sub>4</sub>) (n = 7 per group) on prostaglandin E<sub>2</sub> (10  $\eta$ g)-induced fever. Drugs were coinjected (i.t.) at 0 minutes in a total volume of 100  $\mu$ L. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. change from baseline rectal temperature ( $\Delta T_R$ ). F values are given in the text. \*  $P < 0.05$  compared with group injected with PGE<sub>2</sub> + antagonist.

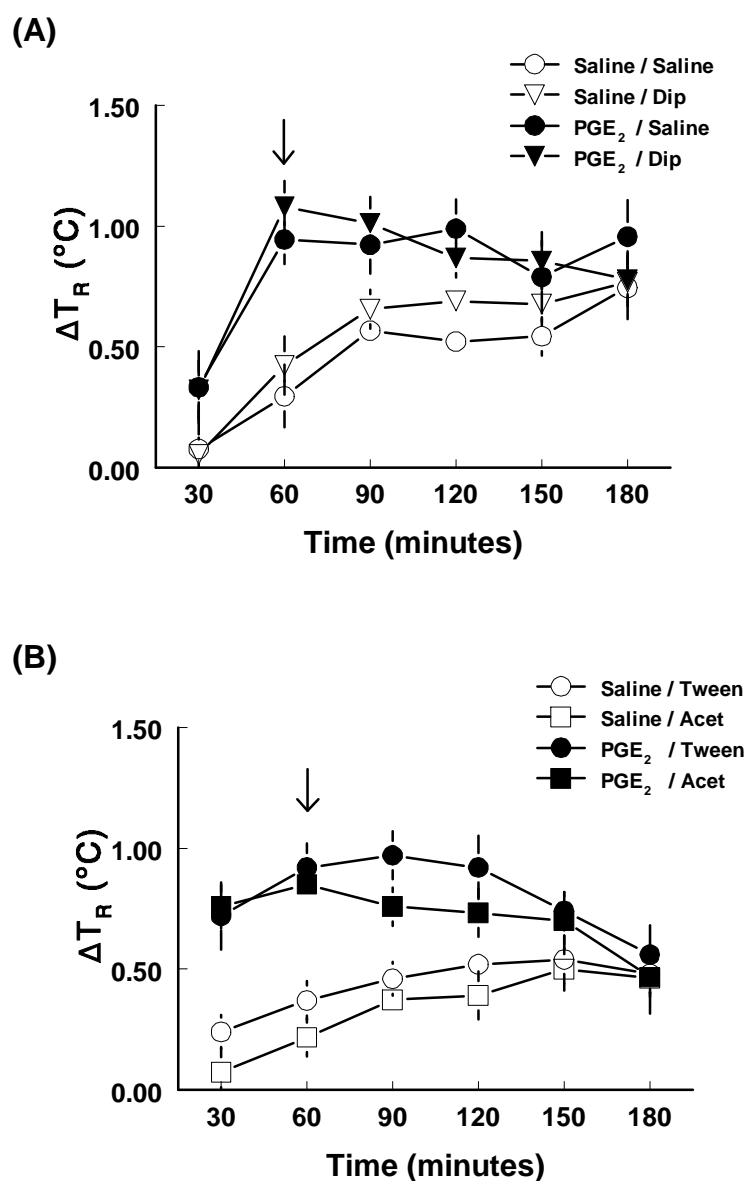


Figure 7 - Lack of effect of dipyrrone (Dip, 0.10 mmol/kg, s.c.) (A) and acetaminophen (Acet, 0.42 mmol/kg, s.c.) (B) on prostaglandin E<sub>2</sub>-induced fever. Prostaglandin E<sub>2</sub> (10 ng) was injected (i.t.) at 0 minutes. The arrow indicates the time of injection of antipyretics or the respective vehicle (0.9% NaCl and 5% Tween 80 for dipyrrone and acetaminophen, respectively). Values represent mean  $\pm$  S.E.M. change from baseline rectal temperature ( $\Delta T_R$ ) (n = 9 per group in A and 10-12 per group in B). F values are given in the text.

#### 4. Discussion

In the present study, we showed that the intrathecal injection of PGE<sub>2</sub> (10 ng) induces fever, which is antagonized by selected antagonists of prostaglandin receptors. In addition, the classic antipyretics dipyrone and acetaminophen, whose mechanisms of action involve the inhibition of prostaglandin production, did not revert the fever induced by the intrathecal injection of PGE<sub>2</sub>.

There is a significant body of evidence suggesting that PGE<sub>2</sub> is the final mediator of the febrile response (Milton, 1996; Blatteis and Sehic, 1997; Coceani and Akarsu, 1998; Engblom et al., 2002; Ivanov and Romanovsky, 2004; Oka, 2004) and that it acts through EP receptors located in the neurons of the preoptic-anterior hypothalamic area (POA), the presumptive site of the fever-producing center (Blatteis, 2004). In fact, the findings that the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of minute amounts of PGE<sub>2</sub> causes fever, and that PGE receptor antagonists prevent PGE<sub>2</sub>-induced fever constitute important evidence supporting a pyrogenic role for PGE<sub>2</sub> (Fernandez-Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b).

One remarkable finding of our study is that we obtained fever in rats by administering only 10 ng (~28 pmol) of PGE<sub>2</sub>, a dose that is five to ten times lower than the dose reported by other groups to produce fever by the i.c.v. route in rats (Fernandez-Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b). We believe that methodological factors may have contributed for this discrepancy. First, in order to inject the animals by the i.c.v. route, the animals must have a cannula implanted in the brain. It is well known that cannula implantation

requires unavoidable trepanation and neural cell injury (Huang et al., 1995), releasing several cytotoxic compounds and inflammatory cytokines, such as IL-1, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998), which increase PGE production (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). Administering PGE $_2$  by the intrathecal route avoids cannula placing and its consequent inflammatory response. Therefore, one might suggest that the inflammatory response caused by cannula implantation could have altered the sensitivity of EP receptors to PGE $_2$  in previous studies of the literature. In fact, it has been recently reported that exposure to PGE $_2$  desensitizes EP receptors by increasing internalization and phosphorylation of EP receptors (Neuschafer-Rube et al., 2005). This would explain why we obtained a significant elevation in body temperature using a dose of PGE $_2$  ten times lower than the dose previously reported to produce fever by the i.c.v. route in rats.

A second interesting finding of the current study was the biphasic effect of PGE $_2$  on rectal temperature change along time. While low doses of PGE $_2$  (10 ng) increased, high doses (30, 50 and 100 ng) had no effect rectal temperature along time. Three different EP receptor subtypes have been implicated in the control of body temperature in rats. While the i.c.v. injection of specific agonists of EP $_1$  and EP $_3$  receptors increases, the injection of an EP $_4$  agonist decreases body temperature (Oka et al., 2003b). Therefore, one could argue that increasing amounts of PGE $_2$  might activate different subpopulations of EP receptors, resulting in a biphasic effect of PGE $_2$  on body temperature. Against this possibility is the finding that the relative affinity of rat EP $_4$  and EP $_3$  receptors for PGE $_2$  is about the same (Boie et al., 1997). However, since nonstimulated animals present lower expression of EP $_4$  receptors (Oka et al., 2000) than LPS-stimulated animals, high doses of PGE $_2$  would probably

be required to fully stimulate EP<sub>4</sub>-mediated responses (in this case, hypothermia) in nonstimulated animals, accounting for the currently biphasic effect of PGE<sub>2</sub> on body temperature.

In order to validate the current model of fever induced by PGE<sub>2</sub>, we investigated the effect of selected EP receptor antagonists on PGE<sub>2</sub>-induced fever. The selective EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors antagonists (SC-19220 and L-826266, respectively), but not the EP<sub>4</sub> antagonist (L-161982), prevented PGE<sub>2</sub>-induced fever. These results demonstrate the specificity of the PGE<sub>2</sub>-induced response and suggest the involvement of EP<sub>3</sub> and EP<sub>1</sub> receptors in the fever induced by the intrathecal injection of PGE<sub>2</sub>. These results are also in full agreement with the previous studies that have suggested a major role for EP<sub>3</sub> and EP<sub>1</sub> receptors in the development of fever in mice and rats (Ushikubi et al., 1998; Oka et al., 2003a; Oka et al., 2003b). Further evidence supporting the specificity of the fever induced by the intrathecal injection of PGE<sub>2</sub> comes from the experiments that have demonstrated that the classic antipyretics dipyrene and acetaminophen (whose mechanism of action seems to involve cyclooxygenase inhibition and decrease of PGE<sub>2</sub> production) did not alter PGE<sub>2</sub>-induced fever. In fact, such specificity makes this model particularly suitable to investigate whether the antipyretic action of selected compounds occurs upstream or downstream the prostaglandin pathway.

In summary, in this study we describe and validate a protocol of fever induction by the intrathecal administration of PGE<sub>2</sub> in young rats. This protocol is particularly advantageous compared to others in the literature considering ethical, technical and economical aspects, because: 1) it minimizes the influence of the inflammatory response caused by cannulation on PGE<sub>2</sub>-induced fever; 2) it reduces animal



suffering and experimental costs associated to a previous surgery of cannula implantation; 3) it provides information regarding the putative mechanism of action of antipyretic compounds.

### **Acknowledgements**

The authors thank Paulino Aguiar and Florindo Moreira for competent technical support.

## References

- Blatteis, C. M. (2004) The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy? *J Therm Biol*, **29**, 359-368.
- Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., Perlik, V. (2005) Cytokines, PGE<sub>2</sub> and endotoxin fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **76**, 1-18.
- Blatteis, C. M., Sehic, E. (1997) Prostaglandin E<sub>2</sub>: a putative fever mediator, In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), *Fever: Basic Mechanisms and Management*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott- Raven, 117-145.
- Boie, Y., Stocco, R., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Ungrin, M.D., Neuschafer-Rube, F., Puschel, G.P., Metters, K.M., Abramovitz, M. (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E<sub>2</sub> prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, **340**, 227-241.
- Claudino, R. F., Kassuya, C. A. L., Ferreira, J., Calixto, J. B. (2006) Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mouse paw edema. *J Pharmacol Exp Ther*, **318**, 611-618.
- Coceani, F., Akarsu, E. S. (1998) Prostaglandin E<sub>2</sub> in the pathogenesis of fever: an update. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 76-82.
- Engblom, D., Ek, M., Saha, S., Ericsson-Dahlstrand, A., Jakobsson, P.-J., Blomqvist, A. (2002) Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain-barrier. *J Mol Med*, **80**, 5-15.
- Fernandez-Alonso, A., Benamar, K., Sancibrián, M., Lopez-Valpuesta, F. J., Minano, F. J. (1996) Role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  in prostaglandin-E<sub>2</sub>-induced hyperthermia in rats. *Life Sci*, **59**, PL185-PL190.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Lukovic, L., Bigaud, M., Stoeckel, M. E. (1998) Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res.*, **794**, 211-224.
- Huang, Y.-L., Säljö, A., Suneson, A., Hansson, H.-A. (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods*, **63**, 13-22.

- Ivanov, A. I., Romanovsky, A. A. (2004) Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci*, **9**, 1977-1993.
- Kluger, M.J. (1991) Fever - Role of Pyrogens and Cryogens. *Physiol Rev*, **71**, 93-127.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, g., Eschaliere, A. (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **32**, 197-200.
- Milton, A. S. (1996) Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res*, **113**, 129-139.
- Morimoto, A., Murakami, N., Sakata, Y., Watanabe, T., Yamaguchi, K. (1990) Functional and structural differences in febrile mechanism between rabbits and rats. *J Physiol*, **427**, 227-239.
- Neuschafer-Rube, F., Hermosilla, R., Kuna, M., Pathe-Neuschafer-Rube, A., Schulein, R., Puschel, G.P. (2005) A Ser/Thr cluster within the C-terminal domain of the rat prostaglandin receptor EP3alpha is essential for agonist-induced phosphorylation, desensitization and internalization. *Br J Pharmacol*, **145**, 1132-1142.
- Oka, K., Oka, T., Hori, T. (1997) Prostaglandin E<sub>2</sub> may induce hyperthermia through EP<sub>1</sub> receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. *Brain Res*, **767**, 92-99.
- Oka, T. (2004) Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front Biosci*, **9**, 3046-3057.
- Oka, T., Oka, K., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C.B. (2003a) Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J Physiol*, **551**, 945-954.
- Oka, T., Oka, K., Saper, C.B. (2003b) Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res*, **968**, 256-262.

- Oka, T., Oka, K., Scammell, T.E., Lee, C., Kelly, J.F., Nantel, F., Elmquist, J.K., Saper, C.B. (2000) Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol*, **428**, 20-32.
- Roth, J. (2006) Endogenous antipyretics. *Clin Chim Acta*, **371**, 13-24.
- Shimada, S.G., Otterness, I.G., Stitt, J.T. (1994) A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. *Agents Actions*, **41**, 188-192.
- Souza, F.R., Souza, V.T., Ratzlaff, V., Borges, L.P., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F. (2002) Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice. *Eur J Pharmacol*, **451**, 141-147.
- Steiner, A. A., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L. G. S. (2002) Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res*, **944**, 135-145.
- Stitt, J.T., Shimada, S.G., Bernheim, H.A. (1985) Comparison of febrile responsiveness of rats and rabbits to endogenous pyrogen. *J Appl Physiol*, **59**, 1721-1725.
- Tomazetti, J., Avila, D.S., Ferreira, A.P.O., Martins, J.S., Souza, F.R., Royer, C., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Bonacorso, W.G., Martins, M.A.P., Zanatta, N., Mello, C.F. (2005) Baker yeast-induced fever in young rats: Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Methods*, **147**, 29-35.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, **395**, 281-284.

---

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que a injeção i.t. de PGE<sub>2</sub>, na dose de 10 ng/animal, induz febre em ratos jovens. Esta resposta febril é prevenida pela administração de antagonistas seletivos de receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub>, mas não por antagonista de receptor EP<sub>4</sub>. Além disso, os antipiréticos clássicos dipirona e paracetamol, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de prostaglandinas, não revertem a febre induzida pela administração i.t. de PGE<sub>2</sub>.

Evidências experimentais têm sugerido que a PGE<sub>2</sub> é o mediador final da resposta febril (Milton, 1996; Blatteis e Sehic, 1997; Coceani e Akarsu, 1998; Engblom et al., 2002; Ivanov e Romanovsky, 2004; Oka, 2004) e que ela atua por meio dos receptores EP, localizados nos neurônios da POHA, onde se situa o centro termorregulatório (Blatteis, 2004). De fato, os achados de que a injeção i.c.v. de pequenas quantidades de PGE<sub>2</sub> causa febre, e que antagonistas dos receptores EP previnem esta resposta febril constituem evidências importantes de que a PGE<sub>2</sub> desempenha um papel pirogênico no SNC (Fernandez-Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b).

Um achado importante do presente estudo foi a obtenção de febre em ratos pela administração de apenas 10 ng (~28 pmol) de PGE<sub>2</sub>, uma dose que é cinco a dez vezes mais baixa que a dose reportada por outros grupos de pesquisadores para produzir febre pela via i.c.v. em ratos (Fernandez-Alonso et al., 1996; Oka et al., 1997; Steiner et al., 2002; Oka et al., 2003b). Acredita-se que fatores metodológicos possam ter contribuído para esta discrepância. Em primeiro lugar, para injetar substâncias pela via i.c.v., uma cânula precisa ser implantada no cérebro dos animais. É bem conhecido que a implantação de cânulas exige inevitável trepanação e lesão tecidual (Huang et al., 1995), liberando diversos compostos citotóxicos e citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998), as quais aumentam a produção de PGE<sub>2</sub> (Blatteis, 2004; Blatteis et al., 2005). A administração de PGE<sub>2</sub> pela via i.t. evita a colocação de cânula e a conseqüente resposta inflamatória. Por isso, pode-se sugerir que a resposta inflamatória causada pela implantação de cânula poderia ter alterado a sensibilidade dos receptores EP à PGE<sub>2</sub> nos estudos descritos na literatura. De fato, foi reportado recentemente que a exposição prolongada à PGE<sub>2</sub> dessensibiliza os receptores EP

por aumentar a internalização e a fosforilação destes receptores (Neuschafer-Rube et al., 2005). Isto explicaria porque, no presente estudo, obteve-se uma elevação significativa na  $T_c$  usando uma dose de  $PGE_2$  até dez vezes menor do que a dose reportada previamente para produzir febre pela via i.c.v. em ratos.

Um segundo achado interessante do presente estudo foi o efeito bifásico das doses de  $PGE_2$  na variação da  $T_R$  ao longo do tempo. Enquanto baixas doses de  $PGE_2$  (10 ng) aumentaram a  $T_R$ , doses altas (30, 50 e 100 ng) não tiveram efeito significativo ao longo do tempo. Três subtipos diferentes de receptor EP têm sido implicados no controle da  $T_c$  em ratos. Enquanto a injeção i.c.v. de agonistas específicos dos receptores  $EP_1$  e  $EP_3$  aumentaram a  $T_c$ , a administração de um agonista  $EP_4$  diminuiu-a (Oka et al., 2003b). Diante disso, poderia-se argumentar que quantidades crescentes de  $PGE_2$  ativariam diferentes subpopulações de receptores EP, resultando em um efeito bifásico da  $PGE_2$  sobre a  $T_c$ . Para confirmar esta hipótese, a afinidade dos receptores  $EP_1$  e/ou  $EP_3$  pela  $PGE_2$  deveria ser maior que a afinidade dos receptores  $EP_4$ . Se essa afirmação fosse verdadeira, baixas doses de  $PGE_2$  estimulariam principalmente receptores  $EP_1$  e/ou  $EP_3$ , resultando em hipertermia. Doses mais altas estimulariam também receptores  $EP_4$ , não alterando a  $T_c$  devido ao efeito hipotérmico resultante da ativação deste último receptor. Contrário a esta possibilidade, contudo, está o achado de que a afinidade relativa dos receptores  $EP_3$  e  $EP_4$  de ratos pela  $PGE_2$  é praticamente a mesma e, maior que a afinidade do receptor  $EP_1$  (Boie et al., 1997). No entanto, já que animais previamente expostos ao LPS apresentam maior expressão de receptores  $EP_4$  do que animais não-expostos (Oka et al., 2000), doses maiores de  $PGE_2$  seriam provavelmente necessárias para desencadear as respostas mediadas pelo receptor  $EP_4$  (neste caso, hipotermia) em animais virgens experimentalmente, justificando o efeito bifásico da  $PGE_2$  na  $T_R$  observado no presente trabalho.

A fim de validar o presente modelo, investigou-se o efeito de antagonistas seletivos dos receptores EP na febre induzida por  $PGE_2$ . Os antagonistas seletivos dos receptores  $EP_1$  e  $EP_3$  (SC-19220 e L-826266, respectivamente) preveniram a febre induzida por  $PGE_2$ , enquanto o antagonista  $EP_4$  (L-161982) não alterou a resposta febril. Estes resultados demonstram a especificidade da resposta produzida pela  $PGE_2$  e sugerem o envolvimento dos receptores  $EP_1$  e  $EP_3$  na febre induzida

pela injeção i.t. de PGE<sub>2</sub>. Estes resultados também estão de acordo com os estudos prévios que têm sugerido um papel crucial para os receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> no desenvolvimento de febre em camundongos e ratos (Ushikubi et al., 1998; Oka et al., 2003a; Oka et al., 2003b). Mais evidências sustentando a especificidade da febre induzida pela injeção i.t. de PGE<sub>2</sub> provém dos experimentos em que os antipiréticos clássicos dipirona e paracetamol (cujo mecanismo de ação parece envolver a inibição da COX e a conseqüente diminuição da produção de PGE<sub>2</sub>) não alteraram a febre induzida por PGE<sub>2</sub>. De fato, tal especificidade torna este modelo particularmente útil para investigar se a ação antipirética de determinados compostos ocorre antes ou depois da ligação da PGE<sub>2</sub> em seus receptores EP.

Em suma, neste estudo foi descrito e validado um protocolo de indução de febre pela administração i.t. de PGE<sub>2</sub> em ratos jovens. Este modelo é particularmente vantajoso quando comparado a outros descritos na literatura considerando aspectos técnicos, éticos e econômicos, pois: 1) minimiza a influência da resposta inflamatória causada pela canulação na febre induzida por PGE<sub>2</sub>; 2) reduz o sofrimento dos animais e os custos experimentais associados a uma cirurgia prévia de implantação de cânula; 3) fornece informação a respeito do provável mecanismo de ação de compostos antipiréticos.



---

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo foi padronizado e validado um novo modelo de indução de febre pela injeção intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub> em ratos jovens. A avaliação dos resultados obtidos neste trabalho permitiu concluir que:

- 1) A administração intratecal de 100 µL/animal do corante azul de Coomassie atingiu a base do crânio dos ratos jovens dentro de 5 minutos após a injeção e o mesmo volume de salina, estéril e apirogênica, não alterou a temperatura retal dos animais ao longo do tempo.
- 2) A administração intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub> na dose de 10 ng/animal (em um volume de 100 µL) induziu febre em ratos jovens. As doses maiores não alteraram significativamente a temperatura retal dos animais ao longo do tempo.
- 3) A administração intratecal de antagonistas seletivos dos receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> (SC-19220 e L-826266, respectivamente) preveniu a febre induzida por PGE<sub>2</sub> em ratos jovens, enquanto o antagonista de receptor EP<sub>4</sub> (L-161982) não alterou a resposta febril.
- 4) A administração subcutânea dos antipiréticos clássicos dipirona e paracetamol, em doses que não apresentaram efeito *per se*, não reverteu a febre induzida pela injeção intratecal de PGE<sub>2</sub> em ratos jovens.

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUL, H. T.; DAVIDSON, J.; MILTON, A. S.; ROTONDO, D. Prostaglandin E<sub>2</sub> enters the brain following stimulation of the acute phase immune response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **813**: 287-295, 1997.
- ADAM, D.; STANKOV, G. Treatment of fever in childhood. **Eur. J. Pediatr.**, **153**: 394-402, 1994.
- ARELLANO, F.; SACRISTAN, S. A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **38**: 617-619, 1990.
- ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **Am. J. Med.**, **111**: 304-315, 2001.
- ATKINS, E. Fever: its history, cause, and function. **Yale J. Biol. Med.**, **55**: 283-289, 1982.
- ATKINS, E.; BODEL, P. Clinical fever: its history, manifestations and pathogenesis. **Fed. Proc.**, **38**: 57-63, 1979.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: Assessment with species-specific enzyme immunoassays. **J. Neuroimmunol.**, **79**: 22-28, 1997.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**, **2**: 241-248, 1995.
- BENDER, B. S.; SCARPACE, P. J. Fever in the elderly. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 363-373, 1997.
- BERGSTROM, S.; FARNEBO, L. O.; FUXE, K. Effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on central and peripheral catecholamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, **21**: 362-368, 1973.
- BERNHEIM, H. A.; KLUGER, M. J. Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. **Science**, **193**: 237-239, 1976.
- BEUTLER, B. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **J. Rheumatol.**, **26**: 16-21, 1999.
- BEUTLER, B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. **Curr. Opin. Immunol.**, **12**: 20-26, 2000.
- BEUTLER, B.; BEUTLER, S. M. A patogênese da febre. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (Eds.), **Cecil, Tratado de Medicina Interna**, 22<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019-2022, 2001.

- BEUTLER, B.; BEUTLER, S. M. The pathogenesis of fever. In: WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. (Eds.), **Cecil Textbook of Medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1568-1573, 1992.
- BLATTEIS, C. M. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? **J. Therm. Biol.**, **28**: 1-13, 2003.
- BLATTEIS, C. M. The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy? **J. Therm. Biol.**, **29**: 359-368, 2004.
- BLATTEIS, C. M. Thermal homeostasis during the neonatal period. **Prog. Biometeorol.**, **7**: 35-40, 1989.
- BLATTEIS, C. M.; DINARELLO, C. A.; SHIBATA, M.; LLANOS-Q, J.; QUAN, N.; BUSIJA, D. W. Does circulating interleukin-1 enter the brain? In: MERCER, J. B. (Ed.), **Thermal Physiology**. Amsterdam: Elsevier, 385-390, 1989.
- BLATTEIS, C. M.; FELEDER, C.; PERLIK, V.; LI, S. Possible sequence of pyrogenic afferent processing in the POA. **J. Therm. Biol.**, **29**: 391-400, 2004b.
- BLATTEIS, C. M.; LI, S.; LI, Z.; FELEDER, C.; PERLIK, V. Cytokines, PGE<sub>2</sub> and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, **76**: 1-18, 2005.
- BLATTEIS, C. M.; LI, S.; LI, Z.; PERLIK, V.; FELEDER, C. Complement is required for the induction of endotoxic fever in guinea pigs and mice. **J. Therm. Biol.**, **29**: 369-381, 2004a.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Prostaglandin E<sub>2</sub>: a putative fever mediator, In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott- Raven, 117-145, 1997.
- BLESSING, W. W.; NALIVAICO, E. Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. **Neuroscience**, **105**: 923-929, 2001.
- BOIE, Y.; STOCCO, R.; SAWYER, N.; SLIPETZ, D. M.; UNGRIN, M. D.; NEUSCHÄFER-RUBE, F.; PÜSCHEL, G.P.; METTERS, K. M.; ABRAMOVITZ, M. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E<sub>2</sub> prostanoid receptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.**, **340**: 227-241, 1997.
- BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; DAY, R.; FERRAZ, M. B.; HAWKEY, C. J.; HOCHBERG, M. C.; KVIEN, T. K.; SCHNITZER, T. J. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **N. Engl. J. Med.**, **343**: 1520-1528, 2000.
- BONADIO, W. A.; ROMINE, K.; GYURO, J. Relationship of fever magnitude to rate of serious bacterial infections in neonates. **J. Pediatr.**, **116**: 733-735, 1990.

- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L., WILLIAMS, D. A. (Eds.), **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Williams and Wilkins, 535-580, 1995.
- BOULANT, J. A. Thermoregulation. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 35-58, 1997.
- BREDER, C. D.; SAPER, C. B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res.**, **713**: 64-69, 1996.
- BRIESE, E.; CABANAC, M. Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever. **Physiol. Behav.**, **49**: 1153-1157, 1991.
- BRYANT, R. E.; HOOD, A. F.; HOOD, C. E.; LOENIG, M. G. Factors affecting mortality of gram-negative rod bacteremia. **Arch. Intern. Med.**, **127**: 120-128, 1971.
- CANNON, J. G. Inflammatory cytokines in nonpathological states. **News Physiol. Sci.**, **15**: 298-303, 2000.
- CANNON, J. G.; TOMPKINS, R. G.; GELFAND, J. A.; MICHIE, H. R.; STANFORD, G. G.; VAN DER MEER, J. W.; ENDRES, S.; LONNEMANN, G.; CORSETTI, J.; CHERNOW, B.; et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. **J. Infect. Dis.**, **161**: 79-84, 1993.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. **Brain Res.**, **733**: 263-272, 1996.
- CAO, W.-H.; FAN, W.; MORRISON, S. F. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. **Neuroscience**, **126**: 229-240, 2004.
- CAO, W.-H.; MORRISON, S. F. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. **Brain Res.**, **980**: 1-10, 2003.
- CLAUDINO, R. F.; KASSUYA, C. A. L.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mouse paw edema. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **318**: 611-618, 2006.

- COCEANI, F.; AKARSU, E. S. Prostaglandin E<sub>2</sub> in the pathogenesis of fever: an update. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 76-82, 1998.
- COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 205-229, 1994.
- CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. **Front. Biosci.**, **9**: 1433-1449, 2004.
- CRONSTEIN, B. N.; MONTESINOS, M. C.; WEISSMANN, G. Sites of action for future therapy: an adenosine-dependent mechanism by which aspirin retains its antiinflammatory activity in cyclooxygenase-2 and NFkappaB knockout mice. **Osteoarthr. Cartil.**, **7**: 361-363, 1999.
- DASCOMBE, M. J.; MILTON, A. S. Study on the possible entry of bacterial endotoxin and prostaglandin E<sub>2</sub> into the central nervous system from the blood. **Br. J. Pharmacol.**, **66**: 565-572, 1979.
- DAVIDSON, J. V.; ABUL, H. T.; MILTON, A. S.; ROTONDO, D. Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E<sub>2</sub> entry into the brain. **Pflugers Arch.**, **422**: 526-533, 2001.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, **87**: 2095-2147, 1996.
- DINARELLO, C. A.; BUNN, P. A. Fever. **Semin. Oncol.**, **24**: 288-298, 1997.
- DINARELLO, C. A.; GATTI, S.; BARTFAI, T. Fever: links with an ancient receptor. **Curr. Biol.**, **9**: R147-R150, 1999.
- DINARELLO, C. A.; POMERANTZ, B. J. Proinflammatory cytokines in heart disease. **Blood Purif.**, **19**: 314-321, 2001.
- DOGAN, M. D.; ATAOGU, H.; AKARSU, E. S. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. **Life Sci.**, **67**: 2319-2329, 2000.
- DONE, A. K. Treatment of fever in 1982: a review. **Am. J. Med.**, **74**: 27-35, 1983.
- DUBOIS, E. F. Why are fevers over 106 °F rare? **Am. J. Med. Sci.**, **217**: 361-368, 1949.
- DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Eds.), **Psychoneuroimmunology**. New York: Academic, 645-666, 2001.

- DUNN, A. J.; HALL, N. R. S. CNS biogenic amines and the immune system. In: MARSH, J. A.; KENDALL, M. D. (Eds.), **The physiology of immunity**. Boca Raton: CRC, 145-156, 1999.
- DUNN, A. J.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, **2**: 319-328, 1995.
- EK, M.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Distribution of the EP<sub>3</sub> prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J. Comp. Neurol.**, **428**: 5-20, 2000.
- EK, M.; ENGBLOM, D.; SAHA, S.; BLOMQVIST, A.; JAKOBSSON, P. J.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. **Nature**, **410**: 430-431, 2001.
- EK, M.; KUROKAWA, M.; LUNDEBERG, T.; ERICSSON, A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. **J. Neurosci.**, **18**: 9471-9479, 1998.
- ELMQUIST, J. K.; BREDER, C. D.; SHERIN, J. E.; SCAMMEL, 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.**, **381**: 119-129, 1997b.
- ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends Neurosci.**, **20**: 565-570, 1997a.
- ELSBACH, P. Mechanisms of disposal of bacterial lipopolysaccharides by animal hosts. **Microbes Infect.**, **2**: 1171-1180, 2000.
- ENDO, Y.; SHIRAKI, K. Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure. **Physiol. Behav.**, **71**: 263-268, 2000.
- ENGBLOM, D.; EK, M.; SAHA, S.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A.; JAKOBSSON, P. J.; BLOMQVIST, A. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain-barrier. **J. Mol. Med.**, **80**: 5-15, 2002.
- FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATTEIS, C. M. Preoptic  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -noradrenergic agonists induce, respectively, PGE<sub>2</sub>-independent and PGE<sub>2</sub>-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. **Am. J. Physiol.**, **286**: R1156-R1166, 2004.
- FERNANDEZ-ALONSO, A.; BENAMAR, K.; SANCIBRIÁN, M.; LOPEZ-VALPUESTA, F. J.; MINANO, F. J. Role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  in prostaglandin-E<sub>2</sub>-induced hyperthermia in rats. **Life Sci.**, **59**: PL185-PL190, 1996.



- FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). **Nature**, **240**: 410-411, 1972.
- FOSTER, K.; CONN, C.; KLUGER, M. J. Fever, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in young, mature, and aged Fischer 344 rats. **Am. J. Physiol.**, **262**: R211-R215, 1992.
- GAYKEMA, R. P. A.; DIJKSTRA, I.; TILDERS, F. J. H. Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotrophin-releasing hormone neurons and ACTH release. **Endocrinology**, **136**: 4717-4720, 1995.
- GELFAND, J. A.; DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. Fever, including fever of unknown origin. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. (Eds.), **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 13. ed. New York: McGraw-Hill, 81-87, 1997.
- GOEHLER, L.E.; GAYKEMA, R.P.; NGUYEN, K.T.; KIECHLE, R., TARTAGLIA, N., MAIER, S.F., WATKINS, L.R. Interleukin-1 $\beta$  in immune cells of abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.**, **19**: 2799-2806, 1999.
- GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol. Behav.**, **47**: 963-991, 1990.
- GREEN, M. H.; VERMEULEN, C. W. Fever and the control of Gram-negative bacteria. **Res. Microbiol.**, **145**: 269-272, 1994.
- GUPTA, R. A.; DUBOIS, R. N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat. Rev. Cancer**, **1**: 11-21, 2001.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Temperatura Corporal, Regulação Térmica e Febre. In: **Tratado de Fisiologia Médica**, 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 769-779, 2002.
- HAMMEL, H. T. Neurons and temperature regulation. In: YAMAMOTO, W. S.; BROBECK, J. R. (Eds.), **Physiological Controls and Regulations**. Philadelphia: W. B. Saunders, 71-97, 1965.
- HAUSS-WEGRZYNIAK, B.; LUKOVIC, L.; BIGAUD, M.; STOECKEL, M. E. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. **Brain Res.**, **794**: 211-224, 1998.
- HEDQVIST, P. Basic mechanisms of prostaglandin action on autonomic neurotransmission. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **17**: 259-279, 1977.

- HESSE, D. G.; TRACEY, K. J.; FONG, Y.; MANOGUE, K. R.; PALLADINO, M. A. J.; CERAMI, A.; SHIRES, G. T.; LOWRY, S. F. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **166**: 147-153, 1988.
- HOEFS, J.; SAPICO, F. L.; CANAWATI, H. N.; MONTGOMERIE, J. Z. The relationship of white blood cell (WBC) and pyrogenic response to survival in spontaneous bacterial peritonitis (SBP). **Gastroenterology**, **78**: 1308, 1980.
- HOLTZCLAW, B. J. The febrile response in critical care: state of the science. **Heart Lung**, **21**: 482-501, 1992.
- HORI, Y.; BLATTEIS, C. M.; NASJLETTI, A. Production of PGE<sub>2</sub> by brain slices stimulated by various thermoactive agents. **Fed. Proc.**, **46**: 683, 1987.
- HUANG, Y.-L.; SÄLJÖ, A.; SUNESON, A.; HANSSON, H.-A. A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. **J. Neurosci. Methods**, **63**: 13-22, 1995.
- HUNTER, W. S.; SEHIC, E.; BLATTEIS, C. M. In: MILTON, A. S. (Ed.), **Temperature Regulation: Recent Physiological and Pharmacological Advances**. Birkhäuser, 75-85, 1994.
- HUSSEINI, R. H.; SWEET, C.; COLLIE, M. H.; SMITH, H. Elevation of nasal viral levels by suppression of fever in ferrets infected with influenza viruses of differing virulence. **J. Infect. Dis.**, **145**: 520-524, 1982.
- INOUE, W.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; TAKEMIYA, T.; SHIRAKI, T.; KOBAYASHI, S. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. **Neurosci. Res.**, **44**: 51-61, 2002.
- INSEL, P. A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Eds.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 617-657, 1996.
- IVANOV, A. I.; PERO, R. S.; SCHECK, A. C.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. **Am. J. Physiol.**, **282**: R1104-R1117, 2002.
- IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Front. Biosci.**, **9**: 1977-1993, 2004.
- JANSKY, L.; VYBIRAL, S.; POSPISILOVA, D.; ROTH, J.; DORAND, J.; ZEISBERGER, E. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. **Neuroendocrinology**, **62**: 55-61, 1995.

- KIRTIKARA, K.; MORHAM, S. G.; RAGHOW, R.; LAULEDERKIND, S. J.; KANEKURA, T.; GOORHA, S.; BALLOU, L. R. Compensatory prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. **J. Exp. Med.**, **187**: 517-523, 1998.
- KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.**, **71**: 93-127, 1991.
- KLUGER, M. J.; KOZAK, W.; CONN, C. A.; LEON, L. R.; SOSZYNSKI, D. Role of fever in disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 224-233, 1998.
- KLUGER, M. J.; O'REILLY, B.; SHOPE, T. R.; VANDER, A. J. Further evidence that stress hyperthermia is a fever. **Physiol. Behav.**, **39**: 763-766, 1987.
- KOBAYASHI, T.; NARUMIYA, S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, **68-69**: 557-573, 2002.
- KOZAK, W.; KLUGER, M. J.; TESFAIGZI, J.; KOZAK, A.; MAYFIELD, K. P.; WACHULEC, M.; DOKLADNY, K. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **917**: 121-134, 2000.
- 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(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. **Brain Res.**, **825**: 86-94, 1999.
- LI, Z.; BLATTEIS, C. M. Fever onset is linked to the appearance of lipopolysaccharide in the liver. **J. Endotoxin Res.**, **10**: 39-53, 2004.
- LINTHORST, A. C.; FLACHSKAMM, C.; HOLSBOER, F.; REUL, J. M. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic—pituitary-adrenocortical axis activity. **Eur. J. Neurosci.**, **7**:2418-2430, 1995.
- MACHWATE, M.; HARADA, S.; LEU, C. T.; SEEDOR, G.; LABELLE, M.; GALLANT, M.; HUTCHINS, S.; LACHANCE, N.; SAWYER, N.; SLIPETZ, D.; METTERS, K. M.; RODAN, S. B.; YOUNG, R.; RODAN, G. A. Prostaglandin receptor EP<sub>4</sub> mediates the bone anabolic effects of PGE<sub>2</sub>. **Mol. Pharmacol.**, **60**: 36-41, 2001. Erratum in: *Mol. Pharmacol.*, **64**: 192, 2001.
- MACKOWIAK, P. A. Direct effects of physiologic variations in temperature on pathogenic microorganisms. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**. New York: Raven Press, 167-182, 1991.
- MACKOWIAK, P. A. Normal "body" temperature. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 35-58, 1997.

- MACKOWIAK, P. A.; BROWNE, R. H.; SOUTHERN, P. M. J.; SMITH, J. W. Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. **Am. J. Med. Sci.**, **280**: 73-80, 1980.
- MACKOWIAK, P. A.; PLAISANCE, K. I. Benefits and risks of antipyretic therapy. **Ann. N. Y. Sci.**, **856**: 214-223, 1998.
- 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.**, **286**: R320-R325, 2003.
- MALAVIYA, R.; GEORGES, A. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, **22**: 189-204, 2002.
- MALIK, K. U.; SEHIC, E. Prostaglandins and the release of the adrenergic transmitter. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **604**: 222-236, 1990.
- MARINO, M. W.; DUNN, A.; GRAIL, D.; INGLESE, M.; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, E.; JUNGBLUTH, A.; WADA, H.; MOORE, M.; WILLIAMSON, B.; BASU, S.; OLD, I. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 8093-8098, 1997.
- MATSUMURA, K.; CAO, C.; OZAKI, M.; MORII, H.; NAKADATE, K.; WATANABE, Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. **J. Neurosci.**, **18**: 6279-6289, 1998.
- MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of endothelial cells. **Front. Biosci.**, **9**: 2819-2826, 2004.
- MCCARTHY, P. L. Fever in infants and children. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 351-362, 1997.
- MILTON, A. S. Prostaglandins and fever. **Prog. Brain Res.**, **113**: 129-139, 1996.
- MILTON, A. S.; WENDLANDT, 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.**, **218**: 325-336, 1971.
- MONTUSCHI, P.; BARNES, P. J.; ROBERTS, I. I. L. J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. **FASEB J.**, **18**: 1791-1800, 2004.
- MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N.; SAKATA, Y.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K. Functional and structural differences in febrile mechanism between rabbits and rats. **J. Physiol.**, **427**: 227-239, 1990.

- MORRISON, S. F. Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E<sub>2</sub>-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. **Neuroscience**, **121**: 17-24, 2003.
- MORRISON, S. F.; CAO, W.-H.; MADDEN, C. J. Dorsomedial hypothalamic and brainstem pathways controlling thermogenesis in brown adipose tissue. **J. Therm. Biol.**, **29**: 333-337, 2004.
- MORRISON, S. F.; SVED, A. F.; PASSERIN, A. M. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, **276**: R290-R297, 1999.
- NAKAMURA, K. Fever-inducing sympathetic neural pathways. **J. Therm. Biol.**, **29**: 339-344, 2004.
- NAKAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMASHITA, Y.; HASEGAWA, H.; KATOH, H.; ICHIKAWA, A.; NEGISHI, M. Immunocytochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat hypothalamus. **Neurosci. Lett.**, **260**: 117-120, 1999.
- NAKAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMASHITA, Y.; HASEGAWA, H.; KATOH, H.; NEGISHI, M. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **421**: 543-569, 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.**, **24**: 5370-5380, 2004.
- NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KANEKO, T.; KOBAYASHI, S.; KATOH, H.; NEGISHI, M. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. **J. Neurosci.**, **22**: 4600-4610, 2002.
- NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S.; KANEKO, T. Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. **Neurosci. Res.**, **51**: 1-8, 2005.
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol. Rev.**, **79**: 1193-1226, 1999.
- NEGISHI, M.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostaglandin E receptors. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.**, **12**: 379-391, 1995.
- NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. Circulating cytokines as mediators of fever. **Clin. Infect. Dis.**, **31** (Suppl. 5): S178-S184, 2000.

- NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. **Eur. J. Clin. Invest.**, **29**: 351-356, 1999.
- NEUSCHAFER-RUBE, F.; HERMOSILLA, R.; KUNA, M.; PATHE-NEUSCHAFER-RUBE, A.; SCHULEIN, R.; PUSCHEL, G.P. A Ser/Thr cluster within the C-terminal domain of the rat prostaglandin receptor EP3alpha is essential for agonist-induced phosphorylation, desensitization and internalization. **Br. J. Pharmacol.**, **145**: 1132-1142, 2005.
- OKA, K.; HORI, T. EP<sub>1</sub>-receptor mediation of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced hyperthermia in rats. **Am. J. Physiol.**, **267**: R289-R294, 1994.
- OKA, K.; OKA, T.; HORI, T. PGE<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>1</sub> antagonist may inhibit central interleukin-1beta-induced fever in rats. **Am. J. Physiol.**, **275**: R1762-R1765, 1998.
- OKA, K.; OKA, T.; HORI, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> may induce hyperthermia through EP<sub>1</sub> receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. **Brain Res.**, **767**: 92-99, 1997.
- OKA, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. **Front. Biosci.**, **9**: 3046-3057, 2004.
- OKA, T.; OKA, K.; KOBAYASHI, T.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S.; SAPER, C. B. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. **J. Physiol.**, **551**: 945-954, 2003a.
- OKA, T., OKA, K.; SAPER, C. B. Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. **Brain Res.**, **968**: 256-262, 2003b.
- OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T. E.; LEE, C.; KELLY, J. F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J. Comp. Neurol.**, **428**: 20-32, 2000.
- PALKOVITS, M.; ZABORSKY, L.; FEMINGER, A.; MEZEY, E.; FEKETE, M. I.; HERMAN, J. P.; KANYICKSKA, B.; SZABO, D. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental biochemical and electron microscopic studies. **Brain Res.**, **191**: 161-171, 1980.
- PARROTT, R. F.; VELLUCCI, S. V. Effects of centrally administered prostaglandin EP receptor agonists on febrile and adrenocortical responses in the prepubertal pig. **Brain Res. Bull.**, **41**:97-103, 1996.

- PERLIK, V.; LI, Z.; GOORHA, S.; BALLOU, L. R., BLATTEIS, C. M. Fever is triggered by prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> induced in liver by lipopolysaccharide (LPS)-activated complement (C) rather than by LPS itself. **FASEB J.**, **18**: A1098, 2004.
- PIERCE, J. W.; READ, M. A.; DING, H.; LUSCINSKAS, F. W.; COLLINS, T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. **J. Immunol.**, **156**: 3961-3969, 1996.
- QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. **Brain Res.**, **802**:189-197, 1998.
- RAINSFORD, K. D. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Am. J. Med.**, **107**: 27S-36S, 1999.
- RHUR, S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C by G protein. In: LISCOVITCH, M. (Ed.), **Signal-activated phospholipases**. Austin: RG Landes, 1-12, 1994.
- RODBARD, D.; WACHSLICHT-RODBARD, H.; RODBARD, S. Temperature: a critical factor determining localization and natural history of infectious, metabolic and immunological diseases. **Perspect. Biol. Med.**, **23**: 439-474, 1980.
- ROGHMANN, M. C.; WARNER, J.; MACKOWIAK, P. A. The relationship between age and fever magnitude. **Am. J. Med. Sci.**, **322**: 68-70, 2001.
- ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; KARMAN, E. K. Blood-borne, albumin-bound prostaglandin E<sub>2</sub> may be involved in fever. **Am. J. Physiol.**, **276**: R1840-R1844, 1999.
- ROMANOVSKY, A. A.; SIMONS, C. T.; KULCHITSKY, V. A. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. **Am. J. Physiol.**, **275**: 323-331, 1998.
- ROMANOVSKY, A. A.; SIMONS, C. T.; SZEKELY, M.; KULCHITSKY, V. A. The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. **Am. J. Physiol.**, **273**: R407-R413, 1997.
- ROSMAN, P. Febrile convulsions. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott- Raven, 267-277, 1997.
- ROTH, J. Endogenous antipyretics. **Clin. Chim. Acta**, **371**: 13-24, 2006.

- ROTH, J.; HARRÉ, E. M.; RUMMEL, C.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHELE, T. Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. **Front. Biosci.**, **9**: 290-300, 2004.
- ROTHWELL, N. J. Eicosanoids, thermogenesis and thermoregulation. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, **46**: 1-7, 1992.
- ROTONDO, D.; ABUL, H. T.; MILTON, A. S.; DAVIDSON, J. V. Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E<sub>2</sub> in the blood simultaneously with the onset of fever. **Eur. J. Pharmacol.**, **154**: 145-152, 1988.
- SAPER, C. B. Neurobiological basis of fever. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 90-94, 1998.
- SAPER, C. B.; BREDER, C. D. The neurologic basis of fever. **N. Engl J. Med.**, **330**: 1880-1886, 1994.
- SATINOFF, E.; PELOSO, E.; PLATA-SALAMN, C. R. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced fever in young and old Long-Evans rats. **Physiol. Behav.**, **67**: 149-152, 1999.
- SCHIEFERDECKER, H. L. G.; SCHLAF, G.; JUNGERMANN, K.; GOTZE, O. Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. **Int. Immunopharmacol.**, **1**: 469-481, 2001.
- SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **J. Neurosci.**, **22**: 5606-5618, 2002.
- SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. **Front. Biosci.**, **8**: 1321-1329, 2003.
- SCHLAF, G.; SCHMITZ, M.; ROTHERMEL, A.; JUNGERMANN, K.; SCHIEFERDECKER, H. L.; GOTZE, O. Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. **Histol. Histopathol.**, **18**: 299-308, 2003.
- SCHUMACKER, P.; ROWLAND, J.; SALTZ, S.; NELSON, D.; WOOD, L. Effects of hyperthermia on oxygen extraction by tissues during hypovolemia. **J. Appl. Physiol.**, **63**: 1246-1252, 1987.
- SCHÜTZE, S.; KRÖNKI, M. Activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C by cytokines. In: LISCOVITCH, M. (Ed.), **Signal-activated phospholipases**. Austin: RG Landes, 1-12, 1994.
- SEHIC, E.; BLATTEIS, C. M. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. **Brain Res.**, **726**: 160-266, 1996.



- SEHIC, E.; UNGAR, A. L.; BLATTEIS, C. M. Interaction between norepinephrine and prostaglandin E<sub>2</sub> in the preoptic area of guinea pigs. **Am. J. Physiol.**, **271**: R528-R536, 1996.
- SERHAN, C. N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? **Prostaglandins**, **53**: 107-137, 1997.
- SHACKELFORD, R. E.; ALFORD, P. B.; XUE, Y.; THAI, S. F.; ADAMS, D. O.; PIZZO, S. Aspirin inhibits tumor necrosis factor-alpha gene expression in murine tissue macrophages. **Mol. Pharmacol.**, **52**: 421-429, 1997.
- SHIMADA, S. G.; OTTERNESS, I. G.; STITT, J. T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents Actions**, **41**: 188-192, 1994.
- SIMON, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **Am. J. Med.**, **106** (suppl): 37S-42S, 1999.
- SIMONS, C. T.; KULCHITSKY, V. A.; SUGIMOTO, N.; HOMER, L. D.; SZEKELY, M.; ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? **Am. J. Physiol.**, **275**: R64-R68, 1998.
- SIRVENT, J.-L. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. **Cytokine**, **15**: 232-236, 2001.
- SMALL, P. M.; TAUBER, M. G.; HACKBARTH, C. J.; SANDE, M. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. **Infect. Immun.**, **52**: 484-487, 1986.
- SOUZA, F. R.; SOUZA, V. T.; RATZLAFF, V.; BORGES, L. P.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; MELLO, C. F. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **451**: 141-147, 2002.
- STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. S. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. **Brain Res.**, **944**: 135-145, 2002.
- STITT, J. T.; SHIMADA, S. G.; BERNHEIM, H. A. Comparison of febrile responsiveness of rats and rabbits to endogenous pyrogen. **J. Appl. Physiol.**, **59**: 1721-1725, 1985.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Prog. Lipid. Res.**, **39**: 289-314, 2000.

- THOMPSON, C. I.; BRANNON, A. J.; HECK, A. L. Emotional fever after habituation to temperature-recording procedure. **Physiol. Behav.**, **80**: 103-108, 2003.
- TOH, H.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. **FEBS Lett.**, **361**: 17-21, 1995.
- TOMAZETTI, J.; ÁVILA, D. S.; FERREIRA, A. P. O.; MARTINS, J. S.; SOUZA, F. R.; ROYER, C.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; MELLO, C. F. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **J. Neurosci. Methods**, **147**: 29-35, 2005.
- TOMS, G. L.; DAVIES, J. A.; WOODWARD, C. G.; SWEET, C.; SMITH, H. The relation of pyrexia and nasal inflammatory response to virus levels in nasal washings of ferrets infected with influenza viruses of differing virulence. **Br. J. Exp. Pathol.**, **58**: 444-458, 1977.
- TRACEY, K.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Ann. Rev. Med.**, **45**: 491-503, 1994.
- USHIKUBI, F.; HIRATA, M.; NARUMIYA, S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.**, **12**: 343-359, 1995.
- USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; HIZAKI, H.; TUBOI, K.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, A.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, **395**: 281-284, 1998.
- VAUGHN, L. K.; VEALE, W. L.; COOPER, K. E. Antipyresis: its effect on mortality rate of bacterially infected rabbits. **Brain Res. Bull.**, **5**: 69-73, 1980.
- WAN, W. A.; WETMORE, L.; SORENSEN, C. M.; GREENBERG, A. H.; VANCE, D. M. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced *c-fos* expression in the rat brain. **Brain Res. Bull.**, **34**: 7-14, 1994.
- WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RESTON, 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.**, **183**: 27-31, 1995b.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanism. **Life Sci.**, **57**: 1011-1026, 1995a.
- WEINSTEIN, M. P.; IANNIN, P. B.; STRATTON, C. W.; EICKHOFF, T. C. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. **Am. J. Med.**, **64**: 592-598, 1978.

- WEISSMANN, G. Aspirin. **Sci. Am.**, **264**: 84-90, 1991.
- WILKINSON, M. F.; KASTIN, N. W. Central vasopressin V1-blockade prevents salicylate but not acetaminophen antipyresis. **J. Appl. Physiol.**, **68**: 1793-1798, 1990.
- 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.**, **21**: 2669-2677, 2001.
- YOSHIDA, K.; NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KANOSUE, K.; KÖNIG, M.; THIEL, H.-J.; BOLDOGKÖI, Z.; TOTH, I.; ROTH, J.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCLE, T. Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Eur. J. Neurosci.**, **18**: 1848-1860, 2003.
- ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V.; DIMICCO, J. A. Role of the dorsomedial hypothalamus in thermogenesis and tachycardia caused by microinjection of prostaglandin E<sub>2</sub> into the preoptic area in anesthetized rats. **Neurosci. Lett.**, **340**: 1-4, 2003.
- ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V.; SHEKHAR, A.; DIMICCO, J. A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. **Brain Res.**, **928**: 113-125, 2002.
- ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **J. Therm. Biol.**, **24**: 287-326, 1999.
- ZHANG, J.; GOORHA, S.; RAGHOW, R.; BALLOU, L. R. The tissue-specific compensatory expression of cyclooxygenase-1 and -2 in transgenic mice. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, **67**: 121-135, 2002.
- ZHANG, J.; RIVEST, S. Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP<sub>2</sub>- and EP<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub> receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. **Eur. J. Neurosci.**, **11**: 2651-2668, 1999.