

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HAISSA OLIVEIRA BRITO

**PARTICIPAÇÃO TAQUICININÉRGICA VIA RECEPTORES NK₁ NA
RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PIROGÊNIOS ENDÓGENOS**

**CURITIBA
2011**

HAISSA OLIVEIRA BRITO

**PARTICIPAÇÃO TAQUICININÉRGICA VIA RECEPTORES NK₁ NA
RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PIROGÊNIOS ENDÓGENOS**

*Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia,
Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.*

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

**CURITIBA
2011**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao décimo oitavo dia do mês de agosto do ano de dois mil e onze, às nove horas,
3 no Anfiteatro do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da
4 Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de
5 Mestrado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia **HAISSA OLIVEIRA BRITO**,
6 intitulada: **“PARTICIPAÇÃO TAQUICININÉRGICA VIA RECEPTORES NK₁ NA**
7 **RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PIROGÊNIOS ENDÓGENOS”**, sob
8 orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e composta pelos professores: Prof.
9 Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia-UFPR); Prof^ª Dr^ª Luana Fischer
10 (Fisiologia-UFPR); Prof^ª Dr^ª Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR). A Banca
11 Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor
12 oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos
13 membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No
14 final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De
15 acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-
16 graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações
17 sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o
18 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada
19 pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 18 de
20 agosto de 2011.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Orientador- UFPR)

Prof.ª Dr.ª Luana Fischer (Fisiologia-UFPR)

Prof.ª Dr.ª Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR)



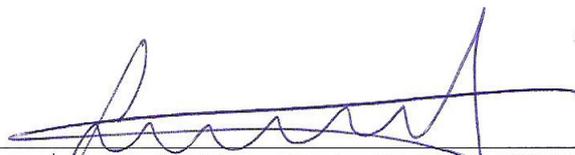
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “PARTICIPAÇÃO TAQUICININÉRGICA VIA RECEPTORES NK₁ NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PIROGÊNIOS ENDÓGENOS”, de autoria da pós-graduanda **HAISSA OLIVEIRA BRITO**, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e composta pelos professores: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia-UFPR); Prof^ª Dr^ª Luana Fischer (Fisiologia-UFPR); Prof^ª Dr^ª Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 18 de agosto de 2011.


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Orientador- UFPR)


Prof^ª Dr^ª Luana Fischer (Fisiologia-UFPR)


Prof^ª Dr^ª Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR)

À minha mãe, Luciane, meu bem mais precioso.

In memorian, Maria Bárbara Faray Oliveira, minha avó, saudades eternas.

À meu pai, Luiz Carlos, pelos valores morais.

Ao meu irmão Luiz Gustavo e minha madrinha, Bethânia, pelo carinho mesmo
que a distância.

In memorian, Alex Sandro Simas, que Deus o guarde.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nosso Senhor e à Virgem Maria, Nossa Senhora e a todos os espíritos de luz, agradeço ontem, hoje e sempre, por tudo.

Ao Prof. Aleksander, pela orientação, amizade construída, exigência, primor à excelência, ensinamentos transmitidos, a minha admiração pelo incentivo ao progresso da Ciência e, acima de tudo, por me ensinar a ser paciente, ética, benevolente. É uma honra ser sua aluna.

À Profa. Célia Clavichiolo, pelos ensaios de imunohistoquímica, mas isso foi o mínimo perto dos ensinamentos de vida que a sra me passou. Minha eterna admiração, carinho e agradecimento. Meu coração nunca irá lhe esquecer.

Ao colega Daniel Fraga, pelo apoio nos experimentos.

Aos amigos, minha família, Alexs Simas (sempre em meu coração), Juliana Pamplona, Fernanda Lapa, Renata Reis, Felipe Barbosa, Rene Piornedo, Priscila de Souza, Luiza, Lígia, as "Pain Girls", pelos momentos inesquecíveis.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela contribuição na formação.

Aos funcionários do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial, às secretárias Ely e Patrícia e à Farmacêutica Sílvia pelo auxílio sempre dispensado.

Aos funcionários do Biotério, pelo fornecimento dos animais.

Aos animais, indispensáveis para a realização deste trabalho e progresso da Ciência.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre pela amizade e companheirismo durante a realização desta etapa.

À Sanofi-Aventis pelo fornecimento do SR140333B.

À Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Luciane, meu tudo, meu amor incondicional, se não fosse a senhora, eu não estaria aqui. Te amo mais que tudo.

Ao meu irmão , Luiz Gustavo, que nunca mediu esforços para conquistar seus objetivos e sempre me apoiou nas situações mais difíceis. Te amo, meu irmão.

À Maria de Lourdes, pelo carinho e dedicação em qualquer hora, sempre disposta a nos ajudar.

À papai, Luiz Carlos, exemplo de honestidade e de que quando gostamos do que fazemos não existe fim-de-semana e tempo ruim. Te amo.

À Bethânia, exemplo de que a família não precisa ser de sangue e sim escolhida pelo coração. Te amo.

À tia Lúcia e Ricardo, pelo carinho e atenção sempre que retorno à minha casa. Amo vocês.

À Raimunda , seu Raimundo e Sr. Manoel, pelas orações e carinho sempre dispensados.

À minha família em São Paulo, em especial, Laurinda , Bia, Alessandra ,Luana e Irá pelos anos de convivência, entendimento e ajuda temperados com muito amor e amizade – o meu muito obrigada eternamente.

À minha família no Rio de Janeiro, Sr. Fausto e Dra. Magdalena, que sempre torceram por mim.

Às minhas amigas-irmãs e amigos, sempre presentes nessa jornada: Elda, Isabela e Átila.

Aos Profs. Raimundo Antônio da Silva e Ana Maria Nogueira Silva, pelo carinho e força, nunca reduzidos pelo tempo e distância. Meu coração nunca lhes esquece.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu eterno obrigada.

*“Cada pessoa deve trabalhar para seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

Marie Curie

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 INFLAMAÇÃO e RESPOSTA DE FASE AGUDA	02
1.2 RESPOSTA FEBRIL E LPS.....	03
1.3 VIAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA FEBRIL.....	08
1.4 TAQUICININAS, SUBSTÂNCIA P E RECEPTORES NK1.....	15
2. OBJETIVOS	20
2.0 OBJETIVO GERAL	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS.....	23
3.2 ESTERILIZAÇÃO.....	23
3.3 SOLUÇÕES.....	24
3.4 REAGENTES E DROGAS.....	24
3.5 IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONEAL.....	25
3.6 IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL.....	26
3.7 DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	27
3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.9 PRÉ-TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM INDOMETACINA.....	29
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 . RESULTADOS	30
4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I.C.V. DA SUBSTÂNCIA P SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS E EFEITO DO ANTAGONISTA NK1 SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SP NA DOSE DE 500 ng.....	31
4.2 EFEITO DO SR140333B SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO MIP-1 α EM RATOS.....	33
4.3 EFEITO DO SR140333B SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO TNF- α EM RATOS	35

4.4 EFEITO DO SR140333B SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA IL-6 EM RATOS	35
4.5 EFEITO DO SR140333B SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA PG _{E2} EM RATOS	38
4.6 EFEITO DA INDOMETACINA NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SUBSTÂNCIA P EM RATOS	40
4.7 EFEITO DA INDOMETACINA NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA IL-1 β EM RATOS.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura esquemática do LPS.....	06
Figura 2:	Desenvolvimento da resposta febril.....	10
Figura 3:	Representação esquemática das vias envolvidas na resposta febril induzida ou não pelo LPS em ratos.....	14
Figura 4:	Estrutura da Substância P.....	16
Figura 5:	Efeito da administração i.c.v. da Substância P sobre a temperatura corporal de ratos.....	32
Figura 6:	Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo MIP-1 α em ratos.....	34
Figura 7:	Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α em ratos	36
Figura 8:	Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo IL-6 em ratos	37
Figura 9:	Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pela PGE ₂ em ratos	39
Figura 10:	Efeito da indometacina na resposta febril induzida pela Substância P em ratos.....	41
Figura 11:	Efeito da indometacina na resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos	42
Figura 12:	Representação esquemática das vias envolvidas na febre induzida por LPS em ratos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

α – MSH – hormônio melanócito estimulante
AVP - arginina-vassopressina
BHE – barreira hemato-encefálica
COX - ciclooxigenase
CRF- fator liberador de corticotropina
CINC-1 – *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* – 1
CSF – Fluido cerebrospinal
ET - endotelina
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina I
HIV – vírus da imunodeficiência imunitária
HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
icv - intracerebroventricular
ip - intraperitoneal
IFN - interferon
IL – interleucina
LPS - Lipopolissacarídeo
MALP2 – *macrophage-activating lipopeptide-2*
MAPKp38 – *p38 mitogen-activated protein kinase*
MIP – proteína inflamatória derivada de macrófagos – 1
NF κ B – fator nuclear κ b
NF-IL6 – *Enhancer-binding protein beta*
OVLT - *organum vasculosum da laminae terminalis*
PGs - prostaglandinas
PO/HA - área pré-óptica do hipotálamo anterior
PE – pirogênio endógeno
PFPF – Fator Pré-Formado de Macrófagos
PAMP – padrões moleculares associadas à patógenos
PPTA – pré-pro-taquicinina A
POLI (I:C) – Ácido Polinosina:policetidílico

PFPF – Fator Pirogênico Pré-Formado de Macrófagos

PKC –Proteína kinase C

RANKL – *receptor activator of nuclear factor-Kb*

RANTES – *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*

RFA - reação de fase aguda

RNAm - ácido ribonucléico mensageiro

SP – Substância P

SNC – Sistema Nervoso Central

TAM - tecido adiposo marrom

TNF - fator de necrose tumoral

TLR – *toll-like*

RESUMO

A Febre é um sinal e um sintoma clínico complexo, que integra os sistemas imune, endócrino e nervoso central. A administração do lipopolissacarídeo (LPS) sistemicamente é um modelo clássico para estudá-la em animais de laboratório. O LPS ativa o sistema imune, que induz a síntese e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6). Essas proteínas podem alcançar o Sistema Nervoso Central (SNC) e induzir a produção de diversos mediadores centrais, como prostaglandina (PG)E₂, que ativam mecanismos que alteram o ponto de regulação da temperatura corporal localizado no hipotálamo, promovendo a resposta febril. A Substância P (SP), é um neuropeptídeo amplamente distribuído no SNC e periférico, está presente em neurônios sensoriais primários e é pertencente à família das taquicininas. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que sua liberação, no SNC, mas não na periferia, é crucial para o desenvolvimento da resposta febril induzida pelo LPS, uma ação mediada pela ativação de receptores NK₁. Também verificou-se que ela não participa da resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos (REIS et al, 2011), a qual depende da liberação de prostaglandinas. Baseado nisso, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da SP, através do uso do antagonista para receptor NK₁ (SR140333B), na resposta febril induzida pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de diversos pirogênios endógenos em ratos. Na tentativa de inibir a ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e reduzir a degradação da SP, os animais foram pré-tratados com captopril 5 μ g/sítio e após 30 min, foi administrado a SP. Foi verificado um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente, nas doses de 500 e 750 ng/sítio, iniciando em torno da 3^a hora e se mantendo até a 6^a hora. A dose de 500 ng/sítio foi escolhida para os experimentos subsequentes. Em seguida, levantamos a hipótese de que a SP participaria da resposta febril induzida pela quimiocina, MIP-1 α , cuja atividade pirogênica, diferentemente da IL-1 β , independe de prostaglandinas. No entanto, o pré-tratamento dos animais com antagonista de receptores NK₁ SR140333B (3 μ g, icv), 30 min antes da administração de MIP-1 α (500 pg/sítio) também não reverteu a febre induzida por este pirogênio. Considerando que outros mediadores estão envolvidos na resposta febril induzida pelo LPS, além da IL-1 β , avaliamos o efeito do antagonista NK₁ na resposta febril induzida pelo TNF- α (250 ng/sítio) e IL-6 (300 ng/sítio). A administração do SR140333B, 30 min antes dessas citocinas reduziu a resposta febril de ambas, em torno de 60%. Além disso, investigamos a inter-relação entre prostaglandinas e Substância P. O pré-tratamento dos animais com antagonista de receptores NK₁ reduziu a resposta febril induzida pela PGE₂ (250 ng/sítio) em torno de 73% sugerindo que SP é necessária para a febre induzida por este prostanóide. Por outro lado, a indometacina (2,0 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de prostaglandinas, reduziu a resposta febril induzida pela SP em torno de 73% assim como a resposta febril induzida pela IL-1 β (3,12 ng/ sítio) em 93%. Em conjunto, estes dados sugerem que a Substância P induz um aumento de temperatura corporal em ratos e que essa resposta é dependente de prostaglandinas. Além disso, esta taquicinina está envolvida no desenvolvimento da resposta febril induzida pelo TNF- α , IL-6 e PGE₂, mas não do MIP-1 α .

ABSTRACT

Fever is a clinical complex sign and symptom that integrates immune, endocrine and central nervous systems. The administration of lipopolysaccharide (LPS) systemically is a classical model to study the febrile response in laboratory animals. LPS activates the immune system, which induces synthesis and release of several pro-inflammatory cytokines, such as Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumoral Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6). These proteins reach the Central Nervous System (CNS) and induce the production of several central mediators, such as prostaglandin (PG)E₂, that activate mechanisms that ultimately increase the thermoregulatory set point located in the hypothalamus to promote the febrile response. Substance P (SP) is a neuropeptide largely distributed in the CNS and peripherally, is found in primary sensory neurons and belongs to the tachykinin family. Previous studies in our group, showed that its central, but not peripheral, release is crucial to the development of LPS-induced febrile response, an action mediated by the activation of NK₁ receptors. We also verified that SP does not participate in the febrile response induced by IL-1 β in rats (REIS et al, 2011), which is dependent of prostaglandins release. Based on that, our goal in this study was to investigate the role of SP, using NK₁ receptor antagonist (SR140333B), in the febrile response induced by intracerebroventricular (i.c.v.) administration of several endogenous pyrogens in rats. In the attempt of inhibit the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and reduce the degradation of SP, animals were pre-treated with captopril 5 μ g/site and after 30 min, SP was administrated . It was verified an increase in body temperature in a dose-dependent manner, at doses of 500 and 750 ng/2 μ l, starting around the 3rd hour and remaining up to the 6th hour. The dose of 500 ng/2 μ l was chosen for remaining experiments. Then, we hypothesized that SP participates in the febrile response induced by the chemokine CCL3/MIP-1 α , which differently from IL-1 β , induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. However, the treatment of the animals with NK₁ antagonist (3 μ g, icv), 30 min before the administration of CCL3/MIP-1 α (500 pg/site) also did not modify the febrile response induced by this pyrogen. Considering that many others mediators are involved in the febrile response induced by LPS, besides IL-1 β , we evaluated the effect of the NK₁ antagonist in the febrile response induced by TNF- α (250 ng/site) and IL-6 (300 ng/site). The administration of SR140333B, 30 min before these cytokines reduced the febrile response induced by both around 60%. Furthermore, we investigated the relation between prostaglandins and Substance P. The pre-treatment in animals with NK₁ antagonist reduced the febrile response induced by PGE₂ (250 ng/site) around 73% suggesting that SP is necessary for the febrile response induced by this prostanoid. On the other hand, indomethacin (2,0 mg/kg, i.p.), a prostaglandin synthesis inhibitor, also reduced the febrile response induced by SP around 73%, as well as, the febrile response induced by IL-1 β (3,12 ng/site) around 93%. Taken all together, these data suggests that Substance P induces an increase in body temperature in rats and this response is dependent of prostaglandins. Moreover, this tachykinin is involved in the development of the febrile response induced by TNF- α , IL-6 and PGE₂, but not the one by MIP-1 α .

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO e RESPOSTA DE FASE AGUDA

A inflamação é uma resposta protetora do corpo para remoção do estímulo nocivo, bem como para reparar qualquer dano remanescente ao tecido (MEDZHITOV, 2008). Classicamente, é caracterizada pelos cinco sinais: Dor, Calor, Rubor, e Edema, que podem ou não ser acompanhados da perda de função do tecido ou órgão (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985) .

Esses sintomas macroscópicos são reflexos de uma série de eventos iniciados e conduzidos por mediadores de origem plasmática (cininas, C5a, fibrinopeptídeos e fator XII ativado) ou celular (histamina, eicosanóides, fator de agregação plaquetária, neuropeptídeos, óxido nítrico e citocinas) liberados a partir da ativação de células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e células migratórias (GALLIN *et al.*, 1992). Isso tudo se reflete na dilatação de arteríolas, capilares e vênulas com aumento da permeabilidade venular e do fluxo sangüíneo, exsudação de fluidos, migração de leucócitos para o foco inflamatório e degradação da matriz extracelular pelas metaloproteinases.

No transcorrer do processo inflamatório, tais mediadores podem chegar à corrente sanguínea, caso a lesão seja persistente e/ou sua intensidade aumente, alcançando o Sistema Nervoso Central (SNC) que coordena, uma variedade de respostas metabólicas, endócrinas, autonômicas e comportamentais (RANELS & GRIFFIN, 2005) , tais como:

- Aumento de produção de proteínas de fase aguda;
- Leucocitose;
- Ativação do sistema complemento;
- Aumento da produção de glicocorticóides;
- Alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de íons como ferro, cobre e zinco;
- Febre.

A esse conjunto de alterações sistêmicas denominamos de Reação de Fase Aguda (RFA) (STADNYK & GAULDIE,1991), sendo que um dos sinais e sintomas mais importantes que encontramos, clinicamente, é a febre.

1.2 RESPOSTA FEBRIL e LPS

A febre pode ser considerada como parte de uma complexa estratégia de defesa do organismo contra microorganismos ou qualquer substância reconhecida como estranha pelas células imunes, sendo considerada um elemento chave da RFA (BLATTEIS & SEHIC, 1998). Sua complexidade é orquestrada pelo SNC através da integração de mecanismos endócrinos, imunes, autonômicos e comportamentais (DIMICCO & ZARETSKY,2007).

De início, postulava-se, que o próprio organismo produziria alguma substância que causava a febre, o que chamaram de “fermento de fibrina” (WELCH, 1888). Porém, na década de 50, Atkins (1960) formulou a base do estudo da resposta febril, postulando que a febre seria gerada pela ação de uma proteína endógena, sintetizada e liberada por células fagocíticas denominada de *pirogênio endógeno*. Entre esses pirogênios endógenos, podemos citar interleucina (IL)-1 α e β (DINARELLO, 1984), fator de necrose tumoral (TNF- α) (DINARELLO *et al*, 1986), proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1) (DAVATELIS *et al*, 1989), IL-6 (HELLE *et al*, 1988), IL-8 (ROTHWELL *et al*, 1990b; ZAMPRONIO *et al*, 1994), IL-11 (LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994), interferon (IFN) α , β e γ (DINARELLO *et al*, 1989; DINARELLO *et al*, 1988), fator neurotrófico ciliar (SHAPIRO *et al*, 1993), RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) (TAVARES & MIÑANO, 2000), RANKL (*receptor activator of nuclear factor-Kb*) (HANADA *et al*, 2009) e MALP2 (*macrophage-activating lipopeptide-2*) (KNORR *et al*, 2008) e CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant -1*) (SOARES *et al*, 2008).

No entanto, sabia-se que a administração de determinadas substâncias externas ao organismo, como os derivados de bactérias gram-positivas e gram-negativas, como o lipopolisacarídeo (LPS), desencadeava uma resposta febril. Estes agentes passaram a ser conhecidos como *pirogênios exógenos* e dão origem aos pirogênios endógenos.

Atualmente, sabe-se que existe um verdadeiro arsenal de pirogênios endógenos, que atuam de diversas maneiras para que o aumento da temperatura corporal, ocorra de forma gradual e coordenada, caracterizando uma resposta febril ou Febre. De maneira mais completa, a Febre é a elevação controlada da

temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico, o qual é denominado de *set point*.

A febre difere da Hipertermia, pois nela, o *set point* não é alterado e o aumento da temperatura corporal é resultado de mecanismos de dissipação de calor comprometidos ou de situações em que a dissipação não é suficiente para a manutenção da temperatura dentro da normalidade, devido a produção excessiva de calor (por doenças metabólicas ou agentes farmacológicos) ou temperaturas externas muito elevadas (DINARELLO *et al*, 1988; BLATTEIS, 2006). Outra diferença que pode ser evidenciada é no comportamento. Na febre, o indivíduo tende a preferir ambientes quentes a fim de facilitar a conservação do calor. Já na hipertermia, o indivíduo prefere ambientes frios no intuito de perder calor (BLATTEIS, 2006).

Após atingir a resposta máxima, eventualmente a febre começa a decair, fase na qual denominamos de *defervescência*. Tanto o estabelecimento de um máximo de resposta, ou seja, o fato de não ser possível aumentar a temperatura corporal acima de determinados níveis como a fase de defervescência se devem ao fato de que o organismo libera diversas substâncias no organismo conhecidas como *antipiréticos endógenos* ou *criogênios endógenos*, que são moléculas que reduzem a temperatura corporal, auxiliando o organismo a retornar o *set point* inicial. Como exemplo destas substâncias podemos citar o α -Hormônio Melanócito Estimulante (α -MSH), a Arginina-vasopressina (AVP), os glicocorticóides endógenos e a Interleucina-10 (IL-10) (ROTH, 2006).

Embora se tenha uma forte evidência de que a febre possua vários benefícios, como o aumento da capacidade fagocítica das células de defesa, da migração de neutrófilos, da proliferação de células T, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a redução da proliferação dos agentes infectantes (BLATTEIS & SEHIC, 1998), alguns estudos apontam que clinicamente esse aumento na temperatura pode ser prejudicial. Em algumas situações, a temperatura corporal pode atingir níveis muito elevados e críticos, como 41^o C, um fenômeno designado de *hiperpirexia*. Nesses casos, o aumento de temperatura pode causar seqüelas neuronais, delírio, malformações fetais e até coma. Portanto, quando o risco é maior que os benefícios durante o estado febril, é indicada a terapia antipirética (HASDAY *et al*, 2000).

A maior parte do conhecimento atual sobre a resposta febril provém de estudos em animais de laboratório. Existem inúmeras substâncias que podem induzir febre em animais podendo ser derivadas ou não de microorganismos. As derivadas de microorganismos são: LPS (Lipopolissacarídeo derivada de bactéria gram-negativa), Muramil-dipeptídeo (derivada de bactéria gram-positiva), parasitas, micoplasmas, vírus e fungos. Já os que não são derivados de microorganismos abrangem alguns produtos sintéticos (agentes antitumorais, polinucleotídeos), substâncias derivadas do hospedeiro (tecido destruído, sobrenadante de macrófagos, metabólitos, produtos de linfócitos), compostos secundários de plantas e pirogênios endógenos (citocinas)(FORTIER *et al*,2004).

Um dos modelos clássicos de indução de febre experimental é a administração intracerebroventricular, intraperitoneal ou intravenosa de LPS. O LPS está presente na membrana de bactérias gram-negativas, como *E.coli* e é composto de 3 domínios ou *motifs* distintos: Lipídio A, uma porção pequena (core) de oligossacarídeo e o antígeno polissacarídeo O (LEON *et al*, 2008)(Figura 1). A bactéria ao se multiplicar, acaba sofrendo lise ou morre, liberando o LPS de sua superfície celular (RIETSCHER *et al*, 1994). Essa molécula é exclusiva desse grupo de bactérias e sua presença é crítica para a estabilidade da membrana. Ela é extremamente importante pois confere maior patogenicidade às bactérias e dificulta a ação de neutralização dos anticorpos (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). O lipídeo A é o domínio bioativo da biomolécula e é reconhecido durante a infecção. Já a composição do antígeno O varia entre as diferentes bactérias dessa categoria, ou seja, a presença ou ausência, remete à considerar se o LPS é brando ou agressivo (CHOW *et al*, 1999).

Esses “motifs” são conhecidos como PAMPs (padrões moleculares associadas à patógenos), que são reconhecidos principalmente pela família de receptores do tipo Toll-Like (TLR), no caso do LPS o tipo 4. Esse reconhecimento é realizado via proteína ligante do LPS, o LBP, que é uma proteína plasmática de fase aguda sintetizada no fígado (WAN *et al*,1995). Ao interagir com a proteína acessória CD14, eles podem mediar as ações via TLR4.

Após esse reconhecimento, diversos mecanismos de transdução intracelulares são ativados e resultam na fosforilação do complexo de inibição do NF- κ B (Complexo IKK), ativando o fator de transcrição NF- κ B, que irá promover a

transcrição gênica, sintetizando e liberando uma gama de citocinas e moléculas efetoras pirogênicas (COHEN, 2002).

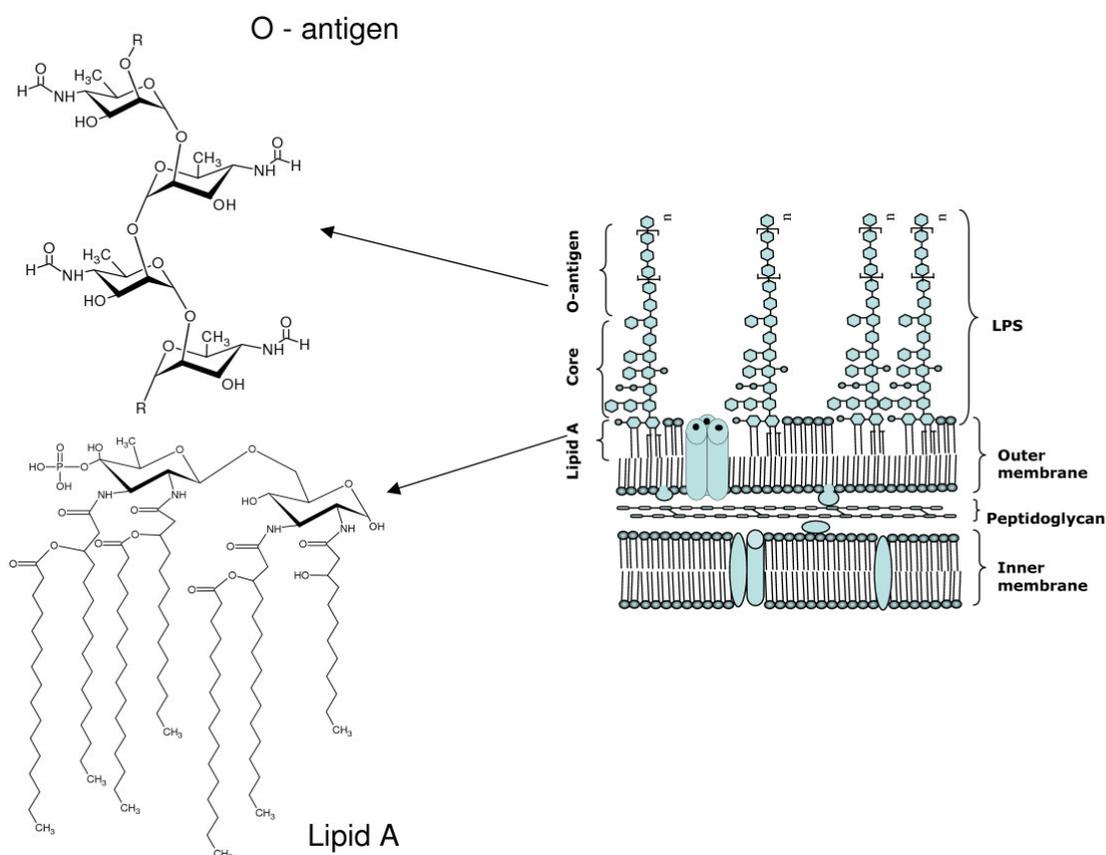


Figura 1 – Estrutura esquemática do LPS. Fonte: CARDOSO *et al*, 2006.

Uma vez liberados, a informação carregada por essas citocinas ou pirogênicos endógenos presentes na circulação, como a IL-1 α e β , TNF- α , MIP-1, IL-6, IL-8, IL-11, IFN α , β e γ , fator neurotrófico ciliar, RANTES, RANKL, MALP2 e CINC-1 e sua informação, alcança o Sistema Nervoso Central através de diversos mecanismos. Entre os mecanismos propostos podemos citar:

- 1- Através da participação de nervos periféricos como o nervo vago e nervos cutâneos aferentes, que fazem sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (BLATTEIS *et al*, 2000; BLATTEIS *et al*, 1992; ROMANOVSKY *et al*, 2000; ROSS *et al*, 2000). Esses estudos tem demonstrado que o transporte de sinais inflamatórios da periferia para o SNC, induzindo febre durante a reação inflamatória, não se deve exclusivamente a mecanismos

humorais (ROTH, 1999); A vagotomia subdiafragmática inibe respostas controladas pelo cérebro, incluindo a febre, induzida pela administração de LPS ou pirogênios endógenos (WATKINS *et al*, 1995; WERNER *et al*, 2003);

- 2- Através dos órgãos circunventriculares, que se localizam em torno dos ventrículos como o *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) e órgão subfornical, pois são ausentes de barreira hematoencefálica (TAKAHASHI *et al*, 1991; BLATTEIS *et al*, 2000);
- 3- Via interação com células endoteliais perivasculares (TILDERS *et al*, 1994; CAO *et al*, 1996; ELMQUIST *et al*, 1997; BANKS *et al*, 1991; BANKS *et al*, 1994).

De qualquer maneira, seja através da circulação sanguínea ou através de estímulos nervosos, o sinal pirogênico gerado na periferia, uma vez no SNC não promove diretamente a mudança no ponto de regulação hipotalâmico e sim geram mediadores centrais como Prostaglandinas E_2 , $F_{2\alpha}$ e D_2 (PG) (MORIMOTO *et al*, 1988, SOUZA *et al*, 2002; GAO *et al*, 2009), o Fator Liberador de Corticotropina (CRF) (ZAMPRONIO *et al*, 2000; SOUZA *et al*, 2002), Endotelina (ET)-1 (FABRÍCIO *et al*, 1998; FABRÍCIO *et al*, 2005; FABRÍCIO *et al*, 2006), Opióides endógenos (FRAGA *et al*, 2008), Endocanabinóides (BENAMAR *et al*, 2007) e Substância P (SZÉKELY *et al*, 2000; REIS *et al*, 2011).

Esses mediadores atuam modificando a frequência de disparo de neurônios presentes na área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA/HA), que passam a controlar a temperatura corporal a níveis acima de 36,5-37° C. O que torna essa área tão importante para a resposta febril é a presença de 3 classes especiais de neurônios: Neurônios insensíveis à temperatura, Neurônios sensíveis ao calor e Neurônios sensíveis ao frio (BOULANT, 1998).

Os neurônios insensíveis à temperatura são a maioria (60%) e sua denominação se origina pelo fato de não apresentarem alteração de sua frequência de disparos durante o aquecimento ou resfriamento. Já os neurônios sensíveis ao calor, são aproximadamente 30% dos neurônios existentes, recebem aferências dos termorreceptores periféricos e da medula espinhal e seus disparos aumentam no aquecimento e reduzem no resfriamento. Por último, os neurônios sensíveis ao frio, correspondem a um número menor de neurônios (5%), são inibidos pelos neurônios

sensíveis ao calor e sua frequência de disparos aumenta durante o resfriamento e reduz no aquecimento (RANELS & GRIFFIN, 2005).

Por uma ação direta ou indireta sobre o SNC, os mediadores centrais são capazes de afetar o controle da temperatura corporal, pois promovem alterações na atividade neuronal da região pré-óptica, ou seja, inibem a atividade dos neurônios sensíveis ao calor e aumentam a atividade daqueles sensíveis ao frio, havendo assim, a alteração do ponto de regulação hipotalâmico (KLUGER, 1991; ROTH *et al*, 2006).

Como consequência dessa alteração de frequência neuronal, são desencadeadas respostas efetoras periféricas de produção e conservação de calor. O músculo esquelético começa a se contrair rapidamente, caracterizando a termogênese associada a tremores, a fim de produzir calor. Para evitar a perda de calor, como resultado da ativação simpática, ocorre uma vasoconstricção periférica associada ainda à produção de calor através da termogênese do tecido adiposo marrom (TAM). Essas ações em conjunto, atuam a fim de conservar o calor do organismo e promover a febre. Um esquema geral desta resposta está representado na Figura 2.

1.3 VIAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA FEBRIL

O avanço de técnicas de purificação, isolamento, biologia molecular e produção de recombinantes, foi possível identificar e estudar os pirogênios endógenos e mediadores centrais mais facilmente e com isso elucidar o seu envolvimento nas vias envolvidas na resposta febril.

Desses diversos pirogênios estudados, o primeiro e mais estudado foi a IL-1. Esta possui duas isoformas IL-1 α e IL-1 β , sendo este considerado um dos principais mediadores da resposta febril (ROTHWELL, 1991). Ela induz febre, seja administrada no SNC ou periféricamente, em diferentes espécies animais (DINARELLO *et al*, 1984).

Outra citocina extremamente relevante nessa modulação é o TNF- α . Alguns estudos o consideram um agente pirogênico e outros, criogênico. A administração i.c.v. de TNF- α induz uma resposta febril em ratos (ROTHWELL, 1988) e coelhos (MORIMOTO *et al*, 1988). Ainda, existe uma ampla evidência de que a administração periférica do TNF- α causa febre em camundongos (DINARELLO *et*

al, 1986), coelhos (MORIMOTO *et al*, 1988), ratos (DINARELLO *et al*, 1986) e seres humanos (MICHIE *et al*, 1988). Entretanto, alguns dados sugerem que um papel criogênico (antipirético) do TNF- α . A resposta febril induzida pelo LPS é reduzida quando esta citocina endógena é neutralizada com a injeção sistêmica de anti-TNF- α em camundongos (KOZAK *et al*, 1995).

A IL-6 é uma citocina muito importante, produzida em grandes quantidades após a administração de pirogênios exógenos e induz uma resposta febril potente quando administrada no SNC de ratos (SUNDGREN-ANDERSSON *et al*, 1998; CARTMELL *et al*, 2000). Seus níveis mensurados no CSF estão de acordo com o desenvolvimento da febre em animais (HOUSSIAU *et al*, 1988; LeMAY *et al*, 1990; ROTH *et al*, 1993). Assim como o LPS, IL-1 β também aumentou os níveis de IL-6 no fluido cerebrospinal (CSF) e a imunoneutralização da IL-6, diminui a febre induzida por LPS ou IL-1 β (LeMAY *et al*, 1990; ROTHWELL, 1991) sugerindo que, em ratos, o efeito pirogênico da IL-1 β seja mediado pela liberação de IL-6.

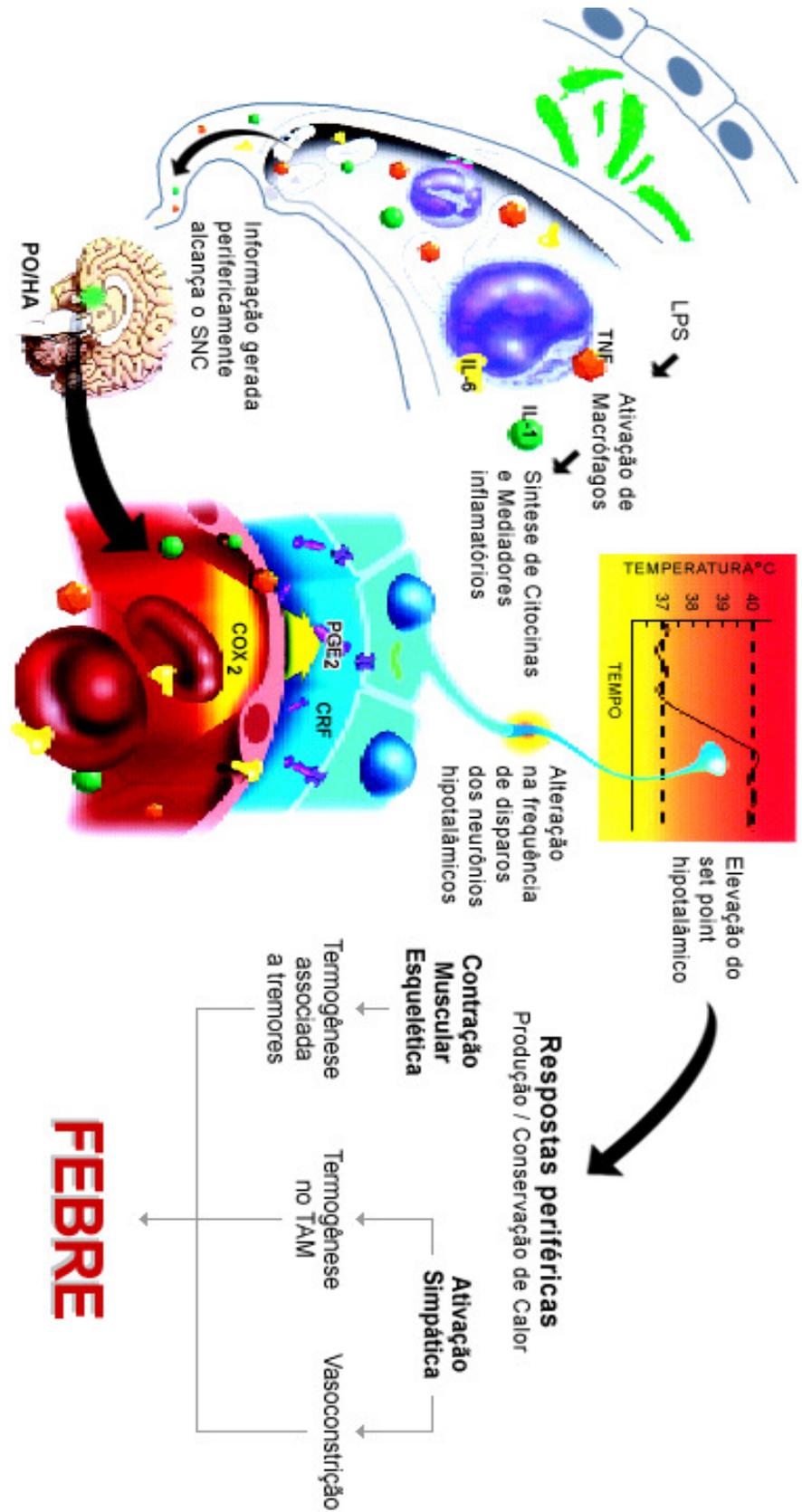


Figura 2- Desenvolvimento da resposta febril .Fonte: modificado de ARONOFF & NEILSON (2001).

Essas citocinas e mediadores centrais previamente mencionados integram a resposta febril induzida pelo LPS. Entretanto, a quimiocina MIP-1 não participa dessa resposta e possui uma atividade pirogênica relevante (SOARES *et al*, 2009). DAVATELIS *et al* (1989) foram os primeiros a demonstrar que o ibuprofeno não reduz a febre induzida pelo MIP-1 sugerindo a existência de uma via na resposta febril independente de prostaglandinas. Um pouco depois, MIÑANO *et al* (1990) mostraram que a injeção intrahipotalâmica de indometacina é ineficaz em bloquear a febre a induzida pelo MIP-1. Embora hajam duas isoformas, CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β , que compartilham similaridades estruturais, elas exibem perfis de resposta febril distintos (TAVARES & MIÑANO, 1998).

Essas citocinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 e MIP-1 α) estão entre os pirogênicos mais conhecidos e estudados e por enquanto vamos ater nossa discussão somente à eles pois são aqueles que foram utilizados neste estudo. Assim que alcançam o SNC, estes pirogênicos promovem a geração de uma intrincada rede de mediadores centrais, entre eles as prostaglandinas E₂, F_{2 α} e D₂, CRF, ET-1 e opióides endógenos que passaremos a descrever e esclarecer a seguir.

A PGE₂ é um dos principais mediadores centrais da resposta febril e quando administrada icv, se liga no receptor EP3 (principal responsável por essa resposta) presente em neurônios sensíveis a variações de temperatura no hipotálamo, desencadeando a febre (DINARELLO, 1999; USHIKUBI *et al*, 1998). A terapêutica antipirética atual se baseia na inibição da síntese desses mediadores. A cascata de síntese de prostaglandinas se inicia com a liberação de ácido araquidônico da membrana fosfolipídica através da ação de lípases, como a fosfolipase A₂. A partir daí, duas isoenzimas convertem o ácido araquidônico em prostaglandina G₂ e em sequência, prostaglandina H₂. Essas duas isoenzimas são as ciclooxygenases (COX) 1 e 2. Então, dependendo do tecido e dos tipos celulares, poderá haver a formação de diferentes eicosanóides como PGE₂, Tromboxano A₂, PGD₂, PGF_{2 α} e PGI₂ (DUBOIS *et al*, 1998; FITZGERALD, PATRONO, 2001). Os antiinflamatórios e antipiréticos atuam bloqueando a COX-2, seja seletivamente ou não, pois é a isoforma que se encontra elevada em sítios inflamatórios, ao contrário da COX-1, que é constitutiva.

Outra isoforma que parece importante para a resposta febril é a PGF_{2 α} pois sua concentração aumenta no fluido cerebrospinal durante esta resposta quando

induzida pelo LPS e também a administração central deste eicosanóide aumenta a temperatura corporal dos animais (ROTHWELL, 1990b).

O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos presente, principalmente no núcleo paraventricular hipotalâmico. É um dos mediadores chave na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Além disso, sua administração no ventrículo cerebral de ratos promove um aumento nos níveis de noradrenalina no hipotálamo e na termogênese no TAM (EMOTO *et al*, 1993; LeFEUVRE *et al*, 1987).

Outro peptídeo que tem sua expressão aumentada por LPS e por diferentes citocinas (IL-1 e TNF- α) é a endotelina (ET-1) (EHRENREICH *et al*, 1990; CORDER *et al*, 1995; MARSDEN *et al*, 1992). Sua administração, tanto intravenosa quanto i.c.v., é capaz de promover um aumento da temperatura corporal em animais (KOSHI *et al*, 1992; FABRICIO *et al*, 1998). FABRICIO *et al* (2005) demonstraram que a injeção via i.v. de LPS, em dose que causa febre de longa duração, promove um aumento na produção de ET-1 e de seu precursor imediato, a big-endotelina, no CSF de ratos.

Os opióides endógenos também exercem um papel relevante. A administração i.c.v. de morfina, um agonista opióide, induziu um aumento de temperatura de maneira dose-dependente. Também verificaram que o LPS e alguns pirogênicos endógenos e mediadores centrais, como TNF- α , IL-6, MIP-1 α , CRF e ET-1 (exceto IL-1 β e prostaglandinas) recrutam o sistema opioidérgico para induzir resposta febril mediada por receptores μ (FRAGA *et al*, 2008).

Devido a complexidade da regulação da resposta febril, nosso grupo de pesquisa entre outros, concentra suas ações no estudo das vias envolvidas nesta resposta, pesquisando de que maneira essas substâncias interagem entre si, regulando essas respostas.

Sugere-se, por exemplo, que os efeitos pirogênicos de citocinas, como IL-1 β e IL-6 sejam mediados por CRF, já que o antagonista do CRF (CRF₉₋₄₁, este fragmento é capaz de inibir os efeitos metabólicos e comportamentais induzidos por CRF₁₋₄₁) reverteu o aumento da temperatura corporal e o aumento do consumo de oxigênio induzido por estas citocinas. Entretanto, as respostas da IL-1 α e TNF- α não foram reduzidas pelo antagonista do CRF mas foram bloqueadas por indometacina, demonstrando que embora elas dependam de PGs, não dependem de CRF para sua ação. A atividade pirogênica de CRF não é inibida por inibidores de COX

(ROTHWELL, 1990c; ROTHWELL, 1990d). No entanto, existem estudos que demonstram que IL-1 β pode gerar PGE₂ também (LI *et al*, 2003)

Como a febre causada pela PGF_{2 α} é inibida pelo antagonista de CRF, diferentemente da resposta febril promovida pela PGE₂, sugere-se que as respostas da IL-1 β e IL-6 são mediadas por PGF_{2 α} e que as da IL-1 α e TNF- α são mediadas por PGE₂ (ROTHWELL, 1991). Em relação ao efeito pirogênico da IL-8, que é independente da síntese de prostaglandinas, aparentemente também possa ser mediado pelo CRF, já que a resposta febril induzida por essa citocina foi inibida pelo antagonista de CRF (ZAMPRONIO *et al*, 1994).

Quanto à participação da ET-1 como mediador central da resposta febril, foi observado ainda que o antagonista dos receptores ET_B não modificou a febre induzida por IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 ou ainda pelas PGs (PGE₂ ou PGF_{2 α}), mas reduziu a febre induzida pelo CRF e pelo PFPF. FABRÍCIO *et al* (1998), FABRÍCIO *et al* (2005) e FABRÍCIO *et al* (2006) sugeriram, então, uma via alternativa para explicar a participação da ET-1 na cascata de mediadores envolvidos na resposta febril. Neste caso, durante a febre induzida pelo LPS, pode ocorrer a liberação de PFPF, atuando como um fator intermediário. O PFPF, por sua vez estimularia a liberação central de CRF e este finalmente, levaria a síntese/liberação de ET-1, independente de prostaglandinas e das demais citocinas .

Vale a pena comentar que o Fator Pirogênico Pré-Formado de Macrófagos (PFPF), é uma fator liberado por macrófagos, ainda não inteiramente caracterizado, que causa uma resposta febril , que não está relacionado com a liberação de IL-1, IL-6 ou TNF- α e que atua indiretamente e independentemente de prostaglandinas. Aparentemente, sua atividade pirogênica está relacionada com a redução de níveis de Fe e Zinco, mas não com a neutrofilia (ZAMPRONIO *et al*, 1994b).

Com relação a participação dos opióides endógenos, foi demonstrado que estes, através da ativação de receptores μ , participam da febre induzida por todos os pirogênios endógenos e mediadores centrais, com exceção de IL-1 β e PGE₂ (FRAGA *et al.*, 2008).

Dessa maneira, atuando de forma conjunta com outros pesquisadores, podemos reunir esses estudos e representar seu envolvimento através do esquema da Figura 3.

Conforme citado anteriormente, após estimular diferentes células do hospedeiro, principalmente macrófagos, o LPS desencadeia a liberação de diversas

citocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e PFPF. Estas ativam duas vias principais: uma via que depende da liberação de prostaglandinas (retângulos com fundo branco) e uma via que não depende, representada pelos retângulos com fundo roxo. Vale a pena mencionar que o CRF está implicado em ambas as vias. Também podemos observar a presença de outra via, que independe da liberação de opióides endógenos (simbolizada pelo losango hachurado) enquanto que todas as outras dependem da liberação destes mediadores. De maneira paralela, a quimiocina MIP-1 α , embora não participe da resposta febril induzida pela endotoxina bacteriana, exerce sua atividade pirogênica, dependendo somente de CRF(Figura 3).

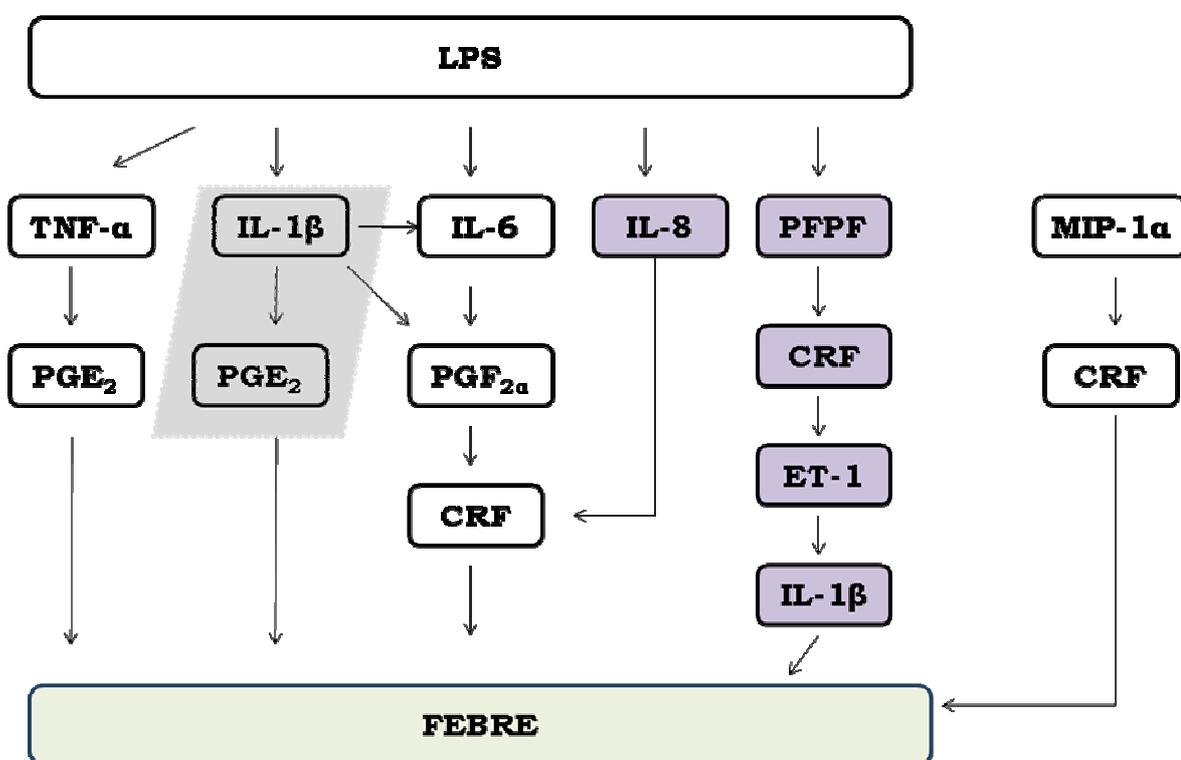


Figura 3 – Representação esquemática das vias envolvidas na resposta febril induzida ou não pelo LPS em ratos. Fontes: FABRÍCIO *et al*, 2006; SOUZA *et al*; 2009; FRAGA *et al*, 2008; ZAMPRONIO *et al*, 1994.

Embora muitas destas vias pareçam redundantes e contraditórias, é importante salientar que elas não necessariamente são paralelas e ocorrem concomitantemente durante a resposta febril. Ainda não sabemos se, por exemplo, se a ação do TNF- α , que atua via PGE₂, ocorre nos mesmos neurônios

hipotalâmicos onde atua a IL-1 β , que também libera PGE₂, lembrando que enquanto a primeira via é dependente da liberação de opióides endógenos a segunda não é. Assim, é possível que diferentes vias sejam ativadas e atuem em diferentes neurônios, em diferentes tempos após a administração de LPS. Em adição, é possível que algumas vias estejam mais relacionadas com uma resposta efetora, por exemplo, vasoconstrição periférica enquanto que outras estejam mais relacionadas à ativação de tremores musculares.

Entretanto, pouco se conhece sobre a participação de uma taquicinina amplamente distribuída no SNC, a Substância P, e sua interação com estas vias. Alguns autores observaram que a SP participa da resposta febril induzida por LPS (BLATTEIS *et al.*, 1994; SZELENYI *et al.*, 1997) sendo provável que ela participe de pelo menos algumas delas.

A compreensão dos detalhes da indução destas vias, a interação dos diferentes mediadores dentro do sistema e com sistemas externos, a existência de novas moléculas, bem como novas maneiras de bloquear a resposta, são úteis não somente para se entender a febre *per se* (e, conseqüentemente, como controlá-la mais adequadamente), mas também para se entender como se processa a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central.

1.4 TAQUICININAS, SUBSTÂNCIA P E O RECEPTOR NK1

As taquicininas são codificadas a partir dos genes Pré-pró-taquicininas (PPT ou TAC). O gene Pré-pró-taquicinina A (PPTA ou TAC1) codifica os precursores para Substância P e outras taquicininas, incluindo neurocinina A, neuropeptídeo K e neuropeptídeo Y (CARTER & KRAUSE, 1990) e o gene TAC3 codifica o precursor para neurocinina B. Recentemente, foi descoberto o gene TAC4, que codifica novos representantes dessa família denominadas de hemocinina-1 e endocininas A e B, porém, pouco se sabe de seus efeitos biológicos. Elas interagem com, no mínimo, 3 tipos de receptores neurocininérgicos, denominados de NK₁, NK₂ e NK₃. Embora todas as taquicininas se acoplem a todos os receptores, elas possuem seletividade para alguns (para revisão ver PAGE,2004).

A Substância P foi descoberta em 1931 por VON EULER & GADDUM e pertence à família das taquicininas. A “preparação” (no qual se refere o “P” da Substância P), foi purificada de cérebro e intestino de cavalo e foram verificadas

ações como vasodilatação e estimulação de motilidade estomacal em coelhos. Foram realizadas numerosas tentativas em isolar a forma pura da SP nos 40 anos seguintes, porém, sem sucesso. Somente em 1970, CHANG & LEEMAN conseguiram isolar e caracterizar sua estrutura mostrada na Fig.4. Sua região C-terminal é crucial para ativação dos receptores neurocininérgicos, já, a região N-terminal é responsável pela especificidade ao receptor.

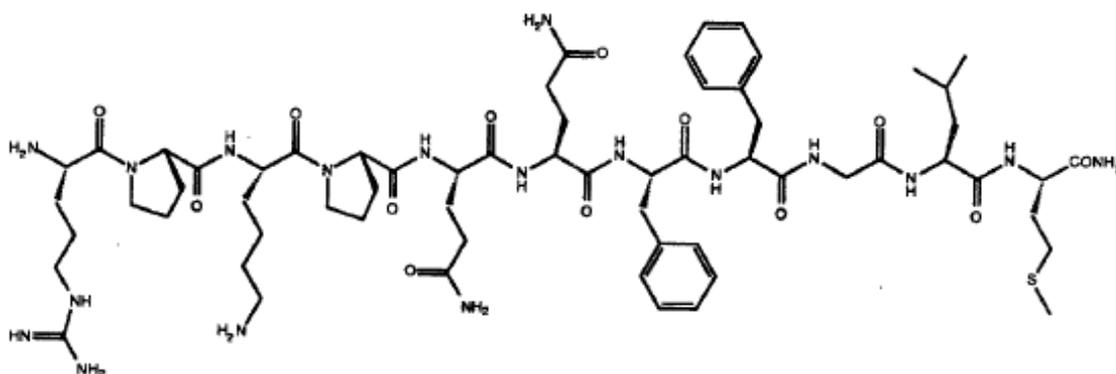


Figura 4 – Estrutura da Substância P. Fonte: QUARTARA & MAGGI,1997.

Essa taquicinina é liberada de seu precursor pela ação de proteases, chamadas convertases. Uma vez sintetizada nos ribossomos, a taquicinina é armazenada em vesículas e transportada axonalmente para as terminações nervosas (BRIMIJOIN *et al.*, 1980; MERIGHI, *et al.*, 1988). Seu metabolismo é realizado por diversas enzimas como a endopeptidase neutra, a enzima conversora de angiotensina e as catepsinas D e E (para revisão ver HARRISON & GEPPETTI, 2001).

A Substância P é um neuropeptídeo amplamente distribuído, principalmente, SNC e periférico. São encontradas altas concentrações, na substância negra, no mesencéfalo, na região pre-óptica do hipotálamo, dentre outras. Na periferia, pode ser encontrada nos aferentes primários (fibras A δ e C, sensíveis à capsaicina), que estão envolvidas na transmissão de estímulos nocivos (OTSUKA & YOSHIOKA, 1993). Mas também pode ser produzida em células não-neuronais como células do sistema imune e presentes no processo inflamatório como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas (WEINSTOCK *et al.*, 1988; BOST *et al.*, 1992; KILLINGSWORTH *et al.*, 1997; JOOS *et al.*, 2000).

Suas ações são mediadas, principalmente, através de receptores NK₁ (REGOLI *et al.*, 1994). Após a ligação, promove uma rápida endocitose e internalização do receptor, o que contribui para a dessensibilização das células à sinalização pela Substância P. Essa endocitose é extremamente rápida, ocorrendo em minutos e logo em seguida, ela é degradada em um compartimento ácido (GARLAND *et al.*, 1994).

A maioria dessas informações é proveniente de estudos em culturas de células de diversas linhagens. No entanto, existem diferenças substanciais na cinética de internalização e reciclagem do receptor NK₁ retornando à superfície. Sua ligação pode variar de 3 minutos a 5 minutos, a internalização de 1 a 3 horas e pode demorar até 8 horas para retornar à superfície (WANG *et al.*, 2002).

Esse receptor está acoplado às proteínas G_{q/11}, G_{α_s} e G_{α₀} (ROUSH & KWATRA, 1998). Sua estimulação pode levar a ativação da fosfolipase C_β, resultando num aumento transitório de inositol 1,4,5-trifosfato e cálcio; ativação da fosfolipase A₂, resultando num aumento da mobilização de ácido araquidônico; e ativação da adenilato ciclase, promovendo um acúmulo de AMPc (TAKEDA *et al.*, 1992; GARCIA *et al.*, 1994).

Vale a pena comentar que foram identificadas duas isoformas de receptores NK₁. Uma isoforma denominada de *completa*, composta por 407 aminoácidos em sua sequência, incluindo um resíduo de cisteína, que auxilia no ancoramento do receptor à membrana e uma alça intracitoplasmática importante para a transdução do sinal via proteínas G. A outra isoforma denominada *truncada* ou *curta*, possui apenas 311 aminoácidos, faltando 96, que englobam os resíduos de cisteína e a alça intracitoplasmática. Essa diferença estrutural confere ao receptor completo, cerca de 10 vezes maior afinidade à Substância P em relação à isoforma truncada, embora ambas possuam respostas, principalmente, imunes, diferenciadas (TULUC *et al.*, 2009).

No SNC, a expressão dos receptores NK₁ é elevada no núcleo caudado-putâmen, hipocampo, hipotálamo, córtex cerebral, núcleo da rafe e outras regiões. Na periferia, são encontrados principalmente em gânglios da raiz dorsal e nos neurônios intrínsecos do intestino (para revisão ver HARRISON & GEPETTI, 2001). Porém, células imunes como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos também expressam receptores NK₁ funcionais (HO *et al.*, 1997; LAI *et al.*, 1998; COOKE *et al.*, 1998; LAMBRECHT *et al.*, 1999).

Devido a sua ampla distribuição, o receptor NK₁ encontra-se envolvido em diversas patologias como doença de Parkinson e Coréia de Huntington (WHITTY *et al*,1995), stress, ansiedade e depressão (KRAMER *et al*,1998), náusea e êmese (NAVARI *et al*,1999), AIDS (TULUC *et al*,2009), abuso de drogas como cocaína e ecstasy (COMPAN *et al*,2003) e obesidade (KARAGIANNIDES *et al*,2008). Mais especificamente, existem várias evidências que suportam seu envolvimento em diversas patologias com fundo inflamatório como edema cerebral (DONKIN & VINK, 2010), asma (TOMAKI *et al*,1995), artrite (KRAUSE *et al*,1995), doença inflamatória intestinal (SHANAHAN,1993), dor (LONGMORE *et al*,1997), inflamação neurogênica (HARRISON & GEPETTI,2001) e doença periodontal (LEE *et al*,2007). Biologicamente, as taquicininas são encontradas em concentração extremamente baixas, porém em tecidos inflamados, a Substância P, encontra-se elevada pois é liberada por diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, radicais livres, derivados do ácido araquidônico, e conseqüentemente, parece contribuir para amplificação da resposta inflamatória (HOLZER & HOLZER-PETSCH,1997).

Diversos antagonistas NK₁, tanto de natureza peptídica, quanto não-peptídica, foram desenvolvidos e ainda estão em desenvolvimento (ensaios clínicos). Alguns como o Fosaprepitant e Aprepitant (Emend[®] ou Emecort[®]), já são comercializados com indicação para terapia antiemética em pacientes oncológicos. Como antagonistas peptídicos da SP são moléculas grandes e apresentam diversos efeitos adversos (SACHAIS *et al*, 1993), resolvemos utilizar em nosso estudo o antagonista não-peptídico seletivo para os receptores NK₁, SR140333B, fornecido pela Sanofi-Aventis (França).

O tratamento com SR140333B em ratos, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais, neutrófilos e outras células para a cavidade peritoneal, quatro horas após a injeção de 1, 25% de formalina (SANTOS *et al*, 2004).O mesmo antagonista também promoveu o mesmo efeito, porém no modelo de pleurisia induzida por veneno de *P.nigriventer* (COSTA *et al*, 2002).

Existem bem poucos estudos demonstrando a participação da Substância P na resposta febril. BLATTEIS *et al* (1994), SZELÉNYI *et al* (1997) e BALASKÓ *et al* (2000) observaram que a administração central de substância P causa um aumento no índice metabólico, uma diminuição na perda de calor e, conseqüentemente, uma elevação regulada da temperatura corporal. Ainda, estes autores evidenciaram que a administração central de antagonistas de substância P, reduz a resposta febril

induzida por LPS. Esses dados mostram que este neuropeptídeo apresenta efeitos termoregulatórios, e que pode, assim, modular a resposta febril à níveis centrais.

Ainda, esta taquicinina tem a capacidade de alterar a atividade de neurônios insensíveis e sensíveis à temperatura presentes na área pré-óptica do hipotálamo. O uso do antagonista bloqueia as respostas excitatórias desencadeadas pela Substância P em alguns neurônios de ratos (SHIBATA *et al*, 1988).

Dados recentes obtidos em nosso laboratório mostraram que a administração central, mas não periférica, do antagonista de receptor NK₁, SR140333B, reduz em aproximadamente 50% a febre induzida pelo LPS. Sugerindo que a SP atua como um mediador importante na resposta febril desencadeada por esta endotoxina (REIS *et al*, 2011).

Além disso, o antagonista não reverteu a febre induzida por IL-1 β , uma ação similar observada com antagonista opiodérgico μ (REIS *et al*, 2011; FRAGA *et al*, 2008). Sabe-se também que os receptores NK₁ medeiam o controle de neurônios do núcleo paraventricular e hipotálamo dorsomedial, duas áreas essenciais no controle da temperatura corporal (WOMACK & BARRETT-JOLLEY, 2007; WOMACK *et al*, 2007), ratificando que as ações desta taquicinina podem ser via receptor NK₁.

Conforme evidenciado pela Figura 3, a regulação da resposta febril é complexa e orquestrada por diversos mediadores. Portanto, o presente trabalho visa caracterizar o perfil da resposta febril induzida pela Substância P e verificar seu envolvimento com outros pirogênicos cruciais para esta resposta como TNF- α , IL-6, MIP-1 α e prostaglandinas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da substância P liberada no sistema nervoso central, na resposta febril induzida pela administração central de diferentes pirogênios endógenos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil da resposta febril induzida pela substância P em animais pré-tratados com captopril.
- Avaliar a participação da substância P, através do receptor NK1, na resposta febril induzida pelo pirogênio MIP-1 α .
- Avaliar a participação da substância P, através do receptor NK1, na resposta febril induzida pelas citocinas TNF- α e IL-6.
- Avaliar a participação da substância P, através do receptor NK1, na resposta febril induzida pelo mediador central PGE₂.
- Avaliar a participação de prostaglandinas na febre induzida pela Substância P.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água, antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e ficaram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (nº.384).

3.2. ESTERILIZAÇÃO

Os materiais utilizados nos experimentos foram adquiridos estéreis ou autoclavados a 127°C por 30 minutos ou esterilizados por calor seco a 180°C por 2 hs.

As soluções e diluições das citocinas e drogas foram preparadas em condições assépticas.

3.3. SOLUÇÕES

- Solução de Azul de pontamida
 - azul de pontamida (Merck, BR)..... 1 g
 - salina estéril -.....q.s.p. 100 mL

- Solução Tampão Tris – HCl 0,2 N (dissolução da indometacina)
 - Tris (hidroximetil)-aminometano (Merck)1 g
 - Água deionizadaq.s.p. 1 L

O pH foi acertado para 8,2 com HCl 1N, a solução foi autoclavada e depois armazenada a 4º C.

3.4. REAGENTES E DROGAS

- Acrílico auto-polimerizante Policron - Dencril Ltda., BR
- Cetamina – Fort Dodge, BR
- IL-6 – R&D Systems
- Lidocaína 2% inj. com noradrenalina – Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda., BR
- MIP1- α - R&D Systems, EUA
- Solução salina estéril 0,9% - Halex Istar, BR
- SR140333B (cloreto de (S)-1-[2-[3-(3,4-diclorofenil)-1 (3-isopropoxi-feniacetil) piperidin-3il] etil]-4-fenil-1 azaniabicyclo[2.2.2] octano)– doação da Sanofi-Aventis, França
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®]) – Pfizer, BR
- TNF- α - rr-NIBSC, Inglaterra
- IL-1 β - rr-NIBSC, Inglaterra
- Tween 80 – Merck, BR
- Xilasina 2% s/v - Synthec do Brasil, BR
- PGE₂ - Sigma Chemicals & Co, EUA
- Indometacina - Sigma Chemicals & Co, EUA

3.5. IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL

Um dia antes do implante na cavidade peritoneal, os registradores remotos de temperatura (SubCue data loggers, Calgary, Canada) foram programados para iniciar o registro de temperatura no dia do experimento (6 a 7 dias após o procedimento cirúrgico). Em seguida, o ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biocompatível. Para o implante do registrador no dia seguinte, os animais foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilasina (7,5 mg/kg) por via intraperitoneal (ip). Após tricotomia e antisepsia da pele da região ventral dos animais, foi realizada uma incisão na pele, e posterior incisão da camada muscular e peritoneal, para inserção dos registradores na cavidade peritoneal. Os registradores ficaram imersos em etanol 70% no mínimo 30 minutos antes do implante, para garantir assepsia da superfície dos mesmos, e foram imersos em solução fisiológica estéril imediatamente antes do implante na cavidade peritoneal.

Em seguida, as camadas foram suturadas, separadamente, com fio cirúrgico de algodão 3-0. Após a cirurgia, os animais receberam injeção de oxitetraciclina - Terramicina (400 mg/kg, im), como profilaxia cirúrgica.

3.6. IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL

O implante da cânula no ventrículo lateral direito dos animais foi realizado com o objetivo de injetarmos as substâncias via intracerebroventricular (i.c.v). Este procedimento foi realizado após o implante do registrador remoto de temperatura na cavidade peritoneal, sob o mesmo efeito anestésico.

As cânulas foram preparadas utilizando-se agulhas descartáveis 30X8 que foram polidas até atingirem um comprimento de 14 mm. Antes do implante,

as mesmas foram esterilizadas em estufa a 200 °C, por um período de duas horas.

Após tricotomia e antissepsia da pele, as cabeças dos animais foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-USA). Foi administrado por via subcutânea (sc) 0,2 mL de lidocaína a 2% com noradrenalina na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana. Este procedimento facilita a remoção do periósteo, inibindo a resposta ao estímulo nociceptivo e diminuindo o sangramento.

Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral direito foram de -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, sendo a inclinação da barra incisal de -3,3 mm.

As cânulas esterilizadas, com 14 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotáxico, e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2,5 mm abaixo da superfície craniana. Todas as coordenadas estereotáxicas foram determinadas com base no atlas de PAXINOS & WATSON (2005).

Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando-se uma prótese de acrílico auto-polimerizável, com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana (esterilizados previamente). Os experimentos foram conduzidos entre 6 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais.

A fim de verificarmos a posição da cânula, após o término dos experimentos de avaliação da resposta febril, os animais foram anestesiados com halotano e receberam 3 µL do corante azul de pontamida, no local correspondente à microinjeção. Em seguida, os ratos foram decapitados e os encéfalos extraídos, cortando-se transversalmente a região correspondente à localização da cânula, sendo o local da microinjeção verificado macroscopicamente.

Os animais em que a injeção do corante mostrou-se fora do ventrículo lateral ou que apresentaram um padrão anormal de ganho de peso foram excluídos dos experimentos.

3.7. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

No dia anterior aos experimentos, os animais foram transferidos para uma sala climatizada a $28 \pm 1^\circ \text{C}$, baseado na zona de termoneutralidade dos ratos (GORDON, 1990). A leitura da temperatura corporal pelos registradores remotos iniciou-se às 07:00h do dia seguinte. Permitiu-se a leitura da temperatura em torno de 2 horas, a fim de se obter os níveis basais de temperatura corporal. Os tratamentos e estímulos foram feitos entre as 09:00 e 11:00h. O registro da temperatura foi feito por pelo menos 6hs após o estímulo, a cada 15 min.

Os animais foram mantidos dentro de suas respectivas gaiolas e manuseados o mínimo possível. Ao final do experimento, os animais foram mortos com overdose de anestésico, os registradores retirados e os dados coletados em computador. A temperatura basal dos animais foi calculada levando-se em conta pelo menos 4 medidas de temperatura antes da administração de qualquer substância. A partir desta basal foi calculada a variação da temperatura corporal de cada animal. Somente animais que apresentaram temperaturas basais entre $36,7$ e $37,4^\circ \text{C}$ foram considerados.

3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Para a confecção da curva dose-resposta da Substância P foram utilizadas doses variando entre 250 ng à 750 ng / 2 μl . Os animais que receberam Substância P foram tratados com captopril na dose de 5 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, por via intracerebroventricular (i.c.v.) 30 min antes a fim de promover uma inibição da metabolização da Substância P. Animais controles receberam o mesmo volume de salina.

Em protocolos anteriores, a injeção de Substância P icv em animais não-tratados com esta droga não modificou a temperatura corporal dos animais (resultado não mostrado). Baseado nisso, o captopril foi utilizado neste experimento por ser um inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA), que tem sido relatada como uma das enzimas responsáveis pela degradação da Substância P (SKIDGEL & ERDOS, 2004).

O antagonista de receptor NK₁, SR140333B, foi administrado via i.c.v. na dose de 3µg / 2 µL, 30 minutos antes dos seguintes estímulos pirogênicos nas respectivas doses:

- TNF-α: 250 ng / 2 µL
- IL-6: 300 ng / 2 µL
- MIP1-α: 500 ng / 2 µL
- PGE₂: 125.0 ng / 2 µL

Em todos os experimentos o grupo controle recebeu Veículo (Tween 80 a 0,1% em salina estéril, 2 µL/sítio), utilizado na diluição do antagonista, e salina estéril 0,9% num volume de 2µL, ambos via i.c.v., utilizada na diluição dos estímulos.

Tais administrações foram realizadas no ventrículo lateral direito dos animais através de uma agulha de injeção (30 G), que excedeu a cânula em 2,0 mm, acoplada a um tubo de polipropileno P10, conectado a uma micro-seringa Hamilton (capacidade de 25 µL).

As doses dos pirogênicos foram baseadas em curvas dose-resposta previamente determinadas pelo nosso laboratório e representam doses sub-máximas para indução da febre (WERNER et al, 2006; FRAGA et al, 2008).

3.9. PRÉ-TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM INDOMETACINA

Nos experimentos realizados para verificar a participação de prostaglandinas na febre induzida pela Substância P, os animais foram pré-tratados com indometacina (2,0 mg/kg) ou veículo (Tampão Tris-HCl, 2,0 ml/kg). Trinta minutos após este tratamento os animais receberam captopril na dose de 5 µg/2µl. Trinta minutos após a administração de captopril (60 min após a indometacina), foi administrada Substância P (500 ng) .

Como controle positivo para este experimento, avaliou-se o efeito do tratamento com indometacina ou veículo (i.p.) sobre a resposta febril induzida pela administração, após 30 min, de IL-1β na dose de 3,12 ng/2µl (i.c.v.). Tanto a dose desta citocina quanto a da indometacina estão de acordo com estudos anteriores (DE SOUZA et al, 2002).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As porcentagens de redução da resposta febril foram calculadas considerando a média do pico da resposta febril induzido por um pirogênio (SP, TNF-α, IL-6, MIP-α, PGE₂ ou IL-1β), correspondendo a 100%, correlacionando com a média da resposta febril com o pré-tratamento utilizando o antagonista NK1 ou a indometacina naquele mesmo tempo .

Todos os resultados obtidos foram expressos com média ± erro padrão da média (EPM) da variação da temperatura corporal e avaliados por análise de variância com um critério (*ANOVA – One way*). Quando encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste para comparações múltiplas de Bonferroni foi aplicado. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 3.00 for Windows, San Diego California USA*.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE SUBSTÂNCIA P EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM CAPTOPRIL

Nosso primeiro passo, foi investigar o efeito da Substância P sobre a temperatura corporal.

A administração da Substância P i.c.v. em animais previamente tratados com captopril induziu um aumento de temperatura de forma dose-dependente. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com salina e a menor dose da Substância P (250 ng). Nas doses de 500 e 750ng, este aumento teve início entre a 2^a e a 3^a hora após a injeção de Substância P, atingindo um pico entre a 4^a e 5^a hora e mantendo-se significativamente maior até o final do experimento .

O pré-tratamento dos animais com antagonista seletivo para receptores NK₁ na resposta febril induzida pela Substância P , na dose de 500 ng/sítio, reduziu em torno de 91% a resposta febril induzida por esta taquicinina (Figura 5).

A administração do antagonista seletivo para receptores NK1 não alterou a temperatura corporal de animais tratados com salina (resultado não apresentado) .

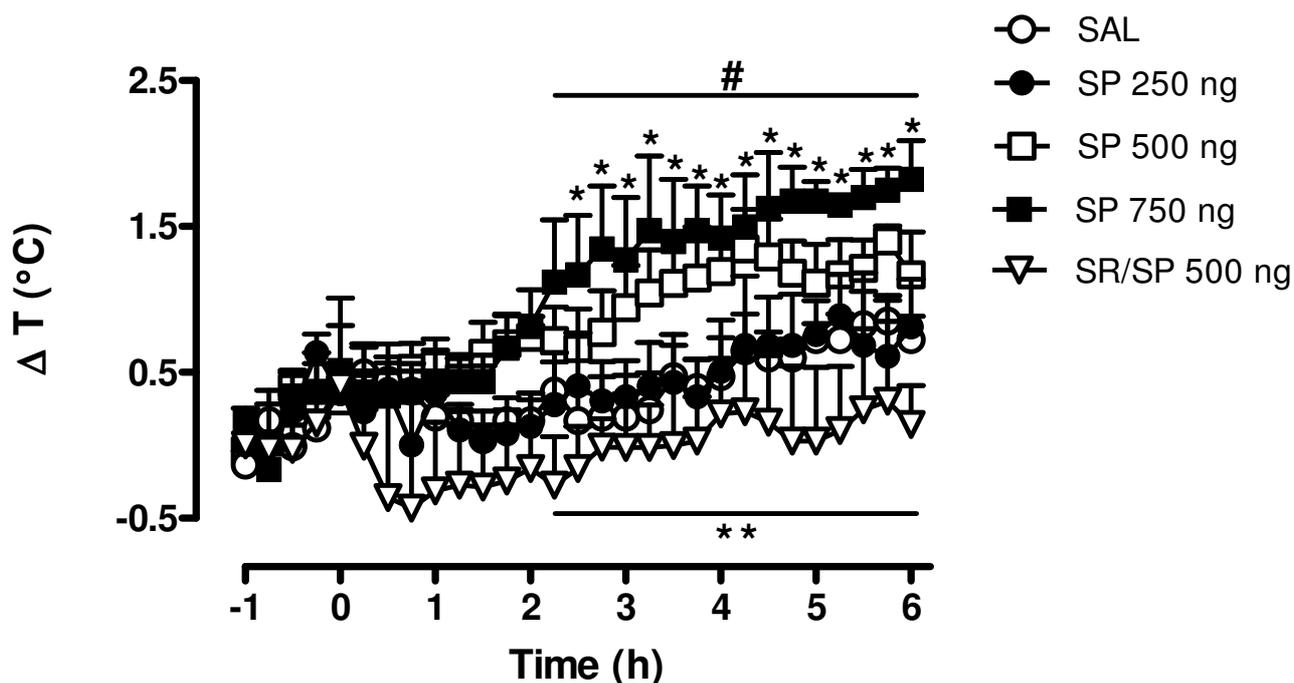


Figura 5: Efeito da administração i.c.v. de Substância P (SP) sobre a temperatura corporal de ratos e efeito do antagonista NK_1 sobre a resposta febril induzida pela SP. Os animais foram pré-tratados i.c.v. com, captopril (CAP, 5 $\mu\text{g/sítio}$) e após 30 min, os animais receberam SP nas doses de 250, 500 e 750 ng ou salina (SAL), 2 μl , icv. Para avaliação do efeito do antagonista, os animais foram tratados com SR140333B (3 $\mu\text{g/sítio}$), 30 min antes do captopril. Neste estudo a dose de SP utilizada foi de 500ng/sítio. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}\text{C}$, registrada a cada 15 min, 4-9 animais. *,# diferença significativa em relação ao grupo CAP/SAL, $p < 0,05$. ** diferença significativa em relação ao grupo SR/SP 500 ng, $p < 0,05$.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM SR140333B NO AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO PELA QUIMIOCINA MIP-1 α

Posteriormente, investigamos a participação da SP, em uma via que não dependeria da liberação de prostaglandinas. Para isso, verificamos se houve recrutamento taquicininérgico na resposta febril desencadeada pela quimiocina MIP-1 α .

A administração do MIP-1 α , na concentração de 500 pg/sítio, via i.c.v., promoveu um aumento estatisticamente significativo da temperatura corporal a partir de 2,5 h e se mantendo sustentável até a 6^a hora . O pré-tratamento com SR140333B na dose de 3 μ g/sítio, por via i.c.v., não modificou a resposta febril induzida pelo MIP-1 α em nenhum momento do experimento (Figura 6).

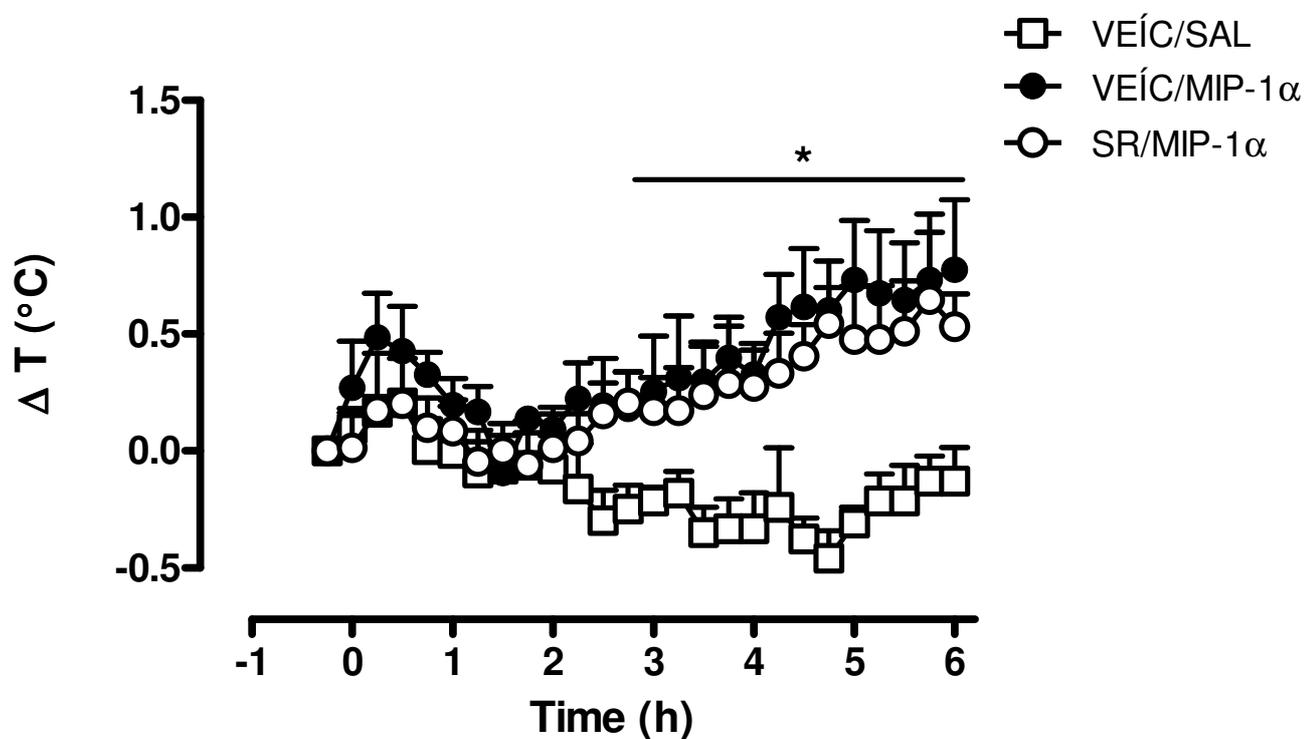


Figura 6: Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo MIP-1 α em ratos. Os animais foram pré-tratados com SR140333B 3 μ g/2 μ l ou veículo (VEÍC) 2 μ l por via i.c.v. e após 30 minutos os animais receberam MIP-1 α 500 pg/2 μ l ou salina estéril (SAL), 2 μ l, via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}$ C, registrada a cada 15 min, 5-7 animais. * diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/SAL, $p < 0,05$.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM SR140333B NO AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO PELAS CITOCINAS TNF- α e IL-6

Em um estudo anterior havíamos demonstrado que apesar da substância P participar da resposta febril induzida por LPS ela não estava envolvida na resposta febril induzida por IL-1 β (REIS *et al*, 2011). Assim, procedemos a investigação da participação da SP na resposta febril desencadeada por outros pirogênicos endógenos, também envolvidos na resposta febril induzida por LPS, como o TNF- α e IL-6.

A administração do TNF- α , na dose de 250 ng/sítio, via i.c.v., promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 1^a hora, se mantendo sustentável até a 6^a hora. O pré-tratamento com SR140333B 3 μ g/sítio, por via i.c.v. reduziu em 61% a resposta febril induzida pelo TNF- α , a partir da 2^a hora aproximadamente, mantendo-se inalterada até a 6^a hora após o tratamento (Figura 7).

A administração da IL-6, na dose de 250ng/sítio, via i.c.v., provocou um aumento significativo da temperatura corporal a partir da 2^a hora, se mantendo sustentável até o final do experimento. O pré-tratamento com SR140333B 3 μ g/2 μ l, por via i.c.v. reduziu a febre induzida pela IL-6 em 61%, a partir da 2^a hora aproximadamente, mantendo-se inalterada até a 6^a hora após o tratamento (Figura 8) .

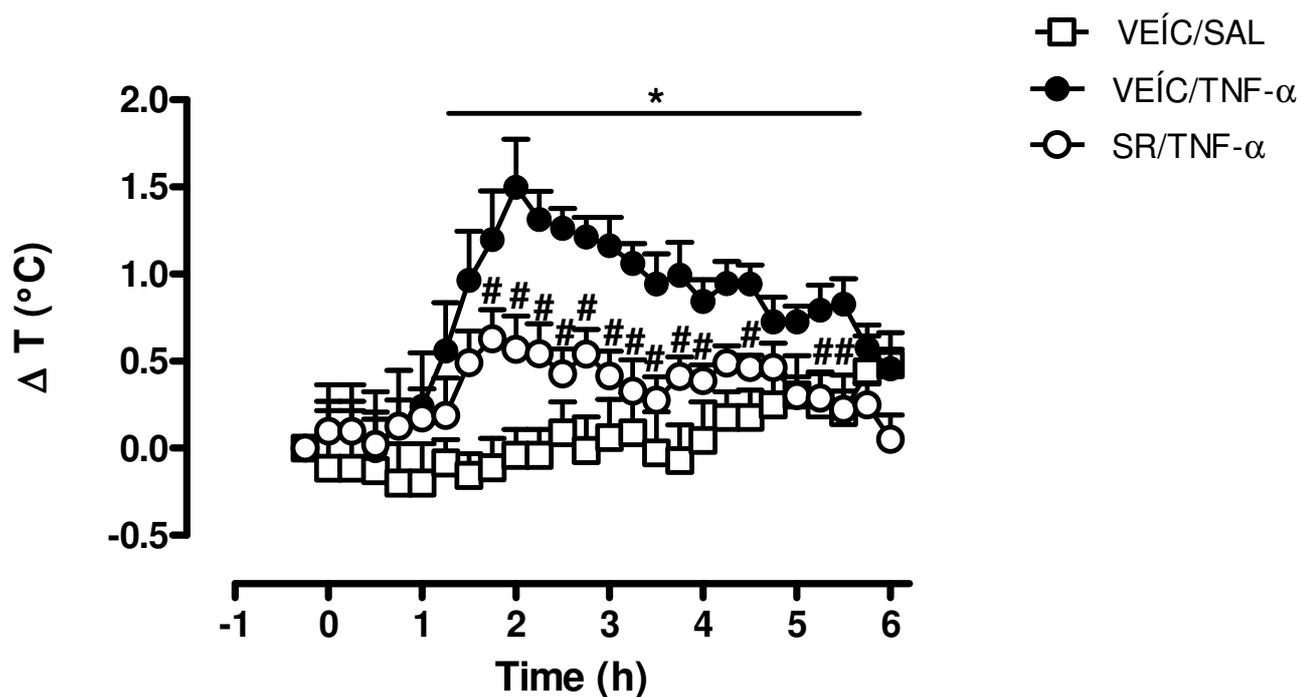


Figura 7: Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α em ratos. Os animais foram pré-tratados com SR140333B 3 μ g/2 μ l ou veículo (VEÍC) 2 μ l por via i.c.v. e após 30 minutos os animais receberam TNF- α 250 ng/2 μ l ou salina estéril (SAL), 2 μ l, via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}$ C, registrada a cada 15 min, 5-8 animais. * diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/SAL, $p < 0,05$. # diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/TNF- α , $p < 0,05$.

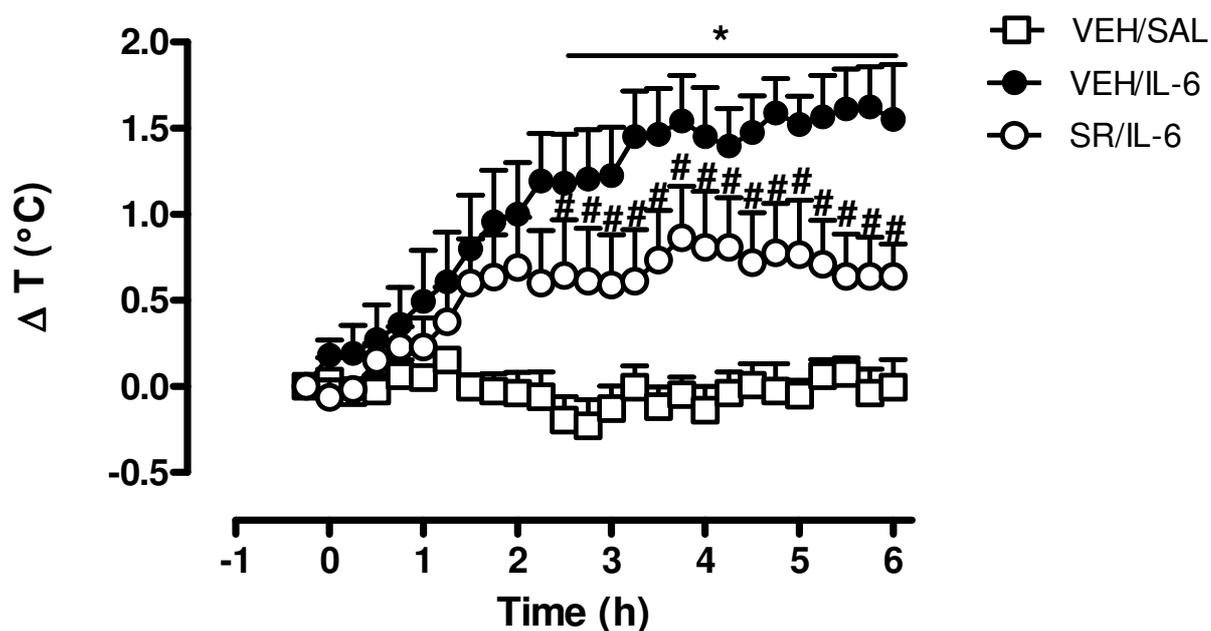


Figura 8: Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pela IL-6 em ratos. Os animais foram pré-tratados com SR140333B 3 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ou veículo (VEÍC) 2 μl por via i.c.v. e após 30 minutos os animais receberam IL-6 250 $\text{ng}/2\mu\text{l}$ ou salina estéril (SAL), 2 μl , via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}\text{C}$, registrada a cada 15 min, 5-8 animais. * diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/SAL, $p < 0,05$. # diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/IL-6, $p < 0,05$.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM SR140333B NO AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO POR PGE₂

Como o antagonista de receptores NK₁ foi efetivo em reduzir a resposta febril de duas citocinas que dependem da síntese de prostaglandinas, passo seguinte foi investigar a interação entre a Substância P e estes mediadores centrais. Iniciamos, verificando a participação da SP na resposta febril desencadeada pelo mediador central, PGE₂.

A administração da PGE₂, na concentração de 250ng/sítio, via i.c.v., promoveu um aumento intenso, rápido e significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, sendo este o pico da resposta e de curta duração (somente 1 hora).

Surpreendentemente, o pré-tratamento com SR140333B 3 µg/sítio, por via i.c.v. reduziu em até 56% a resposta febril induzida pela PGE₂, evitando a formação do pico da resposta febril (Figura 9).

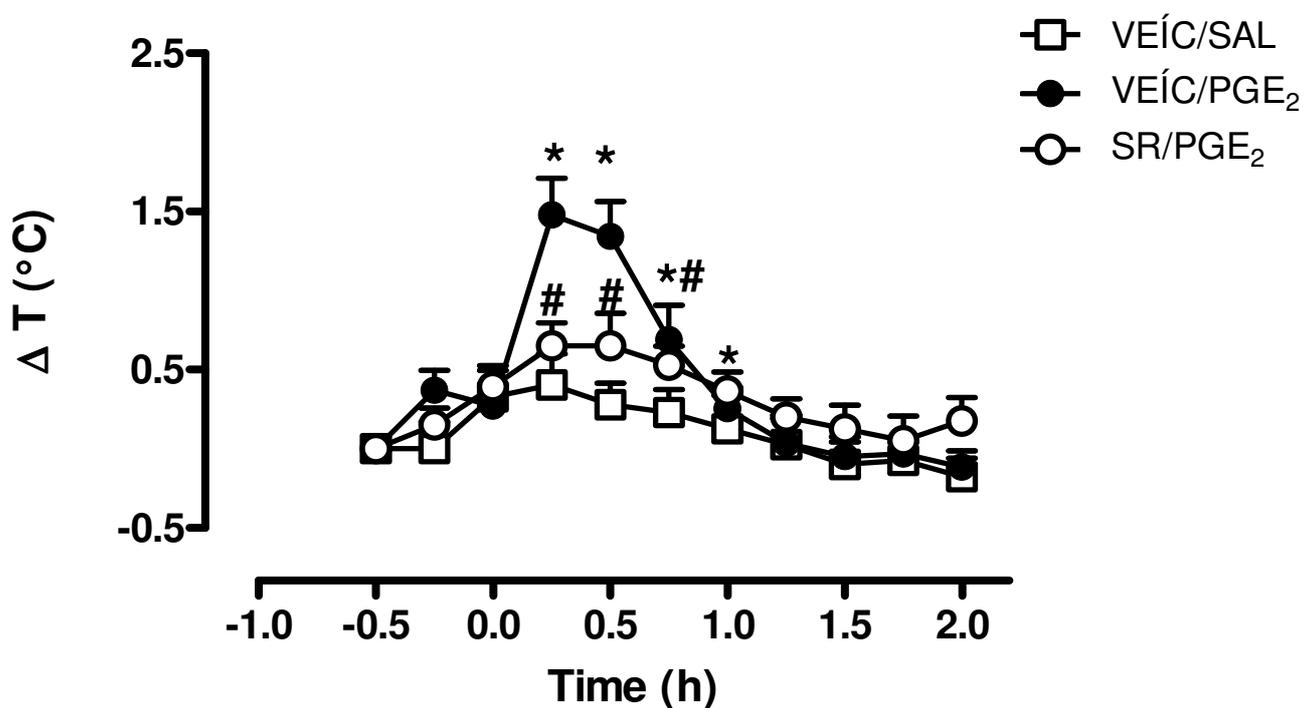


Figura 9: Efeito do SR140333B sobre a resposta febril induzida pela PGE₂ em ratos. Os animais foram pré-tratados com SR140333B 3 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ou veículo 2 μl por via i.c.v., após 30 minutos os animais receberam PGE₂ 250 ng/2 μl ou salina estéril (SAL), 2 μl , via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}\text{C}$, registrada a cada 15 min, 5-7 animais. * diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/SAL, $p < 0,05$. # diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/ PGE₂, $p < 0,05$.

4.5 PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SUBSTÂNCIA P

O experimento anterior nos sugeriu que a Substância P é liberada posteriormente a síntese de PGE₂ e não anteriormente. Assim, para corroborar esta hipótese o próximo passo foi verificar se a resposta febril desenvolvida pela Substância P dependia, ou não, da síntese e liberação de prostaglandinas.

O pré-tratamento dos animais tratados com Captopril e Substância P, na dose de 500 ng/sítio, promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, característico desta taquicinina, que se iniciou em torno da 3^a hora, atingindo pico entre a 4^a e 5^a hora, permanecendo elevada até o final da observação.

O pré-tratamento com a indometacina, um inibidor não seletivo das enzimas COX, na dose de 2 mg/kg, por via i.p., reduziu a febre induzida pela Substância P em torno de 73%. Essa redução iniciou desde as primeiras horas da febre induzida pela SP (3^a hora) e manteve-se até a 6^a hora (Figura 10).

Como controle positivo deste experimento, decidimos utilizar a febre induzida por IL-1 β que sabidamente é revertida pela indometacina (SOUZA *et al*, 2009). A febre induzida pela IL-1 β iniciou na 2^a hora, atingindo um pico na 3^a e possuindo um leve declínio na 5^a hora. Conforme esperado, a indometacina reverteu a febre induzida pela IL-1 β , atingindo níveis de até 93% (Figura 11).

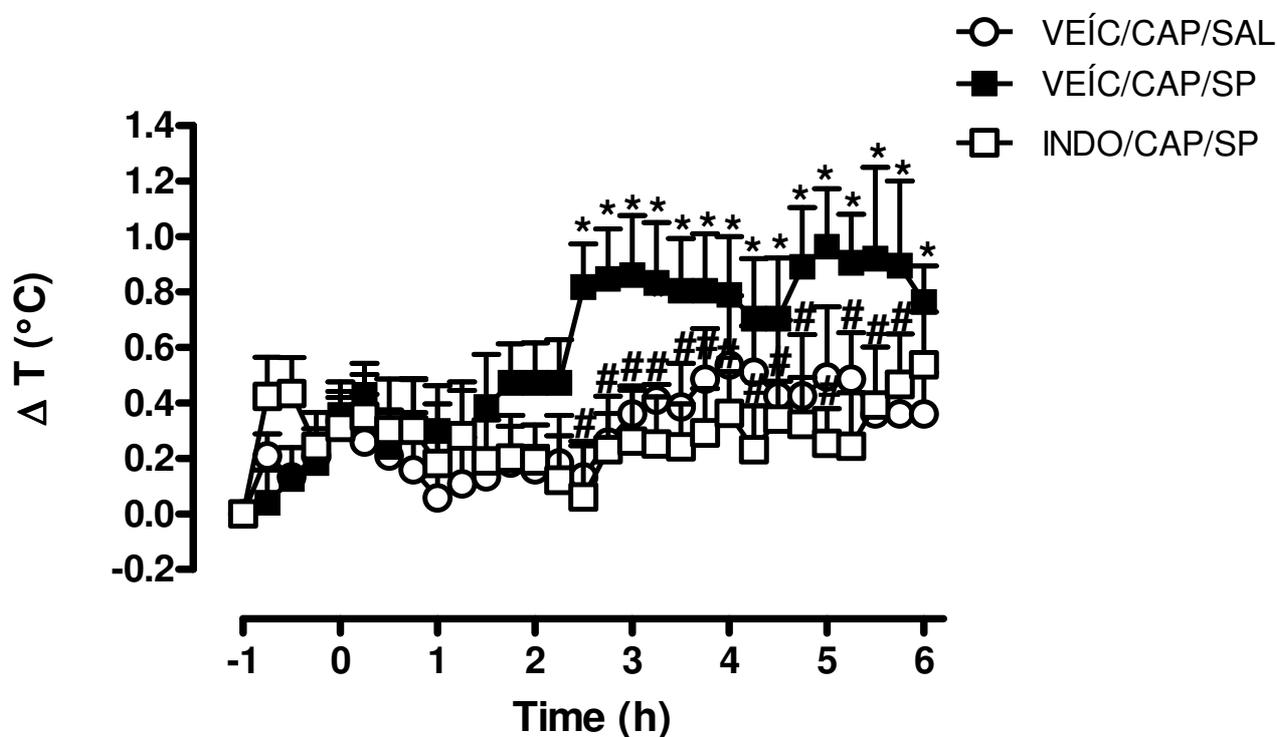


Figura 10: Efeito da indometacina na resposta febril induzida pela Substância P em ratos. Os animais foram tratados com Veíc (Tris) ou Indometacina, 2 mg/kg, via i.p., após 30 minutos os animais receberam Captopril (CAP) 5 μ g, via i.c.v, e após mais 30 minutos, receberam Substância P(SP), 500 ng/2 μ l ou salina estéril (SAL), 2 μ l, via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}$ C, registrada a cada 15 min, 5-7 animais. * diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/CAP/SAL, $p < 0,05$. # diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/CAP/SP, $p < 0,05$.

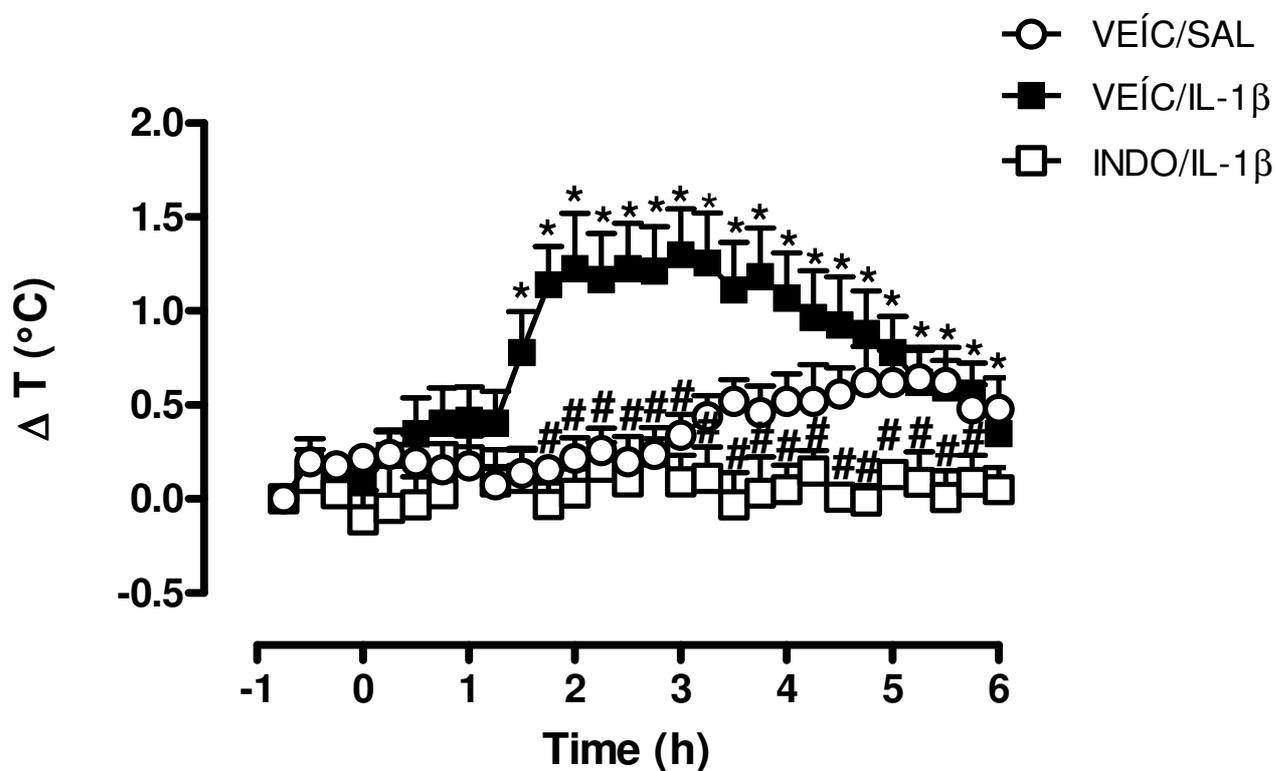


Figura 11: Efeito da indometacina na resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos. Os animais foram tratados com Veíc (Tris) ou Indometacina, 2 mg/kg, via i.p., após 30 minutos os animais receberam IL-1 β , 3,12 ng/2 μ l, ou salina estéril (SAL), 2 μ l, via i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal em $^{\circ}$ C, registrada a cada 15 min, 5-7 animais. *diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/SAL, $p < 0,05$. # diferença significativa em relação ao grupo VEÍC/IL-1 β , $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo sugerem que a Substância P é um destes mediadores centrais que, pela ativação de receptores NK₁, é capaz de produzir um aumento controlado da temperatura corporal em ratos. Esse efeito parece ser dependente da síntese/liberação de prostaglandinas. Além disso, ela participa no desenvolvimento da resposta febril promovida pelo TNF- α , IL-6 e PGE₂. Entretanto, a Substância P não contribui para a resposta febril induzida pelo CCL3/MIP-1 α .

Inicialmente, avaliamos o efeito da administração central da Substância P na temperatura corporal. A administração da Substância P, em animais pré-tratados com captopril, por via i.c.v., promoveu um aumento dose-dependente da temperatura corporal de ratos na doses de 500 ng e 750 ng/2 μ l. Este efeito se iniciou em torno da 3^a hora, permanecendo elevado até o final do experimento (6^a hora) (Figura 1). Doses menores de Substância P, não foram capazes de induzir febre.

O pré-tratamento dos animais com captopril foi realizado pois observamos em estudos preliminares que a administração isolada da Substância P apresentava resultados bastante variados em relação à temperatura corporal dos animais (resultado não mostrado). Mesmo em altas doses, acima de 500ng alguns animais apresentavam uma potente resposta febril enquanto em outros nenhuma variação era observada. Aventamos a possibilidade de que, por ser de origem peptídica, a Substância P poderia estar sendo degradada em diferentes níveis em cada animal, o que poderia resultar nesta grande variabilidade de resultados. No sentido de homogeneizar estes resultados, decidimos testar se o captopril, atuando como inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA) que está entre as enzimas que degradam a substancia P (SKIDGEL & ERDOS, 2004; HARFORD-WRIGHT *et al*, 2010) poderia reduzir sua degradação, aumentando a disponibilidade da Substância P e facilitando sua atuação em receptores NK₁. Os resultados obtidos confirmam esta hipótese pois, utilizando esta estratégia, fomos capazes de induzir uma resposta febril dependente da dose de substância P administrada.

É importante lembrar que assim como a Substância P, outras neurocininas podem ter seu metabolismo alterado com o uso do captopril, como a bradicinina, que também possui um efeito pirogênico descrito (COELHO *et al*, 1997). Entretanto, o bloqueio da resposta febril induzida pela Substância P através do uso do antagonista seletivo para receptor NK₁ sugere que esse efeito se deva

essencialmente à esta taquicinina, descartando qualquer influência de outros neuropeptídeos que poderia ter se formado após a administração de captopril (REIS *et al*, 2011).

A metabolização da Substância P no sistema nervoso central talvez possa explicar os resultados contraditórios de alguns autores sobre a atividade pirogênica deste peptídeo. SZELÉNYI *et al* (2007) e KRUPIN *et al* (1982) demonstraram um aumento de temperatura corporal, semelhante ao nosso, em ratos e coelhos, respectivamente. Corroborando estes resultados, BLATTEIS e colaboradores (1994) também verificaram que a administração desta taquicinina na área pré-óptica do hipotálamo anterior, em porcos da Índia, aumentou a produção de calor concomitantemente com uma redução da perda de calor, resultando em uma elevação da temperatura corporal.

Contrariamente, REWERSKI *et al* (1982) não verificaram nenhuma alteração na temperatura corporal de ratos, mesmo administrando Substância P em doses que variavam de 20 a 2000 ng no ventrículo lateral e hipotálamo anterior. Nossos dados apresentados neste estudo corroboram e dão um maior suporte a hipótese de que a Substância P liberada no sistema nervoso central é um importante mediador da febre. Essa resposta febril evidenciada, tanto por eles, quanto pelo nosso trabalho, pode ser decorrente da capacidade da Substância P afetar a atividade de neurônios sensíveis e insensíveis à temperatura presentes no hipotálamo (BLATTEIS *et al*, 1994)

Contudo, em alguns desses estudos, alguns pontos importantes devem ser ressaltados que podem gerar diferenças nas respostas observadas. Nos experimentos feitos por KRUPIN *et al* (1982), a temperatura corporal dos animais foi acompanhada durante 2 horas. Ainda, este estudo foi conduzido com coelhos, uma espécie que possui um desenvolvimento da resposta febril induzida pelo LPS, por exemplo, de maneira diferenciada daquela observada em ratos pois pequenas doses desta endotoxina induz um aumento de temperatura bastante significativo. Já em ratos, para alcançar os níveis de temperatura equivalentes, é necessário aumentar em cerca de 10 vezes a dose, demonstrando claramente a diferença entre espécies no que diz respeito a esse parâmetro (KLUGER *et al*, 1991). Aparentemente, a resposta febril induzida pela Substância P pode, também, se desenvolver de maneira mais rápida (cerca de 2 horas) e menos intensa (variação máxima de

temperatura de 0,8^o C) em coelhos, e mais lenta (inicia na 3^a hora), porém com mais intensidade (variação da temperatura máxima em 2^o C) em ratos.

No outro estudo, SZELÉNYI e colaboradores (1997) utilizaram ratas fêmeas na avaliação da resposta febril induzida por esta taquicinina. Segundo MOUIHATE & PITTMAN (2003) a resposta febril induzida pelo LPS é modulada pelos hormônios ovarianos, evidenciado pelo acompanhamento do ciclo estral. ASHDOWN *et al* (2007) também verificaram que a gravidez e o estágio da mesma, influenciam a resposta febril induzida pela endotoxina. Esta pode estar entre as razões pelas quais SZELÉNYI e colaboradores (1997) observaram uma resposta bastante rápida e transitória com pico em 30 min e duração máxima de 60 min mesmo em doses tão altas como 1000ng. A outra razão para a diferença entre o perfil da resposta observada entre este estudo e o nosso provavelmente reside justamente na questão discutida acima sobre, em nosso estudo, termos bloqueado o metabolismo da Substância P, obtendo assim respostas mais duradouras. BLATTEIS e colaboradores (1994) provavelmente também observaram uma resposta mais rápida pois utilizaram cobaias e fizeram a injeção de Substância P diretamente na área pré-óptica do hipotálamo.

Portanto, embora existam algumas evidências relacionando a Substância P e temperatura corporal, o presente estudo possui uma abordagem mais completa e específica, permitindo uma comparação melhor com a grande maioria dos estudos de febre que foram feitos em ratos machos, demonstrando que a administração central da SP causa um aumento dose-dependente da temperatura corporal nesta espécie animal.

REIS *et al* (2011) e BALASKÓ *et al* (2000), utilizando os antagonistas SR140333B e CP-96,345, respectivamente, verificaram que essa resposta é mediada principalmente por receptores NK₁, pois seu bloqueio reduziu a febre induzida pela Substância P. Essa evidência pode ser corroborada pela presença tanto do receptor NK₁ quanto da Substância P no hipotálamo anterior (ZHANG *et al*, 2004; TSUCHIDA *et al*, 1990). A partir desse experimento, selecionamos a dose de 500 ng/2µl de Substância P para uso nos demais experimentos que envolveram a administração desta taquicinina.

O LPS, importante componente da parede celular de bactérias gram-negativas (GALLIN *et al*, 1992), simula infecções bacterianas e induz uma resposta febril que pode ser revertida com o uso de antagonistas específicos para receptores

NK₁ (REIS *et al*, 2011; BALASKÓ *et al*, 2000), sugerindo que a Substância P, particularmente através destes receptores, é um componente importante neste evento. Além disso, foi verificado que a liberação periférica desta taquicinina não parece ser relevante para o desenvolvimento da resposta febril induzida por esta toxina, já que a administração do mesmo antagonista via i.p. não reduziu essa resposta. O contrário pode ser evidenciado, após injeção via i.c.v. (REIS *et al*, 2011). Foi possível chegar à esta conclusão pois há evidência de que esse antagonista não atravessa a Barreira Hematoencefálica (BHE) (JUNG *et al*, 1994).

Embora seja um modelo bastante aceito, a ação do LPS, contudo, ainda nutre controvérsias. Alguns pesquisadores acreditam que o mesmo possa alterar diretamente a temperatura corporal. Neste caso, deveríamos considerar a possibilidade de que o próprio LPS poderia liberar Substância P. Entretanto, fortes evidências sugerem que esta toxina atue de maneira indireta, ativando células do sistema imune, em especial os macrófagos, os quais passariam a produzir e liberar diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (ROMANOVSKY & BLATTEIS, 1995; RUDAYA *et al*, 2005). Uma vez no Sistema Nervoso Central, essas citocinas induziriam a produção de mediadores centrais, como PGE₂ e CRF, desencadeando a resposta febril (ZEISBERGER, 1998). Durante essa resposta, podem ser ativadas duas vias principais: uma que depende da liberação de prostaglandinas e outra que não (STRIJBOS *et al*, 1992).

Previamente, em nosso grupo, REIS *et al* (2011) verificaram que o pré-tratamento com antagonista não-peptídico específico para receptor NK₁, não alterou a resposta febril induzida pela IL-1 β , sugerindo que a participação da SP nesse efeito é irrelevante. Como a IL-1 β atua na via que depende da geração de prostaglandinas, inicialmente aventamos a possibilidade de que a SP exerceria alguma participação em vias independentes da síntese e liberação de prostaglandinas. Embora o CCL3/MIP-1 α não participe da febre induzida pelo LPS (SOARES *et al*, 2009), esta quimiocina induz uma resposta febril com mecanismos que independem da liberação de prostaglandinas, necessitando somente da liberação de CRF como mediador central (SOARES *et al*, 2009; DAVATELIS *et al*, 1989; MIÑANO *et al*, 1990). No entanto, para nossa surpresa observamos que o pré-tratamento com SR140333B também não alterou a resposta febril induzida pelo CCL3/MIP1- α , sugerindo que a participação da Substância P não é essencial para a resposta febril desencadeada por esta quimiocina (Fig. 6 e REIS *et al*, 2011). Assim,

a participação de Substância P na resposta febril parece não estar necessariamente segregada às vias dependentes ou independentes de prostaglandinas, ou seja, ambas as vias poderiam ocorrer sem a participação de Substância P.

Por outro lado, SUN e colaboradores (2007) verificaram que a Substância P pode induzir a expressão de CCL3/MIP-1 α em neutrófilos de ratos, atuando como um estímulo inflamatório, via NF- κ B. O mesmo perfil modulatório pode ser verificado, em linfócitos T, com sua outra isoforma CCL4/MIP-1 β (GUO *et al*, 2002), a qual também induz uma resposta febril, com as mesmas doses, porém com características distintas ambas independente da síntese de prostaglandinas (MIÑANO *et al*, 1990, SOARES *et al*, 2009). Se este mesmo efeito poderia ocorrer no SNC não sabemos, mas seria possível que a Substância P, quando liberada, induza a liberação de CCL3/MIP-1 α e esta quimiocina, então, induza febre independente da síntese de prostaglandinas. No entanto, para testar esta hipótese, seria necessário administrar anti-MIP-1 α , na resposta febril induzida pela substância P. No entanto, a possibilidade de que a Substância P estaria induzindo CCL3/MIP-1 α não parece ser o caso, uma vez que evidenciamos neste estudo que a resposta febril induzida por Substância P depende da síntese de prostaglandinas. Assim, estes dados em conjunto sugerem que a Substância P não é liberada nem antes nem após a liberação de CCL3/MIP-1 α .

Deste modo, aparentemente, a Substância P não participa nem da via induzida pela IL-1 β (REIS *et al*, 2011) nem da via ativada por CCL3/MIP-1 α (presente estudo e REIS *et al*, 2011). Contudo, esta taquicinina participa da complexa resposta febril induzida pelo LPS (REIS *et al*, 2011), que também pode ser orquestrada por outros pirogênicos endógenos, como TNF- α e IL-6. Portanto, nosso passo seguinte foi avaliar a participação taquicininérgica, via ativação de receptores NK₁, na febre induzida por estas citocinas.

O antagonista para receptor NK₁, SR140333B, reduziu a febre induzida pelo TNF- α e IL-6 (Figs. 7 e 8) em torno de 61% para ambas as citocinas. Isso sugere que a Substância P é liberada após a síntese destas citocinas e não antes.

Existem algumas evidências demonstrando a relação entre SP, TNF- α e IL-6. No entanto, a grande maioria delas refere-se ao fato de que a Substância P pode induzir a liberação de citocinas e não ao contrário. Segundo GITTER *et al* (1994), MARTIN *et al* (1993) e PALMA *et al* (1994), a Substância P pode induzir a síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias entre elas, TNF- α e IL-6 em astrócitos e

células microgliais . Além disso, LIEB e colaboradores (1997,1998) conduziram alguns estudos utilizando linhagens de células de astrocitoma (U373MG) e IL-6. Essas células compartilham diversas características com astrócitos de ratos e também expressam receptores NK₁ de alta afinidade por Substância P. Portanto, é um ótimo modelo *in vitro* para o estudo da SP. Os autores demonstraram que concentrações nanomolares de Substância P induzem a expressão de IL-6, através da ativação da proteína kinase C (PKC), *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK p38) e fator de transcrição NF-IL6 (NF-IL6/CCAAT/*Enhancer-binding protein beta*). Embora a Substância P possa ativar potencialmente o NF-κB, esse fator de transcrição não parece estar envolvido na indução da expressão da IL-6 pela Substância P (LIEB *et al*,1998).

Em relação ao TNF-α e Substância P, COCCHIARA *et al* (1999) e LUBERNAROD *et al* (1994) demonstraram que SP aumenta a secreção de TNF-α em neuroglia e macrófagos peritoneais. Já em outros estudos, como o de MARTIN *et al* (1993), tanto a SP administrada isoladamente quanto ela atuando em sinergismo com o LPS, não afetaram a produção de TNF-α em macrófagos humanos.

Baseado nesses estudos, a hipótese de que a Substância P precede estas citocinas, ou seja, que a SP induz a liberação de TNF-α e IL-6, deve ser considerada em algumas situações. No entanto, no caso na resposta febril, essa taquicinina parece ser liberada a partir dessas citocinas. Não sabemos qual tipo celular seria o responsável pela liberação da Substância P por estas citocinas. É importante ressaltar, que para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar que durante a resposta febril induzida pelo TNF-α e IL-6, há participação da SP.

Uma vez evidenciada que a Substância P participa da resposta febril induzida por estas duas citocinas o passo seguinte a ser considerado foi que, mediadores centrais estão envolvidos em cada uma dessas vias de indução. Por exemplo, a resposta febril induzida pelo TNF-α é mediada principalmente pela PGE₂, já a febre induzida pela IL-6, PGF_{2α} e CRF (DINARELLO *et al*, 1988; FABRÍCIO *et al*, 2006; ZAMPRONIO *et al*, 2000; ROTHWELL,1990).

Tanto a resposta febril induzida pelo TNF-α, quanto aquela induzida pela IL-6, são mediadas pelo aumento da síntese e liberação de prostaglandinas, através da indução de COX-2 (CAO *et al*, 1996; CAO *et al*, 1998; LI *et al*, 2003; DINARELLO *et al*, 1988; ROTHWELL *et al*, 1990). LI *et al*, em dois estudos, verificaram que a

resposta febril induzida pela IL-6 é bloqueada em animais deficientes para COX-2 (LI *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2003).

Baseado nisso, nossa próxima etapa, foi avaliar o efeito do antagonista NK₁ na febre induzida pela PGE₂. A resposta febril induzida por este mediador central foi reduzida, em até 73%, com o pré-tratamento com SR140333B, sugerindo que a Substância P participa desse efeito. Se a PGF_{2α} também induz febre através da liberação de Substância P ainda não determinamos, mas é bastante provável que isto ocorra uma vez que esta prostaglandina é produzida por IL-6.

Reunindo nossos dados, podemos sugerir que após a liberação de TNF-α e IL-6, há indução de COX-2, que por sua vez induz a síntese e liberação de prostaglandinas, que promoveriam então a estimulação de Substância P, a qual iria atuar alterando a frequência de disparos dos neurônios hipotalâmicos que iria culminar na resposta febril.

Entretanto, estudos anteriores já haviam demonstrado que a resposta febril induzida por Substância P era dependente da síntese de prostaglandinas (BLATTEIS *et al.*, 1994 e SZELENYI *et al.*, 1997). No entanto, BLATTEIS *et al.*, (1994) e SZELENYI *et al.*, (1997) utilizaram uma dose (10 mg/kg) de indometacina 5 vezes maior que a utilizada por nosso grupo em estudos anteriores (2 mg/kg) no mesmo modelo animal. Em nosso grupo, diversos estudos comprovam a efetividade dessa dose em reduzir os níveis de prostaglandinas (ZAMPRONIO *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2002; WERNER *et al.*, 2006). Muitas drogas em altas doses perdem a seletividade e/ou especificidade de seu mecanismo de ação, neste caso a inibição da síntese e liberação de prostaglandinas.

Portanto, nosso último passo foi verificar se a resposta febril desenvolvida pela Substância P em nosso laboratório dependia, ou não, da síntese e liberação de prostaglandinas utilizando para isso, o inibidor não-seletivo das enzimas COX, indometacina em uma dose mais baixa. Para realizar este experimento, como controle positivo, avaliamos o efeito desse inibidor na dose proposta na resposta febril induzida pela IL-1β, a qual já é conhecida por ser dependente da síntese de prostaglandinas (DE SOUZA *et al.*, 2002) .

De forma surpreendente, o aumento da temperatura corporal induzido pela Substância P foi reduzido pela administração prévia da indometacina, em até 73%, de maneira similar à resposta febril induzida pela IL-1β, que foi abolida durante o experimento (redução de 93%)(Figuras 10 e 11). Nossos dados sugerem, que a

febre induzida pela SP também é dependente de prostaglandinas e corrobora os poucos estudos realizados anteriormente (BLATTEIS *et al*, 1994, SZELÉNYI *et al*, 1997).

Nossos dados demonstram que a relação entre prostaglandinas e Substância P parece ser mais complexa do que imaginávamos, pois de acordo com o presente estudo, as prostaglandinas poderiam estimular a liberação de Substância P no SNC, que liberariam mais prostaglandinas, culminando na resposta febril.

Alguns estudos relatam o envolvimento entre PGE₂ e Substância P. Sabemos que injeções de LPS ou PGE₂ ativam algumas regiões do cérebro como a área pré-óptica ventro e dorsomedial do hipotálamo e núcleo paraventricular, que são importantes para indução da febre (ELMQUIST *et al*, 1997). SP e receptores NK₁ são encontrados com seus níveis elevados em todas essas áreas e em células de microglia (WOMACK *et al*, 2007; WOMACK & BARRETT-JOLLEY, 2007; LAI *et al*, 2000). A localização de ambos nessas áreas podem contribuir para a gênese da resposta febril.

Corroborando nossos dados, foi verificado que a Substância P eleva a produção de PGE₂, através do aumento da expressão de COX-2 em culturas de microglia, possivelmente um efeito mediado pelo NF-κB (RASLEY *et al*, 2004). O efeito dessa taquicinina, em ativar esse fator de transcrição, em concentrações nanomolares também pode ser verificado em células de astrocitoma humano, macrófagos murinos, leucócitos humanos, macrófagos alveolares e células dendríticas (LIEB *et al*, 1997; MARRIOTT *et al*, 2000; GALLICCHIO *et al*, 2009; BARDELLI *et al*, 2005). Entretanto, GALLICCHIO e colaboradores (2009) sugerem que esse seu efeito modulatório varia de acordo com o tipo celular e espécie animal.

Nossos estudos não nos permitem sugerir como e a razão pela qual este fenômeno ocorre mas diversas hipóteses podem ser levantadas. É possível, por exemplo, que diferentes células estejam envolvidas (microglia, astrócitos e neurônios) na produção de prostaglandinas e Substância P. Estes será um dos pontos a ser investigado em estudos posteriores. Outras questões podem ser levantadas. Não poderiam PGs e Substância P atuarem sinergicamente para induzir febre? Teriam estas substâncias as mesmas funções, como por exemplo, uma estimulando a outra para sensibilizar os neurônios termossensíveis? Todas estas perguntas ainda necessitam de mais estudos para que possam ser respondidas.

Outro ponto interessante que deve ser mencionado é dentre os representantes das vias dependentes de prostaglandinas, estudados até então (IL-1 β , TNF- α , IL-6), o único que não atua através da liberação de Substância P para desenvolvimento de sua resposta febril é a IL-1 β . Além de não depender dessa taquicinina, essa citocina também difere das outras citocinas citadas pois não recruta opióides endógenos para exercer seu efeito pirogênico (FRAGA *et al.*,2008).

A Substância P pode não ser liberada depois da IL-1 β , mas não podemos descartar a possibilidade dela atuar antes ou em conjunto com esta taquicinina. Como exemplo, PALMA *et al* (1997) verificaram que a Substância P atua em sinergismo com a IL-1 β , potencializando a liberação de PGE₂ em células de astrócitos humanos.

Sabe-se que a cascata de eventos que resulta no aumento controlado da temperatura corporal é iniciada por um patógeno, que após reconhecimento pelas células de defesa , induz a síntese e liberação de diferentes citocinas. Dependendo de qual citocina é gerada, pode ocorrer a ativação de diversas vias diferentes: uma que depende de prostaglandinas e outra que não, uma via que depende de opióides e outra não. As diferentes vias de indução da febre estão representadas na figura 12.

Com os dados obtidos neste estudo, sugerimos a inclusão da Substância P nas vias existentes. Este neuropeptídeo estaria sendo liberado após o TNF- α e IL-6 provavelmente sendo liberada antes e depois da síntese de prostaglandinas. A figura 12 sumariza a cascata de mediadores responsável pelo desenvolvimento da resposta febril induzida ou não pelo LPS, com a inclusão da Substância P .

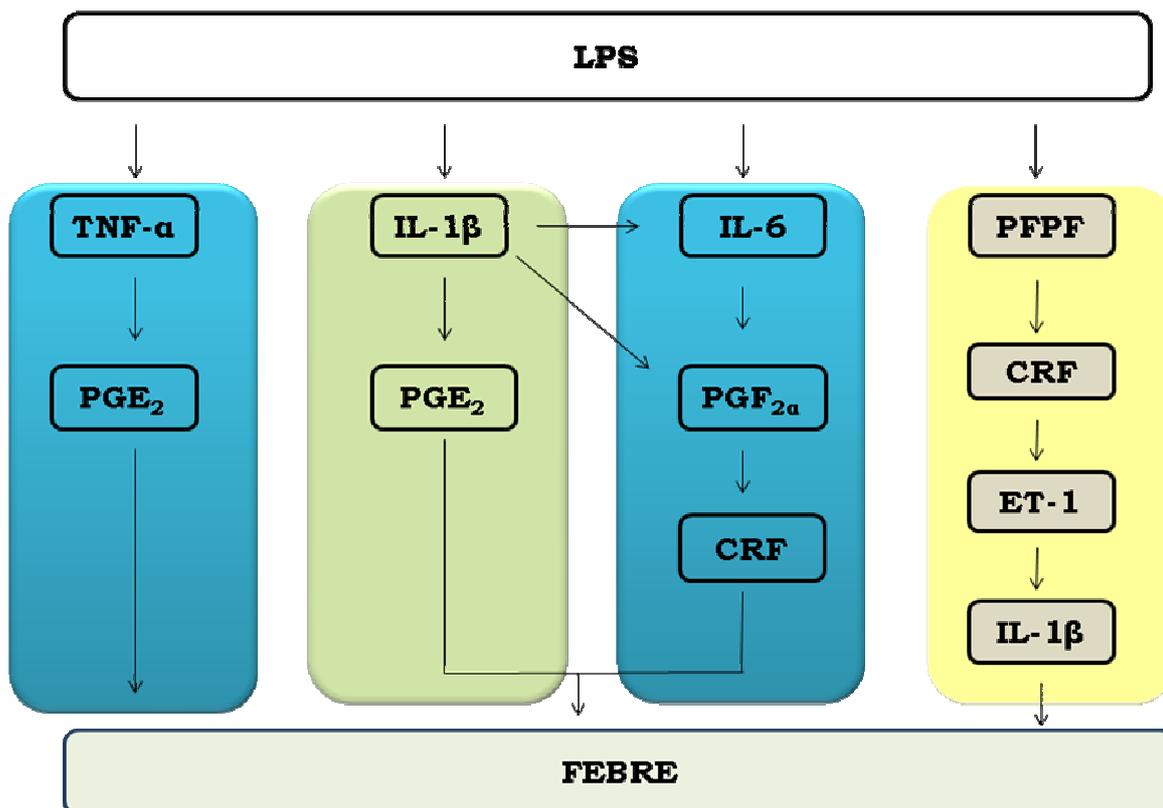


Figura 12 – Representação esquemática das vias envolvidas da febre induzida por LPS em ratos. LPS desencadeia a liberação, por diferentes células do hospedeiro, de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e PFPF a fim de ativar duas diferentes vias de indução de febre. Uma delas claramente depende de prostaglandinas derivadas de ciclooxigenase (elipses abertas em verde e azul) enquanto que a outra via, insensível à indometacina (elipses fechadas em amarelo) depende da liberação de ET-1. CRF está implicado em ambas as vias. Em azul, estão as vias dependentes da liberação de opióides endógenos e de substância P. Em verde, a via independente tanto de opióides endógenos como de substância P. Em amarelo, a via dependente de opióides endógenos e onde a participação de Substância P ainda não foi avaliada. Fonte: Adaptado de FABRICIO *et al*, 2006.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A Substância P quando administrada centralmente, através da ativação de receptores NK1, promovem um aumento controlado da temperatura corporal.
- A liberação central de Substância P está envolvida no desenvolvimento da resposta febril induzida pelas citocinas TNF- α e IL-6, mas não pela quimiocina MIP-1 α .
- A atividade pirogênica de um dos principais mediadores da resposta febril, PGE₂, depende da liberação desta taquicinina.
- A resposta febril induzida pela Substância P depende da síntese/liberação de prostaglandinas.

REFERÊNCIAS

AID, S.; BOSETTI, F. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. **Brain Research Bulletin**, v.73, p.108-113, 2007.

ANDERSON, C.; NEMEROFF, C.B. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. **Journal of Neuroscience**, v.6, p.2908-22914, 1986.

ARONOFF, D.M. & NEILSON, E.G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **The American Journal of Medicine**, v. 111, p.304-315, 2001.

ASHDOWN, H.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G.N. Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.292, p.R1667-1674, 2007.

ATKINS, E. Pathogenesis of fever. **Physiological Reviews**, v.40, n.3, p.580-646, 1960.

BALASKÓ, M.; SZÉKELY M.; SZELÉNYI, Z., The effect of CP-96,345, a non-peptide substance P antagonist, on thermoregulation and the development of endotoxin-fever in rats. **Journal of Thermal Biology**, v. 25, p. 1-4, 2000.

BANKS, W. A., ORTIZ, L.; PLOTKIN, S.R.; KASTIN, A.J. Human interleukin (IL)-1 α , murine IL-1 β are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, p.988-996, 1991.

BANKS, W. A.; KASTIN, A.J.; GUTIERREZ, E.G. penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. **Neuroscience Letters**, v. 179, n.1-2, p. 53-56, 1994.

BARDELLI, C.; GUNELLA, G.; VARSALDI, F.; BALBO, P.; DEL BOCA, E.; BERNARDONE, I.S.; AMORUSO, A.; BRUNELLESCHI, S. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-kappaB pathway. **British Journal of Pharmacology**, v.145, p.385-96, 2005.

BENAMAR, K.; YONDORF, M.; BARRETO, V.T.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Deletion of μ -opioid receptor in mice alters the development of acute neuroinflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, p.990-994, 2007.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.840, p.608-618, 1998.

BLATTEIS, C. M.; XIN, L.; QUAN, N., 1994. Neuromodulation of fever: a possible role for substance P. **Annals of New York Academy**, v.741, p.162-173, 1994.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v.111, p.194-223, 2006.

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

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.S168-S177,2000.

BOST, K.L.; BREEDING, S.A.; PASCUAL, D.W. Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. **Regional Immunology**, v.4, p.105-112, 1992.

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.856, p.108-115, 1998.

BRIMIJOIN, S.; LUNDBERG, J.M.; BRODIN, E.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. **Brain Research**, v. 191, p. 443-457, 1980.

BYRD, J.B.; TOUZIN, K.; SILE, S.; GAINER, J.V.; YU, C.; NADEAU, J.; ADAM, A.; BROWN, N.J. Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. **Hypertension**, v.51, p.141-7,2008.

CAO, C.; MATSUMARA K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Cyclooxygenase-2 induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. **Molecular Brain Research**, v.56, p.45-56, 1998.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. R1712-1725, 1996.

CARDOSO, P.G.; MACEDO, G.C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S.C. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, v.23, p.5-13, 2006.

CARTER, J. E.; KRAUSE, J. E. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. **Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 2203-2214, 1990.

CARTMELL, T.; POOLE, S; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **Journal of Physiology**, v. 526, n.3, p. 653-661, 2000.

CHANG, M.M.; LEEMAN, S.E.; NIALL, H.D. Amino-acid sequence of substance P. **Nature New Biology**, v.232, p.86-87, 1971.

CHAPPELL, P.C.; SMITH, M.A.; KILTS, C.D.; BISSETTE, G.; RITCHIE, J.; CHOW, J.C.; YOUNG, D.W.; GOLENBOCK, D.T.; CHRIST, W.J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide induced signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.10689-10692, 1999.

COCCHIARA, R.; ALBEGGIANI, G.; LAMPIASI, N., BONGIOVANNI, A.; AZZOLINA, A.; GERACI, D. **Neuroreport**, v.10, p.575-578, 1999.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, p.885-891, 2002.

COMPAN, V.; SCEARCE-LEVIE, K.; CROSSON, C.; DASZUTA, A.; HEN, R. Enkephalin contributes to the locomotor stimulating effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine. **European Journal of Neuroscience**, v.18, p.383-390, 2003.

CABRINI, D.; OLIVEIRA, C.R.; PAJOLLA, G.P.; CALIXTO, J.B.; PELÁ, I.R. Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p.296-302, 1997.

COOKE, H.J.; FOX, P.; ALFERES, L.; FOX, C.C.; WOLFE, S.A.Jr. Presence of NK1 receptors on a mucosal-like mast cell line, RBL-2H3 cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.76, p.188-193, 1998.

CORDER, R.; VANE, J.R. Radioimmunoassay evidence that the pressor effect of big endothelin-1 is due to local conversion to endothelin-1. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.375-80, 1995.

COSTA, S.K.; MORENO, R.A.; ESQUISATTO, L.C.; JULIANO, L.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by Phoneutria nigriventer spider venom. **Neuroscience Letters**, v.318, p.158-162, 2002.

DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; et al. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, v. 243, p.1066-1068, 1989.

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

DIMICCO, J.A.; ZARETSKY, D.V. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.292, p.R47-R63, 2007.

DINARELLO, C. A. Cytokines as endogenous pyrogens. **Reviews of Infectious Diseases**, v.179, p.S294-304, 1989.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious Diseases**, v.6, p.51-95, 1984.

DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, n. 2, p.S294-304, 1999.

DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p.168-189, 1988.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.; BEAUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A.Jr.; O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v.163, p.1433-1450, 1986.

DINARELLO, C.A.; DEMPSEY, R.A.; ALLEGRETTA, M.; LOPRESTE, G.; DAINIAK, N.; PARKINSON, D.R.; MIER, J.W. Inhibitory effects of elevated temperature on human cytokine production and natural killer activity. **Cancer Research**, v.46, p.6236-6241, 1986.

DONKIN, J.J.; VINK, R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. **Current Opinion in Neurology**, v.23, p.293-299, 2010.

DUBOIS, R.N., ABRAMSON, S.B., CROFFORD, L., GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal**, p.1063-1073, 1998.

EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E., KEHRL, J.H., FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v.172, p.1741-1748, 1990.

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

EMOTO, H.; YOKOO, H.; YOSHIDA, M.; TANAKA, M. Corticotropin-releasing factor enhances noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracerebral microdialysis. **Brain Research**, v.601, p.286-268, 1993.

EULER, V.; GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **The Journal of Physiology**, v.72, p.74-87, 1931.

FABRÍCIO, A. S.; RAE, G. A.; ZAMPRONIO, A. R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by pre-formed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **American Journal of Physiology**, 2006.

FABRÍCIO, A.S.; SILVA, C.A.; RAE, G.A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA GE. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.125, p. 542-548, 1998.

FABRÍCIO, A.S.C.; VEIGA, F.H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P.; SOUZA, G.E. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. R671–R677, 2005.

FISHER, L.; RIVIER, C.; RIVIER, J.; BROWN, M. Differential antagonist activity of α -helical CRF 9-41 in three bioassay systems. **Endocrinology**, v.129, p.1312-6, 1991.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **New England Journal of Medicine**, v.345, p.433-442, 2001.

FORTIER, M.E.; KENT, S.; ASHDOWN, H.; POOLE, S.; LUHESHI, G.N. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.287, p.R759-766, 2004.

FRAGA, D.; MACHADO, R.R.; FERNANDES, L.C.; SOUZA, G.E.P.; ZAMPRONIO, A.R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **American Journal of Physiology**, v.294, p. R411-R420, 2008.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**, 2a. ed, Raven Press, New York, 1992.

GAO, W.; SCHMIDTKO, A.; WOBST, I.; LU, R.; ANGIONI, C.; GEISLINGER, G. Prostaglandin D2 produced by hematopoietic prostaglandin synthase contributes to lps-induced fever. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, p.145-150, 2009.

GARCIA, M.; SAKAMOTO, K.; SHIGEKAWA, M.; NAKANISHI, S.; ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p.1735-1741, 1994.

GALLICCHIO, M.; BENETTI, E.; ROSA, A.C.; FANTOZZI, R. Tachykinin receptor modulation of cyclooxygenase-2 expression in human polymorphonuclear leucocytes. **British Journal of Pharmacology**, v.156, p.486-496, 2009.

GARLAND, A.M.; GRADY, E.F.; PAYAN, D.G.; VIGNA, S.R.; BUNNETT, N.W. Agonist-induced internalization of the substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. **Biochemistry Journal**, v.303, p.177-186, 1994.

GITTER, B.D.; REGOLI, D.; HOWBERT, J.J.; GLASEBROOK, A.L.; WATERS, D.C. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. **Journal of Neuroimmunology**, v.51, p.101-108, 1994.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiological Reviews**, v. 47, n.5, p.963-991, 1990.

GUO, C.J.; LAI, J.P.; LUO, H.M.; DOUGLAS, S.D.; HO, W.Z. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1 β expression in human T lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v.131, p.160-167, 2002.

HAMKE, M.; HERPFER, I.; LIEB, K.; WANDEL, C.; FIEBICH, B.L. Substance P induces expression of the corticotropin-releasing factor receptor 1 by activation of the neurokinin-1 receptor. **Brain Research**, v.1102, p.135-144, 2006.

HANADA, R.; LEIBBRANDT, A.; HANADA, T.; KITAOKA, S.; FURUYASHIKI, T.; FUJIHARA, H.; TRICHEREAU, J.; PAOLINO, M.; QADRI, F.; PLEHM, R.; KLAERE, S.; KOMNENOVIC, V.; MIMATA, H.; YOSHIMATSU, H.; TAKAHASHI, N.; VON HAESELER, A.; BADER, M.; KILIC, S.S.; UETA, Y.; PIFL, C.; NARUMIYA, S.; PENNINGER, J.M. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**, v.462, p.505-509, 2009.

HARFORD-WRIGHT, E.; THORNTON, E.; VINK, R. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors exacerbate histological damage and motor deficits after experimental traumatic brain injury. **Neuroscience Letters**, v.481, p.26-29, 2010.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Review: Substance P. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.33, p. 555-576, 2001.

HASDAY, J.D., FAIRCHILD, K.D., SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and infection**, v.2, p.1891-1904, 2000.

HELLE, M.; BRAKENHOFF, J.P.; DE GROOT, E.R.; ARDEN, L.A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. **European Journal of immunology**, v.18, p. 957-959, 1988.

HO, W.Z.; LAI, J.P.; ZHU, X.H.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S.D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. **Journal of Immunology**, V.159, P.5654-5660, 1997.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCHKE, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v.73, p.219-263, 1997.

HOUSSIAU, F.A.; BUKASA, K.; SINDIC, C.J.; VAN-DAMME, J.; VAN SNICK, J. Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 71, p. 320-323, 1988.

JANEWAY, C.A. & MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Reviews of Immunology**, v.20, p.197-216, 2002.

JUNG, M.; CALASSI, R.; MARUANI, J.; BAMOUIN, M.C.; SOUILHAC, J.; PONCELET, M.; GUEUDET, C.; EMONDS-ALT, X.; SOUBRIE, P.; BRELIERE, J.; et al. Neuropharmacological characterization of SR140333, a non peptide antagonist of NK1 receptors. **Neuropharmacology**, p.33, p.167-179, 1994.

JOOS, G.F.; GERMONPRÉ, P.R.; PAUWELS, R.A. Role of tachykinins in asthma. **Allergy**, v.55, p.321-337, 2000.

KARAGIANNIDES, I.; TORRES, D.; TSENG, Y.H.; BOWE, C.; CARVALHO, E.; ESPINOZA, D.; POTHOUKAKIS, C.; KOKKOTOU, E. Substance P as a novel anti-obesity target. **Gastroenterology**, v.134, p.747-755, 2008.

KASAHARA, T.; YAGISAWA, H.; YAMASHITA, K.; YAMAGUCHI, Y.; AKIYAMA, Y. IL1 induces proliferation and IL6 mRNA expression in a human astrocytoma cell line: positive and negative modulation by cholera toxin and cAMP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.167, p.1242-1248, 1990.

KILLINGSWORTH, C.R.; SHORE, S.A.; ALESSANDRINI, F.; DEY, R.D.; PAULAUSKIS, J.D. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-1 mRNA-encoding tachykinins. **American Journal of Physiology**, v.273, p.L1073-1081, 1997.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v.71, p.83-127, 1991.

KNORR, C.; HÜBSCHLE, T.; MURGOTT, J.; MÜHLRADT, P.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. **Brain Research**, v.1205, p.36-46, 2008.

KOSHI, T.; EDANO, T.; ARAI, K.; SUZUKI, C.; EHARA, Y.; HIRATA, M.; OHKUCHI, M.; OKABE, T. Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.186, p.1322-1326, 1992.

KOZAK, W.; CONN, C.A.; KLIR, J.J.; WONG, G.H.; KLUGER, M.J. TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. **American Journal of Physiology**, v.269, p.R23-29, 1995.

KRAMER, M.S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J.; SRAMEK, J.J.; REINES, S.A.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT-KNOWLES, E.; HALE, J.J.; MILLS, S.G.; MACCOSS, M.; SWAIN, C.J.; HARRISON, T.; HILL, R.G.; HEFTI, F.; SCOLNICK, E.M.; CASCIERI, M.A.; CHICCHI, G.G.; SADOWSKI, S.; WILLIAMS, A.R.; HEWSON, L.; SMITH, D.; CARLSON, E.J.; HARGREAVES, R.J.; RUPNIAK, N.M. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, v.281, p.1640-1645, 1998.

KRAUSE, J.E.; DIMAGGIO, D.A.; MCCARSON, K.E. Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.73, p.854-859, 1995.

KRUPIN, T.; KOLOMS, B.A.; KLUTHO, L.; WEBB, G.; BECKER, B. Increased intraocular pressure and hyperthermia following administration of substance P into rabbit third ventricle. **Experimental Eye Research**, v.34, p.319-324, 1982.

LAI, J.P.; DOUGLAS, S.D.; HO, W.Z. 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v.86, p.80-86, 1998.

LAMBRECHT, B.N.; GERMONPRE, P.R.; EVERAERT, E.G.; et al. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. **European Journal of Immunology**, v. 29,p. 3815-3825, 1999.

LEE, S.K.; PI, S.H.; KIM, S.H.; MIN, K.S.; LEE, H.J.; CHANG, H.S.; KANG, K.H.; KIM, H.R.; SHIN, H.I.; LEE, S.K.; KIM, E.C. Substance P regulates macrophage inflammatory protein 3alpha/chemokine C-C ligand 20 (CCL20) with heme oxygenase-1 in human periodontal ligament cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.150, p.567-575, 2007.

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

LeMAY, L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. R798-803, 1990.

LEON, C.G.; TORY, R.; JIA, J.; SIVAK, O.; WASAN, K.M. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.1751-1761, 2008.

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

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

LIEB, K.; FIEBICH, B.L.; BERGER, M.; BAUER, J.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. **Journal of Immunology**, v.159, p.4952-4958, 1997.

LIEB, K.; SCHALLER, H.; BAUER, J.; BERGER, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; FIEBICH, B.L. Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. **Journal of Neurochemistry**, v.70, p.1577-1583, 1998.

LONGMORE, J.; HILL, R.G.; HARGREAVES, R.J. Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.75, p.612-621, 1997.

LOPEZ-VALPUESTA, F.J. & MYERS, R.D. Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. **Neuropharmacology**, v.33, n.8, p.989-994, 1994.

LUBER-NAROD, J.; KAGE, R.; LEEMAN, S.E. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor-alpha from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, v.152, p.819-824, 1994.

MARRIOTT, I.; MASON, M.J.; ELHOFY, A.; BOST, K.L. Substance P activates NF-kappaB independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of neuroimmunology**, v.201, p.163-171, 2000.

MARSDEN, P.A.; BRENNER, B.M. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. **American Journal of Physiology**, v.262, p.C854-861, 1992.

MARTIN, F.C.; ANTON, P.A.; GORNBEIN, J.A.; SHANAHAN, F.; MERRILL, J.E. Production of interleukin-1 by microglia in response to substance P: role for a non-classical NK-1 receptor. **Journal of Immunology**, v.42, p.53-60, 1993.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p.428-435, 2008.

MERIGHI, A.; POLAK, J.M.; GIBSON, S.J.; GULBENKIAN, S.; VALENTINO, K.L.; PEIRONE, S.M. Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. **Cell Tissue Research**, v.254, p.101-109, 1988.

MICHIE, H.R.; SPRIGGS, D.R.; MANOGUE, K.R.; SHERMAN, M.L.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.T.; ARTHUR, K.; DINARELLO, C.A.; CERAMI, A.; WOLFF, S.M., ET AL. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v.104, p.280-286, 1988.

MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R.D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. **Brain Research Bulletin**, v.24, p. 849-852, 1990.

MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R.D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. **Brain Research Bulletin**, v.24, p.849-852, 1990.

MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. **American Journal of Physiology**, v.254, p.R633-640, 1988.

MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. **Endocrinology**, v.144, p.2454-2460, 2003.

NAVARI, R.M.; REINHARDT, R.R.; GRALLA, R.J.; KRIS, M.G.; HESKETH, P.J.; KHOJASTEH, A.; KINDLER, H.; GROTE, T.H.; PENDERGRASS, K.; GRUNBERG, S.M.; CARIDES, A.D.; GERTZ, B.J. Reduction of Cisplatin-Induced Emesis by a

Selective Neurokinin-1-Receptor Antagonist. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.190-195, 1999.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 229-308, 1993.

PAGE, N.M. Hemokinins and endokinins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.1652-1563, 2004.

PALMA, C.; GOSO, C.; MANZINI, S. Different susceptibility to neurokinin 1 receptor antagonists of substance P and septide-induced interleukin-6 release from U373 MG human astrocytoma cell line. **Neuroscience Letters**, v. 171, p.221-224, 1994.

PALMA, C.; MINGHETTI, L.; ASTOLFI, M.; AMBROSINI, E.; SILBERSTEIN, F.C.; MANZINI, S.; LEVI, G.; ALOISI, F. Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production. **Glia**, v.21, p.183-93, 1997.

PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 2a ed., Sydney, Australia, 2005.

QUARTARA, L.; MAGGI, C.A. The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. **Neuropeptides**, v.31, p.537-563, 1997.

RANELS, H. J. & GRIFFIN, J.D. Effects of prostaglandin E2 on the electrical properties of thermally classified neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. **Bio Med Central Neuroscience**, v. 6, p. 1-11, 2005.

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

RASLEY, A.; MARRIOTT, I.; HALBERSTADT, C.R.; BOST, K.L.; ANGUITA, J. Substance P augments *Borrelia burgdorferi*-induced prostaglandin E2 production by murine microglia. **Journal of Immunology**, v.172, p.5705-5713, 2004.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. L. Receptors antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v.46, p. 551-599, 1994.

REIS, R.C.; BRITO, H.O.; FRAGA, D.; CABRINI, D.; ZAMPRONIO, A.R. Central substance P NK1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. **Brain Research**, v. 384, p.161-169, 2011.

REWERSKI, W.; MISTEREK, K.; DOROCIĄK, A.; GUMUŁKA, S.W. Effect of intracerebral administration of substance P on body temperature. **Acta Physiologica Polonica**, v.33, p.185-188, 1982.

RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J. ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F. et al.

Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB Journal**, v.8, p.217-225, 1994.

RIVIER, C.L.; PLOTSKY, P.M. Mediation by corticotrophin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. **Annual Review of Physiology**, v.48, p.475-94,1986.

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. VANE, J.R. e FERREIRA, S.H. (eds.), Springer-Verlag, v.50, p.6-25, 1978.

ROSS, G.; ROTH, J.; STÖRR, B.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. **Physiological Behaviour**, v.71, p.305-313,2000.

ROMANOVSKY, A.A.; BLATTEIS, C.M. Biphasic fever: what triggers the second temperature rise? **American Journal of Physiology**, v.269, p.R280-286, 1995.

ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I. ; BERTHOUD, H.R.; KULCHITSKY, V.A. Are vagal efferents involved in the fever response to intraperitoneal lipopolysaccharide? **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.65-70, 2000.

ROTH, J.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J.; ZEISBERGER, E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R653-658, 1993.

ROTH, J.V. What is the correct temperature management of the febrile patient? **Anesthesia e Analgesia**, v.103, p.1059-1060, 2006.

ROTHWELL, N. J. Mechanisms of pyrogenic action of cytokines. **European Cytokine Network**, v.1,p. 211-213,1990a.

ROTHWELL, N. J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. **Hormone and Metabolic Research**, v.22, p.595-596, 1990b.

ROTHWELL, N.J. Central actions of CRF on energy expenditure and body weight regulation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.14, p.263-271, 1990c.

ROTHWELL, N.J. Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. **Hormone and Metabolic Research**, v.22, p.616-618, 1990d.

ROTHWELL, N.J. Central effects of TNF alpha on thermogenesis and fever in the rat. **Bioscience Reports**, v.8, p.345-352, 1988.

ROTHWELL, N.J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Science**, v.12, p.430-436, 1991.

ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; LeFEUVRE, R.A.; HARDWICK, A.J.; GAULDIE, J.; HOPKINS, S.J. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen

in the rat. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 69, p. 1465-1469, 1991.

ROUSH, E.D.; KWATRA, M.M. Human substance P receptor expressed in Chinese hamster ovary cells directly activates G(α q/11), G(α s), G(α o). **FEBS Letters**, v.428,p.291-294,1998.

RUDAYA, A.Y.; STEINER, A.A.; ROBBINS, J.R.; DRAGIC, A.S.; ROMANOVSKY A.A. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.289, p.R1244-52,2005.

SACHAIS, B.S.; SNIDER, R.M.; LOWE, J.A.;KRAUSE, J.E. Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP-96,345. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.2319-2323,1993.

SANTOS, J.M.; TATSUO, M.A.; TURCHETTI-MAIA, R.M.; LISBOA, M.C.; DE FRANCISCHI, J.N. Leukocyte recruitment to peritoneal cavity of rats following formalin injection: role of tachykinin receptors. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.94, p.384-392,2004.

SCAMMELL,T. E.; ELMQUIST, J.K., GRIFFIN, J.D., SAPER, C.B. Ventromedial Preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. **The Journal of Neuroscience**, v.16, p.6246-6254,1996.

SEDGWICK, A.D. ; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of the inflammatory response
SHANAHAN, F. Food allergy: fact, fiction, and fatality. **Gastroenterology**, v.104, p.1229-1231, 1993.

SHAPIRO, L.; ZHANG, X.X.; RUPP, R.G.; WOLFF, S.M.; DINARELLO, C.A. Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p.8614-8618,1993.

SHIBATA, M.;HORI, T.;KIYOHARA, T.;NAKASHIMA, T.;ASAMI,T. Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to substance P and capsaicin. **Neuropharmacology**, v.27, p.143-148, 1988.

SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides**, v.25, p.521-525,2004.

SOARES, D.M.; MACHADO, R.R.; YAMASHIRO, L.H.; MELO, M.C.;SOUZA, G.E. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. **Brain Research**, v.1233, p.79-88,2008.

SOARES, D.M.;FIGUEIREDO, M.J.;MARTINS, J.M.; MACHADO, R.R.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.; PESSINI, A.C.; ROTH, J.; SOUZA, G.E. CCL3/MIP-1 alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. **Brain Research**, v.1260, p.54-60,2009.

SOUZA, G.E.P.; CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.C.; et al. Comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. **Inflammation Research**, v. 51,p. 24–32,2002.

STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Immunology Today**, v.12, p.A7-A12,1991.

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

SUN, J., RAMNATH, R.D., BHATIA, M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. **American Journal of Physiology .Regulatory, Integrative and Comparative**, v.293, p.C696-704,2007.

SUNDGREN-ANDERSSON, A.K.; ÖSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF- α -induced fever. **American Journal of Physiology**, v.275, p.R2028-2034, 1998.

SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M.; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Multiple neural mechanisms of fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinic**, v. 85,p. 78-82,2000.

SZELÉNYI, Z.; SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M. Role of Substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.813, p.316-323,1997.

TAKEDA, Y.; BLOUNT, P.; SACHAIS, B.S.; HERSHEY, A.D.; RADDATZ, R.; KRAUSE, J.E. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic AMP second messenger responses. **Journal of Neurochemistry**, v.59, p.740-745, 1992.

TAKAHASHI, K.; GHATEI, M.A.; JONES, P.M.; MURPHY, J.K.; LAM, H.C.; O'HALLORAN, D.J.; BLOMM, S.R. Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17 (7), p. S101-S103, 1991.

TAVARES, E. & MIÑANO, F.J. RANTES: A new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2505-2513, 2000.

TAVARES, E.; MINANO, F.J. Macrophage inflammatory protein-1beta induces dexamethasone-unresponsive fever in rats. **Neuroreport**, v.9, p.19-22, 1998.

TILDERS, F.J.; DERIJK, R.H.; VAN DAM, A.M.; VINCENT, V.A.; SCHOTANUS, K.; PERSOONS, J.H. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. **Psychoneuroendocrinology**, v.19, p.209-232, 1994.

TOMAKI, M.; ICHINOSE, M.; MIURA, M.; HIRAYAMA, Y.; YAMAUCHI, H.; NAKAJIMA, N.; SHIRATO, K. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.151, p.613-617, 1995.

TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; YOKOTA, Y.; NAKANISHI, S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. **European Journal of Biochemistry**, v.193, p.751-757, 1990.

TULUC, F.; LAI, J.P.; KILPATRICK, L.E.; EVANS, D.L.; DOUGLAS, S.D. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. **Trends in Immunology**, v.30, p.271-276, 2009.

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 E2 receptor subtype EP3. **Nature**, v.395, p.281-284, 1998.

VON EULER, U.S.; GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **Journal of Physiology**, v.72, p.74-87, 1931.

WAN, Y.; FREESWICK, P.D.; KHEMLANI, L.S.; KISPERS, P.H.; WANG, S.C.; SU, G.L.; BILLIAR, T.R. Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. **Infection and immunity**, v.63, p.2345-2342, 1995.

WANG, X.; MARVIZÓN, J.C. Time-course of the internalization and recycling of neurokinin 1 receptors in rat dorsal horn neurons. **Brain Research**, v.944, p.239-247, 2002.

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

WEINSTOCK, J.V.; BLUM, A.; WALDER, J.; WALDER, R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. **Journal of Immunology**, v.141, p.961-966, 1988.

WELCH, W.H. The cartwright lectures on the general pathology of fever. **Medical News**, v. 52, p. 365-568, 1888.

WERNER, M.F.; FRAGA, D.; MELO, M.C.; SOUZA, G.E., ZAMPRONIO, A.R. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflammation Research**, v.52, p.291-296, 2003.

WERNER, M.F.; SOUZA, G.E.; ZAMPRONIO, A.R. Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.543, p.181-189, 2006.

WHITTY, C.J., WALKER, P.D.; GOEBEL, D.J.; POOSCH, M.S.; BANNON, M.J. Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. **Neuroscience**, v.64, p.419-425, 1995.

WOMACK, M.D.; BARRETT-JOLLEY, R. Activation of paraventricular nucleus neurones by the dorsomedial hypothalamus via a tachykinin pathway in rats. **Experimental Physiology**, v.92, p.671-676, 2007.

WOMACK, M.D.; MORRIS, R.; GENT, T.C.; BARRETT-JOLLEY, R. Substance P targets sympathetic control neurons in the paraventricular nucleus. **Circulation Research**, v.100, p.1650-1658, 2007.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor. **Inflammation Research**, v. 49, p. 473–479, 2000.

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **American Journal of Physiology**, v. 266, p.R1670–R1674, 1994.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.; SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v.3, p.365-373, 1994b.

ZAMPRONIO, A.R.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; PELÁ, I.R.; SOUZA, G.E. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. **American Journal of Physiology**, v.269, p.1469-1474, 1995.

ZEISBERGER, E.; ROTH, J. Tolerance to pyrogens. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v.856, p.116-131, 1998.

ZHANG, G.; WANG, L.; LIU, H.; ZHANG, J. Substance P promotes sleep in the ventrolateral preoptic area of rats. **Brain Research**, v.1028, p.225-232, 2004.