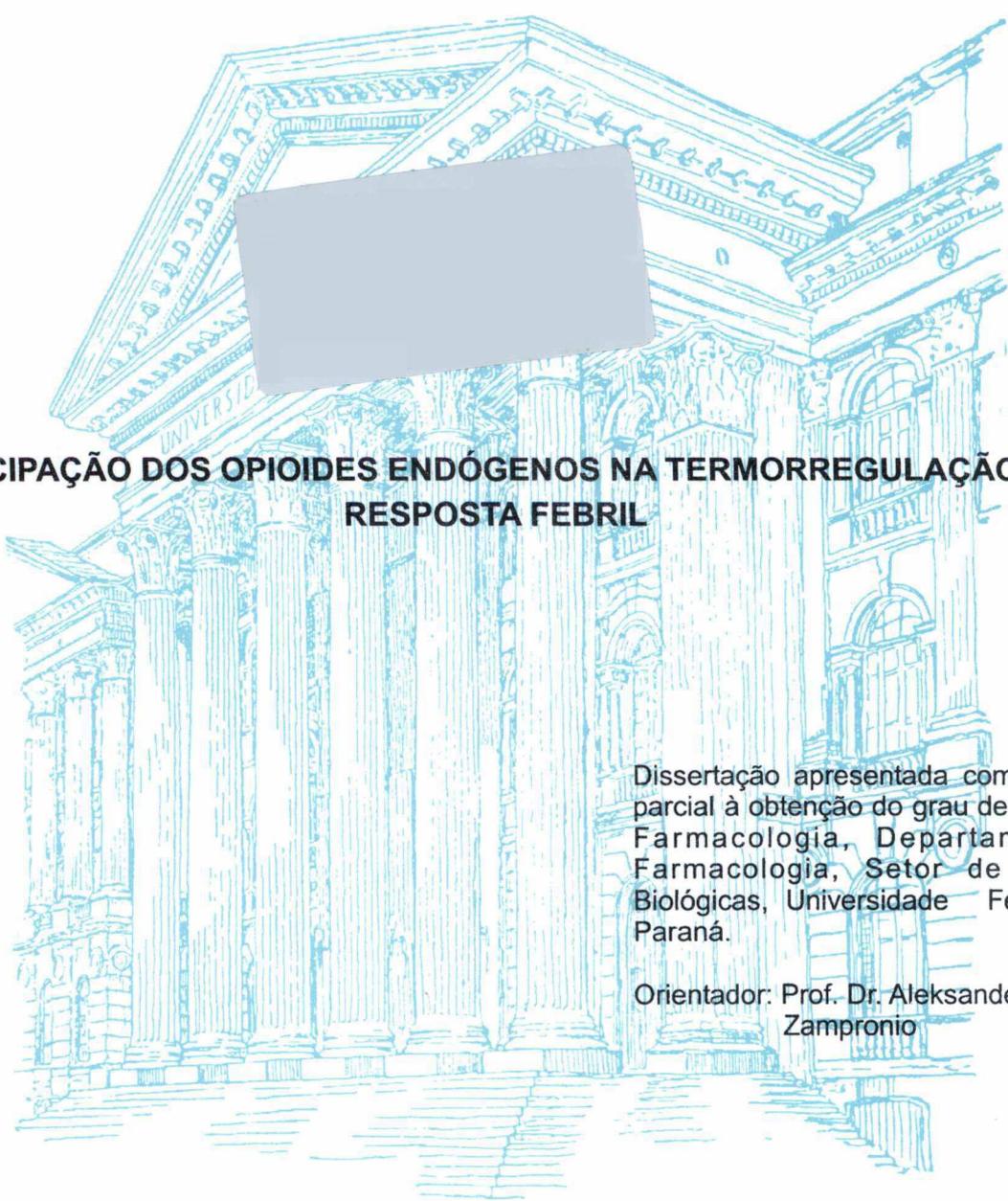


DANIEL FRAGA



**PARTICIPAÇÃO DOS OPIOIDES ENDÓGENOS NA TERMORREGULAÇÃO E NA
RESPOSTA FEBRIL**

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA

2004

DANIEL FRAGA

PARTICIPAÇÃO DOS OPIOIDES ENDÓGENOS NA TERMORREGULAÇÃO E NA
RESPOSTA FEBRIL

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio

CURITIBA

2004



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “**PARTICIPAÇÃO DE OPIÓIDES ENDÓGENOS NA TERMORREGULAÇÃO E NA RESPOSTA FEBRIL**”, de autoria do Pós-Graduando **DANIEL FRAGA**, e composta pelos Professores Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (UFPR); Dra. Glória Emília Petto de Souza (USP), Dr. José Eduardo da Silva Santos (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo coordenador. Em Curitiba, 19 de fevereiro de 2004.



Dr. Aleksander Roberto Zamprônio



Dra. Glória Emília Petto de Souza

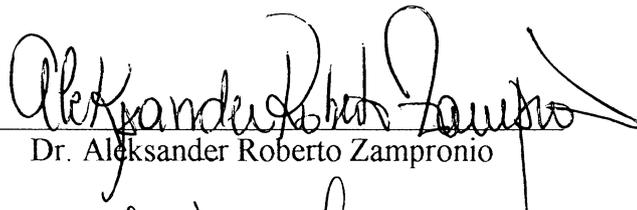


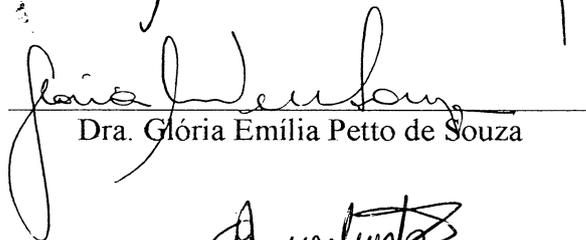
Dr. José Eduardo da Silva Santos



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

2 Aos dezenove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatro, às 14:00 horas, no
3 Anf.07, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a
4 Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria do Pós-Graduando em
5 Farmacologia, **Daniel Fraga**, intitulada: "Participação de Opióides Endógenos na
6 Termorregulação e na Resposta Febril", sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto
7 Zampronio, presidida pelo Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, e composta pelos
8 professores: Dra. Glória Emília Petto de Souza (USP), José Eduardo da Silva Santos
9 (UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco
10 minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze
11 minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada
12 uma das argüições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:
13 aprovado. De acordo com o Regimento Interno do Programa de
14 Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi
15 aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as
16 modificações sugeridas, que serão conferidas pelo coordenador do curso. Nada mais
17 havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata,
18 que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em
19 Curitiba, 19/02/2004.


Dr. Aleksander Roberto Zampronio


Dra. Glória Emília Petto de Souza


Dr. José Eduardo da Silva Santos

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs pelo seu incentivo, esforços e amor que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio, pela amizade, incentivo e pela orientação firme que contribuíram para o meu desenvolvimento científico.

A Prof^a Dr^a Glória Emília Petto de Souza, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto pelo apoio, amizade e colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos pela contribuição na realização dos experimentos de pressão arterial e pelas importantes sugestões.

Agradeço, a minha namorada Claudia pelo seu fundamental apoio, amor e compreensão.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pela contribuição na minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia especialmente a Adriana, Sílvia, Nair e Alessandra pelas importantes contribuições.

Aos funcionários do Biotério em especial ao Candido e Luís pela colaboração.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo tanto nos momentos difíceis como nos alegres.

Agradeço também aos meus amigos do laboratório Márcia, Shirley, Fernanda, Juliana, Renata e Jaime pelo grande apoio, incentivo e amizade.

Aos colegas Renes, Juliana e Miriam do laboratório de febre da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto pela contribuição na realização dos experimentos de variação da temperatura da cauda.

E, a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é a hora de compreender mais e temer menos.”

Marie Curie

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 - A inflamação e a reação de fase aguda.....	2
1.2 - Controle da temperatura corporal e resposta febril.....	3
1.2.1 Citocinas envolvidas na resposta febril.....	5
1.2.2 Tradução da informação periférica para o SNC.....	9
1.2.3 Mediadores centrais da resposta febril	10
1.3 - Participação dos Opióides na Termorregulação e na febre.....	15
1.3.1 – Considerações Gerais	15
1.3.2 Opióides endógenos	16
1.3.3 Opióides e temperatura corporal.....	21
2 - OBJETIVOS	27
2.1 – Objetivo Geral	28
2.2 – Objetivo Específico	28
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 - Animais.....	30
3.2 - Soluções tampões.....	30
3.3 - Reagentes, drogas e doses.....	31
3.4 - Esterilização.....	32
3.5 - Implante de cânulas no ventrículo lateral.....	32
3.6 - Determinação da variação da temperatura corporal.....	33
3.7 - Determinação da temperatura da pele (cauda).....	34
3.8 - Pré-tratamento dos animais com indometacina.....	34
3.9 – Pré-tratamento dos animais com antagonistas opióide	35
3.10 - Preparação do PFPF	35
3.11 - Administração dos estímulos pirogênicos	36

3.12 - Colheita das amostras de CSF para dosagem de PGE ₂	36
3.13 - Imunoensaio enzimático para detecção de PGE ₂	37
3.14 - Análise estatística	38
4 – RESULTADOS	39
4.1 - Efeito da naloxona e do CTAP na resposta febril induzida pelo LPS.	40
4.2 - Efeito da Naloxona, propranolol e CTAP na temperatura corporal.....	43
4.3 - Efeito da nor-BNI e naltrindol na temperatura corporal em animais ambientados na temperatura de 28°C e 20°C.....	48
4.4 - Efeito da administração periférica de morfina na temperatura corporal.....	50
4.5 - Efeito da administração central de morfina na temperatura corporal	52
4.6 - Efeito da tratamento com naloxona e CTAP no aumento da temperatura corporal induzido pela morfina	54
4.7 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida por IL-1 β , TNF- α e IL-6..	58
4.8 - Efeito da indometacina e do CTAP nos níveis de PGE ₂ no CSF induzidos pelo LPS.....	62
4.9 - Efeito do tratamento com indometacina no aumento da temperatura corporal induzido por LPS ou por morfina	65
4.10 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida pelo MIP-1 e PFPF	68
4.11 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida pela PGE ₂ , PGF _{2α} , CRF e ET-1.	71
5 - DISCUSSÃO	76
6 - CONCLUSÕES	91
7 - REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EFEITO DA NALOXONA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS.	41
FIGURA 2: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS.	42
FIGURA 3: EFEITO DA NALOXONA E DO PROPRANOLOL NA TEMPERATURA CORPORAL DE ANIMAIS MANTIDOS À 28 °C.....	44
FIGURA 4: EFEITO DA NALOXONA NA TEMPERATURA CORPORAL DE ANIMAIS AMBIENTADOS À 20 °C.	45
FIGURA 5: EFEITO DO CTAP NA TEMPERATURA CORPORAL DE ANIMAIS MANTIDOS À 28 °C.	46
FIGURA 6: EFEITO DO CTAP NA TEMPERATURA CORPORAL DE ANIMAIS MANTIDOS À 20 °C.	47
FIGURA 7: EFEITO DO NOR-BNI E NALTRINDOL NA TEMPERATURA CORPORAL DE ANIMAIS MANTIDOS À 28 °C (A) ou à 20°C (B).	49
FIGURA 8: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE MORFINA NA TEMPERATURA CORPORAL (A) E NA TEMPERATURA DA PELE (B).....	51
FIGURA 9: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE MORFINA NA TEMPERATURA CORPORAL (A) E NA TEMPERATURA DA PELE (B).....	53
FIGURA 10: EFEITO DO TRATAMENTO COM NALOXONA SOBRE O AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO PELA MORFINA.....	55
FIGURA 11: EFEITO DO TRATAMENTO COM CTAP SOBRE O AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL E DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA DA PELE INDUZIDO PELA MORFINA s.c.	56
FIGURA 12: EFEITO DO TRATAMENTO COM CTAP SOBRE O AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL E DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA DA PELE INDUZIDO PELA MORFINA i.c.v	57
FIGURA 13: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA IL-1 β	59

FIGURA 14: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO TNF- α .	60
FIGURA 15: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA IL-6.	61
FIGURA 16: EFEITO DA INDOMETACINA NOS NÍVEIS DE PGE ₂ NO CSF INDUZIDOS PELO LPS.....	63
FIGURA 17: EFEITO DO CTAP NOS NÍVEIS DE PGE ₂ NO CSF INDUZIDOS PELO LPS.....	64
FIGURA 18: EFEITO DO TRATAMENTO COM INDOMETACINA SOBRE O AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO PELO LPS.	66
FIGURA 19: EFEITO DO TRATAMENTO COM INDOMETACINA SOBRE O AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO PELA MORFINA.....	67
FIGURA 20: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO MIP- 1 α .	69
FIGURA 21: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO PFPF.	70
FIGURA 22: EFEITO DO CTAP NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PGE ₂	72
FIGURA 23: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PGF _{2α}	73
FIGURA 24: EFEITO DO CTAP NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO CRF.	74
FIGURA 25: EFEITO DO CTAP SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR ET-1.	75

LISTA DE SIGLAS

AA- Ácido araquidônico
aa- aminoácido
AcP- proteína acessória
ACTH- hormônio adrenocorticoide
AINE- antiinflamatório não esteroidal
APO/HA- área pré-óptica do hipotálamo anterior
AVP- arginina vasopressina
BHE- barreira hematoencefálica
COX- ciclooxigenases
CRF- fator liberador de corticotrofina
CSF- fluido cérebro espinhal
CTAP- D-Phe-Cys-D-Try-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ cíclico
CVOs- órgãos circunventriculares
ET- endotelina
HPETE- hidroxiperoxieicosatetraenóicos
5-HT- serotonina
i.c.v- intracerebroventricular
IFN- interferon
IL- interleucina
i.p.- intraperitoneal
β-LPH- β-lipotrofina
LPS- lipopolissacarídeo
LT- leucócitos
MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno
MDP- muramildipeptídeo
MIP- proteína inflamatória derivada de macrófagos
α-MSH- hormônio α-melanócito estimulante
Nor-BNI- norbinaltrofimina
OFQ- orfanina FQ
OVLT- órgão vascular da lâmina terminal
PE- pirogênio endógeno
PEx – pirogênio exógeno
PGI₂- prostaciclina
PGs- prostaglandinas
PLC- fosfolipase C
POMC- proopiomelanocortina
PFPF- fator pirogênico pré-formado derivado de macrófago
RANTES – regulado por ativação expresso e secretado por células T normais
RFA- resposta de fase aguda
s.c.- subcutâneo
TNF- fator de necrose tumoral
TXA₂- tromboxano A₂

RESUMO

Há muito tempo se investiga o possível envolvimento dos opióides no controle da temperatura corporal e na resposta febril. Contudo, à luz dos conhecimentos atuais a participação exata dos opióides endógenos nesta resposta ainda não está clara. Por isso este trabalho objetivou avaliar a contribuição dos opióides no controle normal da temperatura corporal, assim como na resposta febril desencadeada tanto pelos mediadores periféricos como pelos mediadores centrais envolvidos neste processo. O pré-tratamento dos animais com o antagonista opióide não seletivo naloxona 0,3 e 1,0 mg/kg via s.c. reduziram em 32,4 e 61,5% a resposta febril induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) respectivamente. Já o tratamento dos animais com o antagonista opióide μ -seletivo CTAP nas doses de 0,1, 0,3 e 1,0 μ g/2 μ l via i.c.v. reduziram em 42,0, 42,0 e 61,2% a resposta febril induzida pelo LPS, respectivamente. No entanto, foi necessário avaliar se os opióides endógenos não estariam envolvidos no controle basal da temperatura corporal. Para tanto, foi avaliado o efeito dos antagonistas opióides na temperatura corporal. O tratamento com a naloxona, em animais mantidos na temperatura de termoneutralidade (28°C) não promoveu alteração da temperatura corporal dos animais, enquanto que, na temperatura de 20°C este antagonista produziu uma pequena, mas significativa redução na temperatura corporal. Por outro lado, o tratamento com CTAP não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal durante todo o experimento, seja ele administrado na temperatura de termoneutralidade ou à 20 °C. O tratamento com o antagonista κ seletivo nor-BNI ou com o antagonista δ seletivo naltrindol em doses equimolares em relação ao CTAP, em animais mantidos na temperatura de termoneutralidade ou a 20°C não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal. Estes dados sugerem que os opióides endógenos não participam do controle da temperatura corporal em condições normais. A administração de morfina, o opióide exógeno protótipo do grupo, promoveu um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente.

Este aumento da temperatura corporal induzido pela morfina não foi modificado pelo pré-tratamento dos animais com o antiinflamatório não esteroide indometacina.

A administração do antagonista opióide não seletivo naloxona e do antagonista opióide μ -seletivo CTAP aboliram o aumento da temperatura corporal induzido por este opióide exógeno. O LPS não induz febre diretamente, mas através da liberação de citocinas e mediadores centrais. O CTAP não modificou a febre induzida pela interleucina (IL)-1 β , reduziu a febre induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF)- α (43,1%) e aboliu a febre induzida pela IL-6, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α e fator pirogênico pré-formado PFPF. Além disso, o CTAP não alterou a febre induzida pela PGE₂, reduziu a febre induzida pela PGF_{2 α} (54,2%, no primeiro pico) e CRF (43,5%) e aboliu a febre induzida pela ET-1. Todos estes dados em conjunto nos permitem concluir que os opióides endógenos parecem não atuar no controle da temperatura corporal em condições basais. No entanto estes peptídeos através da ativação de receptores μ -opióide são importantes mediadores envolvidos no desenvolvimento da resposta febril, assumindo particular importância na resposta febril que independe da síntese de prostanóides. Estes opióides endógenos seriam liberados após a síntese/liberação dos mediadores centrais PGF_{2 α} , CRF e ET-1 possivelmente ou pela ação direta de algumas citocinas como TNF- α , IL-6 e MIP-1 α , mas não de PGE₂.

ABSTRACT

The involvement of opioids in the control of body temperature and in the febrile response has been studied for a long time. Nevertheless, on the light of the present knowledge, the precise participation of the endogenous opioids in this response is still not clear. For this reason, the present work aimed to investigate the contribution of the opioids in the control of normal body temperature, as well as in the febrile response induced by lipopolysaccharide (LPS), cytokines and central mediators of this response in rats. The treatment of the male Wistar rats with the non-selective opioid antagonist naloxone 0.3 and 1.0 mg/kg s.c. reduced 32,4 and 61,6% the febrile response induced by LPS, respectively. Similarly, the treatment of the animals with the μ -selective opioid antagonist CTAP i.c.v. (0.1, 0.3 and 1.0 μ g/2 μ l) reduced 42,0, 42,0 and 61,2% the febrile response induced by LPS, respectively. We also evaluated the involvement of endogenous opioids in the basal control of body temperature. In animals kept in the thermoneutral zone (28°C), naloxone did not modify the body temperature, although in a lower ambient temperature (20°C) this antagonist produced a small, but significant reduction in the body temperature. On the other hand, the treatment with CTAP did not modify the body temperature of the animals during all the experiment either in thermoneutral zone or at 20°C. The treatment of the animals with equimolar doses of the κ -opioid selective antagonist nor-BNI or with the δ -opioid selective antagonist naltrindole kept in the thermoneutral zone or at 20°C also did not modify the body temperature. These results suggest that, despite their involvement on the febrile response, endogenous opioids are not involved in the normal control of body temperature. The administration of morphine, the exogenous opioid prototype of this group, produced a dose-dependent elevation of body temperature which was abolished by naloxone and CTAP. It is widely known that LPS does not induce fever directly, but through the release of cytokines and central mediators. CTAP did not modify the fever induced by interleukin (IL)-1 β , reduced the fever induced by tumor necrosis factor (TNF)- α and abolish the fever induced by IL-6, inflammatory macrophage protein (MIP)-1 α and pre-formed pyrogenic factor (PFPF).

Besides, CTAP did not modified the fever induced by PGE₂, reduced the fever induced by PGF_{2α} (54,2 %, in the first rise) and CRF (43,5%) and abolish the fever induced by ET-1. The increase in the body temperature induced by morphine was also not modified by the pre-treatment of the animals with the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin. All together these results suggest that endogenous opioids are not involved in the control of normal body temperature. However, these peptides, through the activation of the μ-opioid receptor, are important mediators involved in the development of febrile response, with particular importance in the febrile response of the mediators which induce fever by prostaglandin-independent mechanisms. This endogenous opioids appear to be released after the synthesis/release of the central mediators PGF_{2α}, CRF and ET-1, or by the direct action of some cytokines such as TNF-α, IL-6 and MIP-1α but not by PGE₂.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A inflamação e a reação de fase aguda.

Do princípio ao fim de sua existência, os seres vivos são submetidos a diferentes agentes agressores que podem ter origem física, química e/ou microbiana, e que são potencialmente fatais se não forem combatidos. No entanto, os organismos são dotados de complexos e eficientes sistemas de defesa que permitem combater a maioria destes agentes agressores.

Dentre estes sistemas, a reação inflamatória aguda tem papel crucial. Ela tem por finalidade restaurar a homeostasia do tecido injuriado atuando através da diluição, destruição ou isolamento dos agentes agressores (revisado por GALLIN et al., 1992; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). No entanto, a magnitude desta resposta pode ser tal, que os mediadores liberados alcançam a circulação sangüínea desencadeando um sistema complexo de reações organizadas que são coletivamente chamadas de resposta de fase aguda (RFA). Esta resposta é caracterizada por sinais e sintomas como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, alteração nas concentrações plasmáticas de metais como ferro, zinco e cobre (STADNYK e GAULDIE, 1991).

Esta resposta é iniciada e mediada por um grande número de proteínas solúveis que regulam o sistema imune designadas citocinas inflamatórias. Estas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares como polimorfonucleares, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, células da glia dentre outras (revisado por ZEISBERGER, 1999). Estas citocinas podem ser divididas em mediadores pró-inflamatórios, que são responsáveis por desencadear e direcionar o processo inflamatório. Dentre os mediadores pró-inflamatórios enquadram-se a interleucina (IL)- 1α e β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6, IL-8 e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 dentre outras.

Além dos mediadores pró-inflamatórios, existem também mediadores anti-inflamatórios, que são representados pela IL-10 e os glicocorticóides que conferem proteção contra uma reação exagerada, bem como promovem a finalização do processo inflamatório (KUBES, 1993).

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

1.2 Controle da temperatura corporal e resposta febril

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

De modo geral acredita-se que a temperatura corporal seja regulada por uma ativa rede neuronal situada no sistema nervoso central, que exerce seus efeitos sobre os sistemas controladores da temperatura presente por todo o corpo (ADLER et al., 1988). Muitas evidências sugerem que o local de controle termorregulatório primário nos mamíferos, que são homeotérmicos, seja a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA) a qual receberia as informações aferentes dos neurônios sensoriais de frio e de calor provenientes tanto da periferia do corpo como dos órgãos internos. No entanto, existem outros locais do cérebro, medula espinhal e periferia que também são de grande importância. Por exemplo, existem estruturas termossensíveis e termorregulatórias localizada no septo, hipotálamo posterior, medula e na parede abdominal (BLIGH, 1973; MORGANE et al., 1980; NECKER, 1984).

A integração central e periférica da informação térmica resulta em uma apropriada resposta termorregulatória necessária para a manutenção da temperatura corporal em níveis normais.

Enquanto os seres homeotérmicos mantêm sua temperatura interna constante pelo balanço entre a produção e a perda de calor através da ativação do sistema nervoso autônomo assim como por alterações comportamentais, os seres heterotérmicos não possuem tais sistemas de controle, mas utilizam alterações comportamentais tais como a procura por outros ambientes com temperaturas mais adequadas para assim regularem a sua temperatura corporal (ADLER et al., 1988). Neste contexto, particularmente para os animais homeotérmicos, surge o conceito de ponto de regulação (*set point*). O modelo do ponto de regulação pode ser descrito

simplificadamente como a regulação da temperatura corporal dentro dos níveis determinados pela APO/HA. Este ponto de regulação da temperatura corporal relativamente constante, pode ser alterado em algumas situações patológicas, principalmente nas de origem microbiana, como as causadas por vírus e bactérias onde o indivíduo apresenta um aumento da temperatura corporal conhecido como febre (DINARELLO, 1997). Assim, a febre consiste na elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico (DINARELLO et al., 1988). A elevação do ponto termorregulatório desencadeia a inibição de mecanismos de perda de calor (vasodilatação periférica, sudorese e redução da secreção de hormônios tiroidianos e adrenais) e ativação de mecanismos de produção e retenção de calor (vasoconstrição periférica, termogênese induzida por tremores e aumento da taxa metabólica no tecido adiposo marrom) (DINARELLO et al., 1988; KLUGER, 1991; BOULANT, 2000).

No entanto, qual seria o benefício para o organismo deste desagradável aumento controlado da temperatura corporal? Tem sido demonstrado que o aumento da temperatura corporal traz benefícios nas situações de infecção. Há um aumento na capacidade de fagocitose pelos glóbulos brancos, na migração de neutrófilos, na proliferação de células T e na produção de radicais livres de O₂, além de haver uma redução na proliferação de alguns agentes infectantes (BLATTEIS, 1998).

Na década de 60, ATKINS propôs que diferentes substâncias exógenas provenientes de vírus, bactérias ou fungos seriam capazes de induzir resposta febril (por isso foram chamados pirogênios exógenos PEx) além de produzirem também outros sinais e sintomas da inflamação. Estes PEx entrariam então em contato com células fagocíticas que, por sua vez, produziriam e liberariam mediadores endógenos da resposta febril, sendo estes designados pirogênios endógenos (PE).

Sendo assim, para estudar a resposta febril em laboratório, algumas estratégias são adotadas para mimetizar em animais o que ocorre em um organismo infectado por um agente agressor. Sabe-se em particular que as infecções com bactérias GRAM-negativas resultam na liberação de complexos lipopolissacarídeos (LPS), um potente pirogênio da parede celular destas bactérias, que pode ser fagocitado por leucócitos, especialmente macrófagos os quais por sua vez passam a sintetizar e liberar citocinas,

os PE descritos por ATKINS (1960). Algumas destas citocinas são ativadores endógenos do processo de elevação do termostato hipotalâmico (DINARELLO et al., 1999). Outra substância menos freqüentemente utilizada para induzir febre é o muramil-dipeptídeo (MDP), uma estrutura imunoadjuvante da parede de peptidoglicanos de bactérias GRAM-positivas. Ele apresenta muitos dos efeitos biológicos do LPS, porém é menos potente que este (ZEISBERGER e ROTH, 1998).

De modo geral, o LPS tem sido empregado como desencadeador da resposta febril na maioria dos estudos experimentais pois seus efeitos são mais uniformes do que os obtidos com bactérias vivas ou mortas e porque ele é comercialmente disponível em forma altamente purificada (ZEISBERER, 1999).

1.2.1 Citocinas envolvidas na resposta febril

O termo citocina é usado como nome genérico para um vasto grupo de proteínas solúveis as quais atuam como moduladores humorais das funções de células individuais e de tecidos (THOMSON, 1994; IBELGAUFTS, 1995). Seu peso molecular pode variar entre 8 e 26 kDa e podem ser produzidas por uma grande variedade de tipos celulares.

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

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

Dentre as citocinas que participam da resposta febril pode-se destacar: interleucina (IL)-1 (α e β) (DINARELLO, 1984), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DINARELLO et al., 1986); IL-6 (HELLE et al., 1988), IL-8 (ROTHWELL et al., 1990; ZAMPRONIO et al., 1994a) e IL-11 (LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994); *interferon* (IFN) α , β e γ (DINARELLO et al., 1984; DINARELLO et al., 1988); proteína inflamatória

derivada de macrófagos-1 (MIP-1; DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990), fator neurotrófico ciliar (SHAPIRO et al., 1993) e RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted) (TAVARES & MIÑANO, 2000).

Neste contexto, certamente a que é mais estudada e que por isso apresenta maior número de detalhes sobre o seu mecanismo de ação é a IL-1. A IL-1 existe na forma de três proteínas relacionadas IL-1 α , IL-1 β e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) as quais são produtos de três genes distintos (ROTHWELL et al., 2000). A IL-1 α e a IL-1 β atuam como agonistas, e suas ações ocorrem pela ligação a um receptor de superfície celular de 80 kDa, o IL-1RI, que necessita da associação de uma proteína acessória (AcP) para a transdução de sua resposta (SIMS et al., 1988; GREENFEDER et al., 1995).

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

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

Quanto à participação da IL-1 na resposta febril, tem sido sugerido que especificamente a IL-1 β constitui o principal mediador da resposta febril (LONG et al., 1990; ROTHWELL, 1991). Esta citocina, natural ou recombinante, induz febre em diferentes espécies animais seja ela administrada no SNC ou periféricamente (DINARELLO et al., 1984; FARRAR et al., 1987; LONG et al., 1990). Outra observação importante é que camundongos deficientes em IL-1 β apresentam resposta febril reduzida após a administração periférica (intraperitoneal i.p.) de LPS em relação aos

não deficientes (KOZAK, et al., 1995). Além disso, o pré-tratamento de animais com o anti-soro anti-IL-1 β ou com o IL-1ra, inibiu a febre induzida por injeções periféricas de LPS e IL-6, sugerindo sua participação nas respostas febris induzidas por estes pirogênicos (LeMAY et al., 1990; LUHESHI et al., 1996). Foi constatado ainda, que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de LPS, promove um aumento da expressão de mRNA para IL-1 β , IL-1RI e para a AcP no hipotálamo de ratos (ILYIN, et al., 1998).

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

De maneira geral, os efeitos do TNF- α no organismo podem envolver a ativação de 2 tipos de receptores, denominados p55 e p75. Além disso, foi verificada a presença de mRNA constitutivo para o receptor p55 em várias regiões do SNC, o que não ocorre para o receptor p75. No entanto, estímulos imunogênicos promoveram o aumento da expressão para ambos os receptores no SNC. Em relação a resposta febril, estudos apontam um envolvimento maior do receptor p55 do que do receptor p75. (BENIGNI et al., 1996; NADAU et al., 1999; SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998).

Embora a injeção sistêmica de LPS tenha aumentado os níveis circulantes de TNF em animais experimentais, não houve uma correlação satisfatória entre o aumento da temperatura corporal e as concentrações plasmáticas dessa citocina, o que tem levado alguns autores a questionarem sua importância para o desenvolvimento da febre (STEFFERL et al., 1996).

A IL-6 é uma citocina produzida em grandes quantidades após a administração de PEx e é potente indutora de febre quando administrada no SNC de ratos (SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998; CARTMELL et al., 2000). Os níveis desta citocina no fluido cérebro espinhal (CSF) estão de acordo com o desenvolvimento da febre em animais experimentais (HOUSSIAU et al., 1988; LeMAY et al., 1990; ROTH et al., 1993). Além disso, a administração de LPS e IL-1 β promovem um aumento nos

níveis de IL-6 no CSF, e a imuneutralização da IL-6 diminuiu a febre induzida por estes mediadores (LeMAY et al., 1990; ROTHWELL et al., 1991).

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

Já os interferons (IFN)- α , β e γ são citocinas produzidas em especial em infecções por diferentes vírus (LIEBERMAN et al., 1989). Os IFN- α , - β e - γ são capazes de induzir febre com potência variada em diferentes espécies animais e em humanos (revisado por KLUGER, 1991). No entanto, os estudos relacionados ao envolvimento dos IFN na resposta febril são mais escassos. Assim como para as outras citocinas, já foi observada a expressão de receptores para o IFN- γ no SNC de ratos (VILKMAN et al., 1998). O IFN- γ pode induzir outras citocinas pirogênicas, tais como TNF- α e IL-1 β o que sugere que sua ação possa ser, pelo menos parcialmente, indireta (ALOISI et al., 1999).

A IL-8 e o MIP-1 pertencem a um grupo de citocinas com atividade quimiotática, denominadas quimiocinas. Elas podem ser produzidas e secretadas por vários tipos celulares, tendo efeito regulatório sobre a migração leucocitária (LUSTER, 1998). Já foram definidas quatro classes de quimiocinas, de acordo com o número e posição dos resíduos de cisteína. As duas famílias principais são as α e β quimiocinas (BAGGIOLINI e cols., 1994). A IL-8 pertence a classe das α quimiocinas e o MIP-1 à das β quimiocinas (HORUK, 1994)

A administração central de IL-8, MIP-1 α ou MIP-1 β induzem febre em ratos (ROTHWELL et al, 1990; ZAMPRONIO et al., 1994a; MYERS et al., 1993; MINÃÑO et al., 1996; BAJETTO et al., 1999). As quimiocinas produzem seus efeitos biológicos por interagirem com receptores específicos acoplados à proteína G na superfície celular das respectivas células alvo (SCHALL, 1991).

Recentemente, foi identificado mais um mediador que atua na resposta febril. ZAMPRONIO e cols., (1994; 2000) demonstraram que macrófagos estimulados *in vitro* com LPS por um curto período de tempo promovem a liberação de um fator que

quando administrado em ratos induz vários fenômenos da RFA, dentre eles a resposta febril.

Este mediador foi denominado fator pirogênico pré-formado em macrófagos (PFPF) porque ao contrário do que ocorre com as demais citocinas já conhecidas, este fator parece encontrar-se pré-formado nos macrófagos, pois o tratamento destes macrófagos com dexametasona ou cicloheximida drogas que atuam inibindo a síntese protéica, não inibiram a liberação deste fator (ZAMPRONIO et al., 1994).

Além destas citocinas outras também apresentaram atividade pirogênica quando administradas em animais experimentais (IL-11 e RANTES) (LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994; TAVARES & MIÑANO, 2000). No entanto, pouco se sabe a respeito de sua participação no desencadeamento da resposta febril.

1.2.2 Tradução da informação periférica para o SNC:

Uma vez produzidas estas citocinas devem traduzir a sua informação em um sinal neural para que ocorra uma alteração no ponto de termorregulação localizado na área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA). O aumento no ponto de regulação hipotalâmico pelas citocinas está associado à síntese de prostaglandinas (PGs), fator liberador de corticotrofina (CRF) e endotelina (ET)-1 no SNC (DINARELLO, 1991, ROTHWELL, 1991; FABRICIO, 1998).

Embora o mecanismo pelo qual estas citocinas alcançam o SNC não esteja totalmente elucidado, existem várias hipóteses que tentam explicar como ocorre esta comunicação.

As citocinas circulantes são proteínas com peso molecular variando de 8 a 26 kDa, razão esta que as impede de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) (BANKS et al., 1991). No entanto, o SNC possui áreas específicas denominadas órgãos circunventriculares (CVOs), as quais apresentam capilares fenestrados e são portanto, desprovidas de BHE (BROADWELL et al, 1976). Uma das hipóteses, é a de que as citocinas poderiam entrar no SNC via CVOs particularmente através do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), visto que a destruição da OVLT por lesões

eletrolíticas reduz a resposta febril induzida por IL-1 β e TNF- α (BLATTEIS et al., 1983; HASHIMOTO et al., 1994).

A segunda hipótese, proposta por BANKS et al. (1991), considera que citocinas hidrofílicas podem entrar no cérebro através da BHE, mediadas por um sistema específico de transporte saturável, realizado por carreadores específicos.

É possível ainda que as citocinas atuem nas células endoteliais do SNC estimulando a produção dos mediadores lipofílicos responsáveis pelas alterações no termostato hipotalâmico. Dentre estes mediadores estariam as prostaglandinas (PGs) que serão discutidas mais adiante (CAO et al., 1999).

Nos últimos anos, tem sido investigada, ainda, a participação de nervos aferentes periféricos na comunicação entre elementos do sistema mononuclear fagocítico na resposta inflamatória e da RFA periférica, e do hipotálamo. Estes estudos têm levantando a hipótese de que o transporte de sinais inflamatórios da periferia para o SNC, induzindo febre durante a reação inflamatória não se deve exclusivamente à mecanismos humorais (ROTH, 1999). A vagotomia subdiafragmática tem sido eficiente em inibir respostas controladas pelo cérebro, incluindo a febre, induzida pela administração periférica de LPS ou PE (WATKINS et al., 1995a, WERNER et al., 2003), a indução de RNAm para IL-1 β no cérebro (LAYÉ et al., 1995), a hiperalgesia (WATKINS, 1994) e a ativação do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) (FLESHNER et al., 1995).

1.2.3 Mediadores centrais da resposta febril

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

Os mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e LPS, podem promover uma rápida liberação de ácido araquidônico (AA) que se encontra

esterificado na membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A₂ (DINARELLO, 1991). Após a liberação do AA este lipídio pode ser metabolizado principalmente por duas classes de enzimas, sendo elas as enzimas lipoxigenases ou ciclooxigenases (COX).

As lipoxigenases são uma família de enzimas que catalisam a oxigenação do AA em hidroperóxidos lipídicos denominados hidroxiperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Os HPETE são metabólitos instáveis, metabolizados por várias enzimas. A 5-lipoxigenase, é considerada uma das principais enzimas de metabolização do AA, pois é ela que possibilita a formação dos leucotrienos (LT) (SAMUELSSON et al., 1987). Os LT parecem não estar envolvidos na indução da resposta febril, já que a injeção de LTB₄, LTD₄ e LTE₄ i.c.v. ou na área pré-óptica do hipotálamo de ratos não promoveu aumento na temperatura retal destes animais (O'ROURKE e RUDE, 1984). HYNES et al., (1991) demonstram que a injeção i.v. ou i.c.v. de LPS ou i.v. de IL-1 β em doses superiores as que induzem febre não tiveram qualquer efeito nos níveis de leucotrienos no CSF, tanto na presença como na ausência de indometacina.

Por outro lado, as enzimas COX oxidam o AA, gerando endoperóxidos cíclicos instáveis os quais são designados prostaglandinas (PG)G₂ e PGH₂. Após formada a PGH₂, através da ação de isomerasas teciduais específicas, esta é convertida em PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , ou em prostaciclina (PGI₂) pela ação da sintase da prostaciclina, ou ainda em tromboxano A₂ (TxA₂) gerado pela sintase do tromboxano (VANE & BOTTING, 1992; O'NEILL & FORD-HUCTEMPERATURA CORPORALHINSON, 1993; O'BANION, 1999).

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

Já a isoforma COX-2 tem sua expressão seletivamente aumentada no cérebro após estímulos inflamatórios, como LPS, IL-1 α e β e TNF- α . (KÖMHOFF et al., 1997; MAJERUS, 1998; CAO et al., 1997).

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

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

Posteriormente, diversos estudos confirmaram estes achados, utilizando particularmente ratos e camundongos (revisado por KLUGER, 1991)

A PGE₂, quando administrada pela via i.c.v., induz febre por atuar em neurônios sensíveis a variações de temperatura no hipotálamo, estimulando diretamente a termogênese (MURAKAMI e WATANABE, 1989. DINARELLO, 1991). A PGE₂ pode atuar através da ativação de quatro subtipos de receptores da série-E para prostaglandinas sendo eles: EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (COLEMAN et al., 1994; USHIKUBI et al., 1995). Dentre estes quatro, os receptores EP₁, EP₃ e EP₄ são expressos na APO/HA (OKA et al., 2000) e parecem ser importantes para o desenvolvimento da resposta febril. Foi observado que a administração i.c.v. de PGE₂ ou i.v. de IL-1 β ou LPS não foi capaz de induzir febre em camundongos *knockout* para o subtipo EP₃, indicando que este receptor seria importante na gênese da febre (USHIKUBI et al., 1998). OKA et al., (2000) observaram que a administração i.v. de LPS em ratos promoveu um aumento na expressão dos receptores EP₄ no SNC e sugeriram ainda que este receptor estaria envolvido no desenvolvimento da primeira hora da resposta

febril induzida por esta toxina. Posteriormente estes mesmos pesquisadores observaram que camundongos *knockout* para os receptores EP₁, também não desenvolviam resposta febril após tratados com LPS (OKA et al., 2003).

No entanto, não é somente a PGE₂ que está envolvida na febre. A PGF_{2α} é outro eicosanóide derivado do AA que parece ter participação efetiva como um dos indutores da resposta febril. Essa PG também induz aumento da temperatura corporal de ratos e coelhos quando administrada via i.c.v.. (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990) ocorrendo aumento nas concentrações dessa PG no fluido cerebrospinal de ratos após injeção periférica de endotoxina (COELHO et al., 1995). Infelizmente não existem estudos que avaliem a presença de receptores no SNC para a PGF_{2α} e nem estudos com animais *knockout* para receptores de PGF_{2α}.

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

Embora a participação de PGs na resposta febril esteja bem documentada, existem evidências de que algumas citocinas induzem resposta febril em ratos por mecanismos independentes da síntese e liberação de PGs. A febre induzida por MIP-1 não foi modificada pelo tratamento dos animais com ibuprofeno ou indometacina (DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990) e a febre induzida por IL-8 não foi reduzida pelo tratamento dos animais com indometacina (ZAMPRONIO et al., 1994).

Além das PGs vários peptídeos, quando administrados no SNC de animais experimentais, são capazes de induzir um aumento na temperatura corporal. Dentre eles o que tem sido mais extensamente estudado é fator liberador de corticotrofina (CRF)

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

Sabe-se que a administração intracerebral de CRF modifica a liberação de insulina e glucagon, inibe a ingestão de alimentos, aumenta a atividade simpática. Além

disso, quando administrado em pequenas quantidades por via i.c.v. em ratos este peptídeo promove um grande e rápido aumento da taxa metabólica, e estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom, o que eleva a temperatura corporal destes animais (BROWN et al., 1982; LeFEUVRE et al., 1987; DIAMANT et al., 1991).

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

Como a febre causada pela PGF_{2 α} é inibida pelo antagonista de CRF (α -helical CRF₉₋₄₁), 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, 1990). Aparentemente, o efeito pirogênico da IL-8, que como citado anteriormente é independente da síntese de PGs, também seja mediado pelo CRF, já que a resposta febril induzida por essa citocina foi inibida pelo antagonista de CRF (ZAMPRONIO et al., 1994).

Outro peptídeo composto por 21 aminoácidos que tem sua expressão aumentada por LPS e por diferentes citocinas (IL-1 e TNF- α) é a endotelina (ET) (EHRENREICH et al., 1990, CORDER et al., 1995; MARSDEN et al., 1992). Este peptídeo possui ação vasoconstritora potente e participa de vários eventos inflamatórios (EHRENREICH et al., 1990; RAE & HENRIQUES, 1998).

Foi demonstrado também, que a administração i.v. deste peptídeo é capaz de promover um aumento dose dependente da temperatura corporal de coelhos (KOSHI et al., 1992) e em um estudo mais recente, FABRÍCIO e cols., (1998) demonstraram que a ET-1, quando administrada i.c.v., também é capaz de induzir um aumento da temperatura corporal de ratos. Estes últimos pesquisadores observaram que o antagonista inespecífico de receptores de ET, bosentan foi capaz de reduzir a resposta febril do LPS em ratos (FABRÍCIO et al., 1998). Além disso, existem evidências de que o receptor envolvido na resposta febril mediada pela ET-1 corresponde ao tipo ET_B, já que a febre induzida pela injeção central de ET-1 e de LPS i.v., foram inibidas pelo

antagonista específico dos receptores ET_B BQ 788, mas não foram modificadas pelo tratamento com o antagonista seletivo ET_A, BQ 123 (FABRÍCIO et al., 1998).

Quanto a 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 & SOUZA, 2000). FABRÍCIO & SOUZA (2000) sugeriram assim, 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 PE intermediário. O PFPF, por sua vez estimularia a liberação central de CRH e este finalmente levaria a síntese/liberação de ET-1, independente de PGs e das demais citocinas conhecidas (FABRÍCIO & SOUZA, 2000).

Pelos dados supracitados, pode-se dizer que as substâncias envolvidas na gênese da febre podem atuar por quatro vias diferentes, sendo elas: uma primeira via dependente apenas de PGs (IL-1 α e TNF- α); uma segunda dependente de PGs e fator liberador de CRF (IL-1 β e IL-6); uma terceira dependente apenas de CRF (IL-8) e a quarta que depende de endotelina e CRF (PFPF).

1.3 - Participação dos Opióides na Termorregulação e na Febre

1.3.1 – Considerações gerais:

O ópio que é obtido do suco (*opium* = suco) da papoula *Papaver somniferum* é composto por mais de 20 alcalóides distintos. Os primeiros relatos da utilização do ópio com finalidades recreacionais e pelos seus efeitos medicinais datam de aproximadamente 4.000 a.C. No entanto, somente no início do século XIX Sertürner foi capaz de isolar uma substância pura do suco da papoula, a qual chamou de morfina em homenagem a Morfeu, o deus grego dos sonhos.

A morfina é até hoje uma droga muito utilizada para o alívio da dor. Contudo, os opióides apresentam ainda uma notável variedade de efeitos. Dentre eles podemos destacar seu efeito antitussígeno, depressor respiratório e diminuidor da motilidade do

trato gastrointestinal (BROWSTEIN 1993; FOLEY 1993). Além destes efeitos já bem documentados dos opióides, algumas evidências têm sugerido que eles estariam envolvidos também na resposta febril (ADLER et al., 1988, BLATTEIS et al, 1991).

O que é mais intrigante a respeito do sistema opióide (seus receptores e ligantes), é que, apesar do conhecimento do efeito e do uso dos opióides datarem de séculos antes de Cristo, os mecanismos de ação destas substâncias, ainda hoje não estão totalmente elucidados, e provavelmente o entendimento completo e exato de seu funcionamento ainda exigirá muitos esforços.

Isso ocorre provavelmente porque as interações no sistema opióide, tanto nas interações ligante receptor como nas receptor/receptor sejam surpreendentemente complexas como será descrito no decorrer deste texto.

1.3.2 Opióides endógenos:

Até os primeiros anos da década de 70 a existência do sistema opióide endógeno era totalmente desconhecido. A primeira evidência fisiológica sugerindo a existência de um sistema opióide endógeno, foi obtida pela demonstração de que a analgesia provocada pela estimulação elétrica de determinadas regiões cerebrais era revertida pela naloxona, um antagonista opióide não seletivo (AKIL et al., 1972; AKIL et al., 1976).

Em 1975, HUGHES e colaboradores identificaram um fator endógeno semelhante aos opiáceos, que denominaram encefalina (derivado do encéfalo). Posteriormente, foram identificadas duas classes de peptídeos opióides endógenos adicionais, designadas endorfinas e dinorfinas (LI et al., 1976; GOLDSTEIN et al., 1979). Os opióides endógenos são proteínas de baixo peso molecular que estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central. Dentre os mais de 18 peptídeos opióides endógenos identificados em mamíferos três apresentam maior destaque: endorfina, encefalina e dinorfina. Cada uma provém de um precursor diferente e tem distribuição anatômica característica. Estes precursores são codificados por três genes diferentes e são designados pré-proopiomelanocortina (POMC), pré-proencefalina e

pré-prodinorfina. Cada precursor pode sofrer diferentes clivagens e modificações pós-translacionais complexas, o que dará origem a vários peptídeos ativos.

Os peptídeos opióides clássicos apresentam em comum a seqüência aminoterminal Tyr-Gly-Gly-Phe-(Met ou Leu), conhecida como unidade opióide. Esta molécula é seguida de diferentes extensões C terminais que resultam em peptídeos entre 5 e 31 aminoácidos. O principal peptídeo opióide derivado da POMC é a β -endorfina. Além da β -endorfina a POMC também é processada em peptídeos não opióides como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e no hormônio estimulante de melanócito (α -MSH) e na β -lipotropina (β -LPH). A prodinorfina contém três peptídeos com comprimentos diferentes, todos começam com a seqüência da Leu-encefalina sendo eles: dinorfina A, dinorfina B e neo-endorfina. A proencefalina contém várias cópias da Met-encefalina, além de uma cópia da Leu-encefalina (revisado por AKILL et al., 1998).

Um novo peptídeo opióide endógeno foi clonado em 1995. Este peptídeo tem homologia seqüencial significativa com a dinorfina A, com uma ligeira modificação no núcleo opióide aminoterminal (Phe-Gly-Gly-Phe), sendo esta alteração suficiente para suprimir a ligação deste peptídeo aos três receptores clássicos, que serão descritos posteriormente. Este peptídeo foi chamado de orfanina FQ (OFQ) por um grupo de pesquisadores e de nociceptina por outro sendo então abreviado como N/OFQ (MEUNIER et al., 1995; REINSCHEID et al., 1995).

Algum tempo depois da identificação dos primeiros opióides endógenos, foram identificados seus receptores. Com base em estudos *in vivo* em cães MARTIN et al., (1976) postularam a existência de vários tipos de receptores opióides. A confirmação da existência destes receptores só foi possível através do desenvolvimento na década de 80 de ligantes altamente específicos, que permitiram a marcação tipo-específica dos três receptores opióides clássicos sendo os marcadores: DAMGO ([D-Ala²-MePhe⁴-Gly(ol)⁵]encefalina) para o receptor μ , DPDPE ([D-Pen²-D-Pen⁵]encefalina) para o receptor δ e U-50,488 e U 69,593 para o receptor κ (HANDA et al., 1981; MOSBERG et al., 1983; VOIGHTLANDER et al., 1983). Posteriormente, estudos de clonagem molecular em roedores que confirmaram a existência de três tipos de receptores

opioides μ , κ e δ (CHEN et al., 1993; MENG et al., 1993; EVANS et al., 1992; KIEFFER et al., 1992).

O receptor δ é uma proteína de 372 aminoácidos (aa) que apresenta grande afinidade pelo antagonista δ seletivo naltrindol e baixa afinidade pelo antagonista κ seletivo norbinaltrofimina (nor-BNI), assim como para o naloxone (ZIMMERMAN et al., 1990; LUTZ et al., 1992). O receptor κ é uma proteína de 380 aa, que apresenta uma similaridade de 70% com a seqüência do receptor δ (YASUDA et al., 1993). Já o receptor μ é uma proteína de 392 aa, que apresenta similaridade de 57% e de 68% com os receptores δ e κ , respectivamente (CHEN et al., 1993). Quanto aos seus ligantes endógenos, os receptores opioides δ apresentam grande afinidade pela encefalina, os receptores opioides κ apresentam grande afinidade pela dinorfina e os receptores opioides μ apresentam grande afinidade pela β -endorfina. (GOLDSTEIN et al., 1985; DONNERER et al., 1986). Um quarto receptor opióide conhecido como receptor nociceptina/orfanina (N/ORF), foi clonado em 1994 (BUNZOW et al., 1994; MOLLEREAU et al., 1994). Em 2000 o Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacológica (IUPHAR) adotou os termos MOP, DOP, KOP e NOP para indicar os receptores μ , δ , κ e N/ORF respectivamente. No entanto, como a maioria dos trabalhos ainda adota a terminologia grega para designar estes receptores manteremos esta denominação em nosso texto.

Outro dado interessante a respeito dos receptores opioides e que dificulta o estudo e a compreensão da participação dos opioides nos sistemas biológicos é o de que eles apresentam a peculiaridade de atuar em dímeros e além de formarem homodímeros eles podem ainda formar heterodímeros com os demais receptores opioides. Análogos diméricos da oximorfina e encefalina apresentam maior afinidade e potência em relação aos compostos monoméricos, sugerindo que os receptores μ poderiam funcionar como dímeros (HAZUM et al., 1982). CVEJIC e cols., (1997) demonstraram que os receptores δ também existem como homodímeros.

A morfina, o agonista opióide exógeno protótipo do grupo, é capaz de se ligar aos receptores μ e δ e inibir a liberação de neurotransmissores (MACDONALD et al., 1978; YAKSH, 1993).

Dados mais recentes demonstram que os receptores μ e δ podem formar um heterodímero de 150 kDa, e estes heterodímeros exibem propriedades distintas de ligação e sinalização (GOMES et al., 2000). Estes autores demonstraram que a adição de um agonista ou antagonista seletivo para o receptor δ , deltorfina II e TIPP ψ , respectivamente aumentam a ligação do agonista μ -seletivo DAMGO nos receptores μ , quando os receptores estão na forma de heterodímero. Sendo que o inverso também ocorre (GOMES et al., 2000).

Sabe-se que a ativação dos receptores opióides aumenta o nível de fosforilação da MAP-quinase (MAPK) (TRAPAIDZE et al., 2000). Para verificar se o heterodímero representa um receptor funcional, foi verificada a sua capacidade de fosforilação da MAPK. Tanto a deltorfina como o TIPP ψ aumentaram a potência (aproximadamente 6 e 90 vezes, respectivamente) e a eficácia (2 vezes aproximadamente) do agonista opióide DAMGO em fosforilar a MAPK. O antagonista seletivo dos receptores μ -opióide D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ cíclico (CTAP), também potenciou a sinalização do agonista δ deltorfina II (GOMES et al., 2000).

Além disso, o receptor δ heterodimeriza com o receptor κ e quando estão nesta forma, eles alteram a ligação do ligante e suas propriedades de sinalização (JORDAN et al., 1999). No entanto os receptores μ e κ não são capazes de formar heterodímeros.

Os peptídeos opióides são amplamente distribuídos no SNC e periférico e apresentam grande importância na modulação das funções endócrinas, cardiovascular, gastrointestinal e do sistema imune (SIMON 1991).

Sua ampla distribuição no SNC sugere que eles podem atuar como neurotransmissores e/ou como neuromoduladores. Um exemplo, é o efeito da dinorfina que parece modular os potenciais de ação de longa duração (WEISSKOPF et al., 1993). Opióides podem atuar ainda na pré-sinapse, alterando a liberação de neurotransmissores como o GABA, noradrenalina, dopamina e serotonina (CAPOGNA et al., 1993; NORTH, 1993). Um efeito de inibição μ -específico na liberação do neurotransmissor inibitório GABA, foi observada em cultura de hipocampo de ratos (COPAGNA et al., 1993).

Há muito tempo sabe-se que os opióides endógenos são produzidos no cérebro, Recentemente com o avanço das técnicas de biologia molecular observou-se que

diversas células do sistema imune também podem produzir e liberar estes peptídeos (LINNER et al., 1995; CABOT, 2001).

Tem sido demonstrado que os linfócitos e as células fagocitárias mononucleares apresentam em sua superfície receptores opióides δ (CARR et al., 1988 e 1989), κ (CARR et al., 1989, LAWRENCE et al., 1995; BELKOWSKI et al., 1995) e μ (MAKMAN, 1994, CHUANG et al., 1995). Além de possuírem receptores opióides em sua superfície muitas células do sistema imune são capazes de sintetizar os peptídeos opióides. Diversos grupos têm demonstrado que linfócitos e macrófagos expressam mRNA para β -endorfina e outros derivados da POMC (SMITH et al., 1985; LOLAIT et al., 1986).

Além disso, os opióides endógenos são armazenados em órgãos do sistema imune como baço e timo. As encefalinas, endorfinas e dinorfinas são ainda expressas em grande quantidade no sítio inflamatório (MOUSA et al., 2001a; MOUSA et al., 2001b; CABOT et al., 2001).

É importante ressaltar que várias funções do sistema imune são reguladas pelo sistema opióide, tendo um importante destaque na expressão de citocinas. A expressão de uma determinada citocina pode ser tanto aumentada ou diminuída dependendo do receptor e agonista envolvido no processo. Por exemplo, a expressão da IL-6 é aumentada pela morfina um potente agonista μ e por sua vez, reduzida pelo agonista κ U50,488 (ROGERS et al., 2003).

Os receptores opióides são acoplados as proteínas de ligação do GTP sensível à toxina pertussis, que atuam inibindo a atividade da enzima adenilatociclase diminuindo conseqüentemente a produção de AMP cíclico (HERZ, 1993). Eles podem atuar também, promovendo a ativação das correntes de K^+ ativadas pelo receptor e suprimindo as correntes de Ca^{++} controladas pela voltagem (DUGGAN & NORTH, 1983). No entanto, alguns estudos demonstram que os receptores opióides podem estar acoplados a vários outros sistemas de segundo mensageiros, tais como ao da ativação das MAPK e ao da cascata mediada pela foslipase C (PLC), que resulta na formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol (TRAPAIDZE et al., 2000).

1.3.3 – Opióides e temperatura corporal.

Os dados a respeito dos efeitos dos opióides sobre a temperatura corporal são bastante controversos, provavelmente porque os efeitos biológicos dos opióides dependam de inúmeros fatores tais como: agonista ou antagonista empregados, via de administração, dose, espécie animal, idade, ritmo circadiano, estresse, restrição dos movimentos e temperatura ambiente (ADLER et al., 1988). Além destes fatores deve-se ressaltar que a maioria dos estudos mais antigos com opióides empregavam antagonistas não seletivos e isto talvez seja o fator que mais contribua para a variedade de resultados encontrados na literatura.

Os primeiros relatos do envolvimento dos opióides na regulação da temperatura corporal foram observados com a morfina, um agonista opióide, com efeito predominante sobre receptores μ (GIRNDT, et al., 1931, EDDY et al., 1934, WINTER, et al., 1953, ZIMMERMAN et al., 1990).

A morfina exerce um efeito na temperatura corporal que é espécie específico. A hipotermia é o efeito predominante em cães (WINTER, et al., 1953; MARTIN, 1968), coelhos (GIRNDT, et al., 1931; KO, 1937; SINCLAIR, et al., 1974) e pássaros (ZEEHUISEN, 1895). Por outro lado a hipertermia é o efeito predominante em outras espécies, particularmente nas que apresentam efeito excitatório após a administração da morfina, tais como gatos (CLARK et al., 1978), bovinos e cavalos (KRUEGER et al., 1941). Em outras espécies este opióide exógeno apresenta um efeito dual na temperatura corporal, em doses baixas causa hipertermia e em doses altas promove hipotermia. Este efeito é observado em ratos (WINTER et al., 1953; CHAHOVITH et al., 1926; HERMANN, 1942; GELLER et al., 1983), camundongos (ESTELER et al., 1962; ROSOW et al., 1980), cobaias (KAMDASAMY et al., 1984) e em primatas (EDDY et al., 1934; SPRAGG et al., 1939; HOLTZMANN et al., 1969).

De modo geral a naloxona, um antagonista não seletivo com maior afinidade pelos receptores μ , reverte estes efeitos na temperatura corporal. No entanto o inibidor de COX indometacina não foi capaz de reduzir a hipertermia induzida pela morfina sugerindo que a produção de PGs, não está envolvida na hipertermia induzida por este opióide exógeno (KANDASAMY et al., 1983).

Este tipo de resposta dual não é exclusivo da morfina. Por exemplo, a administração intraventricular de noradrenalina em ratos e serotonina em cães produz hipertermia em doses baixas e hipotermia em doses maiores (FELDEBERG et al., 1967; MYERS, 1968).

A atividade locomotora e outros efeitos comportamentais em camundongos e ratos, após a administração de opióides, apresentam a mesma característica de efeito sendo que ocorre depressão seguida de excitação (MARTIN et al., 1980).

Os efeitos da morfina no aumento da temperatura corporal poderiam então ser devido a um aumento na produção de calor pela atividade muscular. No entanto a hipertermia produzida pela morfina é freqüentemente acompanhada por catalepsia em ratos e a hipotermia é geralmente acompanhada por agitação em camundongos. Desta forma a produção de calor pelo aumento da atividade física parece ser uma explicação insuficiente para as alterações na temperatura corporal (GELLER et al., 1982; LOTTI et al., 1965; SLOAN et al., 1962).

Com o decorrer do tempo, o desenvolvimento científico permitiu avaliar o envolvimento dos opióides na temperatura corporal sob um ângulo diferente, ou seja, utilizando-se de ligantes endógenos.

A β -endorfina, um importante opióide endógeno que apresenta sua maior expressão gênica nos lóbulos neurointermediários da glândula pituitária, enquanto o hipotálamo é a principal fonte de POMC e conseqüentemente de β -endorfina no SNC (CIVELLI et al., 1982). Na pituitária a expressão de mRNA de POMC e peptídeos relacionados, é predominantemente regulada pelos glicocorticóides e CRF. A liberação dos peptídeos produzidos a partir da POMC é estimulada por CRF e inibida pelos glicocorticóides (VALE et al., 1981; YASUDA et al., 1978).

A APO/HA, o centro primário de controle da temperatura corporal, possui uma concentração relativamente alta de neurônios que contém β -endorfina (KRIEGER et al., 1979; SNYDER et al., 1979). A estimulação elétrica do hipotálamo *in vitro* resulta em uma grande liberação de β -endorfina e de outros peptídeos (MILLAN et al., 1981). A proximidade anatômica entre neurônios β -endorfinérgicos e termorregulatórios sugerem que a liberação de β -endorfina possivelmente tenha um papel no controle da temperatura corporal. Em adição, a administração de β -endorfina induziu hipertermia

em cobaias, gatos, camundongos e ratos (CLARK et al., 1981; KANDASAMY et al., 1984; HUIDOBRO-TORO et al., 1979; GORDON et al., 1981; MARTIN et al., 1979). Em coelhos a administração central de β -endorfina e encefalina origina uma série de eventos fisiológicos coordenados que resultam em um aumento dose-dependente da temperatura corporal. Este efeito hipertérmico ocorre devido a uma rápida vasoconstrição periférica, que é indicada pela redução na temperatura da orelha somada a uma inibição da perda de calor por evaporação (KANDASAMY et al., 1983). Contudo não ocorre qualquer alteração na taxa metabólica. O pré-tratamento destes animais com indometacina não foi capaz de reduzir o efeito hipertérmico da β -endorfina. Porém, a administração de naloxona reduziu significativamente este efeito, sugerindo que a produção de PGs não é necessária para a resposta febril deste peptídeo opióide endógeno. (KANDASAMY et al., 1983).

Apenas recentemente foram desenvolvidos agonistas e antagonistas mais seletivos para os receptores opióides. Tais ferramentas farmacológicas possibilitaram um adequado estudo da participação dos opióides em diversos fenômenos biológicos inclusive no controle da temperatura corporal.

Dentre os antagonistas seletivos mais utilizados estão os análogos da somatostatina, como o CTAP, que atua como antagonista seletivo dos receptores μ , um derivado da naloxona, o naltrindol, que atua como antagonista seletivo dos receptores δ e um derivado bivalente da naltrexona, conhecido como binaltorfimina (nor-BNI) que é um antagonista seletivo para os receptores κ (GULYA et al., 1986; PORTOGHESE et al., 1987; PORTOGHESE et al., 1988).

Em geral, os estudos que utilizaram os agonistas e antagonistas seletivos revelaram paralelos significativos entre os receptores μ e δ e contrastes marcantes entre os receptores μ/δ e κ (PASTERNAK, 1993). Contudo é importante ressaltar, que mesmo os fármacos relativamente seletivos quando administrado em doses suficientemente altas podem interagir com outros receptores promovendo alterações em seu perfil farmacológico.

Resultados obtidos por HANDLER et al., (1992) demonstraram que a administração i.c.v. de um agonista altamente seletivo para os receptores μ -opióide, PL-017 promoveu hipertermia em ratos. Esta resposta foi abolida pelo antagonista

seletivo dos receptores μ -opióide CTAP. Isto sugere que os opióides promovem um aumento da temperatura corporal via receptor μ .

Posteriormente, YAKIMOVA et al., (1996), demonstraram que a administração de PL-017 em preparações de hipotálamo causa uma inibição na atividade dos neurônios sensíveis ao calor de forma dose dependente. Por sua vez, o antagonista μ -seletivo CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Phe-Thr-NH₂) (semelhante ao CTAP com apenas uma troca de aminoácido Arg por Orn) foi capaz de bloquear este efeito do PL-017, sem promover qualquer alteração na taxa de disparo destes neurônios por si só, sugerindo que este efeito é mediado especificamente pelos receptores μ -opióides. Estes dados sugerem ainda que os neurônios termossensíveis não estão sobre um controle tônico dos opióides endógenos nas preparações de hipotálamo. Este resultado esta de acordo com os efeitos de aumento de temperatura observados durante a administração do PL-017 *in vivo* (HANDLER et al., 1992), já que uma redução na taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor corresponde a uma diminuição dos mecanismos de perda de calor.

Por outro lado, a administração de agonistas seletivos de receptores κ -opióide como o U-50,488H em ratos, resultou em hipotermia. Esta resposta foi revertida pelo antagonista seletivo deste receptor nor-binaltorfimina (nor-BNI) (HANDLER et al., 1993). Estes dados estão de acordo com estudos prévios nos quais observou-se que a administração do opióide endógeno dinorfina, que apresenta maior afinidade pelo receptor κ , resultou em uma redução dose dependente da temperatura corporal (ADLER et al., 1983). Em conjunto estes dados sugerem que a ativação dos receptores κ estaria envolvida em resposta de perda de calor.

Já a participação dos opióides via receptores δ -opióide na temperatura corporal é controversa. A administração i.c.v. do agonista seletivo dos receptores δ opióide DPDPE em ratos não foi capaz de promover qualquer alteração na temperatura corporal em diferentes temperaturas ambiente (HANDLER et al., 1993). No entanto dados recentes de SALMI e cols. (2003), empregando a deltorfina II outro agonista δ opióide, o qual apresenta maior seletividade e eficácia em ativar estes receptores, promoveu uma resposta bifásica na temperatura corporal de ratos, caracterizada por uma queda inicial da temperatura seguida de uma elevação.

Existem dados bem documentados na literatura que demonstram interações funcionais entre os receptores μ e δ -opióide que seriam responsáveis pelos efeitos bifásicos das deltorfinas na atividade locomotora (TRAYNOR et al., 1993; NEGRI et al., 1996). Esta interação parece ser responsável também pelo efeito bifásico da deltorfina II na resposta febril em ratos, visto que o antagonista δ -opióide é capaz de reverter apenas a hipotermia, mas não a hipertermia induzida por este agonista. Esta segunda fase no entanto, foi reduzida pelo antagonista μ -seletivo β -funaltrexamina (SALMI et al., 2003).

Outro dado relevante que favorece a participação dos opióides endógenos seja no controle da temperatura corporal ou na resposta febril é sugerido por estudos de auto-radiografia envolvendo ligantes com alta seletividade. Estes demonstraram que em ratos, existe uma alta densidade de receptores μ , κ e δ especialmente na APO/HA, estrutura de fundamental importância no controle da temperatura corporal (DESJARDINS et al., 1990).

Todos estes dados em conjunto permitem concluir que, em ratos, de modo geral a ligação dos opióides nos receptores μ está associada com respostas que resultam em ganho de calor, os receptores κ medeiam respostas de perda de calor e a ativação dos receptores δ promoveriam efeitos bifásicos, com uma hipotermia inicial seguida de hipertermia.

Em vista das evidências citadas de que os opióides podem promover alterações na temperatura corporal, tornou-se evidente a importância de entender como estes peptídeos atuam na resposta febril.

Em 1991 BLATTEIS et al., observaram que a naloxona foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS em cobaias. BENAMAR et al., (2000) observaram que o pré-tratamento com CTAP icv promoveu uma redução significativa da resposta febril induzida pelo LPS, sugerindo que os opióides endógenos, atuando nos receptores μ -opióides participariam da resposta febril induzida por este Pex.

Contudo sabe-se que o LPS não age diretamente induzindo febre. Ele atua promovendo a liberação de vários PE que são os responsáveis pelo aumento da temperatura corporal desta toxina bacteriana. Complexas interações entre as citocinas e os opióides ocorrem no sistema nervoso central: se por um lado o efeito das citocinas

no SNC parece ser modulado pelos opióides endógenos (De SERRO e NISTICO, 1990; HORI et al., 1991; XIN e BLATTEIS, 1991) por outro os efeitos neuronais dos opióides são alterados pelas citocinas (AHMED et al., 1985; JEANJEAN et al., 1995).

BLATTEIS et al., (1991), demonstraram que a naloxona administrada s.c é capaz de reduzir a resposta febril induzida pela administração i.v de LPS, IL-6, INF e TNF- α em cobaias.

Interessantemente a naloxona não é capaz de reduzir a resposta febril induzida pela IL-1 em ratos, gatos, coelhos e em cobaias (CLARK et al., 1978; revisado por BLATTEIS et al., 1991). No entanto, a febre induzida por esta citocina foi antagonizada pela administração de naloxona em um estudo em humanos (BLATTEIS et al., 1991).

Além disso, o CTAP foi capaz de reverter a resposta febril induzida pela IL-6, MIP-1 β mas não a da IL-1 β em ratos (BENAMAR et al., 2002; HANDLER et al., 1998).

Sugere-se então, que a ativação de receptores opióides é importante para a efetivação da resposta febril induzida por TNF- α , INF- α , MIP-1 β e IL-6 embora possa não ser para IL-1 β .

Contudo, como descrito anteriormente, estes pirogênios endógenos ainda não são os mediadores finais da resposta febril. Existem outros mediadores centrais que estão envolvidos na efetivação desta resposta sendo eles: PGs, CRF e ET-1.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Há muito tempo se investiga o possível envolvimento dos opióides no controle da temperatura corporal. Contudo, a contribuição exata dos opióides endógenos nesta resposta ainda não está clara.

Muitos dados sugerem que os opióides endógenos estariam envolvidos no desencadeamento da resposta febril induzida por algumas citocinas. Todavia, alguns pontos devem ser considerados: em primeiro lugar para citocinas como o TNF- α estes estudos foram feitos somente com antagonistas não específicos. Em segundo lugar para citocinas como o MIP-1 α e PFPF não existem estudos que esclareçam esta participação. Além disso, as citocinas são os intermediários neste processo de aumento da temperatura corporal durante a resposta febril.

Por isso, objetivamos avaliar a contribuição dos opióides no controle normal da temperatura corporal, assim como na resposta febril desencadeada tanto pelos mediadores periféricos como pelos mediadores centrais envolvidos neste processo.

2.2 - Objetivos específicos:

Avaliar a contribuição dos opióides endógenos na manutenção da temperatura corporal utilizando antagonistas opióide específicos.

Avaliar o efeito da administração do opióide exógeno morfina sobre a temperatura corporal de ratos bem como a participação de receptores μ e de PGs neste efeito.

Avaliar a participação de opióides endógenos, particularmente através de receptores μ , na resposta febril induzida por LPS.

Avaliar a participação de opióides endógenos, particularmente através de receptores μ , na resposta febril induzida por IL-1 β , TNF- α , IL-6, MIP-1 α , PFPF.

Avaliar a participação de opióides endógenos, particularmente através de receptores μ , na resposta febril induzida por PGE₂, PGF_{2 α} , CRF e ET-1.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais.

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os animais foram levados para a sala de ambientação no mínimo 7 dias antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela comissão de ética da UFPR.

3.2 - Soluções tampões.

- Solução de Azul de Pontamida

Azul de Pontamida (Merck).....	1,00	g
Soro fisiológico.....q.s.p.	100,00	mL

- Solução de Pentobarbital sódico

Pentobarbital sódico (Cristália).....	1,00	g
Soro fisiológico.....q.s.p.	40,00	mL

- Solução Tampão Tris – HCl 0,2 N (dissolução da indometacina)

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck).....	24,22	g
Água deionizada.....q.s.p.	1,00	L

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

- Solução tamponada com fosfato (PBS)

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	2,00 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O.....	14,4 g
Água deionizada.....q.s.p.	1,00 L

O pH foi acertado para 7,4 com HCl 1 N, a solução foi autoclavada e depois armazenada a 4°C.

3.3 - Reagentes, drogas e doses.

- Acrílico Autopolimerizante Policron (Dencril Ltda, Brasil);
- CRH₁₋₄₁ - RBI, EUA (dose de 2,5 µg/2µL – i.c.v);
- CTAP – Peninsula Labs, EUA (doses de 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 µg/2µl – i.c.v);
- ET-1 - RBI, EUA (dose de 1 pmol/3µL - i.c.v);
- IL-1β, rr- NIBSC, Inglaterra (dose de 3,12 ng/2µL - i.c.v);
- IL-6, rr- NIBSC, Inglaterra (dose de 300,0 ng/2µL - i.c.v);
- Indometacina – Merck Sharp & Dhome, Alemanha (dose de 2,0 mg/kg – ip);
- Kit de enzima imuno-ensaio para detecção de PGE₂ - Cayman Chemical Company, EUA (lote 15284 B);
- Lipopolissacarídeo *E. coli* 0111:B4 (LPS) - Sigma Chemicals & Co, EUA (dose de 5,0 µg/kg - ip).;
- Líquido Auto Polimerizante Policron (Dencril Ltda, Brasil);
- MIP1-α -rm - R&D; EUA (dose de 500,0 ng/2µL - i.c.v);
- Morfina - Merck Sharp & Dhome, Alemanha (doses de 1,0, 3,0 e 10 mg/kg – s.c)
- Naloxona – Sigma Chemicals & Co, EUA (doses de 0,3, 1,0 e 3,0 mg/kg –s.c)
- Naltrindol - RBI, EUA (dose de 2,45 µg/2µL – i.c.v);
- Nor-BNI - RBI, EUA (dose de 1,5 µg/2µL – i.c.v);

- PFPF- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (dose de 100,0 ng/2 μ L - i.c.v);
- PGE₂ - Sigma Chemicals & Co, EUA (dose de 125,0 ng/2 μ L - i.c.v);
- PGF_{2 α} - Sigma Chemicals & Co, EUA (dose de 500,0 ng/2 μ L - i.c.v);
- Solução de lidocaína injetável com noradrenalina a 2% (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil);
- Solução salina estéril;
- Terramicina® -Pfizer, São Paulo, Brasil (0,2 mL/animal - im);
- TNF- α -rr - NIBSC; Inglaterra (dose de 250,0 ng/2 μ L – i.c.v).
- Tris(hidroximetil)-aminometano – Merck, Alemanha.

3.4 – Esterilização.

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

Quando necessário, as soluções foram preparadas em condições assépticas.

3.5 - Implante de cânulas no ventrículo lateral.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40,0 mg/kg por via intraperitoneal (ip). Após tricotomia e anti-sepsia da pele, a cabeça dos ratos foram imobilizadas em um aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 900-USA). Foi administrado pela via subcutânea cerca de 0,2 mL de uma solução de lidocaína a 2,0% com noradrenalina na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro na pele, para a exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo, inibindo o estímulo doloroso e diminuindo o sangramento.

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

As cânulas esterilizadas, constituídas de um segmento de agulhas hipodérmicas BD, com 10,0 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foram conectadas ao estereotáxico e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no atlas de PAXINOS & WATSON (1986).

Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando uma prótese de acrílico auto-polimerizável com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana. Ao final da cirurgia, os ratos receberam injeção intramuscular (im) de terramicina para uso veterinário (0,2 mL/animal). Os experimentos foram conduzidos 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais.

A fim de verificarmos a posição da injeção, após o término dos experimentos de avaliação da resposta febril, os animais foram anestesiados com éter e receberam 3,0 μ l de corante azul de pontamida no local correspondente à microinjeção. Em seguida, os ratos foram decaptados e os encéfalos extraídos, cortando-se transversalmente a região correspondente a localização da cânula, sendo o local da microinjeção verificado macroscopicamente.

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

3.6 - Determinação da variação da temperatura corporal.

Os animais foram transportados para uma sala climatizada, cuja temperatura ambiente foi mantida a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, no mínimo 24 h antes do início dos experimentos. Durante o experimento, a temperatura ambiente foi controlada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (zona de termoneutralidade para ratos, GORDON, 1990). Nos experimentos de avaliação da termorregulação os animais foram ambientados na temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por uma semana e durante o experimento foi mantida esta mesma temperatura ambiente.

Os animais foram mantidos dentro de suas respectivas gaiolas, e manuseados o mínimo possível durante as medidas. A temperatura retal foi medida

por inserção de uma sonda (CE n° 400, Yellow Springs Instruments (YSI), USA) a 4,0 cm de profundidade no reto dos animais, conectada a um teletermômetro (modelo 4000-A, YSI, EUA). Os animais foram adaptados às condições experimentais através da realização desse procedimento, no mínimo três vezes, no dia anterior ao experimento, objetivando minimizar possíveis variações de temperatura ocasionadas por estresse do manuseio.

No dia do experimento, as temperaturas basais foram determinadas por 3 ou mais medidas, em intervalos de 30 minutos, antes da administração de qualquer tratamento. Após administração dos estímulos pirogênicos, as medidas continuaram a ser realizadas em intervalos de 30 minutos, por um período que variou de 4 a 6 horas conforme o experimento.

As injeções das drogas foram feitas entre 9:30 e 10:30 horas da manhã, nos animais que apresentaram uma temperatura estável e na faixa de 36,6 a 37,4 °C.

3.7 - Determinação da temperatura da pele (cauda).

A temperatura da cauda foi medida por meio de uma sonda posicionada na superfície lateral da cauda no seu primeiro terço distal. A sonda foi fixada à cauda e isolada da perda de calor para o ambiente com a utilização de uma fita adesiva de 2 a 3 cm de largura envolta por uma fita isolante. No local onde a sonda era inserida, utilizou-se um pedaço de milipore, para que não ocorresse irritação da cauda do animal e também para facilitar a inserção e retirada da sonda. O isolamento da referida extensão da cauda não comprometeu os mecanismos de perda de calor, uma vez que os animais controle não apresentaram alteração da temperatura retal.

3.8 - Pré-tratamento dos animais com indometacina.

Nos experimentos onde avaliou-se a participação de PGs, os animais foram pré-tratados com indometacina (2,0 mg/kg) ou veículo tampão tris pH=8,2 (2,0 ml/kg), por via i.p, 30 min antes da administração do estímulo pirogênico. A dose escolhida para a indometacina, foi obtida através da realização de uma curva dose resposta.

3.9 – Pré-tratamento dos animais com antagonistas opióide

Nos experimentos onde utilizou-se o antagonista opióide não seletivo naloxona os animais foram pré-tratados com a droga (0,3 – 1,0 mg/kg) ou salina (2,0 ml/kg), por via s.c, imediatamente antes da administração do estímulo pirogênico. O antagonista μ -opióide seletivos CTAP foi administrado nas doses de 0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ por via i.c.v, 30 minutos antes da administração do estímulo pirogênico. Os antagonistas κ - e δ -opióide seletivos nor-BNI e naltrindol respectivamente foram administrados nas doses, de 1,5 e 2,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por via i.c.v, 30 min antes do estímulo pirogênico. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina.

3.10 - Preparação do PFPF.

Dentre os pirogênios utilizados, houve a necessidade de preparação do PFPF, que foi realizada em condições assépticas de acordo com a metodologia descrita por ZAMPRONIO et al. (2000), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP.

Para esta preparação, os macrófagos foram obtidos das cavidades peritoneais de ratos estimuladas com 10,0 mL de tioglicolato (3 %, p/v em água) via ip. Quatro dias após este procedimento, os macrófagos foram coletados através de leve massagem do peritônio com 10,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,4) contendo 5 U/mL de heparina. As células foram incubadas em placas de Petri a 37°C por 1 h em atmosfera de 5 % de CO₂ para permitir que os macrófagos presentes aderissem ao fundo das mesmas.

As monocamadas aderidas foram lavadas com PBS estéril e foram então pré-tratadas com 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dexametasona por 1 hora. Dexametasona foi mantida no meio de cultura em todas as etapas subsequentes. Esse procedimento visou a inibição da síntese *de novo* de citocinas. Ao final desta etapa, os macrófagos foram incubados com LPS (10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio RPMI 1640) por 30 minutos à 37 °C, 5 % de CO₂, a fim de que ocorresse a estimulação destas células. Depois deste

procedimento, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 1 hora à 37 °C, 5 % CO₂ com meio de cultura RPMI 1640 na ausência de LPS.

O sobrenadante foi então recolhido e centrifugado a 1000 g por 15 minutos à temperatura de -4°C e ultrafiltrado em membranas AMICON YM30, que retém substâncias com peso molecular acima de 30 KDa, presentes no meio de cultura. O material retido na membrana foi resuspenso em água estéril, liofilizado e armazenado à -70°C. Para a dosagem de proteínas, imediatamente antes da liofilização uma amostra foi retirada e a quantidade de proteínas avaliada por espectrofotômetro à 280 nm. Para administração nos animais, o PFPF liofilizado foi ressuspendido em salina estéril em concentração apropriada e ultrafiltrado em membrana MILLIPORE (poros de 0,22 µ de diâmetro).

3.11 - Administração dos estímulos pirogênicos

LPS (5,0 µg/kg) ou salina estéril (2,0 mL/kg) foram injetados por via ip .

IL-1β (3,12 ng), TNF-α (250,0 ng), IL-6 (300,0 ng), PFPF (100,0 ng), MIP-1α (500,0 ng), PGE₂ (125,0 ng), PGF_{2α} (500,0 ng), CRH (2,5 µg) e ET-1 (1,0 pmol) foram administrados por via i.c.v em um volume de 2,0 µL de salina. Estas injeções centrais foram realizadas no ventrículo lateral direito dos ratos, através de uma agulha de microinjeção (30 G) que excedeu a cânula em 2,0 mm, acoplada a um tubo de polipropileno P20, que por sua vez estava conectado a uma microsseringa Hamilton (25 µL).

As doses dos pirogênios foram baseadas em curvas dose-resposta determinadas no laboratório e representam doses sub-máximas para indução de febre.

3.12 - Colheita das amostras de CSF para dosagem de PGE₂.

Os níveis de PGE₂ foram avaliados em animais tratados ou não com CTAP e que receberam como estímulo LPS. Antes de receberem quaisquer tratamentos, a temperatura basal dos animais foi determinada conforme descrito anteriormente no

item 2.6. Próximo ao horário da colheita, a temperatura retal foi determinada, a fim de correlacionarmos se a temperatura estava de acordo com o tratamento recebido pelo animal.

Para a colheita destas amostras, 3 h após a administração dos tratamentos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40,0 mg/kg) por via ip.

Utilizando a metodologia descrita por CONSIGLIO & LUCION (2000), os animais foram fixados no aparelho estereotáxico, tendo o corpo alinhado verticalmente e a cabeça mantida horizontalmente, de maneira a formar um ângulo de 90° entre a cabeça e o corpo dos animais. A região foi umedecida com um algodão embebido em etanol, evidenciando o orifício entre o occipital e a espinha. Então, coletou-se cerca de 60 µL de CSF da cisterna magna utilizando um escalpe conectado a uma seringa de 1,0 mL. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo 5µg/2µL de indometacina e após centrifugação de 15 min (1000g, 0° C), as amostras foram armazenadas a -70° C para posterior análise. Somente amostras que não apresentaram contaminação por sangue foram utilizadas.

3.13 - Imunoensaio enzimático para detecção de PGE₂.

Os níveis de PGE₂ nas amostras de CSF foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo (Cayman Chemical Company). Em placas de ELISA de 96 well foram preparados os controles necessários e a curva padrão em duplicatas. A curva padrão referente a PGE₂ foi preparada utilizando-se PGE₂ padrão em concentrações que variaram de 7,8 até 1000,0 pmol/mL. As amostras de CSF, diluídas 2 vezes foram analisadas em duplicata.

Depois de adicionar a PGE₂ marcada aos wells, a placa foi incubada por 18 horas à 4° C na ausência de luz. Transcorrido o tempo necessário, a placa foi lavada, incubada com o reagente de revelação e colocada sobre um agitador orbital, também na ausência de luz. Uma hora depois, a absorbância das amostras foi determinada a 405 nm.

3.14 - Análise estatística.

As respostas febris foram avaliadas pela variação da temperatura retal dos animais em °C e expressa como média \pm EPM da variação entre as médias das temperaturas basais e a diferentes tempos após a injeção do estímulo (variação da temperatura retal - ΔT_{re}). A diferença entre os tratamentos foi avaliada por análise de variância a um critério (ANOVA de uma via) seguida por teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. Os níveis de PG foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. Os resultados apresentados em porcentagem referem-se ao cálculo da área sob as curvas de cada animal, expressa como média \pm EPM. O nível de significância considerado foi de 5%.

4 – RESULTADOS

4.1 - Efeito da naloxona e do CTAP na resposta febril induzida pelo LPS.

O tratamento com naloxona na dose de 1,0 mg/kg não modificou a temperatura corporal dos animais, em relação àqueles que receberam somente salina (Figura 1). A administração de LPS 5,0 µg/kg promoveu uma resposta febril que teve início em 1,5 h e que manteve-se significativamente diferente do controle até a 6,0 h (Figura 1 e 2). O pré-tratamento dos animais com naloxona 0,3 (Figura 1A) e 1,0 mg/kg (Figura 1B) reduziram em 32,4 e 61,5% a resposta febril induzida pelo LPS, respectivamente. Esta redução foi observada a partir de 1,5 h e manteve-se significativa até 2,5 h para a dose de 0,3 e até a 6^a h para a dose de 1,0 mg/kg.

O pré-tratamento com CTAP na dose de 1,0 µg/2µl causou uma pequena, mas significativa redução da temperatura corporal dos animais, em relação àqueles que receberam somente salina durante a primeira hora do experimento (Figura 2A). O CTAP nas doses de 0,1 (Figura 2A), 0,3 (Figura 2B) e 1,0 µg/2µl (Figura 2C) reduziram em 42,0, 42,0 e 61,2% a resposta febril induzida pelo LPS, respectivamente. Esta redução foi observada a partir da 2^a h para a dose 1,0 µg/2µl, mantendo-se até o final do experimento. Já para as doses de 0,1 e 0,3 µg/2µl a redução teve início a partir de 3^a. h, mantendo-se significativas até a 4,0 e 6,0 h, respectivamente.

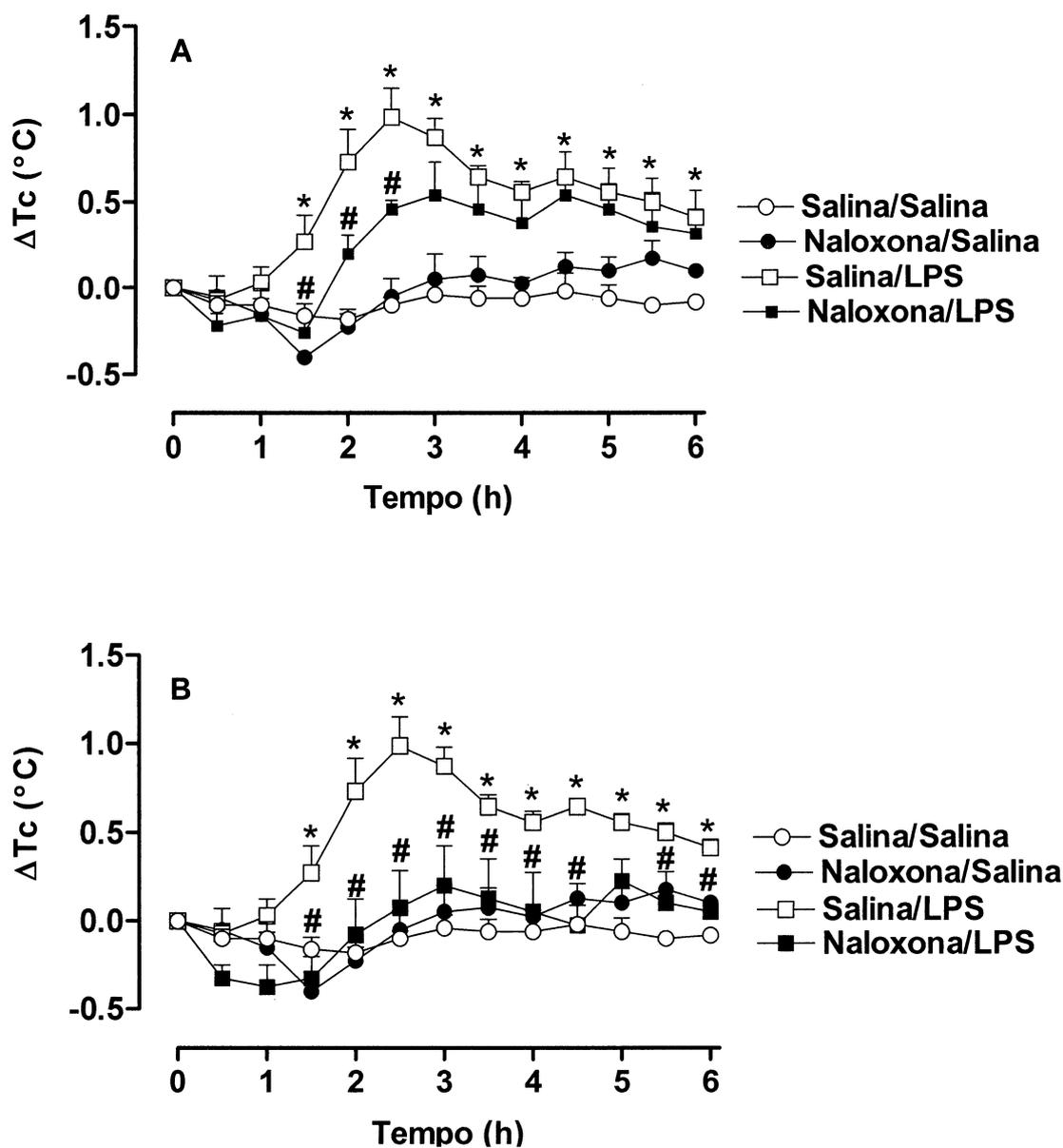


Figura 1: Efeito da naloxona sobre a resposta febril induzida por LPS. Os animais receberam salina estéril 1,0 ml/kg, s.c ou naloxona 0,3 (A) ou 1,0 mg/kg (B), s.c imediatamente antes da injeção de LPS 5,0 μ g/kg, i.p ou salina 1,0 ml/kg, i.p. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina $p < 0,05$ e # diferença significativa entre o grupo salina/LPS $p < 0,05$.

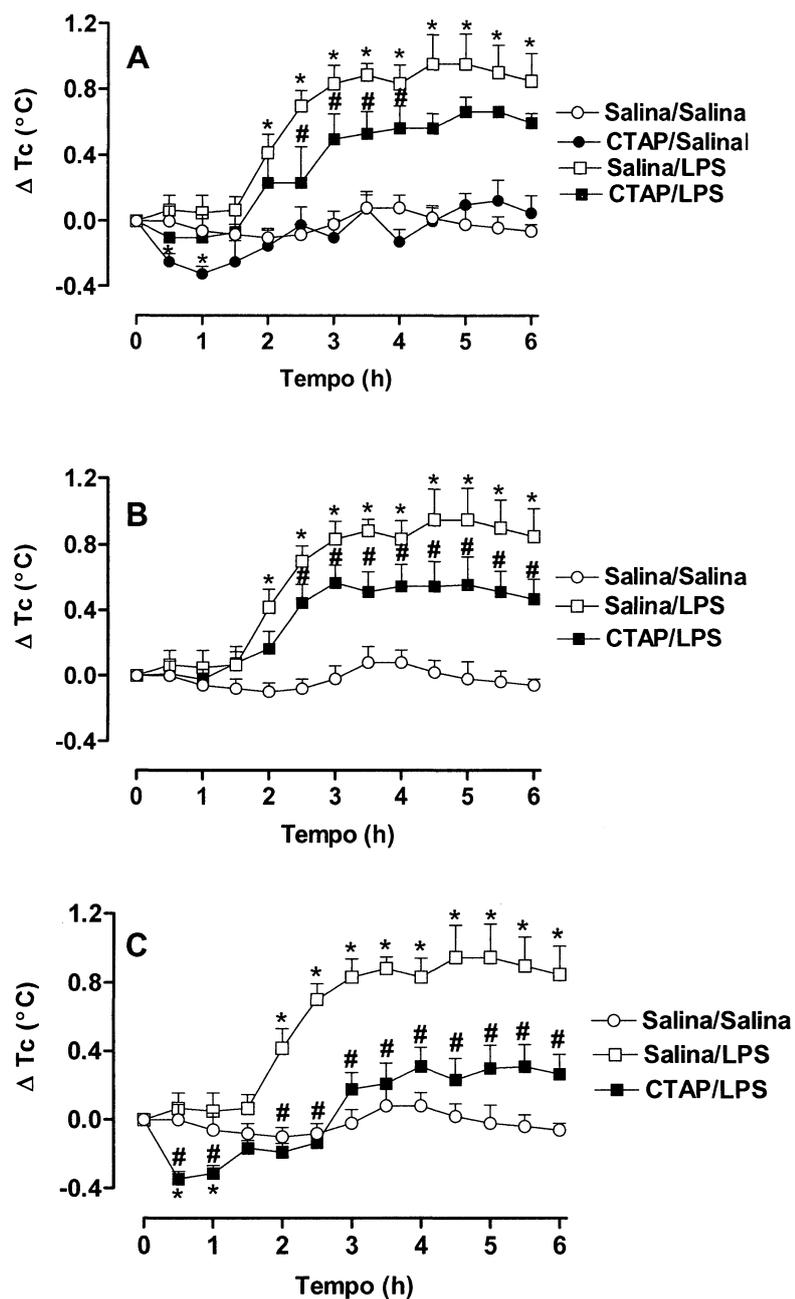


Figura 2: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida por LPS. Os animais receberam salina estéril 2 μ l, i.c.v ou CTAP 0,1 (A), 0,3 (B) ou 1,0 μ g/2 μ l (A e C), i.c.v 30 minutos antes da injeção de LPS 5,0 μ g/kg, i.p ou salina 1,0 ml/kg, i.p. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais(n=5-9). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p < 0,05$ e # diferença significativa entre o grupo salina/LPS $p < 0,05$.

4.2 - Efeito da Naloxona, propranolol e CTAP na temperatura corporal.

Como controle positivo, utilizamos o propranolol, um antagonista β . O tratamento com propranolol na dose de 20,0 mg/kg, mas não na de 10 mg/kg em animais mantidos na temperatura de termoneutralidade (28 °C) promoveu uma redução da temperatura corporal que foi significativa apenas 30 minutos após a administração, quando comparado aos animais que receberam apenas salina (Figura 3). O tratamento com a naloxona na dose de 1,0 mg/kg, em animais mantidos na temperatura de termoneutralidade promoveu uma pequena, mas não significativa redução da temperatura corporal dos animais em relação àqueles que receberam somente salina. (Figura 3).

Com o intuito de avaliar se havia algum rompimento na termorregulação dos animais que não estaria sendo observado devido à execução do experimento na temperatura de termoneutralidade o mesmo experimento foi executado à 20°C, um condição onde se favorece a perda de calor. Nesta condição o tratamento com propranolol na dose de 20,0 mg/kg, mas não na de 10,0 mg/kg em animais ambientados na temperatura de 20 °C, promoveu uma rápida e acentuada queda da temperatura corporal, quando comparado aos animais que receberam apenas salina. Esta redução foi significativa nos primeiros 30 minutos, mantendo-se até 1,5 h. A naloxona por sua vez, na dose de 1,0 mg/kg produziu uma menor, mas significativa redução na temperatura corporal dos animais que iniciou-se 30 minutos após a administração mantendo-se até 1,0 h (Figura 4).

Por outro lado, o tratamento com CTAP na dose de 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal durante todo o experimento, seja ele administrado na temperatura de termoneutralidade (28°C Figura 5) ou à 20 °C. (Figura 6).

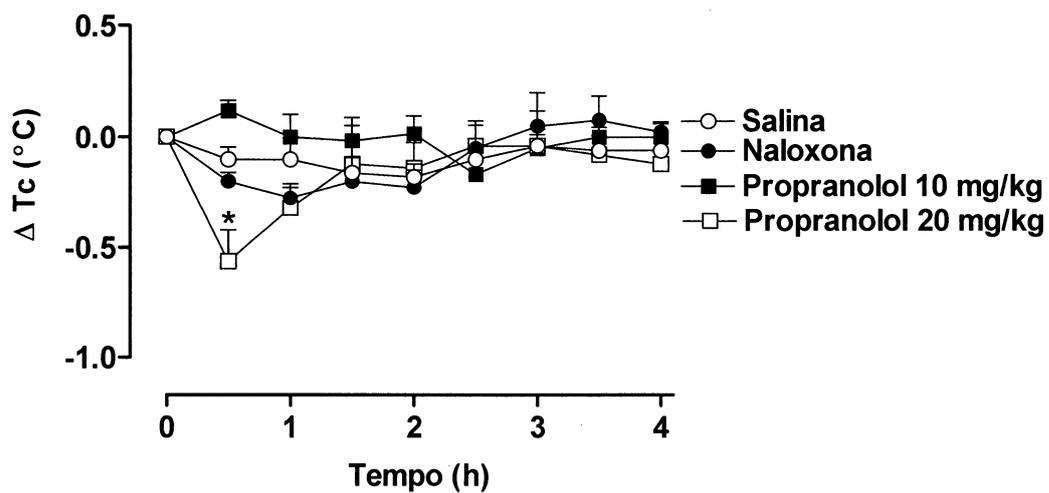


Figura 3: Efeito da naloxona e do propranolol na temperatura corporal de animais mantidos à 28 °C. Os animais receberam salina estéril (1,0 ml/kg, s.c) ou naloxona (1,0 mg/kg, s.c) ou propranolol (10,0 ou 20,0 mg/kg, i.p). Os pontos representam a média \pm EPM a variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo que recebeu somente salina, $p < 0,05$.

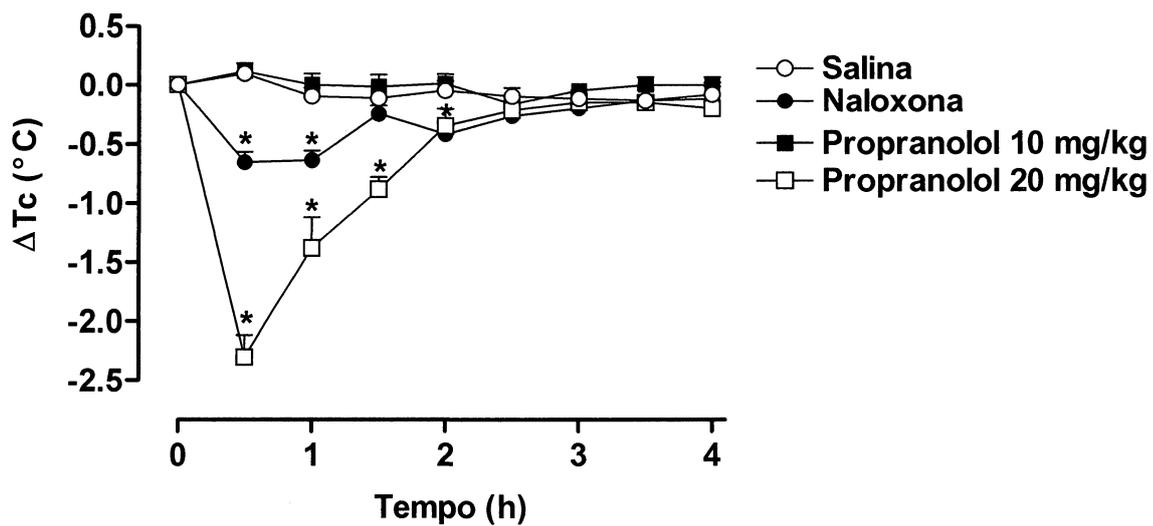


Figura 4: Efeito da naloxona na temperatura corporal de animais ambientados à 20 °C. Os animais receberam salina estéril (1,0 ml/kg, s.c) ou propranolol (20,0 ou 10,0 mg/kg, i.p) ou naloxona (1,0 mg/kg, s.c). Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina, $p < 0,05$.

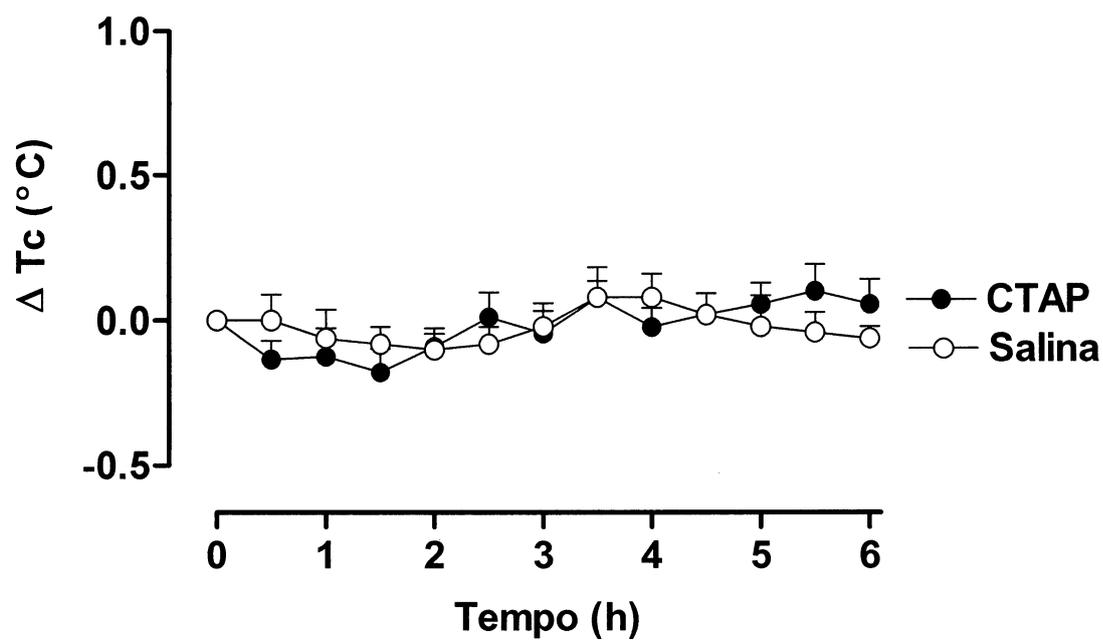


Figura 5: Efeito do CTAP na temperatura corporal de animais mantidos à 28 °C. Os animais receberam salina estéril (1,0 ml/kg, i.c.v) ou CTAP (1,0 μ g/2 μ l, i.c.v). Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-9).

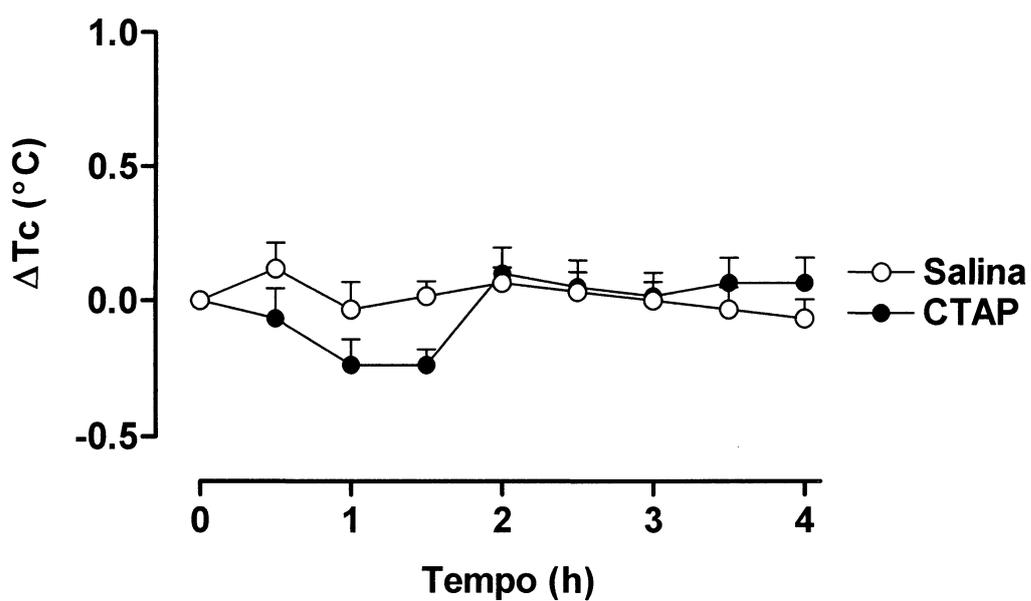


Figura 6: Efeito do CTAP na temperatura corporal de animais mantidos à 20 °C. Os animais receberam salina estéril (1,0 ml/kg, i.c.v) ou CTAP (1,0 μ g/2 μ l, i.c.v). Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-6).

4.3 - Efeito do nor-BNI e naltrindol na temperatura corporal em animais ambientados na temperatura de 28°C e 20°C.

O tratamento com o antagonista κ seletivo nor-BNI ou com o antagonista δ seletivo naltrindol nas doses equimolares em relação ao CTAP (1,50 e 2,45 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ respectivamente), dos animais mantidos tanto na temperatura de termoneutralidade (28 °C), como a 20 °C não promoveram nenhuma alteração significativa da temperatura corporal, quando comparado aos animais que receberam apenas salina. (Figura 7).

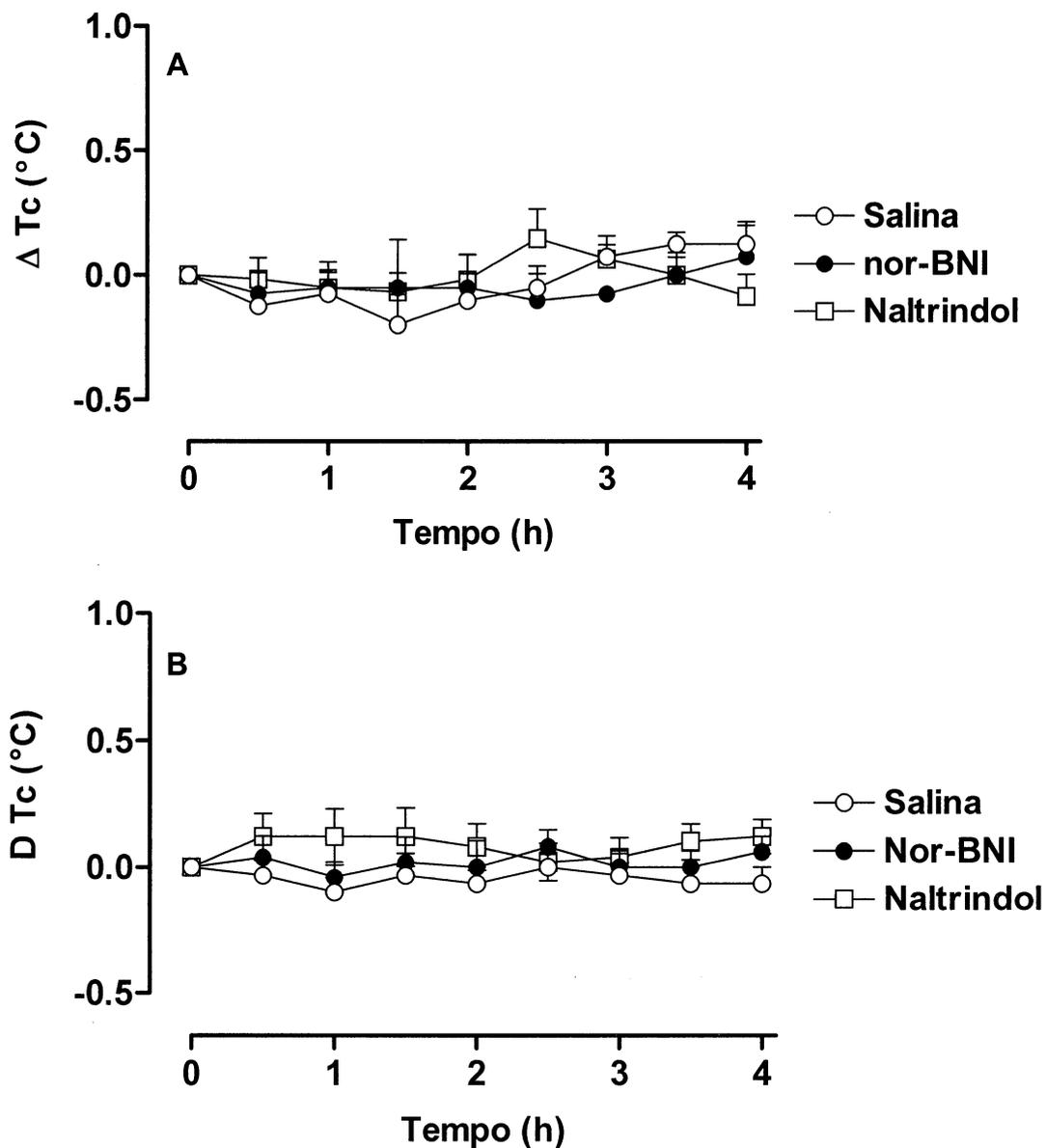


Figura 7: Efeito do nor-BNI e naltrindol na temperatura corporal de animais mantidos à 28 °C (A) ou à 20 °C (B). Os animais receberam salina estéril (1,0 ml/kg, s.c) ou nor-BNI ou naltrindol (1,50 e 2,45 μ g/2 μ l, i.c.v). Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5).

4.4 - Efeito da administração periférica de morfina na temperatura corporal.

A administração de morfina s.c. promoveu um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente. Este aumento teve início logo nos primeiros 30 minutos para todas as doses utilizadas, já o pico e a duração da resposta variaram com a dose. O pico da resposta para as doses de 1,0 e 3,0 mg/kg ocorreu em 1,0 h e a duração da resposta foi de 2,0 h e de 2,5 h para as doses de 1,0 e 3,0 mg/kg respectivamente. Já a dose de 10,0 mg/kg apresentou o pico de sua resposta em 1,5 h e manteve-se significativa até a 5,0 h (Figura 8A). O aumento da temperatura corporal induzido pela morfina foi acompanhado por uma redução na temperatura da cauda. A redução da temperatura da cauda acompanhou o desenvolvimento do aumento da temperatura retal coincidindo o pico da resposta em 1,0 h (Figura 8B)

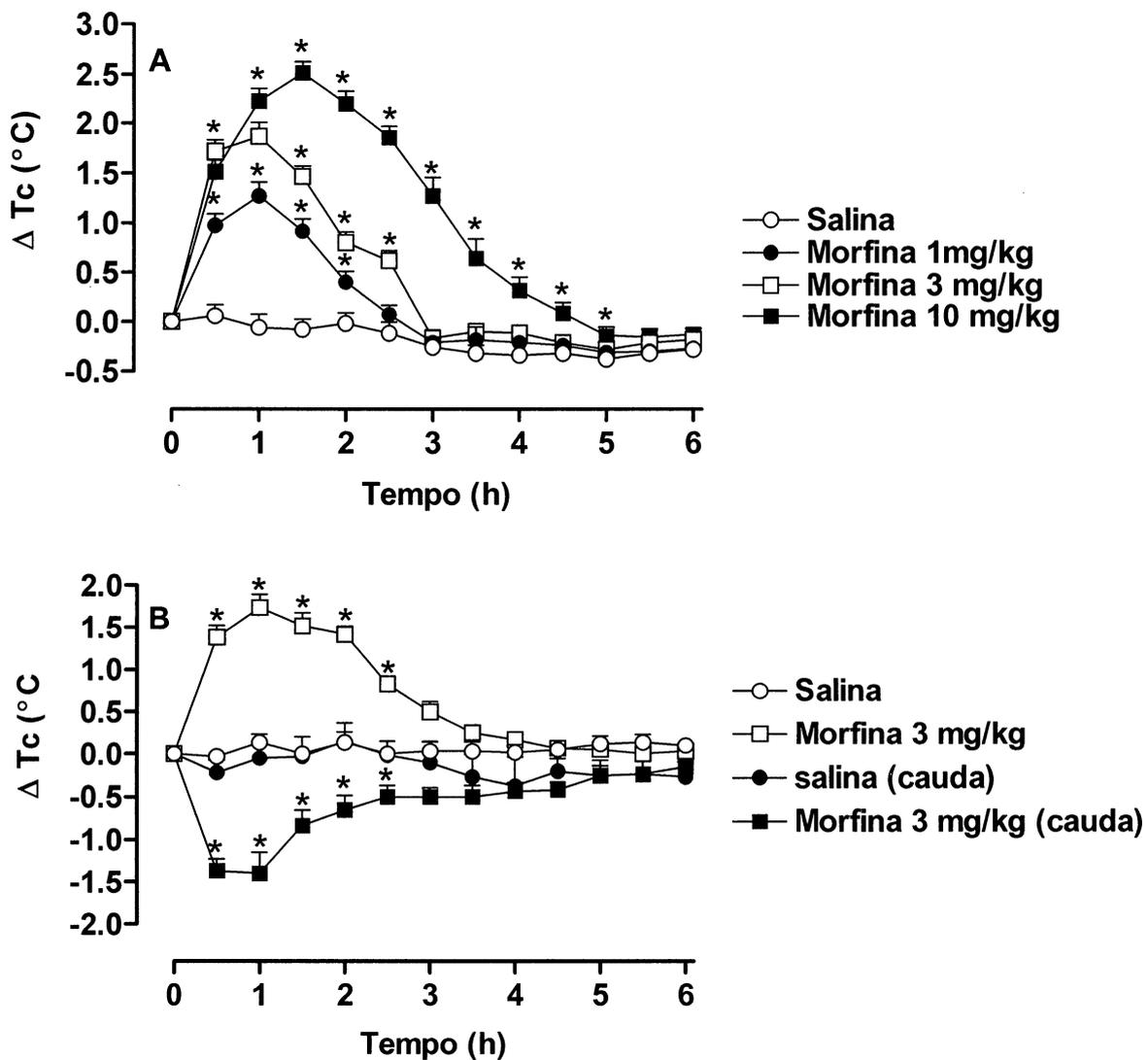


Figura 8: Efeito da administração periférica de morfina na temperatura corporal (A) e na temperatura da pele (B). Os animais receberam salina estéril 1,0 ml/kg, s.c ou morfina nas doses de 1,0, 3,0 ou 10,0 mg/kg, s.c. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (A) ou cutânea (B) ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina, $p < 0,05$.

4.5 - Efeito da administração central de morfina na temperatura corporal.

A administração de morfina i.c.v. promoveu um aumento da temperatura corporal de forma dose-dependente. Este aumento teve início logo nos primeiros 30 minutos para todas as doses utilizadas, já o pico e a duração da resposta variaram com a dose. O pico da resposta para as doses de 3,0 e 10,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ocorreram em 1,0 h e a duração da resposta foi de 1,5 h e de 2,0 h para as doses de 3,0 e 10,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, respectivamente. Já a dose de 30,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ apresentou o pico de sua resposta em 1,0 h e manteve-se significativa até a 3,5 h (Figura 9A). O aumento da temperatura corporal induzido pela morfina foi acompanhada por uma redução na temperatura da cauda. A redução da temperatura da cauda acompanhou o desenvolvimento do aumento da temperatura retal coincidindo o pico da resposta em 1,0 h (Figura 9B)

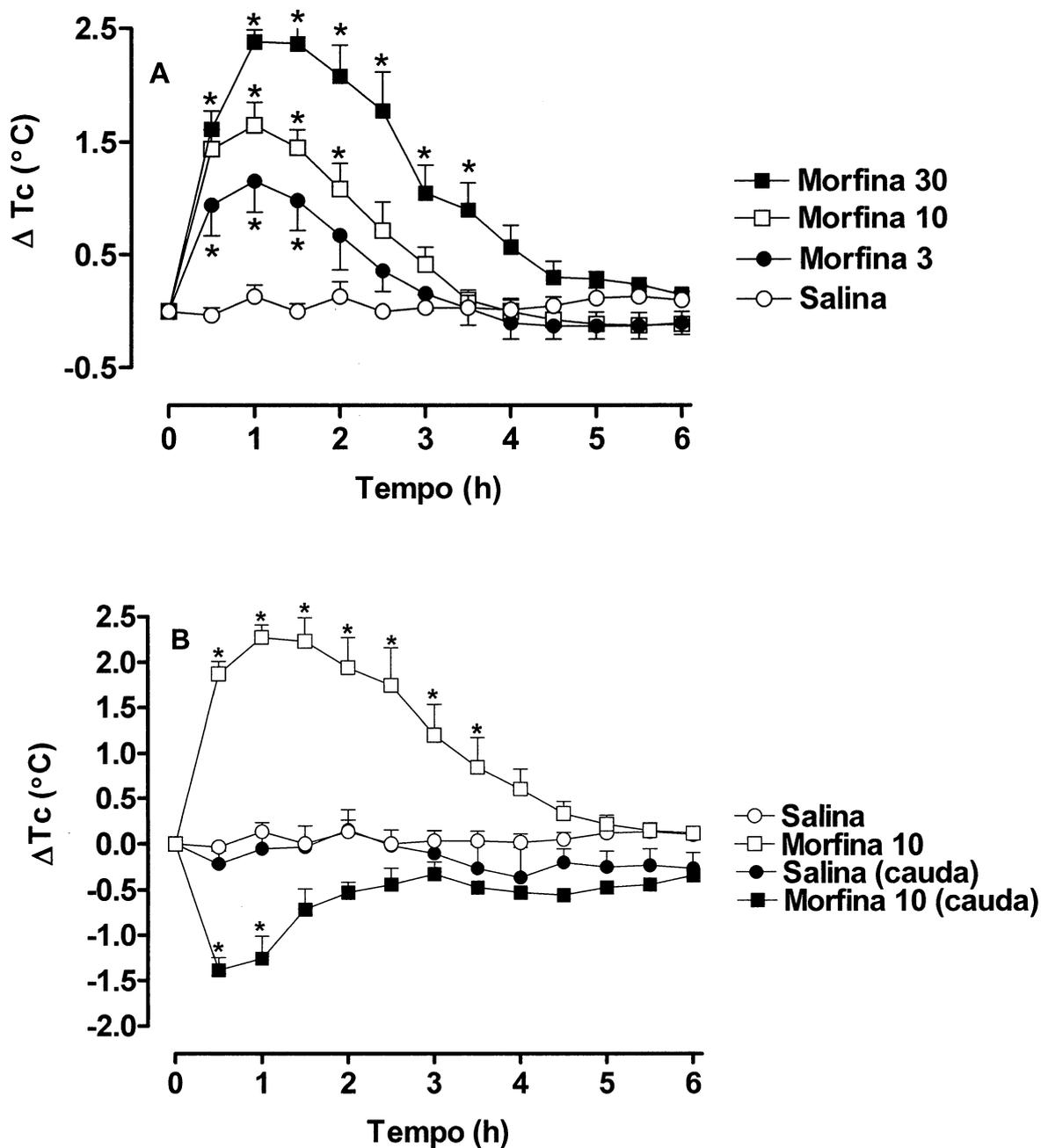


Figura 9: Efeito da administração central de morfina na temperatura corporal (A) e na temperatura da pele (B). Os animais receberam salina estéril 1,0 ml/kg, s.c ou morfina nas doses de 1,0, 3,0 ou 10,0 mg/kg, s.c. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal (A) ou cutânea (B) ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina, $p < 0,05$.

4.6 - Efeito do tratamento com naloxona e CTAP no aumento da temperatura corporal induzido por morfina.

A administração de morfina 3,0 mg/kg promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 1,0 h e que permaneceu significativamente diferente do controle até 2,5 h (Figuras 10 e 11). O tratamento com naloxona 1,0 mg/kg por si só não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal. Contudo, o pré-tratamento dos animais com naloxona nesta mesma dose aboliu o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina (Figura 10). Por sua vez, a administração de CTAP 1 µg/2µl não promoveu alteração significativa da temperatura corporal quando administrado sozinho. O pré-tratamento dos animais com CTAP nesta mesma dose reverteu completamente tanto o aumento da temperatura corporal como a redução da temperatura da pele induzido pela morfina administrada s.c. (Figura 11). Além disso, o CTAP reduziu significativamente o aumento da temperatura corporal e da pele induzido pela administração central de morfina (Figura 12).

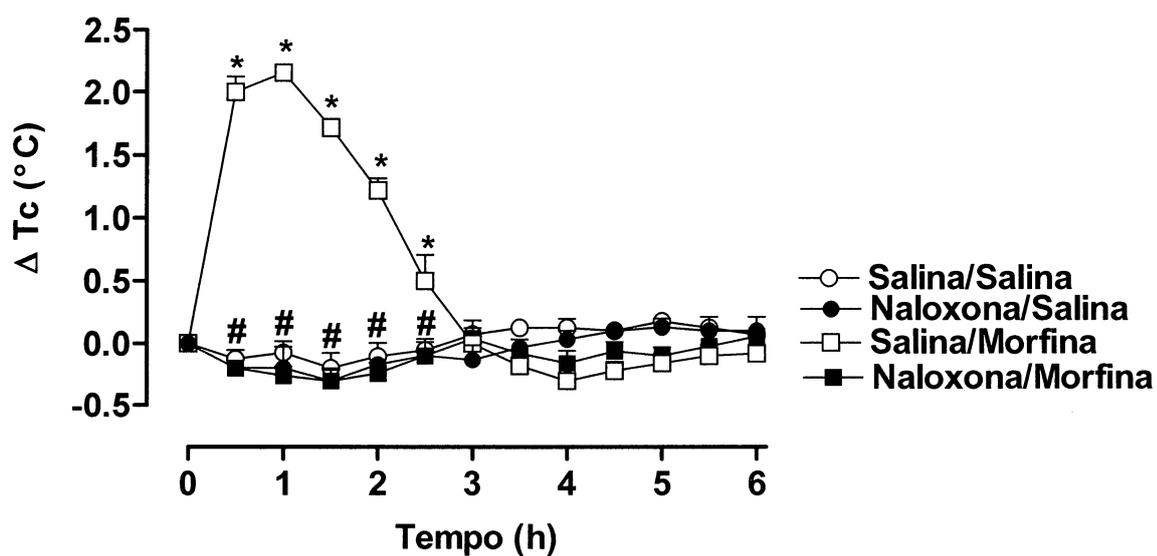


Figura 10: Efeito do tratamento com naloxona sobre o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina. Os animais receberam salina estéril 1,0 ml/kg, s.c ou naloxona 1,0 mg/kg s.c imediatamente antes da administração de morfina 3,0 mg/kg, s.c ou de salina estéril 1,0 ml/kg s.c. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=4-5$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p<0,05$ e # diferença significativa entre o grupo salina/morfina $p<0,05$.

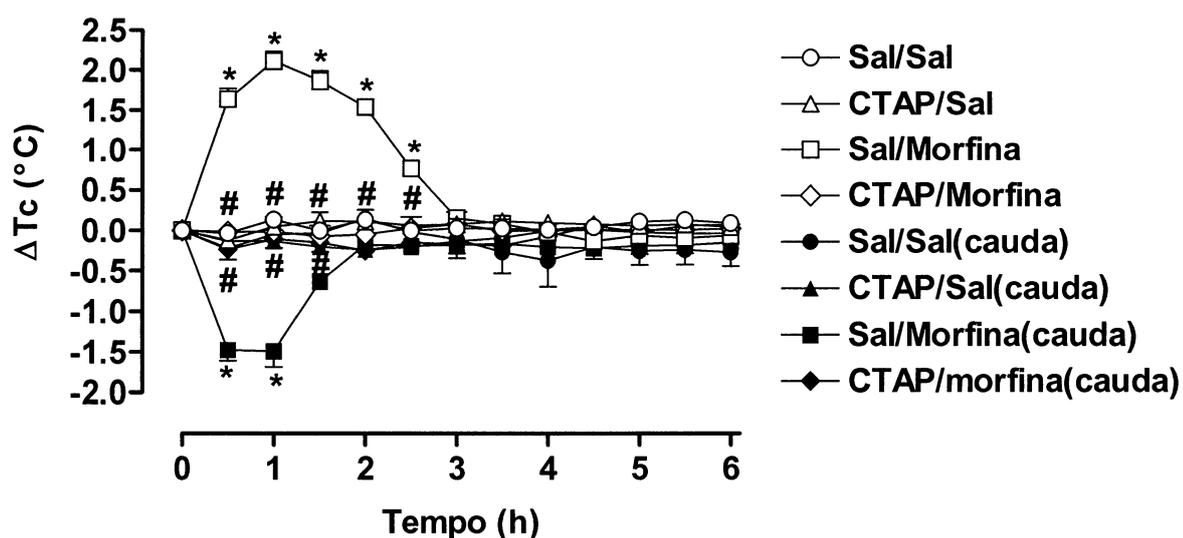


Figura 11: Efeito do tratamento com CTAP sobre o aumento da temperatura corporal e da redução da temperatura da pele induzido pela morfina s.c. Os animais receberam salina estéril $2\mu\text{l}$, i.c.v ou CTAP $1,0\ \mu\text{g}/2\mu\text{l}$ i.c.v 30 minutos antes da administração de morfina $3,0\ \text{mg}/\text{kg}$, s.c ou de salina estéril $1,0\ \text{ml}/\text{kg}$ s.c. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ou cutânea (°C) dos animais ($n=4-5$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p<0,05$ e # diferença significativa entre o grupo salina/morfina $p<0,05$.

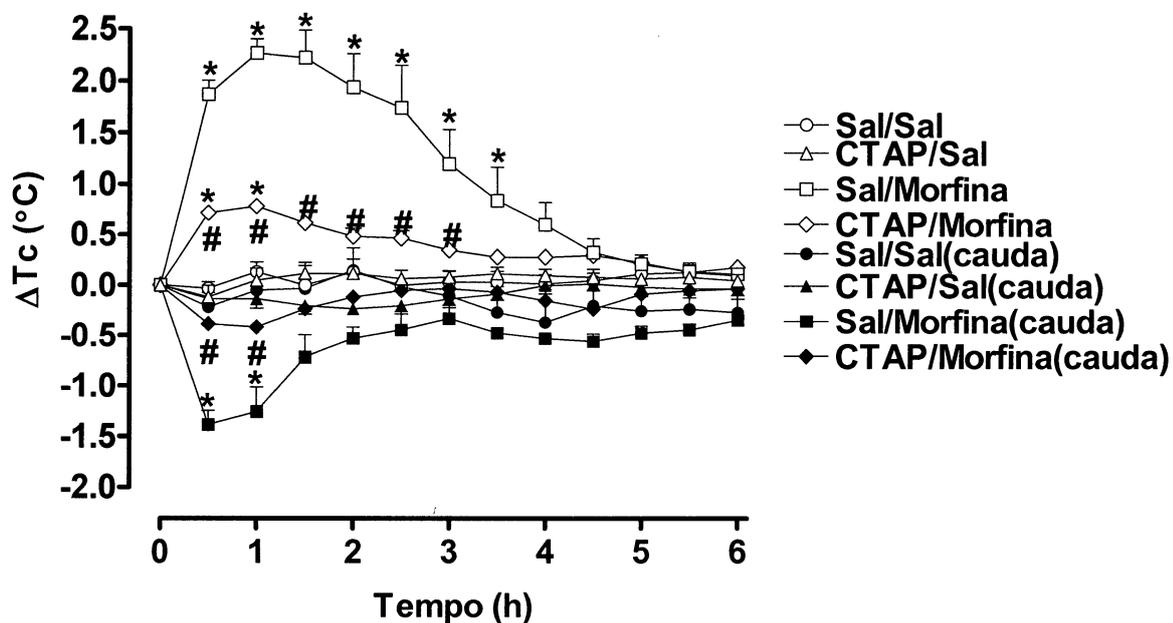


Figura 12: Efeito do tratamento com CTAP sobre o aumento da temperatura corporal e da redução da temperatura da pele induzido pela morfina administrada i.c.v. Os animais receberam salina estéril 2 μ l, i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l i.c.v 30 minutos antes da administração de morfina 10,0 μ g/2 μ l, i.c.v. ou de salina estéril 1,0 ml/kg i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ou cutânea (°C) dos animais (n=4-5). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p < 0,05$ e # diferença significativa entre o grupo salina/morfina $p < 0,05$.

4.7 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida por IL-1 β , TNF- α e IL-6:

A IL-1 β promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 1,5 h e sustentável até a 6^a h. O pré-tratamento com CTAP 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, não modificou a temperatura corporal dos animais, em relação àqueles que receberam somente salina. O pré-tratamento com CTAP nesta dose não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela IL-1 β em nenhum momento do experimento (Figura 13). Por sua vez, o TNF- α promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 1,5 h e sustentável até a 6,0 h. O pré-tratamento com CTAP 1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$, não modificou a temperatura corporal dos animais, em relação àqueles que receberam somente salina. O pré-tratamento com CTAP nesta dose reduziu em 41,3% a resposta febril induzida pelo TNF- α . Esta redução foi observada a partir de 30 minutos, mantendo-se até a 3,5 h (Figura 14). Já a IL-6 promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 5,0 h e que se manteve até a 6,0 h. O pré-tratamento com CTAP 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ não promoveu alteração significativa da temperatura corporal dos animais, quando administrado sozinho. Entretanto, quando administrado nesta mesma dose ele reduziu em 77,9% a resposta febril induzida pela IL-6. Esta redução foi observada a partir de 30 minutos, mantendo-se até a 6^o h (Figura 15).

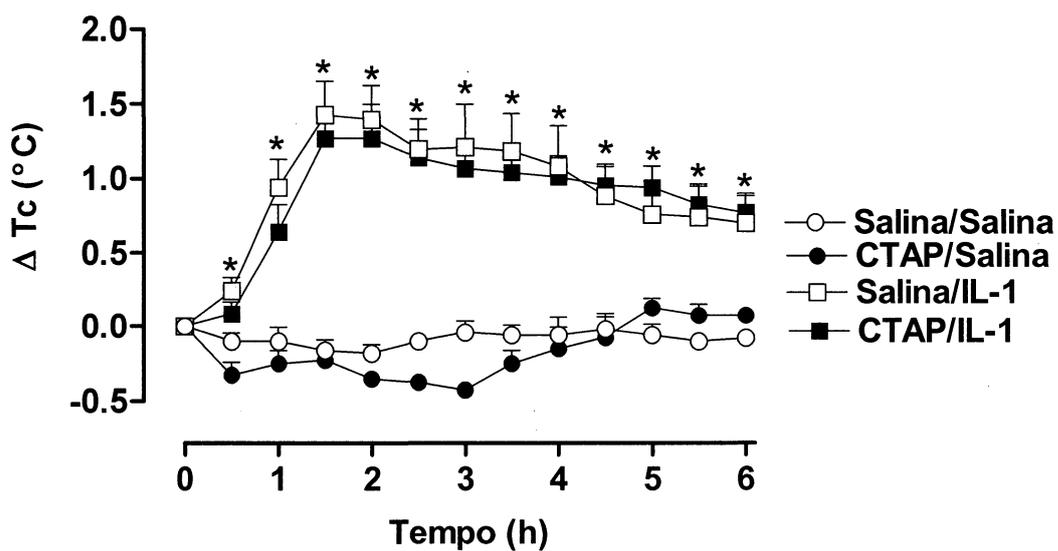


Figura 13: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida pela IL-1 β . Os animais receberam salina estéril 2 μ l i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l i.c.v, após 30 minutos os animais receberam IL-1 β 3,12 ng/2 μ l i.c.v ou Salina estéril 2 μ l i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina.

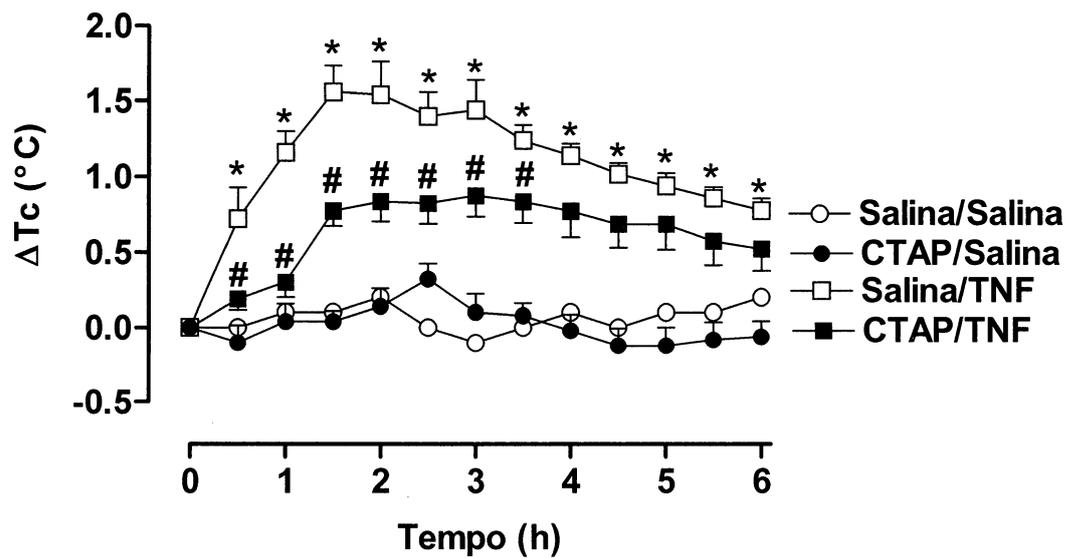


Figura 14: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α . Os animais receberam salina estéril 2 μ l i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l i.c.v, 30 minutos antes da administração de TNF- α 250 ng/2 μ l i.c.v ou de salina estéril 2 μ l i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-8). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina. # diferença significativa entre o grupo salina/TNF- α p<0,05.

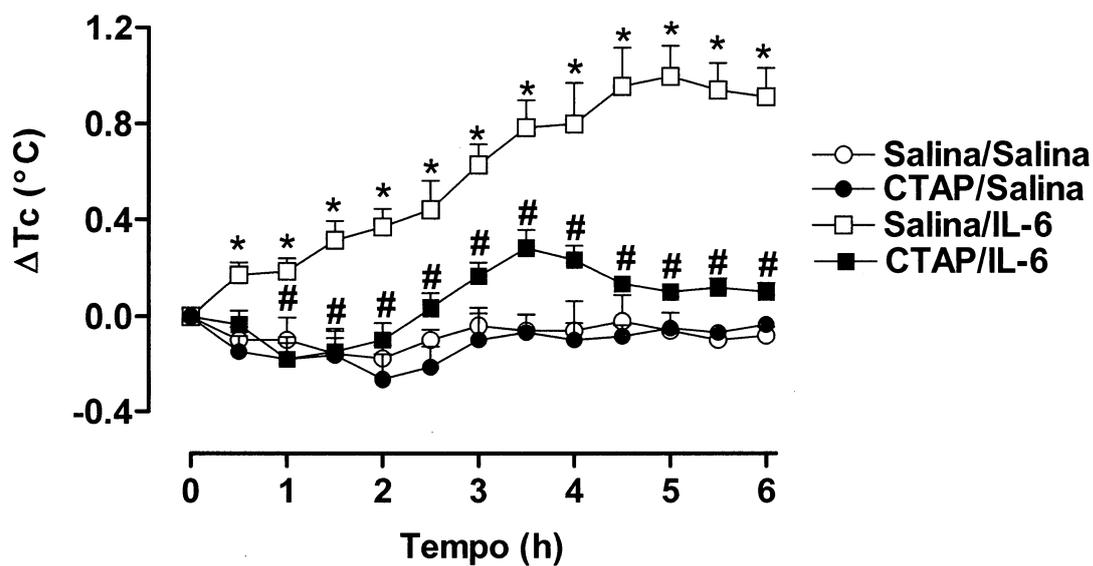


Figura 15: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida pela IL-6. Os animais receberam salina estéril $2\mu\text{l}$ i.c.v ou CTAP $1,0\ \mu\text{g}/2\mu\text{l}$ i.c.v, 30 minutos antes da administração de IL-6 $20\ \text{ng}/2\mu\text{l}$ i.c.v ou de salina estéril $2\mu\text{l}$ i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=6-7$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina. # diferença significativa entre o grupo salina/IL-6 $p<0,05$.

4.8 - Efeito da indometacina e do CTAP nos níveis de PGE₂ no CSF induzidos pelo LPS:

A administração de LPS promoveu um aumento significativo na concentração de PGE₂ no CSF quando comparado aos animais que receberam apenas tampão Tris (Figura 16 e 17). O pré-tratamento dos animais com indometacina reduziu significativamente a produção central desta PGE₂ (Figura 14).

No entanto, o pré-tratamento dos animais com CTAP não reduziu significativamente a produção central da PGE₂ (Figura 17).

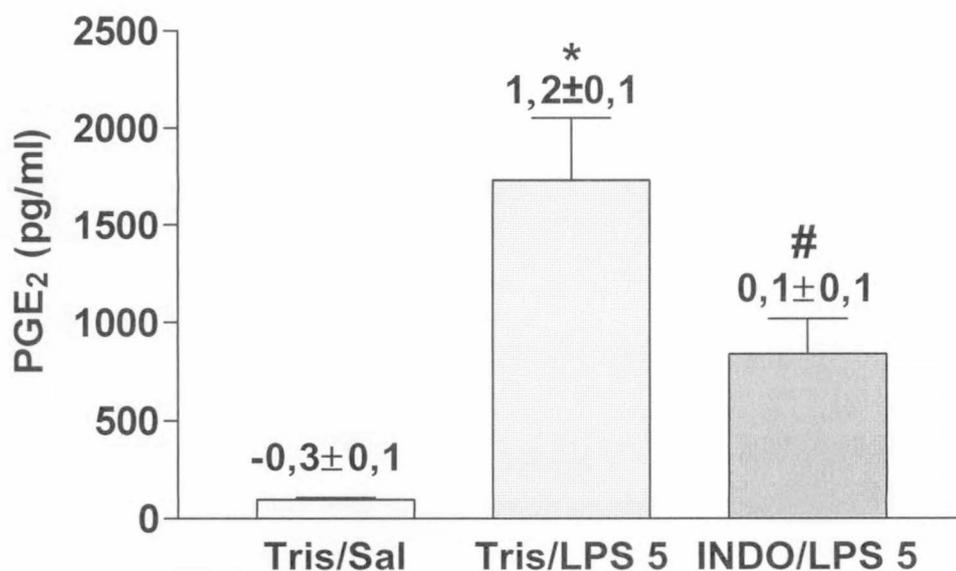


Figura 16: Efeito da indometacina nos níveis de PGE₂ no CSF induzidos pelo LPS. Os animais receberam Tris estéril 2,0 ml/kg i.p ou indometacina 2,0 mg/kg i.p e após 30 minutos os animais receberam salina 2 ml/kg i.p ou LPS 5,0 µg/kg i.p As barras representam a média ± EPM da variação dos níveis de PGE₂ produzidos no CSF 3,0 h após o tratamento com LPS dos animais (n=3-5) analisados em duplicata por ELISA. Os valores sobre as barras representam as médias ± EPM das temperaturas dos animais. * Representa a diferença significativa em relação ao grupo Tris/salina; # diferença significativa entre o grupo Tris/LPS p<0,05.

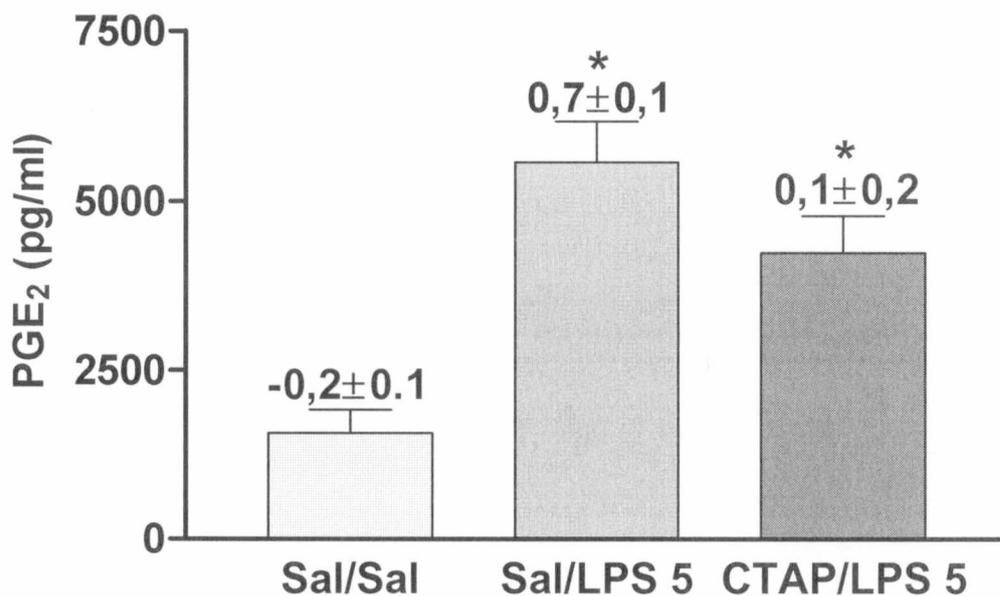


Figura 17: Efeito do CTAP nos níveis de PGE₂ no CSF induzidos pelo LPS. Os animais receberam salina estéril 2,0 µl i.c.v ou CTAP 1,0 µg/2µl i.c.v e após 30 minutos os animais receberam salina 2 ml/kg i.p ou LPS 5,0 mg/kg i.p As barras representam a média ± EPM da variação dos níveis de PGE₂ produzidos no CSF 3,0 h após o tratamento com LPS dos animais (n=4-5) analisados em duplicata por ELISA. Os valores sobre as barras representam as médias ± EPM das temperaturas dos animais. * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina; # diferença significativa entre o grupo salina/LPS p<0,05.

4.9 - Efeito do tratamento com indometacina no aumento da temperatura corporal induzido por LPS ou por morfina.

A administração de LPS 5,0 µg/kg promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 1,5 h, com pico da resposta em 2,5 h e que permaneceu significativamente diferente do controle até a 6,0 h. O pré-tratamento dos animais com indometacina 2,0 mg/kg reduziu significativamente a resposta febril induzida pelo LPS a partir de 1,5 h e este efeito manteve-se até a 6,0 h (Figura 18).

A administração de morfina 3,0 mg/kg promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 1,0 h e que permaneceu significativamente diferente do controle até 3,0 h (Figuras 19). O pré-tratamento dos animais com indometacina 2,0 mg/kg, não modificou o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina (Figura 19).

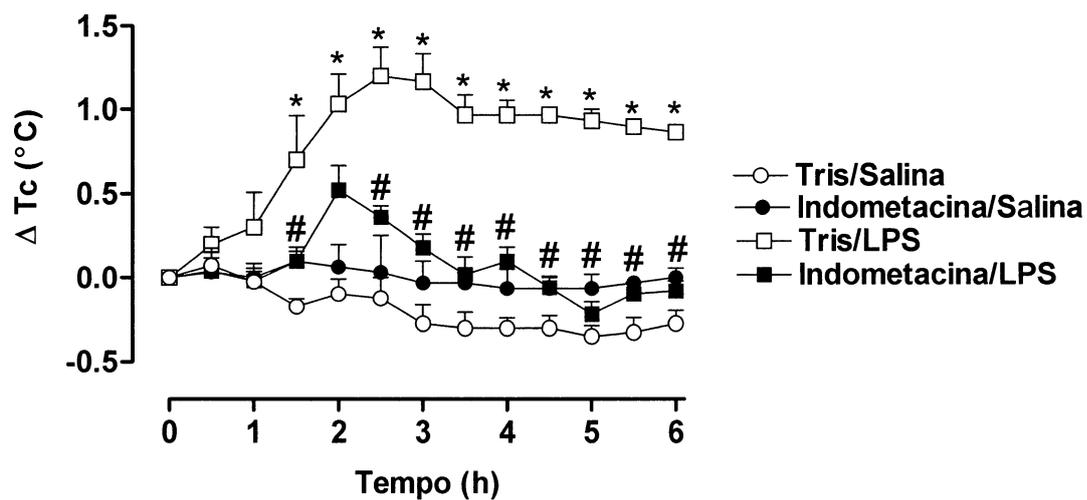


Figura 18: Efeito do tratamento com indometacina sobre o aumento da temperatura corporal induzido pelo LPS. Os animais receberam tampão Tris estéril 1,0 ml/kg, i.p. ou indometacina 2,0 mg/kg i.p. 30 minutos antes da administração de LPS 5,0 μ g/kg, i.p ou de salina estéril 1,0 ml/kg i.p. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=4-5). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p < 0,05$. e # diferença significativa entre o grupo salina/LPS $p < 0,05$.

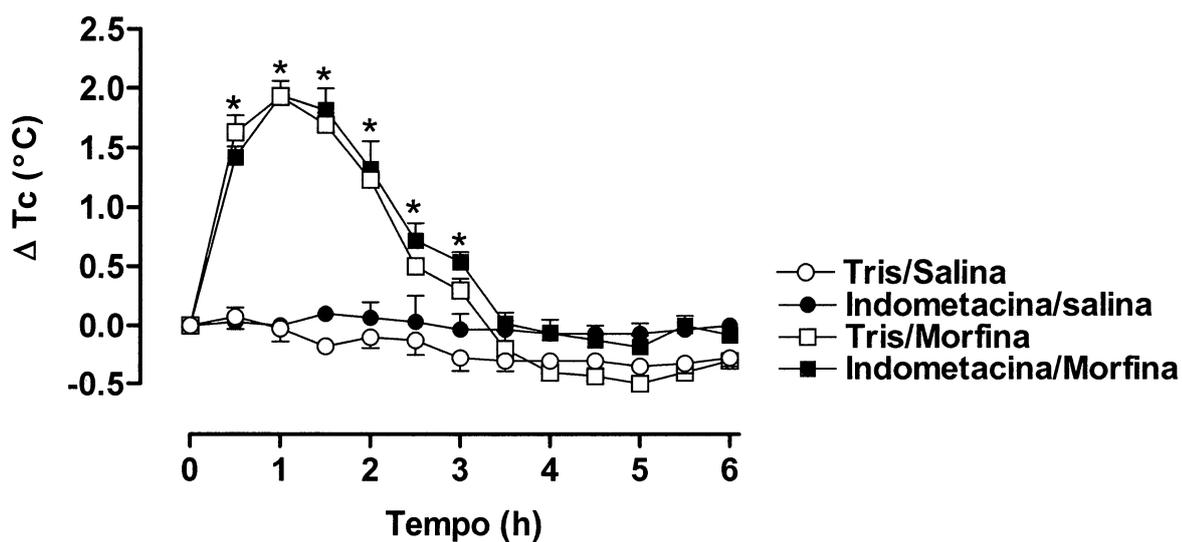


Figura 19: Efeito do tratamento com indometacina sobre o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina. Os animais receberam Tris estéril 1,0 ml/kg, i.p. ou indometacina 2,0 mg/kg i.p. 30 minutos antes da administração de morfina 3,0 mg/kg, s.c ou de salina estéril 1,0 ml/kg s.c. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=4-5$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina, $p < 0,05$.

4.10 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida pelo MIP-1 α e PFPF:

O MIP-1 α promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 1,0 h, com pico da resposta na 4,0 h e sustentável até a 6,0 h. O pré-tratamento com CTAP 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ não promoveu alteração significativa da temperatura corporal dos animais quando administrado sozinho. Entretanto, quando administrado nesta mesma dose ele praticamente aboliu (redução de 90,4%) a resposta febril induzida pelo MIP-1 α . Esta redução foi observada a partir de 1,0 h, mantendo-se até a 6 h (Figura 20).

Por sua vez, o PFPF promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta na 5,0 h e sustentável até a 6,0 h. O pré-tratamento com CTAP 1,0 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ praticamente aboliu (redução de 82,2 %) a resposta febril induzida pelo PFPF. Esta redução foi observada a partir de 1,0 h, mantendo-se até a 6 h (Figura 21).

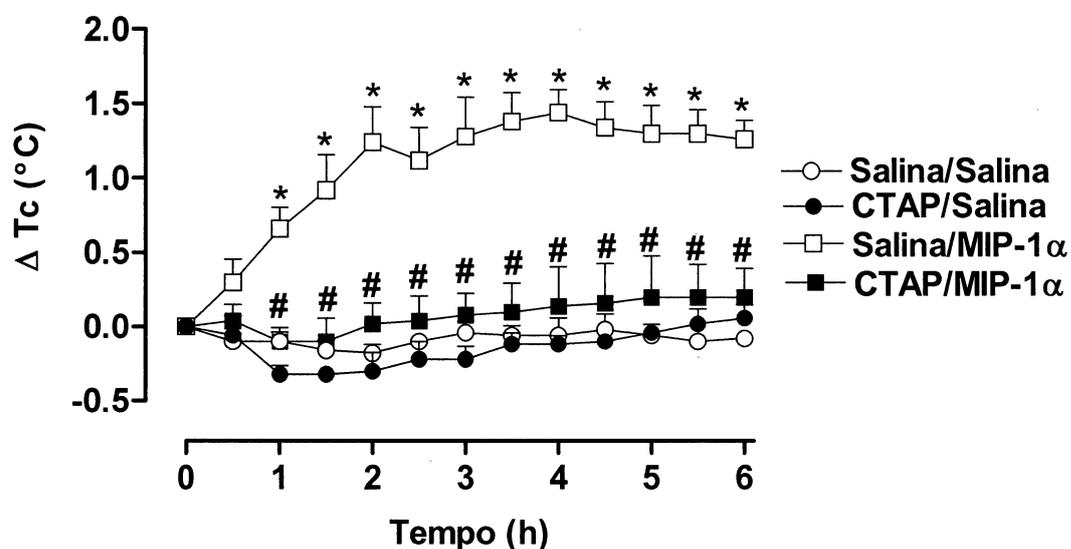


Figura 20: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida pelo MIP-1 α . Os animais receberam salina estéril 2 μ l i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l i.c.v, 30 minutos antes da administração de MIP-1 α 500 ng/2 μ l i.c.v ou de salina estéril 2 μ l i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina. # diferença significativa entre o grupo salina/MIP-1 α p<0,05.

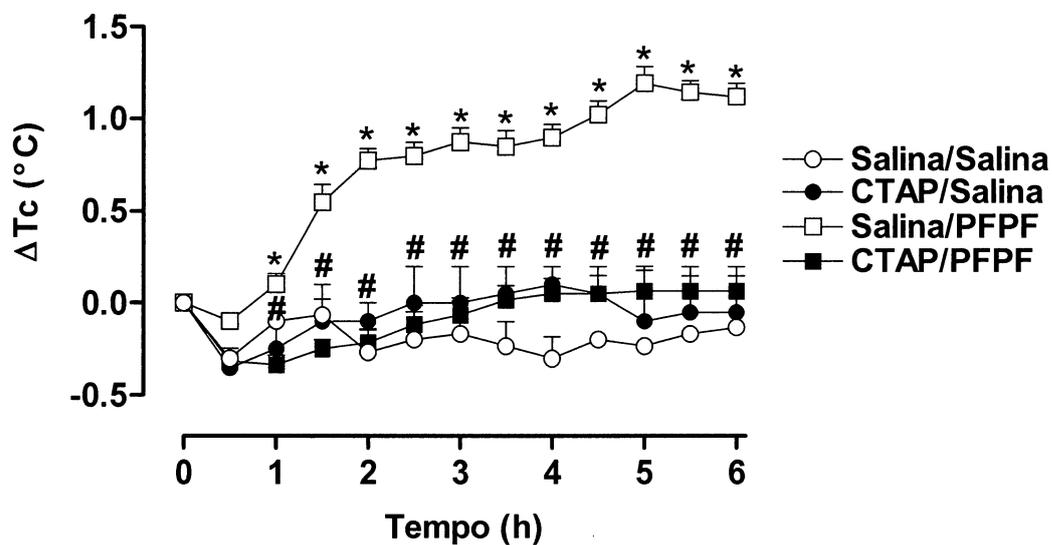


Figura 21: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida pelo PFPF. Os animais receberam salina estéril $2\mu\text{l}$ i.c.v ou CTAP $1,0\ \mu\text{g}/2\mu\text{l}$ i.c.v, 30 minutos antes da administração do PFPF $100\ \text{ng}/2\mu\text{l}$ i.c.v ou de salina estéril $2\mu\text{l}$ i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=5$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina. # diferença significativa entre o grupo salina/PFPF $p<0,05$.

4.11 - Efeito do CTAP na resposta febril induzida pela PGE₂, PGF_{2α}, CRF e ET-1:

A administração central de PGE₂ promoveu um rápido e intenso aumento da temperatura corporal, porém com uma curta duração (apenas 1,0 h). O CTAP na dose de 1 µg/2µl, por sua vez, não modificou significativamente a temperatura corporal dos animais em relação àqueles que receberam somente salina. O pré-tratamento com CTAP nesta mesma dose não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela PGE₂ (Figura 22).

Por outro lado, a administração central de PGF_{2α} promoveu um rápido e intenso aumento da temperatura corporal, porém com uma curta duração (apenas 1,0 h), seguido de um segundo aumento menos intenso que se manteve até o final do experimento. O CTAP na dose de 1 µg/2µl não modificou significativamente a temperatura corporal dos animais em relação àqueles que receberam somente salina. O pré-tratamento com CTAP nesta mesma dose produziu uma redução de 50,0% no pico inicial da resposta febril induzida pela PGF_{2α}, contudo ele não promoveu qualquer alteração na segunda fase da resposta febril deste pirogênio central (Figura 23).

O CRF promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 minutos, com pico da resposta em 4,5 h e sustentável até a 6,0 h. O CTAP na dose de 1 µg/2µl não modificou significativamente a temperatura corporal dos animais em relação àqueles que receberam somente salina. O pré-tratamento com CTAP nesta mesma dose produziu uma redução de 56,6% na resposta febril induzida pelo CRF. Esta redução foi observada a partir de 30 min, mantendo-se até 4,5 h (Figura 24).

Já a ET-1 promoveu um aumento significativo da temperatura corporal a partir de 30 min, com pico da resposta em 4,5 h e sustentável até a 6,0 h. O pré-tratamento com CTAP, não modificou a temperatura corporal dos animais, em relação àqueles que receberam somente salina. O CTAP causou uma redução praticamente total da resposta febril da ET-1 (81,3%). Esta redução foi observada a partir de 30 min, mantendo-se até a 6 h (Figura 25).

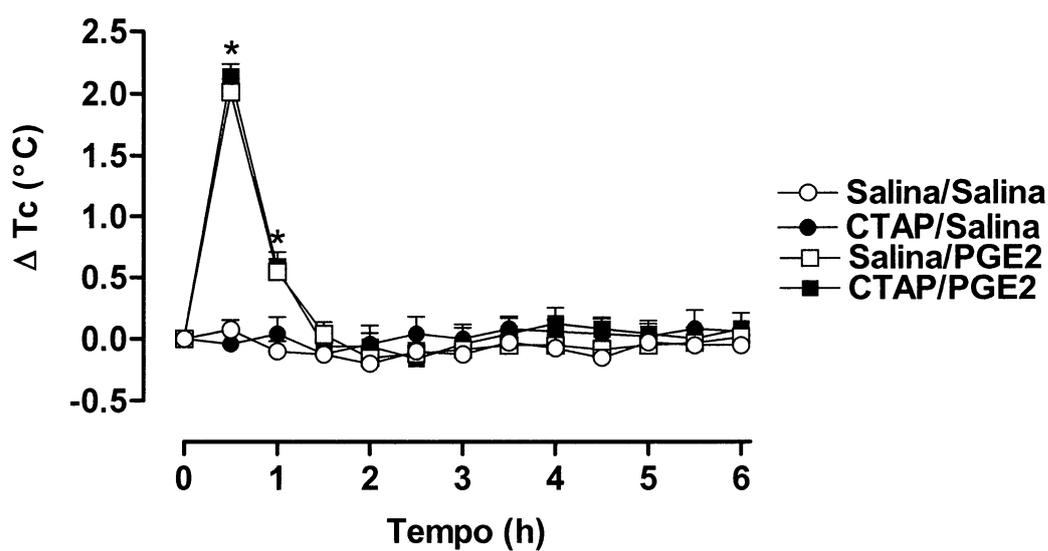


Figura 22: Efeito do CTAP na resposta febril induzida por PGE₂. Os animais receberam salina estéril 2 μ l i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l i.c.v, 30 minutos depois os animais receberam salina 2 μ l i.c.v ou PGE₂ 125 ng/2 μ l i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina.

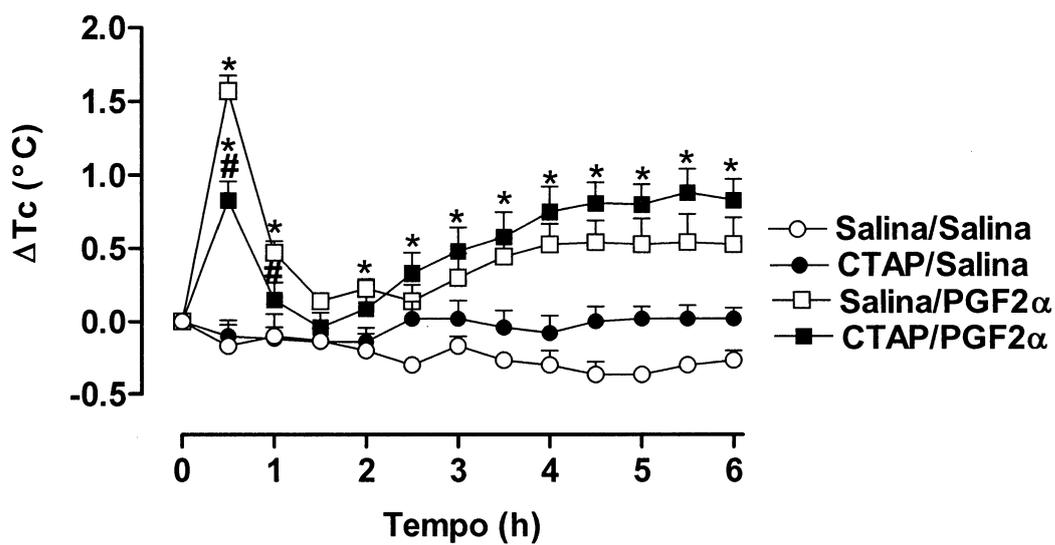


Figura 23: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida por PGF_{2α}. Os animais receberam salina estéril 2μl i.c.v ou CTAP 1,0 μg/2μl i.c.v, 30 minutos depois os animais receberam salina 2μl i.c.v ou PGF_{2α} 500 ng/2μl i.c.v. Os pontos representam a média ± EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n=5-6). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo sal/sal; # diferença significativa em relação ao grupo salina/PGF_{2α}.

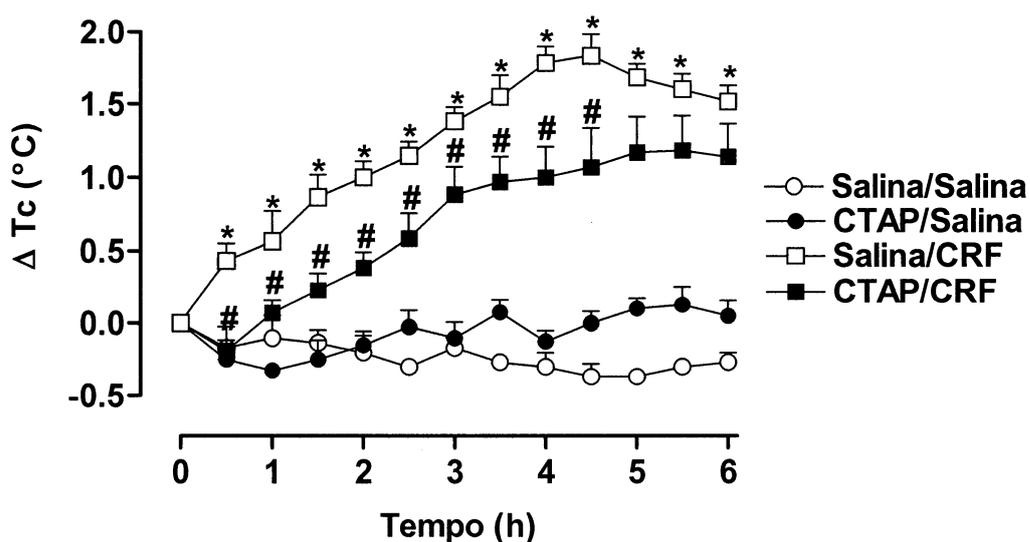


Figura 24: Efeito do CTAP na resposta febril induzida pelo CRF. Os animais receberam salina estéril Sal 2 μ l i.c.v ou CTAP 1,0 μ g/2 μ l icv, 30 minutos antes da administração de salina 2 μ l icv ou CRF 2,5 μ g/2 μ l i.c.v. Os pontos representam a média \pm EPM da variação da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) dos animais (n=5-7). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina; # diferença significativa entre o grupo salina/CRF p<0,05.

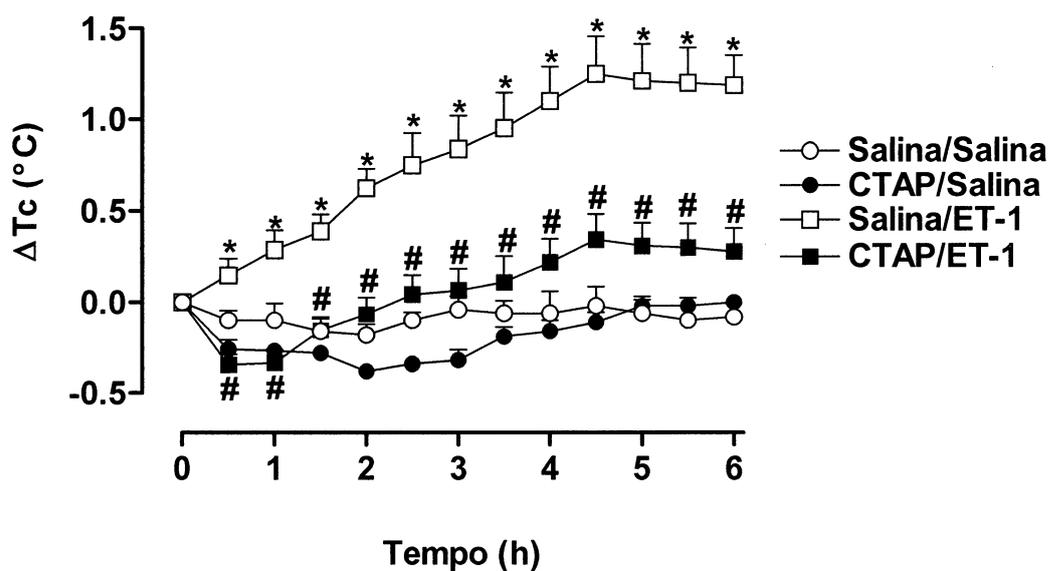


Figura 25: Efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida por ET-1. Os animais receberam salina estéril $2\mu\text{l}$ i.c.v ou CTAP $1,0\ \mu\text{g}/2\mu\text{l}$ i.c.v e após 30 minutos os animais receberam salina $2\mu\text{l}$ i.c.v ou ET-1 $1,0\ \text{pmol}/2\mu\text{l}$ i.c.v. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média (EPM) da variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais ($n=5-10$). * Representa a diferença significativa em relação ao grupo salina/salina; # diferença significativa entre o grupo salina/ET-1 $p<0,05$.

5 – DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a contribuição dos opióides no controle normal da temperatura corporal, assim como na resposta febril desencadeada por LPS e por mediadores periféricos e centrais envolvidos neste processo. Embora o envolvimento dos opióides no controle da temperatura corporal já venha sendo investigado há muito tempo, os dados disponíveis não permitem uma visão clara do papel destes peptídeos endógenos nesta resposta, principalmente pela variedade de espécies em que os estudos foram realizados, bem como por muitos destes estudos utilizarem antagonistas não específicos. Ainda, não havia estudos onde a relação destes peptídeos endógenos com os mediadores centrais da resposta febril prostaglandinas, CRF, e endotelina-1 fosse avaliada.

Inicialmente, avaliamos o efeito de antagonistas opióides na resposta febril de um pirogênio exógeno, o LPS, que simula uma infecção bacteriana. Este pirogênio promoveu uma resposta febril significativa e duradoura. O pré-tratamento dos animais com doses crescentes do antagonista opióide não seletivo naloxona, reduziu de maneira dose-dependente a resposta febril induzida por esta toxina bacteriana. Este resultado sugere que a ativação de receptores opióides por seus ligantes endógenos participe no desencadeamento da resposta febril durante a reação de fase aguda. No entanto, não se pode determinar por este resultado o receptor responsável por esta resposta, já que a naloxona é um antagonista opióide não seletivo, podendo bloquear tanto receptores μ , κ e δ .

Apesar deste fato, a naloxona apresenta maior afinidade para os receptores μ -opióide (BLATTEIS et al., 1990). Sendo assim, para determinar se este seria o receptor envolvido no desenvolvimento da resposta febril avaliamos o efeito do antagonista seletivo dos receptores μ -opióide CTAP na resposta febril induzida pelo LPS. O pré-tratamento dos animais com CTAP, de maneira similar, promoveu uma redução dose dependente da resposta febril induzida pelo LPS sugerindo que o envolvimento dos opióides endógenos nesta resposta seja mediado pela ativação de receptores μ opioidérgicos. Estes dados confirmam resultados anteriores obtidos por outros pesquisadores, inclusive utilizando outras espécies animais. Em 1990, BLATTEIS et al., observaram que a naloxona era capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS em cobaias. No entanto, o receptor

envolvido nesta resposta só foi confirmado no ano de 2000 por BENAMAR et al. Utilizando também o CTAP, estes pesquisadores obtiveram uma redução significativa da resposta febril induzida pelo LPS em ratos, sugerindo que o envolvimento dos opióides endógenos nesta resposta seja mediado pela ativação dos receptores μ opioidérgicos.

No entanto, para confirmar estes dados é importante avaliar se estes antagonistas não promovem, por si só, uma ruptura do mecanismo termorregulatório. Uma possibilidade seria a de que o sistema opióide poderia estar tonicamente ativado, ou seja, ele contribuiria para manter a temperatura corporal em condições normais. Se este fosse o caso, então a administração de um antagonista opióide perturbaria o sistema e seria observada uma alteração na temperatura corporal. Para investigar esta hipótese, avaliou-se o efeito da naloxona na temperatura corporal de animais submetidos à diferentes temperaturas ambiente.

A administração de naloxona, na dose que foi efetiva para reduzir a resposta febril induzida pelo LPS em animais mantidos na temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, zona de termoneutralidade para ratos (GORDON, 1990), causou uma pequena, mas não significativa redução da temperatura corporal. Por sua vez, a administração do antagonista β -adrenérgico não seletivo propranolol na dose de 20 mg/kg, mas não na de 10 mg/kg promoveu uma redução significativa da temperatura corporal nos primeiros 30 minutos do experimento. Além disso, a administração de propranolol na dose de 20 mg/kg promove uma pequena queda na pressão arterial de animais anestesiados (resultado não apresentado). Estes dados nos permitem sugerir que, pelo menos quando mantida a temperatura ambiente na zona de termoneutralidade, não há ruptura dos mecanismos termorregulatórios quando se administra os antagonistas opióide, ao contrário do que ocorre quando o sistema nervoso autônomo β -adrenérgico é bloqueado pelo propranolol. Entretanto, a zona de termoneutralidade, pode ser entendida como uma faixa de temperatura ambiente onde os mecanismos de perda e ganho de calor se anulam (GORDO, 1990). Assim, uma análise mais precisa do possível envolvimento de substâncias na termorregulação requer a avaliação do

comportamento termorregulatório em temperaturas diferentes da termoneutralidade. Selecionamos utilizar uma temperatura abaixo da termoneutralidade (20°C) a fim de favorecer a perda de calor, já que a administração dos antagonistas estaria diminuindo a febre.

A administração de naloxona nesta mesma dose, promoveu uma queda significativa na temperatura corporal em animais mantidos em uma temperatura abaixo da zona de termoneutralidade (20 °C). A administração da maior dose de propranolol nesta temperatura também promoveu uma acentuada queda da temperatura corporal logo nos primeiros 30 minutos retornando ao normal 2,0 h após a administração. Estes resultados sugerem que ambos os sistemas, opióide e simpático via receptores β -adrenérgicos, parecem estar ativados nestas condições, contribuindo para a manutenção da temperatura corporal. No entanto, no caso da naloxona por tratar-se de um antagonista inespecífico, este efeito pode ser ocasionado pela ativação de outros receptores que não o receptor μ . A participação do sistema nervoso autônomo via receptores β -adrenérgicos no controle da temperatura corporal já está bem documentada. Em temperaturas abaixo da termoneutralidade a temperatura corporal pode ser mantida pelo aumento na produção de calor como, por exemplo, através dos tremores e/ou pela manutenção de calor como, por exemplo, pela vasoconstrição periférica (BANET et al., 1977).

De modo geral, acredita-se que os processos de manutenção/conservação de calor induzidos pelo frio sejam controlados pelo sistema nervoso simpático via receptores β -adrenérgicos (HORWITZ et al., 1976). Estes mesmos pesquisadores observaram que a queda na taxa metabólica, observada quando da administração de bloqueadores β -adrenérgicos, tais como o propranolol, é devida principalmente ao bloqueio da vasoconstrição periférica.

Além disso, sugere-se que um dos possíveis mecanismos para a eficácia dos β -bloqueadores decorra de uma diminuição central da atividade simpática (TAKITA et al., 1995). Isso aparentemente seria possível já que o propranolol pode facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (MYERS et al., 1995).

Quanto à participação dos opióides no controle da temperatura corporal outros pesquisadores observaram que a naloxona em doses abaixo de 10 mg/kg (faixa em que atua principalmente em receptores μ -opióide) e em temperaturas próximas a zona de termoneutralidade, não promove alterações significativas da temperatura corporal (ROMANOVSKY et al., 1998). Entretanto, em temperaturas abaixo da zona de termoneutralidade esta droga produz uma pequena, mas significativa hipotermia. (HANDLER et al., 2001). Estes pesquisadores sugeriram que esta hipotermia pode ser o resultado do desequilíbrio entre os receptores μ -opióide, que estão bloqueados pela naloxona e os receptores κ -opióide que estão livres favorecendo o efeito hipotérmico de ligantes endógenos nos receptores κ nestas condições (HANDLER et al., 2001).

BOURHIM et al., (1997), observaram ainda que animais climatizados em temperaturas abaixo da zona de termoneutralidade apresentam um aumento nos níveis circulantes de β -endorfina, metaencefalina e dinorfina. Assim a administração de naloxona a um animal climatizado em temperaturas abaixo da zona de termoneutralidade pode bloquear os receptores μ -opióide, impedindo o efeito do aumento da temperatura corporal pela β -endorfina circulante e induzindo hipotermia através da ligação da dinorfina agindo sobre os receptores κ livres.

Em adição, outros pesquisadores observaram que além de antagonizar os receptores opióides, a naloxona apresenta ainda outros efeitos adicionais tais como a liberação de arginina vasopressina (AVP) do núcleo paraventricular (DAY, 1987; ZHAO et al., 1988), que é um potente agente antipirético endógeno (RUWE et al., 1985).

Para melhor avaliar a participação dos opióides no controle da temperatura corporal, utilizamos antagonistas opióides seletivos para os receptores μ , κ e δ . A administração do antagonista seletivo para os receptores opióides μ , CTAP na dose efetiva em reduzir a resposta febril induzida pelo LPS, em animais mantidos tanto à 28°C, como à 20°C, não promoveu alterações significativas na temperatura corporal durante todo o período de avaliação. Estes dados demonstram que os opióides não participam do controle da temperatura corporal através da ativação

dos receptores μ , mesmo em condições de temperatura abaixo da zona de termoneutralidade. Este resultado também foi importante pois nos permitiu utilizar com segurança este antagonista no decorrer do estudo.

Adicionalmente, avaliamos ainda a possibilidade de outros receptores opióides estarem sendo ativados para a manutenção da temperatura corporal normal. Isto se torna importante devido às complexas interações entre os receptores opióide e seus ligantes endógenos. A administração dos antagonistas opióide κ -seletivo nor-BNI e δ -seletivo naltrindol em doses equimolares a do CTAP, em animais ambientados tanto na temperatura de 28°C como na de 20 °C, também não promoveram qualquer alteração da temperatura corporal durante todo o período de avaliação.

Estes dados corroboram os resultados anteriores em que a administração destes mesmos antagonistas seletivos CTAP, nor-BNI e naltrindol em animais submetidos a diferentes temperaturas ambiente (5, 20 e 30°C) não promoveram qualquer alteração na temperatura corporal quando administrados sozinhos (HANDLER et al., 1992; BENAMAR et al., 2000). Deste modo, nossos dados em conjunto permitem sugerir que os opióides endógenos não atuam no controle da temperatura corporal por nenhum dos receptores analisados, tanto em condição de temperatura ambiente na faixa de termoneutralidade como abaixo dela e reforçam que o efeito hipotérmico da naloxona se deva a liberação de antipiréticos endógenos.

Para confirmar estes dados espera-se que a administração de um agonista opióide induza um aumento da temperatura corporal. A administração periférica de morfina (opióide exógeno protótipo do grupo), assim como a central, promoveu um aumento dose dependente da temperatura corporal. Este aumento da temperatura corporal foi acompanhado por uma redução da temperatura da pele. Este resultado nos permite inferir indiretamente que o aumento da temperatura corporal foi acompanhado por uma vasoconstrição periférica. Estes dados indicam que o aumento da temperatura corporal causado pela morfina não é apenas um efeito hipertérmico, mas sim um aumento controlado da temperatura corporal.

COX et al. (1976) utilizando baixas doses de morfina, observaram que o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina é acompanhado por vasoconstrição periférica o que reduz a perda de calor. Por sua vez LIN, (1982) observou que a administração direta de morfina no hipotálamo de ratos promoveu um aumento dose-dependente da temperatura corporal em diferentes temperaturas ambiente (8-30°C). Este pesquisador demonstrou ainda que este efeito ocorreu devido a um aumento da taxa metabólica e por uma vasoconstrição periférica. THORNHILL & DESAUTELS (1984) observaram que a hipertermia induzida por baixas doses de morfina não se deve à ativação do tecido adiposo marrom. Estes resultados demonstram que a morfina promove a ativação de mecanismos coordenados de ganho de calor sugerido que os opióides estariam envolvidos no controle da temperatura corporal.

Além destes estudos, existem evidências que sugerem que o efeito da morfina não seja meramente um efeito hipertérmico. Estudos utilizando preparações de hipotálamo demonstraram que doses elevadas de morfina podem aumentar a taxa de disparo de neurônios sensíveis ao calor, o que seria condizente com o efeito de hipotermia observado com altas doses de morfina (BALDINO et al., 1980). Por outro lado, em outro estudo foi demonstrado que a morfina, em pequenas doses, pode diminuir a atividade destes neurônios e aumentar a atividade de neurônios sensíveis ao frio (LIN et al., 1984). Estes dados apontam que os neurônios responsáveis pelo controle da temperatura corporal possuem receptores para opióides e que a administração de um agonista opióide promove efeitos coordenados de ativação e inibição destes neurônios que culminam com uma resposta de aumento controlado da temperatura corporal.

Na avaliação do efeito dos antagonistas opióides sobre o aumento da temperatura corporal induzido pela morfina observamos que tanto a naloxona quanto o CTAP foram efetivos em abolir esta resposta, sugerindo que há ativação de receptores μ opióide de maneira similar ao que ocorre quando da administração de LPS. Além disso, a redução da temperatura da pele induzida pela morfina administrada tanto pela via periférica como central, também foi abolida pelo CTAP, sugerindo que os efeitos coordenados que são responsáveis

pelo aumento da temperatura corporal sejam controlados pelos opióides e que isto ocorra através da ativação de receptores μ no sistema nervoso central.

Sendo assim, o sistema opióide parece ser ativado em determinadas situações como na reação de fase aguda, contribuindo para o desenvolvimento da resposta febril. Em particular, este sistema parece atuar nesta resposta via ativação de receptores μ centrais e o candidato mais provável para a ativação deste receptor seria o opióide endógeno β -endorfina, uma vez que este apresenta grande afinidade pelos receptores μ -opióide (GOLDSTEIN et al., 1985; DONNERER et al., 1986). Ainda a administração periférica de doses pirogênicas de LPS ou i.c.v de IL-1 β ou TNF- α foram capazes de aumentar a concentração de β -endorfina no hipotálamo e na APO/HA de ratos de maneira dose dependente (KNIGGE et al., 1994; ZHAO et al. 1995 e XIN et al. 1997). Outro dado que sugere o envolvimento da β -endorfina na resposta febril é o de que a APO/HA, o centro primário de controle da temperatura corporal, possui uma concentração relativamente alta de neurônios que contém este peptídeo (KRIEGER et al., 1979; SNYDER et al., 1979). Além disso, a administração de β -endorfina induziu hipertermia em cobaias, gatos, camundongos e ratos (CLARK et al., 1981; KANDASAMY et al., 1983; HUIDOBRO-TORO et al., 1979; GORDON et al., 1981; MARTIN et al., 1979). Em coelhos, a administração central de β -endorfina origina uma série de eventos fisiológicos coordenados que resultam em um aumento dose-dependente da temperatura corporal. Este efeito hipertérmico ocorre devido a uma rápida vasoconstrição periférica, que é indicada pela redução na temperatura da orelha somada a uma inibição da perda de calor por evaporação (KANDASAMY et al., 1983).

De que maneira a ativação dos receptores μ -opióide poderiam promover estes efeitos? Os receptores μ -opióide são acoplados a proteínas G inibitórias, que atuam inibindo a atividade da enzima adenilatociclase diminuindo conseqüentemente a produção de AMP cíclico (HERZ, 1993). Eles ainda podem atuar também, promovendo a ativação das correntes de K⁺ ativadas pelo receptor e suprimindo as correntes de Ca⁺⁺ controladas pela voltagem (DUGGAN &

NORTH, 1983). Estes receptores são portanto receptores inibitórios, causando em geral hiperpolarização de neurônios.

A febre consiste na elevação controlada do ponto de termorregulação hipotalâmico (DINARELLO et al., 1988). A elevação do ponto termorregulatório é desencadeada pela diminuição da atividade dos neurônios sensíveis ao calor que controlam os mecanismos de perda de calor (vasodilatação periférica, sudorese e redução da secreção de hormônios tireoidianos e adrenais) e pelo aumento da ativação dos neurônios sensíveis ao frio que são responsáveis pelos mecanismos de produção e retenção de calor (vasoconstrição periférica, termogênese induzida por tremores e aumento da taxa metabólica no tecido adiposo marrom) (DINARELLO et al., 1988; KLUGER, 1991; BOULANT, 2000).

Sendo assim, sugere-se que os opióides poderiam atuar suprimindo a atividade dos neurônios sensíveis ao calor, através da ativação de receptores μ -opióide. Este dado é corroborado pelos resultados de YAKIMOVA et al., (1996). Estes pesquisadores demonstraram que a administração de PL-017 um agonista μ -opióide altamente seletivo administrado em preparações de hipotálamo causa uma inibição na atividade dos neurônios sensíveis ao calor de forma dose dependente. Por sua vez, o antagonista μ -seletivo CTOP foi capaz de bloquear este efeito do PL-017, sem promover qualquer alteração na taxa de disparo destes neurônios por si só, sugerindo que este efeito é mediado especificamente pelos receptores μ -opióide.

Além disso, os opióides poderiam atuar controlando também a atividade de neurônios sensíveis ao frio. YAKIMOVA et al., (1996) demonstraram que estes neurônios estão sob um controle inibitório tônico de neurônios gabaérgicos. Por sua vez os opióides podem atuar na pré-sinapse, alterando a liberação deste neurotransmissor (CAPOGNA et al., 1993; NORTH, 1993). Um efeito de inibição μ -específico na liberação do neurotransmissor inibitório GABA, foi observado em cultura de hipocampo de ratos (COPAGNA et al., 1993). Sendo assim a ativação dos receptores μ -opióide inibiria o efeito inibitório tônico que os neurônios GABAérgicos exercem sobre os neurônios sensíveis ao frio, permitindo um

aumento na frequência de disparo destes neurônios desencadeando os mecanismos de ganho e conservação de calor.

Até o momento foi demonstrado que os opióides endógenos participam na resposta febril do PEx LPS, particularmente através da ativação de receptores μ . Contudo, o LPS não é o responsável direto pela alteração da temperatura corporal. Ao ativar células do sistema imune, em especial os macrófagos, estes passam a produzir e liberar citocinas inflamatórias que chegam ao sistema nervoso central onde através da indução da produção de mediadores centrais, desencadeiam a resposta febril (ZEISBERGER, 1999).

Portanto, o passo seguinte foi avaliar a participação de opióide via ativação de receptores μ na febre induzida por citocinas.

O CTAP não modificou a febre induzida pela IL-1 β , reduziu a febre do TNF- α e aboliu a febre induzida pela IL-6, MIP-1 α e PFPF. O fato de que para a maior parte das citocinas o CTAP reduziu a febre sugere que os opióides endógenos estão sendo sintetizados e liberados após a síntese de citocinas e não antes.

Algumas destas citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) parecem exercer seus efeitos na febre via indução de COX-2 (CAO et al., 1996; CAO et al., 1998; LI et al., 2003) e portanto de PGs (DINARELLO et al. 1988; ROTHWELL 1990). Sendo assim os seus efeitos podem ser bloqueados por AINES (SOUZA et al., 2002).

Embora pouco provável, consideramos a possibilidade de que o CTAP poderia estar reduzindo a produção central de PGE₂ o que poderia explicar a sua eficiência em reduzir tanto a resposta febril do LPS como das citocinas que dependem desta PG.

Contudo, como esperado, este não parece ser o caso já que o pré-tratamento com o CTAP, apesar de reduzir a resposta febril do LPS não alterou significativamente as concentrações da PGE₂ no CSF dos animais que receberam esta toxina, o que sugere que a indução de COX-2 por estas citocinas não estaria sendo afetada. Além disso, o AINE indometacina, não alterou a febre induzida pela morfina.

É importante ressaltar que é conhecido que estas citocinas estão promovendo a síntese de diferentes PGs. Enquanto o TNF- α induz febre via PGE₂

a IL-6 e a IL-1 β induzem via PGF_{2 α} e CRF (DINARELLO et al. 1988; ROTHWELL 1990; ZAMPRONIO et al., 2000). No entanto, o CTAP não altera a febre induzida por PGE₂, apesar de reduzir a febre do TNF- α , mas reduz o primeiro pico da febre induzida por PGF_{2 α} e a resposta febril induzida pelo CRF, apesar de não alterar a resposta febril da IL-1 β . Sendo assim, a participação dos opióides endógenos para o desenvolvimento da resposta febril das citocinas varia, sendo maior para a IL-6, menor para o TNF- α e inexistente para a IL-1 β .

HANDLER e colaboradores (1998) utilizando o CTAP, também não observaram redução da resposta febril induzida pela IL-1 β . Outro dado condizente com a não participação dos opióides na febre induzida pela IL-1 β é o de que a ativação dos neurônios da APO/HA produzidas pela IL-1 foi revertida por salicilato de sódio mas não pela naloxona. Isto indica que os efeitos da IL-1 são mediados pela produção central de PGs mas não de opióides endógenos (HORI et al., 1991). Todavia, outros pesquisadores observaram que a resposta febril induzida pela administração i.v de TNF- α e IL-6 em cobaias foram reduzidas pela administração s.c de naloxona (BLATTEIS et al., 1990). BENAMAR e colaboradores (2002) observaram que a resposta febril induzida pela IL-6 também foi revertida pelo pré-tratamento com CTAP i.c.v. em ratos.

A explicação mais plausível para estes resultados é que cada citocina, quando administrada separadamente estaria ativando vias neuronais diferenciadas. A IL-1 β estaria induzindo a síntese de COX-2 em populações de células, provavelmente nas células endoteliais da microvasculatura cerebral (CAO et al., 1996) e estas por sua vez, sintetizariam PGF_{2 α} que atuaria nos neurônios de frio e de calor da APO/HA induzindo febre. Além disso, a PGF_{2 α} atuaria em locais que liberariam CRF e estes também poderiam atuar nos neurônios termossensíveis da APO/HA induzindo febre. Infelizmente não existem dados que confirmem os efeitos do CRF em neurônios termossensíveis.

Além da ação da IL-1 β nas células endoteliais induzindo COX-2, FAGARASAN e colaboradores (1990) observaram que a IL-1 estimula a liberação e de β -endorfina em células da pituitária anterior de ratos e camundongos.

Provavelmente esta liberação de β -endorfina seja ativada pelo CRF o qual estimula a síntese e liberação dos peptídeos produzidos a partir da POMC (VALE et al., 1981). Desta forma era de se esperar que houvesse uma redução mesmo que parcial da resposta febril da IL-1 β , considerando que o CTAP foi capaz de reduzir parcialmente a resposta febril induzida pelo CRF. Uma possível explicação para esta aparente contradição pode residir no fato de que a IL-1 produz uma diminuição significativa na ligação de todos os agonistas opióides- μ , κ e δ em várias regiões do cérebro de cobaias, sendo a redução maior para os agonistas μ (AHAMED et al., 1985). Para todos os ligantes empregados a maior redução na ligação ocorreu no hipotálamo. Desta forma, a contribuição que os opióides poderiam exercer no desenvolvimento da resposta febril desta citocina ficaria reduzida.

Além disso, ERICH et al. (1998) avaliaram a expressão do receptor μ na microvasculatura cerebral. Eles evidenciaram que não há expressão do receptor μ -opióide nem em condições basais assim como após a estimulação com IL-1 α ou β ou com ambas simultaneamente. RUZICKA e AKIL (1997) avaliaram também o efeito da IL-1 β na expressão do mRNA para o receptor μ -opióide em diferentes estruturas cerebrais. Eles observaram que ocorre um aumento na expressão deste gene no estriado, cerebelo e hipocampo, mas não nas regiões cortical e no hipotálamo principal região envolvida no controle da temperatura corporal.

Já a IL-6 por sua vez, estaria atuando em duas populações celulares diferentes, induzindo também COX-2 e conseqüentemente síntese de PGF_{2 α} nas células endoteliais da microvasculatura (LI et al., 2003). E esta PG, por sua vez, atuaria liberando CRF (ROTHWELL, 1990). Em parte uma ação similar a da IL-1 β . Em adição a esta liberação de PGs, nossos dados indicam que esta citocina também estaria promovendo a liberação de opióides endógenos que poderiam atuar na APO/HA inibindo neurônios de calor e/ou ativando os neurônios sensíveis ao frio (através da retirada da inibição gabaérgica).

Com relação a resposta febril induzida pelo TNF- α , uma vez que sua resposta febril é reduzida pelo CTAP, mas a resposta febril induzida por seu

mediador central PGE₂ não é reduzida por este antagonista poderia levar a uma primeira aproximação de que o TNF- α estaria liberando opióides endógenos e que estes, por sua vez, de algum modo estariam induzindo a síntese/liberação de PGE₂. Em primeiro lugar este não deve ser o caso, pois nem a febre induzida pela morfina (presente estudo) nem a da β -endorfina são bloqueadas por indometacina (KANDASAMY et al., 1983), sugerindo que PGE₂ e opióides sejam duas vias distintas de indução de febre. Portanto, o mais provável é que assim como a IL-6 o TNF- α esteja agindo em dois tipos celulares diferentes, a microvasculatura cerebral, determinando a síntese de COX-2 seguida de uma ativação de uma seqüência de eventos que determina a síntese de PGE₂ que inibiria os neurônios de calor e ativaria os neurônios de frio (CAO et al., 1998; GORDON et al., 1980; RANELS et al., 2003). Por outro lado o TNF- α estaria atuando ainda através da liberação de opióides endógenos pela ativação direta de neurônios opioidérgicos. Desta forma a febre induzida pelo TNF- α seria o resultado da ativação destas duas vias.

Até este momento foi avaliada e discutida a participação dos opióides na resposta febril de citocinas dependentes da geração de PGs. Como descrito anteriormente, as PGs não são os únicos mediadores centrais da resposta febril.

Assim, o passo seguinte de nossa investigação foi avaliar o efeito do CTAP sobre a resposta febril induzida por citocinas cuja resposta não são bloqueadas por antiinflamatórios não esteroidais como indometacina, e que desta forma atuam independentemente de síntese de prostanóides.

Dentre estes mediadores destacam-se algumas quimiocinas como o MIP-1 α e β e a IL-8 (DAVATELIS et al., 1989; ZAMPRONIO et al., 1994; MIÑANO et al., 1990, SCHALL et al., 1990).

Foi observado que o pré-tratamento com CTAP aboliu a resposta febril induzida pelo MIP-1 α , sugerindo que a indução da síntese e liberação dos opióides endógenos é essencial para a resposta febril desta quimiocinas. Outros autores empregando o mesmo antagonista obtiveram resultado semelhante utilizando outro membro desta família o MIP-1 β (HANDLER et al., 1998).

É importante ressaltar que apesar do MIP-1 α e β compartilharem uma homologia de mais de 70% em sua seqüência de aminoácidos (WOLPE et al., 1988) e de exercerem alguns efeitos semelhantes na inflamação, a administração separada de cada um destes peptídeos na APO/HA na mesma dose promovem respostas febris distintas. O MIP-1 β promove um aumento rápido da temperatura corporal que se mantém por volta de 2,0 h (MIÑANO et al., 1996). Estudos desenvolvidos por nosso grupo, incluindo este estudo, demonstram que o MIP-1 α causa um aumento gradual da temperatura corporal e que persiste por mais tempo.

No caso do MIP-1 α ou β , não existem dados que demonstrem que sua ação é dependente de CRF, portanto é difícil dizer se esta citocina estaria ou não ativando diretamente o sistema opioide ou através do CRF.

Outro mediador que atua induzindo febre independente de PGs é o PFPF. O efeito de sua administração central na temperatura corporal não foi alterado pela indometacina. Contudo, ele parece atuar via CRF, já que a resposta febril deste fator é bloqueada pelo antagonista de CRF, α -helicoidal CRF₉₋₄₁ (ZAMPRONIO et al., 2000).

O pré-tratamento dos animais com o CTAP aboliu a resposta febril induzida por este fator, sugerindo que este mediador além de atuar via CRF, também atua via opióides endógenos mais especificamente pela ativação dos receptores μ -opióide. No entanto, é importante ressaltar também que particularmente o PFPF é o único dos PE testados cuja febre foi bloqueada pelo antagonista de receptores endotelinérgicos ET-B BQ788, sugerindo a participação de ET na resposta febril induzida por este fator (FABRICIO et al., 2000; FABRICIO et al., 2002). A febre induzida pela ET-1 por sua vez foi completamente abolida pelo CTAP o que sugere que a via de atuação deste novo pirogênio, o PFPF, envolva CRF, ET-1.

Estes dados em conjunto, demonstram que para as citocinas que atuam independente de PGs, a liberação de opióides pode ser essencial para o desenvolvimento da resposta febril. Assim, embora estas citocinas não atuem a síntese de COX-2 e conseqüentemente síntese de prostanóides elas devem promover diretamente a liberação de opióides que inibem neurônios de calor e/ou

ativam os neurônios de frio (através da retirada da inibição do GABA) que resultaria em febre.

Nossos dados em conjunto nos permitem concluir que os opióides endógenos parecem não atuar no controle da temperatura corporal em condições basais. No entanto, estes peptídeos, através da ativação de receptores μ -opióide, são importantes mediadores envolvidos no desenvolvimento da resposta febril. Estes opióides endógenos seriam liberados após a síntese/liberação de mediadores centrais $\text{PGF}_{2\alpha}$, CRF e ET-1, mas não de PGE_2 , bem como através de uma ação de algumas citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 sobre neurônios opioidérgicos. Eles atuam inibindo neurônios de calor e/ou ativando os neurônios de frio (através da retirada da inibição gabaérgica) para promover o aumento controlado da temperatura corporal. Além disso, é importante ressaltar que estes opióides parecem ser essenciais para o desenvolvimento da febre das citocinas que independem da participação de prostanóides.

6 – CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- Os opióides endógenos parecem não atuar no controle da temperatura corporal em condições basais.
- Estes peptídeos, através da ativação de receptores μ -opióide, são importantes mediadores envolvidos no desenvolvimento da resposta febril do TNF- α , IL-6, MIP-1 α e PFPF, mas não para a IL-1 β .
- Os opióides endógenos seriam liberados após a síntese/liberação de mediadores centrais PGF_{2 α} , CRF e ET-1, mas não de PGE₂, bem como através de uma ação de algumas citocinas como TNF- α e IL-6 sobre neurônios opioidérgicos.
- Estes peptídeos atuariam inibindo neurônios de calor e/ou ativando os neurônios de frio (através da retirada da inibição gabaérgica) para promover o aumento controlado da temperatura corporal.
- Os opióides parecem ser essenciais para o desenvolvimento da febre das citocinas que independem da participação de prostanóides.

7 - REFERÊNCIAS

ADLER, B.A.; GOODMAN, R.R.; PASTERNAK, G.W. Quantitative autoradiographic distribution of meptazinol-sensitive binding sites in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, v.8, n.4, p.471-6, 1988.

ADLER, M.W.; GELLER, E.B.; ROSOW, C.E.; COCHIN, J. The opioid system and temperature regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.28, p.429-49, 1988.

AHMED, M.S.; LLANOS, Q.J.; DINARELLO, C.A.; BLATTEIS, C.M. Interleukin 1 reduces opioid binding in guinea pig brain. *Peptides*, v.6, n.6, p.1149-54, 1985.

AKIL, H.; MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. [Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periaqueductal gray matter and morphine analgesia]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, v.274, n.26, p.3603-5, 1972.

AKIL, H.; MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, v.191, n.4230, p.961-2, 1976.

AKIL, H.; OWENS, C.; GUTSTEIN, H.; TAYLOR, L.; CURRAN, E.; WATSON, S. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend*, v.51, n.1-2, p.127-40, 1998.

ALOISI, F.; DE SIMONE, R.; COLUMBA-CABEZAS, S.; LEVI, G. Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities. *J Neurosci Res*, v.56, n.6, p.571-80, 1999.

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

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, v.55, p.97-179, 1994.

BAJETTO, A.; BONAVIA, R.; BARBERO, S.; FLORIO, T.; COSTA, A.; SCHETTINI, G. Expression of chemokine receptors in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*, v.876, p.201-9, 1999.

BALDINO, F., JR.; BECKMAN, A.L.; ADLER, M.W. Actions of iontophoretically applied morphine on hypothalamic thermosensitive units. *Brain Res*, v.196, n.1, p.199-208, 1980.

BANET, M.; HENSEL, H. The control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. *J Physiol*, v.269, n.3, p.669-76, 1977.

BANKS, W.A.; ORTIZ, L.; PLOTKIN, S.R.; KASTIN, A.J. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain

in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, v.259, n.3, p.988-96, 1991.

BELKOWSKI, S.M.; ZHU, J.; LIU-CHEN, L.Y.; EISENSTEIN, T.K.; ADLER, M.W.; ROGERS, T.J. Sequence of kappa-opioid receptor cDNA in the R1.1 thymoma cell line. *J Neuroimmunol*, v.62, n.1, p.113-7, 1995.

BENAMAR, K.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Role of the nitric oxide pathway in kappa-opioid-induced hypothermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v.303, n.1, p.375-8, 2002.

BENAMAR, K.; XIN, L.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a mu-opioid receptor-selective antagonist in rats. *Eur J Pharmacol*, v.401, n.2, p.161-5, 2000.

BENIGNI, F.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; FANTUZZI, G.; VANDENABEELE, P.; TAKAHASHI, N.; SACCO, S.; FIERS, W.; BUURMAN, W.A.; GHEZZI, P. TNF receptor p55 plays a major role in centrally mediated increases of serum IL-6 and corticosterone after intracerebroventricular injection of TNF. *J Immunol*, v.157, n.12, p.5563-8, 1996.

BLATTEIS, C.M.; BEALER, S.L.; HUNTER, W.S.; LLANOS, Q.J.; AHOKAS, R.A.; MASHBURN, T.A., JR. Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull*, v.11, n.5, p.519-26, 1983.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. *Ann N Y Acad Sci*, v.840, p.608-18, 1998.

BLATTEIS, C.M.; XIN, L.; QUAN, N. Neuromodulation of fever: apparent involvement of opioids. *Brain Res Bull*, v.26, n.2, p.219-23, 1991.

BLIGH, J. The central neurology of mammalian thermoregulation. *Neuroscience*, v.4, n.9, p.1213-6, 1979.

BOULANT, J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*, v.31 Suppl 5, p.S157-61, 2000.

BOURHIM, N.; KABINE, M.; ELKEBBAJ, M.S. Characterization of opioid peptides and opioid receptors in the brain of jerboa (*Jaculus orientalis*), a hibernating rodent. *Brain Res Bull*, v.44, n.5, p.615-20, 1997.

BROADWELL, R.D.; BLEIER, R. A cytoarchitectonic atlas of the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, v.167, n.3, p.315-39, 1976.

BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; RIVIER, J.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. *Life Sci*, v.30, n.2, p.207-10, 1982.

BUNZOW, J.R.; SAEZ, C.; MORTRUD, M.; BOUVIER, C.; WILLIAMS, J.T.; LOW, M.; GRANDY, D.K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett*, v.347, n.2-3, p.284-8, 1994.

CABOT, P.J.; CARTER, L.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain*, v.93, n.3, p.207-12, 2001.

CANNON, J.G.; TOMPKINS, R.G.; GELFAND, J.A.; MICHIE, H.R.; STANFORD, G.G.; VAN DER MEER, J.W.; ENDRES, S.; LONNEMANN, G.; CORSETTI, J.; CHERNOW, B.; ET AL. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*, v.161, n.1, p.79-84, 1990.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res*, v.733, n.2, p.263-72, 1996.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol*, v.272, n.6 Pt 2, p.R1712-25, 1997.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res*, v.56, n.1-2, p.45-56, 1998.

CAPOGNA, M.; GAHWILER, B.H.; THOMPSON, S.M. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, v.470, p.539-58, 1993.

CARR, D.J.; DECOSTA, B.R.; KIM, C.H.; JACOBSON, A.E.; GUARCELLO, V.; RICE, K.C.; BLALOCK, J.E. Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for delta- and kappa-classes. *J Endocrinol*, v.122, n.1, p.161-8, 1989.

CARR, D.J.; KIM, C.H.; DECOSTA, B.; JACOBSON, A.E.; RICE, K.C.; BLALOCK, J.E. Evidence for a delta-class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol*, v.116, n.1, p.44-51, 1988.

CARTMELL, T.; POOLE, S.; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol*, v.526 Pt 3, p.653-61, 2000.

CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; YU, L. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J*, v.295 (Pt 3), p.625-8, 1993.

CHUANG, T.K.; KILLAM, K.F., JR.; CHUANG, L.F.; KUNG, H.F.; SHENG, W.S.; CHAO, C.C.; YU, L.; CHUANG, R.Y. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.216, n.3, p.922-30, 1995.

CIVELLI, O.; BIRNBERG, N.; HERBERT, E. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem*, v.257, n.12, p.6783-7, 1982.

CLARK, W.G. Effects of opioid peptides on thermoregulation. *Fed Proc*, v.40, n.13, p.2754-9, 1981.

CLARK, W.G.; HARRIS, N.F. Naloxone does not antagonize leukocytic pyrogen. *Eur J Pharmacol*, v.49, n.3, p.301-4, 1978.

COELHO, M.M.; LUHESHI, G.; HOPKINS, S.J.; PELA, I.R.; ROTHWELL, N.J. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. *Am J Physiol*, v.269, n.3 Pt 2, p.R527-35, 1995.

COLEMAN, R.A.; GRIX, S.P.; HEAD, S.A.; LOUTTIT, J.B.; MALLETT, A.; SHELDRIK, R.L. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, v.47, n.2, p.151-68, 1994.

CORDER, R.; CARRIER, M.; KHAN, N.; KLEMM, P.; VANE, J.R. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.26 Suppl 3, p.S56-8, 1995.

COX, B.; ARY, M.; CHESAREK, W.; LOMAX, P. Morphine hyperthermia in the rat: an action on the central thermostats. *Eur J Pharmacol*, v.36, n.1, p.33-9, 1976.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum*, v.36, n.2, p.147-57, 1993.

CVEJIC, S.; DEVI, L.A. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem*, v.272, n.43, p.26959-64, 1997.

DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; DAYER, J.M.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science*, v.243, n.4894 Pt 1, p.1066-8, 1989.

DAY, T.A.; CIRIELLO, J. Effects of renal receptor activation on neurosecretory vasopressin cells. *Am J Physiol*, v.253, n.2 Pt 2, p.R234-41, 1987.

DE SOUZA, G.E.; CARDOSO, R.A.; MELO, M.C.; FABRICIO, A.S.; SILVA, V.M.; LORA, M.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; RAE, G.A.; FERREIRA, S.H.; ZAMPRONIO, A.R. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. *Inflamm Res*, v.51, n.1, p.24-32, 2002.

DESJARDINS, G.C.; BRAWER, J.R.; BEAUDET, A. Distribution of mu, delta, and kappa opioid receptors in the hypothalamus of the rat. *Brain Res*, v.536, n.1-2, p.114-23, 1990.

DIAMANT, M.; DE WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. *Endocrinology*, v.129, n.1, p.446-54, 1991.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1. *Rev Infect Dis*, v.6, n.1, p.51-95, 1984.

DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, v.179 Suppl 2, p.S294-304, 1999.

DINARELLO, C.A.; BERNHEIM, H.A.; DUFF, G.W.; LE, H.V.; NAGABHUSHAN, T.L.; HAMILTON, N.C.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J Clin Invest*, v.74, n.3, p.906-13, 1984.

DINARELLO, C.A.; BUNN, P.A., JR. Fever. *Semin Oncol*, v.24, n.3, p.288-98, 1997.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res*, v.562, n.2, p.199-206, 1991.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*, v.10, n.1, p.168-89, 1988.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.A.; BEUTLER, 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. *J Exp Med*, v.163, n.6, p.1433-50, 1986.

DONNERER, J.; OKA, K.; BROSSI, A.; RICE, K.C.; SPECTOR, S. Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.12, p.4566-7, 1986.

DUGGAN, A.W. Electrophysiology of opioid peptides and sensory systems. *Br Med Bull*, v.39, n.1, p.65-70, 1983.

EDDY, N.B.; REID, J.G. studies of morphine, codeine, and other derivatives. VII. Dihydromorphine (Paramorphan), and dihydromorphine (Dilaudid) and Dihydrocodeine (Dicodine). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.52, p.468-93, 1934.

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. *J Exp Med*, v.172, n.6, p.1741-8, 1990.

EVANS, C.J.; KEITH, D.E., JR.; MORRISON, H.; MAGENDZO, K.; EDWARDS, R.H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, v.258, n.5090, p.1952-5, 1992.

FABRICIO, A.S.; SILVA, C.A.; RAE, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. *Br J Pharmacol*, v.125, n.3, p.542-8, 1998.

FABRICIO, A.S.; ZAMPRONIO, A.R.; RAE, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E. Endothelin (ET): A central mediator of fever induces by pre-formed pyrogenic factor (pfpf) released from lps-stimulated macrophage in rats. latinamericam congress of pharmacology. Águas de Lindóia, 2000. 335 p.

FAGARASAN, M.O.; AIELLO, F.; MUEGGE, K.; DURUM, S.; AXELROD, J. Interleukin 1 induces beta-endorphin secretion via Fos and Jun in AtT-20 pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.20, p.7871-4, 1990.

FARRAR, W.L.; KILIAN, P.L.; RUFF, M.R.; HILL, J.M.; PERT, C.B. Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol*, v.139, n.2, p.459-63, 1987.

FELDBERG, W.; SAXENA, P.N. Fever produced by prostaglandin E1. *J Physiol*, v.217, n.3, p.547-56, 1971.

FLESHNER, M.; GOEHLER, L.E.; HERMANN, J.; RELTON, J.K.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull*, v.37, n.6, p.605-10, 1995.

FOLEY, K.M. Opioids. *Neurol Clin*, v.11, n.3, p.503-22, 1993.

GALLIN, J.I.; LETO, T.L.; ROTROSEN, D.; KWONG, C.H.; MALECH, H.L. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Opin Immunol*, v.4, n.1, p.53-6, 1992.

GATTI, S.; BARTFAI, T. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res*, v.624, n.1-2, p.291-4, 1993.

GELLER, E.B.; HAWK, C.; KEINATH, S.H.; TALLARIDA, R.J.; ADLER, M.W. Subclasses of opioids based on body temperature change in rats: acute subcutaneous administration. *J Pharmacol Exp Ther*, v.225, n.2, p.391-8, 1983.

GELLER, E.B.; HAWK, C.; TALLARIDA, R.J.; ADLER, M.W. Postulated thermoregulatory roles for different opiate receptors in rats. *Life Sci*, v.31, n.20-21, p.2241-4, 1982.

GIRNDT, O.; LIPSCHITZ, W. The effect of morphine upon the body temperature. Experiments in normal rabbits. *Arch Exp. Pathol. Pharmacol.*, v.159, p.249-58, 1931.

GOLDSTEIN, A.; BARRETT, R.W.; JAMES, I.F.; LOWNEY, L.I.; WEITZ, C.J.; KNIPMEYER, L.L.; RAPOPORT, H. Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.82, n.15, p.5203-7, 1985.

GOLDSTEIN, A.; TACHIBANA, S.; LOWNEY, L.I.; HUNKAPILLER, M.; HOOD, L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76, n.12, p.6666-70, 1979.

GOMES, I.; JORDAN, B.A.; GUPTA, A.; TRAPAIIDZE, N.; NAGY, V.; DEVI, L.A. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci*, v.20, n.22, p.RC110, 2000.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav*, v.47, n.5, p.963-91, 1990.

GORDON, C.J.; HEATH, J.E. Effect of beta-endorphin on the thermal excitability of preoptic neurons in the unanesthetized rabbit. *Peptides*, v.2, n.4, p.397-401, 1981.

GREENFEDER, S.A.; VARNELL, T.; POWERS, G.; LOMBARD-GILLOOLY, K.; SHUSTER, D.; MCINTYRE, K.W.; RYAN, D.E.; LEVIN, W.; MADISON, V.; JU, G. Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity. *J Biol Chem*, v.270, n.38, p.22460-6, 1995.

GULYA, K.; PELTON, J.T.; HRUBY, V.J.; YAMAMURA, H.I. Cyclic somatostatin octapeptide analogues with high affinity and selectivity toward mu opioid receptors. *Life Sci*, v.38, n.24, p.2221-9, 1986.

HANDA, B.K.; LAND, A.C.; LORD, J.A.; MORGAN, B.A.; RANCE, M.J.; SMITH, C.F. Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *Eur J Pharmacol*, v.70, n.4, p.531-40, 1981.

HANDLER, C.M.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, v.43, n.4, p.1209-16, 1992.

HANDLER, C.M.; PRICE, R.; BAUMGART, M.; LAW, E.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Effect of selective and non-selective opioids on body temperature in warm- and cold-acclimated rats. *Journal of thermal biology*, v.26, p.351-356, 2001.

HANDLER, C.M.; PRICE, R.W.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Effect of mu-selective opioid antagonists on MIP-1 beta and IL-1 beta-induced fever. *Ann N Y Acad Sci*, v.856, p.270-3, 1998.

HASHIMOTO, M.; UENO, T.; IRIKI, M. What roles does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? *Pflugers Arch*, v.429, n.1, p.50-7, 1994.

HAZUM, E.; CHANG, K.J.; LEIGHTON, H.J.; LEVER, O.W., JR.; CUATRECASAS, P. Increased biological activity of dimers of oxymorphone and enkephalin: possible role of receptor crosslinking. *Biochem Biophys Res Commun*, v.104, n.1, p.347-53, 1982.

HELLE, M.; BRAKENHOFF, J.P.; DE GROOT, E.R.; AARDEN, L.A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol*, v.18, n.6, p.957-9, 1988.

HERZ, A. Opioids. Berlin: Springer, v.1. 1993

HOPKINS, S.J.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*, v.18, n.2, p.83-8, 1995.

HORI, T.; NAKASHIMA, T.; TAKE, S.; KAIZUKA, Y.; MORI, T.; KATAFUCHI, T. Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Res Bull*, v.27, n.3-4, p.309-13, 1991.

HORUK, R. The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol Today*, v.15, n.4, p.169-74, 1994.

HORWITZ, B.A.; HANES, G.E. Propranolol and pyrogen effects of shivering and nonshivering thermogenesis in rats. *Am J Physiol*, v.230, n.3, p.637-42, 1976.

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. *Clin Exp Immunol*, v.71, n.2, p.320-3, 1988.

HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W.; FOTHERGILL, L.A.; MORGAN, B.A.; MORRIS, H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, v.258, n.5536, p.577-80, 1975.

HUIDOBRO-TORO, J.P.; WAY, E.L. Studies on the hyperthermic response of beta-endorphin in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v.211, n.1, p.50-8, 1979.

ILYIN, S.E.; GAYLE, D.; FLYNN, M.C.; PLATA-SALAMAN, C.R. Interleukin-1beta system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-alpha, TGF-beta1 and neuropeptide Y mRNAs in specific brain regions during bacterial LPS-induced anorexia. *Brain Res Bull*, v.45, n.5, p.507-15, 1998.

JEANJEAN, A.P.; MOUSSAOUI, S.M.; MALOTEAUX, J.M.; LADURON, P.M. Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience*, v.68, n.1, p.151-7, 1995.

JORDAN, B.A.; DEVI, L.A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, v.399, n.6737, p.697-700, 1999.

KIEFFER, B.L.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C.; HIRTH, C.G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.24, p.12048-52, 1992.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*, v.71, n.1, p.93-127, 1991.

KNIGGE, U.; KJAER, A.; JORGENSEN, H.; GARBERG, M.; ROSS, C.; ROULEAU, A.; WARBERG, J. Role of hypothalamic histaminergic neurons in mediation of ACTH and beta-endorphin responses to LPS endotoxin in vivo. *Neuroendocrinology*, v.60, n.3, p.243-51, 1994.

KOMHOFF, M.; GRONE, H.J.; KLEIN, T.; SEYBERTH, H.W.; NUSING, R.M. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol*, v.272, n.4 Pt 2, p.F460-8, 1997.

KOSHI, T.; EDANO, T.; ARAI, K.; SUZUKI, C.; EHARA, Y.; HIRATA, M.; OHKUCHI, M.; OKABE, T. Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. *Biochem Biophys Res Commun*, v.186, n.3, p.1322-6, 1992.

KOZAK, W.; ZHENG, H.; CONN, C.A.; SOSZYNSKI, D.; VAN DER PLOEG, L.H.; KLUGER, M.J. Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol*, v.269, n.5 Pt 2, p.R969-77, 1995.

KRIEGER, D.T.; LIOTTA, A.S. Pituitary hormones in brain: where, how, and why? *Science*, v.205, n.4404, p.366-72, 1979.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte--endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Physiol Pharmacol*, v.71, n.1, p.88-97, 1993.

LAWRENCE, D.M.; EL-HAMOULY, W.; ARCHER, S.; LEARY, J.F.; BIDLACK, J.M. Identification of kappa opioid receptors in the immune system by indirect immunofluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92, n.4, p.1062-6, 1995.

LEFEUVRE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. *Neuropharmacology*, v.26, n.8, p.1217-21, 1987.

LEMAY, L.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol*, v.258, n.3 Pt 2, p.R798-803, 1990.

LI, C.H.; LEMAIRE, S.; YAMASHIRO, D.; DONEEN, B.A. The synthesis and opiate activity of beta-endorphin. *Biochem Biophys Res Commun*, v.71, n.1, p.19-25, 1976.

LI, S.; GOORHA, S.; BALLOU, L.R.; BLATTEIS, C.M. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 beta and IL-18: pyrogenic and PGE(2)-mediated? *Brain Res*, v.992, n.1, p.76-84, 2003.

LI, S.; WANG, Y.; MATSUMURA, K.; BALLOU, L.R.; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res*, v.825, n.1-2, p.86-94, 1999.

LIEBERMAN, A.P.; PITHA, P.M.; SHIN, H.S.; SHIN, M.L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, n.16, p.6348-52, 1989.

LIN, M.T. An adrenergic link in the hypothalamic pathways which mediates morphine- and beta-endorphin-induced hyperthermia in the rat. *Neuropharmacology*, v.21, n.7, p.613-7, 1982.

LIN, M.T.; UANG, W.N.; CHAN, H.K. Hypothalamic neuronal responses to iontophoretic application of morphine in rats. *Neuropharmacology*, v.23, n.5, p.591-4, 1984.

LINNER, K.M.; QUIST, H.E.; SHARP, B.M. Met-enkephalin-containing peptides encoded by proenkephalin A mRNA expressed in activated murine thymocytes inhibit thymocyte proliferation. *J Immunol*, v.154, n.10, p.5049-60, 1995.

LOLAIT, S.J.; CLEMENTS, J.A.; MARKWICK, A.J.; CHENG, C.; MCNALLY, M.; SMITH, A.I.; FUNDER, J.W. Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages. *J Clin Invest*, v.77, n.6, p.1776-9, 1986.

LONG, N.C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S.L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol*, v.259, n.4 Pt 2, p.R724-8, 1990.

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

LOTTI, V.J.; LOMAX, P.; GEORGE, R. Temperature responses in the rat following intracerebral microinjection of morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, v.150, n.1, p.135-9, 1965.

LUHESHI, G.; MILLER, A.J.; BROUWER, S.; DASCOMBE, M.J.; ROTHWELL, N.J.; HOPKINS, S.J. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol*, v.270, n.1 Pt 1, p.E91-5, 1996a.

LUHESHI, G.; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol*, v.109, n.4, p.301-7, 1996b.

LUSTER, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, v.338, n.7, p.436-45, 1998.

LUTZ, R.A.; PFISTER, H.P. Opioid receptors and their pharmacological profiles. *J Recept Res*, v.12, n.3, p.267-86, 1992.

MACDONALD, R.L.; NELSON, P.G. Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science*, v.199, n.4336, p.1449-51, 1978.

MAJERUS, P.W. Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. *Curr Biol*, v.8, n.3, p.R87-9, 1998.

MAKMAN, M.H. Morphine receptors in immunocytes and neurons. *Adv Neuroimmunol*, v.4, n.2, p.69-82, 1994.

MARSDEN, P.A.; BRENNER, B.M. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol*, v.262, n.4 Pt 1, p.C854-61, 1992.

MARTIN, G.E.; PAPP, N.L. Correlation of morphine-induced locomotor activity with changes in core temperature of the rat. *Life Sci*, v.26, n.20, p.1731-8, 1980.

MARTIN, R.; FROSCH, D.; WEBER, E.; VOIGT, K.H. Met-enkephaline-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ. *Neurosci Lett*, v.15, n.2-3, p.253-7, 1979.

MCCMAHAN, C.J.; SLACK, J.L.; MOSLEY, B.; COSMAN, D.; LUPTON, S.D.; BRUNTON, L.L.; GRUBIN, C.E.; WIGNALL, J.M.; JENKINS, N.A.; BRANNAN, C.I.; ET AL. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J*, v.10, n.10, p.2821-32, 1991.

MENG, F.; XIE, G.X.; THOMPSON, R.C.; MANSOUR, A.; GOLDSTEIN, A.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.21, p.9954-8, 1993.

MEUNIER, J.C.; MOLLEREAU, C.; TOLL, L.; SUAUDEAU, C.; MOISAND, C.; ALVINERIE, P.; BUTOUR, J.L.; GUILLEMOT, J.C.; FERRARA, P.; MONSARRAT, B.; ET AL. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, v.377, n.6549, p.532-5, 1995.

MILLAN, M.J.; PRZEWLOCKI, R.; JERLICZ, M.; GRAMSCH, C.; HOLLT, V.; HERZ, A. Stress-induced release of brain and pituitary beta-endorphin: major role of endorphins in generation of hyperthermia, not analgesia. *Brain Res*, v.208, n.2, p.325-38, 1981.

MILTON, A.S.; WENDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol*, v.218, n.2, p.325-36, 1971.

MINANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VIZCAINO, 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 Res Bull*, v.24, n.6, p.849-52, 1990.

MOLLEREAU, C.; PARMENTIER, M.; MAILLEUX, P.; BUTOUR, J.L.; MOISAND, C.; CHALON, P.; CAPUT, D.; VASSART, G.; MEUNIER, J.C. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*, v.341, n.1, p.33-8, 1994.

MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. *Am J Physiol*, v.254, n.4 Pt 2, p.R633-40, 1988.

MOSBERG, H.I.; HURST, R.; HRUBY, V.J.; GALLIGAN, J.J.; BURKS, T.F.; GEE, K.; YAMAMURA, H.I. Conformationally constrained cyclic enkephalin analogs with pronounced delta opioid receptor agonist selectivity. *Life Sci*, v.32, n.22, p.2565-9, 1983.

MOUSA, S.A.; ZHANG, Q.; SITTE, N.; JI, R.; STEIN, C. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol*, v.115, n.1-2, p.71-8, 2001.

- MURAKAMI, N.; WATANABE, T. Activation of ACTH release is mediated by the same molecule as the final mediator, PGE₂, of febrile response in rats. *Brain Res*, v.478, n.1, p.171-4, 1989.
- MYERS, K. Heroin dependence. A community experiment in therapeutics. *Lancet*, v.1, n.7546, p.805-6, 1968.
- MYERS, M.G.; AL-SHAIKH, T. Benefits of beta-blocker prophylaxis against supraventricular arrhythmias following aortocoronary bypass surgery in routine clinical practice. *Can J Cardiol*, v.11, n.3, p.195-8, 1995.
- MYERS, R.D.; PAEZ, X.; ROSCOE, A.K.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Fever and feeding: differential actions of macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), MIP-1 alpha and MIP-1 beta on rat hypothalamus. *Neurochem Res*, v.18, n.6, p.667-73, 1993.
- NEGRI, L.; MELCHIORRI, P.; ROCCHI, R.; SCOLARO, B. Opioid receptor affinity and analgesic activity of O- and C-glycosylated opioid peptides. *Acta Physiol Hung*, v.84, n.4, p.441-3, 1996.
- NORTH, R.B. Neurosurgical procedures for chronic pain. General neurosurgical practice. *Clin Neurosurg*, v.40, p.182-96, 1993.
- O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, v.13, n.1, p.45-82, 1999.
- OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T.E.; LEE, C.; KELLY, J.F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J.K.; SAPER, C.B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol*, v.428, n.1, p.20-32, 2000.
- O'NEILL, G.P.; FORD-HUTCHINSON, A.W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, v.330, n.2, p.156-60, 1993.
- O'ROURKE, S.T.; RUDY, T.A. Intracerebroventricular and preoptic injections of leukotrienes C₄, D₄, and E₄ in the rat: lack of febrile effect. *Brain Res*, v.295, n.2, p.283-8, 1984.
- PASTERNAK, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin Neuropharmacol*, v.16, n.1, p.1-18, 1993.
- PORTOGHESE, P.S.; LIPKOWSKI, A.W.; TAKEMORI, A.E. Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective kappa-opioid receptor antagonists. *Life Sci*, v.40, n.13, p.1287-92, 1987.

PORTOGHESE, P.S.; NAGASE, H.; LIPKOWSKI, A.W.; LARSON, D.L.; TAKEMORI, A.E. Binaltorphimine-related bivalent ligands and their kappa opioid receptor antagonist selectivity. *J Med Chem*, v.31, n.4, p.836-41, 1988.

REINSCHEID, R.K.; NOTHACKER, H.P.; BOURSON, A.; ARDATI, A.; HENNINGSEN, R.A.; BUNZOW, J.R.; GRANDY, D.K.; LANGEN, H.; MONSMA, F.J., JR.; CIVELLI, O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, v.270, n.5237, p.792-4, 1995.

ROGERS, T.J.; PETERSON, P.K. Opioid G protein-coupled receptors: signals at the crossroads of inflammation. *Trends Immunol*, v.24, n.3, p.116-21, 2003.

ROMANOVSKY, A.A.; BLATTEIS, C.M. Pathophysiology of opioids in hyperthermic states. *Prog Brain Res*, v.115, p.111-27, 1998.

ROTH, J.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J.; ZEISBERGER, E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol*, v.265, n.3 Pt 2, p.R653-8, 1993.

ROTHWELL, N.J. Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. *Horm Metab Res*, v.22, n.12, p.616-8, 1990a.

ROTHWELL, N.J. Mechanisms of the pyrogenic actions of cytokines. *Eur Cytokine Netw*, v.1, n.4, p.211-3, 1990b.

ROTHWELL, N.J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci*, v.12, n.11, p.430-6, 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. *Can J Physiol Pharmacol*, v.69, n.10, p.1465-9, 1991.

ROTHWELL, N.J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent of prostaglandins. *Horm Metab Res*, v.22, n.11, p.595-6, 1990.

ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, v.23, n.12, p.618-25, 2000.

RUZICKA, B.B.; AKIL, H. The interleukin-1beta-mediated regulation of proenkephalin and opioid receptor messenger RNA in primary astrocyte-enriched cultures. *Neuroscience*, v.79, n.2, p.517-24, 1997.

SALMI, P.; KELA, J.; ARVIDSSON, U.; WAHLESTEDT, C. Functional interactions between delta- and mu-opioid receptors in rat thermoregulation. *Eur J Pharmacol*, v.458, n.1-2, p.101-6, 2003.

SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S.E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, v.237, n.4819, p.1171-6, 1987.

SCHALL, T.J. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*, v.3, n.3, p.165-83, 1991.

SHAPIRO, L.; ZHANG, X.X.; RUPP, R.G.; WOLFF, S.M.; DINARELLO, C.A. Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.18, p.8614-8, 1993.

SIMON, E.J. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med Res Rev*, v.11, n.4, p.357-74, 1991.

SIMS, J.E.; GAYLE, M.A.; SLACK, J.L.; ALDERSON, M.R.; BIRD, T.A.; GIRI, J.G.; COLOTTA, F.; RE, F.; MANTOVANI, A.; SHANEBECK, K.; ET AL. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.13, p.6155-9, 1993.

SIMS, J.E.; MARCH, C.J.; COSMAN, D.; WIDMER, M.B.; MACDONALD, H.R.; MCMAHAN, C.J.; GRUBIN, C.E.; WIGNALL, J.M.; JACKSON, J.L.; CALL, S.M.; ET AL. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*, v.241, n.4865, p.585-9, 1988.

SMITH, A.I.; FUNDER, J.W. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev*, v.9, n.1, p.159-79, 1988.

SNYDER, S. The opiates, opioid peptides (endorphins), and the opiate receptor. *Tex Med*, v.75, n.9, p.41-5, 1979.

STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunol Today*, v.12, n.3, p.A7-12, 1991.

STEFFERL, A.; HOPKINS, S.J.; ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. *Br J Pharmacol*, v.118, n.8, p.1919-24, 1996.

SUNDGREN-ANDERSSON, A.K.; OSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *Am J Physiol*, v.275, n.6 Pt 2, p.R2028-34, 1998.

TAKITA, M.; ODA, Y.; KIGOSHI, S.; MURAMATSU, I. Effects of propranolol and atenolol on immobilization stress-induced hypertension and down-regulation of central beta-adrenoceptors in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v.50, n.2, p.225-32, 1995.

TAVARES, E.; MINANO, F.J. RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. *Neuropharmacology*, v.39, n.12, p.2505-13, 2000.

THOMSON, A.W.; SATOH, S.; NUSSLER, A.K.; TAMURA, K.; WOO, J.; GAVALER, J.; VAN THIEL, D.H. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in autoimmune liver disease and evidence for the production of ICAM-1 by cytokine-stimulated human hepatocytes. *Clin Exp Immunol*, v.95, n.1, p.83-90, 1994.

THORNHILL, J.A.; DESAUTELS, M. Is acute morphine hyperthermia of unrestrained rats due to selective activation of brown adipose tissue thermogenesis? *J Pharmacol Exp Ther*, v.231, n.2, p.422-9, 1984.

TRAPAIKZE, N.; GOMES, I.; CVEJIC, S.; BANSINATH, M.; DEVI, L.A. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res*, v.76, n.2, p.220-8, 2000.

TRAYNOR, J.R.; ELLIOTT, J. delta-Opioid receptor subtypes and cross-talk with mu-receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v.14, n.3, p.84-6, 1993.

USHIKUBI, F.; HIRATA, M.; NARUMIYA, S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal*, v.12, n.2-3, p.343-59, 1995.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; HIZAKI, H.; TUBOI, K.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, A.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, v.395, n.6699, p.281-4, 1998.

VALE, W.; RIVIER, C.; BROWN, M.R.; SPIESS, J.; KOOB, G.; SWANSON, L.; BILEZIKJIAN, L.; BLOOM, F.; RIVIER, J. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog Horm Res*, v.39, p.245-70, 1983.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, v.213, n.4514, p.1394-7, 1981.

VALLIERES, L.; RIVEST, S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem*, v.69, n.4, p.1668-83, 1997.

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, n.3, p.289-302, 1995.

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. *Inflamm Res*, v.52, n.7, p.291-6, 2003.

WINTER, C.A.; FLATAKER, L. The relationship between skin temperature and the effect of morphine upon the response to thermal stimuli in the albino rat and the dog. *J Pharmacol Exp Ther*, v.109, n.2, p.183-8, 1953.

WOLPE, S.D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D.G.; NGUYEN, H.T.; MOLDAWER, L.L.; NATHAN, C.F.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*, v.167, n.2, p.570-81, 1988.

XIN, L.; ZHAO, S.F.; GELLER, E.B.; MCCAFFERTY, M.R.; STERLING, G.H.; ADLER, M.W. Involvement of beta-endorphin in the preoptic anterior hypothalamus during interleukin-1 beta-induced fever in rats. *Ann N Y Acad Sci*, v.813, p.324-6, 1997.

YAKIMOVA, K.; SANN, H.; SCHMID, H.A.; PIERAU, F.K. Effects of GABA agonists and antagonists on temperature-sensitive neurones in the rat hypothalamus. *J Physiol*, v.494 (Pt 1), p.217-30, 1996.

YAKIMOVA, K.S.; SANN, H.; PIERAU, F.K. Neuronal basis for the hyperthermic effect of mu-opioid agonists in rats: decrease in temperature sensitivity of warm-sensitive hypothalamic neurons. *Neurosci Lett*, v.218, n.2, p.115-8, 1996.

YAKSH, T.L. The spinal pharmacology of facilitation of afferent processing evoked by high-threshold afferent input of the postinjury pain state. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, v.6, n.2, p.250-6, 1993.

YASUDA, I.; HIRANO, T.; YUSA, T.; SATOH, M. Tracheal constriction by morphine and by fentanyl in man. *Anesthesiology*, v.49, n.2, p.117-9, 1978.

YASUDA, K.; RAYNOR, K.; KONG, H.; BREDER, C.D.; TAKEDA, J.; REISINE, T.; BELL, G.I. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.14, p.6736-40, 1993.

ZAMPRONIO, A.R.; HOADLEY, M.E.; LUHESHI, G.; ROTHWELL, N.J.; DE SOUZA, G.E.; HOPKINS, S.J. Interleukin (IL)-6 release and fever induced by a pre-formed pyrogenic factor (PFPF) derived from LPS-stimulated macrophages. *Eur Cytokine Netw*, v.11, n.4, p.589-96, 2000a.

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

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELA, I.R.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. A Preformed Pyrogenic Factor Released by Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, v.3, n.5, p.365-373, 1994a.

ZAMPRONIO, A.R.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; PELA, I.R.; SOUZA, G.E. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. *Am J Physiol*, v.269, n.6 Pt 2, p.R1469-74, 1995.

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.; SILVA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. *Am J Physiol*, v.266, n.5 Pt 2, p.R1670-4, 1994b.

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

ZHAO, B.G.; CHAPMAN, C.; BICKNELL, R.J. Functional kappa-opioid receptors on oxytocin and vasopressin nerve terminals isolated from the rat neurohypophysis. *Brain Res*, v.462, n.1, p.62-6, 1988.

ZHAO, S.F.; XIN, L.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Blockade by μ - and δ - opioid receptor antagonist of hyperthermia induced by tumor necrosis factor- α and β -endorphin. *Analgesia*, v.1, p.878-881, 1995.

ZIMMERMAN, D.M.; LEANDER, J.D. Selective opioid receptor agonists and antagonists: research tools and potential therapeutic agents. *J Med Chem*, v.33, n.3, p.895-902, 1990.

ZIMMERMAN, R.S.; HAYES, R.L.; MORRIS, D.L.; LYETH, B.G.; DEWEY, W.L.; YOUNG, H.F. Beta-endorphin in cerebrospinal fluid and serum after severe head injury. *Neurosurgery*, v.26, n.5, p.764-70, 1990.

