UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

MARINA MILHOMENS DE QUEIROZ

**Efeito da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre resposta febril induzida
pelo LPS e seus mediadores em ratos**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

MARINA MILHOMENS DE QUEIROZ

**Efeito da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre resposta febril induzida
pelo LPS e seus mediadores em ratos**

Dissertação a ser apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO TRADICIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Queiroz, Marina Milhomens de

Efeito da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores em ratos. Ribeirão Preto, 2016.

98p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Souza, Glória Emília Petto de

1. Dipirona. 2. Metabólitos da dipirona. 3. Febre. 4. LPS. 5. Citocinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Milhomens de Queiroz

“Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores em ratos”

Dissertação a ser apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza

Instituição: FCFRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Pós-Doc Alexandre Kanashiro

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar
pelo menos outros dez”.*

George Bernard Shaw

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu pai João de Queiroz Neto (*in memoriam*) por todo incentivo e por me ensinar a lutar pelos meus sonhos.

À minha mãe Geni Milhomens da Costa por todo carinho, amor e compreensão.

À minha afilhada Isadora R. de Queiroz pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao **CNPq e CAPES** pelo apoio financeiro;

À **Profa. Dra. Glória E. P. de Souza** pela confiança, paciência, dedicação, por ter contribuído para o meu crescimento profissional, além de todo o carinho maternal;

À minha companheira de laboratório **Débora Assis** pela amizade, apoio e zueiras que contribuíram para a formação de uma amizade verdadeira e duradoura e também às **MANÉS, Tamy Peixoto, Marcella Grando, Fabiola Zuchi e Sabrina** pela amizade, risadas e companheirismo em todos os momentos;

À **Miriam Melo** por todo o apoio profissional e pela amizade e risadas durante a rotina de trabalho;

À **Marlene Rodrigues** por todo apoio profissional e pelo carinho e à **Aparecia Rosa** por me acolher no laboratório com tanto carinho;

À **todos os docentes** do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP pela contribuição à minha formação científica;

Ao meu professor de graduação **Dr. Nelson Wataro** pelo carinho paternal, por ter me iniciado nesse mundo científico e pelo suporte durante todo o mestrado;

À **minha família** que sempre me apoiou e acreditou no meu sucesso;

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

Resumo

RESUMO

QUEIROZ, M.M. **Efeito da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores em ratos.** 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A dipirona é uma pró-droga com potente atividade antipirética e analgésica. Vários trabalhos mostram que assim como a indometacina, a dipirona reduz a resposta febril induzida pela endotoxina de *E. coli*, o LPS. Entretanto, a dipirona reduz respostas febris que são insensíveis a indometacina como a resposta febril induzida pela ET-1 e pelo vTs. Também foi demonstrado o efeito antipirético da dipirona sobre a resposta febril induzida por mediadores envolvidos na febre induzida pelo LPS. O objetivo deste estudo foi comparar o efeito antipirético da dipirona com o efeito de seus principais metabólitos ativos, 4-MAA e 4-AA, sobre a resposta febril induzida por citocinas, prostaglandinas, CRF e AEA. Nossos resultados mostraram que nas doses utilizadas, tanto a dipirona (120 mg/kg, i.p.) quanto os metabólitos 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg, i.p.) não alteraram a temperatura corporal basal dos animais. Na febre induzida pelo LPS (50 µg/kg, i.p.), apenas o 4-MAA foi capaz de abolir a resposta enquanto que a dipirona e o 4-AA reduziram apenas a fase inicial. O tratamento com dipirona, 4-MAA e 4-AA foi efetivo para reduzir a resposta febril induzida após injeção i.c.v. de IL-6 (300 ng/rato), TNF- α (250 ng/rato) e PGF_{2 α} (750 ng/rato). Na febre induzida pela IL-1 β (3,12 ng/rato, i.c.v.), apenas a dipirona e o 4-MAA inibiram esta resposta, enquanto que o 4-AA reduziu a febre apenas até a 2^ah. Também demonstramos que a redução da concentração de PGE₂ no hipotálamo não está diretamente relacionada com o efeito antipirético desses fármacos, pois animais tratados com 4-AA apresentaram redução da concentração de PGE₂ sem significativa redução da resposta febril. Dipirona, 4-MAA e 4-AA não reduziram a resposta febril induzida pela PGE₂ (250 ng/rato, i.c.v.) e CRF (5 µg/rato, i.c.v.). Entretanto animais estimulados com CRF apresentaram hipotermia quando tratados com 4-MAA e 4-AA. Nos animais estimulados com AEA (10µg/rato, i.c.v.), apenas o 4-MAA foi capaz de abolir a resposta febril, enquanto que a dipirona e 4-AA reduziram apenas o início desta resposta. Os resultados apresentados sugerem que, dependendo do estímulo, a dipirona, 4-MAA e 4-AA podem, além de inibir a síntese de PGE₂, inibir a síntese/liberação de CRF e/ou opióides endógenos.

Palavras-chave: Dipirona. Metabólitos da dipirona. Febre. LPS. Citocinas.

Abstract

ABSTRACT

QUEIROZ, M.M. **Effect of dipyrone, 4-MAA and 4-AA on LPS fever-induced and its mediators in rats.** 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dipyrone is a pro-drug with potent antipyretic and analgesic activity. Several studies show that as indomethacin, dipyrone reduces fever induced by endotoxin of *E. coli*, LPS. However, dipyrone reduces febrile responses that are insensitive to indomethacin as the fever induced by ET-1 and vTs. It has also been demonstrated the antipyretic effect of dipyrone on fever induced by pyrogenic mediators involved in LPS-induced febrile response. The aim of this study was to compare the antipyretic effect of dipyrone with the effect of its major active metabolites 4-MAA and 4-AA, on febrile response induced by cytokines, prostaglandins, CRF and AEA. Ours results showed that at the doses used, both dipyrone (120 mg/kg, i.p.) and 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg, i.p.) did not alter basal body temperature of the animals. In LPS-induced fever (50 µg/kg, i.p.) only 4-MAA abolished the fever while dipyrone and 4-AA reduced only the initial phase. Pre-treatment with dipyrone, 4-MAA and 4-AA reduced the febrile response induced after i.c.v. injection of IL-6 (300 ng/rat), TNF- α (250 ng/rat) and PGF_{2 α} (750 ng/rat). The fever induced by IL-1 β (3.12 ng/rat, i.c.v.) was reduced only by dipyrone and 4-MAA while 4-AA reduced only until the second hour. We also demonstrated that the reduction of PGE₂ concentration in hypothalamus is not directly related to the antipyretic effects without significant reduction of fever response. Dipyrone, 4-MAA and 4-AA did not reduced the febrile response induced by PGE₂ (250 ng/rat, i.c.v.) and CRF (5 µg/rat, i.c.v.). Though animals stimulated with CRF showed hypothermia when treated with 4-MAA and 4-AA. In animals injected with anandamide (10 µg/rat, i.c.v.), only 4-MAA abolished the fever response, and dipyrone and 4-AA only reduced the beginning of this response. These data suggest that, depending on stimulus, dipyrone, 4-MAA and 4-AA can, besides inhibiting PGE₂ synthesis, inhibit synthesis/release of CRF and/or endogenous opioids.

Keywords: Dipyrone. Dipyrone metabolites. Fever. LPS. Cytokines.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias envolvidas na febre induzida por LPS em ratos	29
Figura 2. Sequência da formação dos quatro principais metabólitos da dipirona: 4-MAA, 4-AA, 4-AAA e 4-FAA	35
Figura 3. Efeito do tratamento intraperitoneal com dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a variação da temperatura retal em ratos	46
Figura 4. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pelo LPS em ratos	48
Figura 5. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pela IL-1 β em ratos	50
Figura 6. Efeito da administração sistêmica de dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre o aumento da síntese de PGE ₂ no hipotálamo induzido pela IL-1 β em ratos	52
Figura 7. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pela IL-6 em ratos	54
Figura 8. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pelo TNF- α em ratos	56
Figura 9. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pela PGE ₂ em ratos	58
Figura 10. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pela PGF _{2α} em ratos	60
Figura 11. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pelo CRF em ratos	62
Figura 12. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a reposta febril induzida pela AEA em ratos	64

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos tratamentos com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores.....	75

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ^9 -THC	Δ^9 -tetra-hidrocanabinol
2-AG	2-acilglicerol
4-AA	4-aminoantipirina
4-AAA	4-acetilaminoantipirina
4-FAA	4-formilaminoantipirina
4-MAA	4-metilaminoantipirina
AA	Ácido araquidônico
AEA	Anandamida
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
APO-HA	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
AVP	Arginina-vasopressina
BAT	Tecido adiposo marrom
BK	Bradicinina
CB	Canabinóide
COX	Ciclooxigenase
CRF	Fator liberador de corticotropina
CINC	Citocina induzida por neutrófilo quimioatrativo
CSF	Fluido cerebrospinal
DIP	Dipirona
ET	Endotelina
I.C.V.	Intracerebroventricular
IFN	Interferon
IL	Interleucina

IL-1ra	Antagonista de receptor IL-1
I.M.	Intramuscular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
I.P.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
MIP-1	Proteína inflamatória derivada de macrófago
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
OVLT	<i>Organum vasculosum da laminae terminalis</i>
PFPF	Fator pirogênico pré-formado em macrófagos estimulados com LPS
PG	Prostaglandina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SAL	Salina
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP-1	Proteína de desacoplamento
UCN	Urocortina
VEI	Veículo
vTs	Veneno de escorpião <i>Tityus serrulatus</i>

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Termorregulação.....	22
1.2 Resposta de fase aguda e resposta febril	23
1.3 Mediadores da resposta febril.....	23
1.3.1 Interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral.....	24
1.3.2 Prostaglandinas e fator liberador de corticotropina.....	26
1.3.3 Canabinóides	30
1.4 Controle farmacológico da resposta febril.....	34
 2 OBJETIVOS	 38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 40
3.1 Animais.....	40
3.2 Esterilização.....	40
3.3 Soluções, drogas e reagentes	40
3.4 Síntese do metabólito 4-metilaminoantipirina.....	41
3.5 Implantação de cânulas no ventrículo lateral	42
3.6 Implante do transmissor de temperatura na cavidade abdominal.....	42
3.7 Determinação da variação da temperatura retal por telemetria	43
3.8 Determinação da variação da temperatura corporal por radiotelemetria.....	43
3.9 Coleta do hipotálamo.....	43
3.10 Determinação da concentração de PGE ₂ no hipotálamo.	44
3.11 Análise estatística	44
 4 RESULTADOS.....	 46
4.1 Efeito do tratamento intraperitoneal com dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a variação da temperatura retal em ratos	46
4.2 Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratos.....	47
4.3 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos	49

4.4 Efeito da administração sistêmica de dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre o aumento da síntese de PGE ₂ no hipotálamo induzido pela IL-1 β em ratos	51
4.5 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-6 em ratos	53
4.6 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α em ratos.....	55
4.7 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGE ₂ em ratos.....	57
4.8 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGF _{2α} em ratos	59
4.9 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo CRF em ratos.....	61
4.10 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela AEA em ratos	63
 5 DISCUSSÃO	66
 6 SUMÁRIO DE RESULTADOS	75
 7 CONCLUSÃO.....	77
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
 ANEXO.....	98

Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Termorregulação

A regulação da temperatura corporal ocorre por meio de uma complexa integração de conexões neuronais que envolvem uma série de estruturas cerebrais ordenadas hierarquicamente, tais como a área pré-óptica hipotalâmica, o hipotálamo dorso-medial, a região medular rostral da rafe, o sistema límbico, a formação reticular, a medula espinhal e os gânglios simpáticos (BOULANT, 2000; NAKAMURA, 2011). Ao hipotálamo, mais precisamente a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO-HA), tem sido atribuído a função termorreguladora da temperatura interna do organismo (ZEISBERGER, 1999; NAKAMURA, 2011). Nesta região estão localizados neurônios termossensíveis, cuja frequência de disparo é afetada tanto por influência de conexões diretas com termorreceptores distribuídos na pele e nos músculos, como por alterações da temperatura sanguínea da área adjacente (DINARELLO et al., 1988) e por ação de pirógenos e criógenos endógenos (ROTH et al., 2006; NAKAMURA, 2011).

O hipotálamo possui três tipos básicos de neurônios termossensíveis. Neurônios sensíveis ao calor, que aumentam a sua frequência de disparo durante aumento da temperatura na região pré-óptica e que transmitem essa informação para neurônios termoefetores sensíveis ao calor, os quais controlam respostas para perda de calor como vasodilatação e transpiração. Também há os neurônios sensíveis ao frio que são inibidos pelos neurônios sensíveis ao calor que estão ao seu redor. Quando há resfriamento da região pré-óptica, a frequência de disparo dos neurônios sensíveis ao calor diminui, reduzindo a inibição sináptica e permitindo o aumento da frequência de disparo dos neurônios sensíveis ao frio que ativam os neurônios efetores sensíveis ao frio, os quais controlam respostas para produção de calor (tremor ou *shivering*, sem tremor ou *nonshivering*, vasoconstrição). Por último, há os neurônios insensíveis à mudança de temperatura na região pré-óptica, cujas funções podem ou não estar relacionadas com a termorregulação (BOULANT, 2000).

A termogênese através de tremor, *shivering*, é o último mecanismo de defesa ativado quando o organismo está exposto a um estímulo frio, já que o seu limiar térmico é menor que o de vasoconstrição, além disso, também há alto consumo de energia para geração dos tremores. A termogênese do tecido adiposo marrom (BAT) é uma função metabólica específica do tecido que ocorre através da liberação de prótons pela membrana mitocondrial dos adipócitos. Esta função é facilitada pela elevada expressão da proteína de desacoplamento

1 (UCP-1) nas membranas mitocondriais do BAT e pode ocorrer também por ativação simpática e liberação de noradrenalina e ativação de receptores β -adrenérgicos 3 (MORRISON; NAKAMURA, 2011).

1.2 Resposta de fase aguda e resposta febril

A resposta de fase aguda é um arranjo complexo de reações sistêmicas, iniciada e mediada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias por diversos tipos celulares (leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos, células endoteliais, células gliais, etc.). A febre constitui parte dessa resposta complexa e é caracterizada pela integração do sistema imune com o sistema nervoso autônomo e central diante de agressões de diferentes origens (ZEISBERGER, 1999; ROTH; SOUZA, 2001; NAKAMURA, 2011). A febre é definida como uma elevação regulada da temperatura corporal para níveis acima dos normais em virtude da alteração do ponto de regulação hipotalâmico (DINARELLO et al., 1988; ROTH; SOUZA, 2001; NAKAMURA, 2011).

Na vigência de infecção ou inflamação, principalmente com grande área de lesão tecidual, a febre constitui importante resposta de defesa do organismo. Assim, estudos relatam que a resposta febril promove aumento da migração celular, fagocitose e pinocitose, proliferação de células T *helper*, maior liberação de interferon, desenvolvendo um ambiente desfavorável para o crescimento e sobrevivência de microrganismos (KLUGER, 1991; LEGRAND; ALCOCK, 2012). Todavia, quando a resposta febril se estende por um período prolongado, provoca efeitos nocivos ao organismo como desnaturação de proteínas e potencialização do efeito de determinadas doenças pré-existentes como doenças autoimunes, cardiorrespiratórias entre outras (BLATTEIS, 2006). Dessa forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de terapias antipiréticas para o controle da resposta febril.

1.3 Mediadores da resposta febril

Algumas substâncias produzidas por fungos, bactérias, vírus ou parasitas são denominadas pirogênios exógenos. Estas substâncias são incapazes de induzir a resposta febril diretamente, mas são capazes de estimular a produção e/ou liberação de pirogênios endógenos de células imunes ativadas, que são os responsáveis pela elevação da temperatura corporal (ATKINS, 1960; ZEISBERGER, 1999; ROTH; SOUZA, 2001).

A resposta febril é desencadeada através da interação dos pirogênios endógenos, dos quais podem ser citadas as interleucinas (IL)-1 α e β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- α , - β e - γ , proteína inflamatória derivada de macrófagos (MIP)-1, fator pirogênico pré-formado (PFPF), fator liberador de corticotropina (CRF), RANTES, endotelina (ET)-1, bradicinina (BK), óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs) (ROTH et al., 2006; SOARES et al., 2006; ZAMPRONIO et al., 1994; MACHADO et al., 2007; FABRÍCIO et al., 2005a; GOURINE, 1995; BLATTEIS, 2007).

Bennet e Beeson (1953a; 1953b) apresentaram a primeira evidência de que os pirogênios exógenos atuam através da produção e/ou liberação de pirogênios endógenos pelas células do hospedeiro. Estes seriam os responsáveis pela ativação dos centros cerebrais que controlam a temperatura promovendo elevação da temperatura corporal (ATKINS, 1960). Entretanto, a ação direta de pirogênios exógenos não pode ser descartada, pois existem sítios receptores específicos para componentes da parede celular e material liberado pelos diferentes pirogênios exógenos (DINARELLO, 2004; AKIRA 2006).

1.3.1 Interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral

A Interleucina-1 (IL-1) é um mediador inflamatório de fase aguda que provoca respostas locais e sistêmicas. A IL-1 induz a expressão de moléculas de adesão nas células do endotélio, que facilitam a diapedese de células de defesa para o local da inflamação, e consequentemente, promove vasodilatação, febre, sensibilidade à dor e hipotensão (WEBB et al., 1986). Esta citocina é expressa em macrófagos, monócitos, células dendríticas, linfócitos B, células NK e células epiteliais (ZHANG et al., 1990; WEBB et al., 1986).

A IL-1 pode ser classificada em dois subtipos, IL-1 α e IL-1 β , ligam-se aos receptores IL-1 tipo I (IL-1RI) e IL-1 tipo II (IL-1RII), e são bloqueadas pelo antagonista endógeno IL-1ra. Apenas a ligação com o receptor IL-1RI desencadeia uma resposta, já que o receptor IL-1RII é desprovido da proteína acessória AcP, necessária para a transdução dos sinais (UM et al., 2003). A expressão de IL-1 α e IL-1 β pode ser induzida através da ativação do fator de transcrição NF- κ B após exposição à pirogênios exógenos (lipopolissacarídeos - LPS) ou da própria IL-1 β (MEANS et al., 2000; DINARELLO, 1989).

Os níveis de IL-1 β estão elevados no hipotálamo após administração central de endotelina-1 (FABRÍCIO et al., 2006b) e também no plasma e fluido cerebrospinal (CSF) após administração de LPS (VIRTA et al., 2002) e zymozan (LYTE et al., 1986).

A administração de IL-1 β induz resposta febril em coelhos (PALMI et al., 1994), em ratos (De SOUZA et al., 2002) e em humanos (NEMUNAITIS et al., 1994). Esta resposta febril é inibida após administração de dipirona, indometacina (De SOUZA et al., 2002) e antagonista de receptor canabinóide CB1 (AM251) (FRAGA et al., 2016). A resposta febril induzida por estímulos como ET-1, CRF, e PFPF é reduzida após administração do antagonista IL-1ra, demonstrando que a IL-1 β atua como mediador dessa resposta (FABRÍCIO et al., 2006a).

Assim como a IL-1 β , a IL-6 também é considerada um dos principais pirogênicos endógenos. Após estímulo inflamatório, a transcrição de IL-6 é realizada por monócitos, células do endotélio vascular, células B, células T, queratinócitos, sinoviócitos e fibroblastos. No encéfalo a IL-6 é sintetizada por neurônios e células da glia (KISHIMOTO et al., 1989; MAIMONE et al., 1993; FREI et al., 1989; JUTTLER et al., 2002; NISHIMOTO et al., 2006).

Apesar de não ser expressa constitutivamente, a expressão de IL-6 é rapidamente induzida por vários estímulos inflamatórios como IL-1, TNF- α , INF- γ e LPS em diversos tipos celulares (SEHGAL et al., 1988; NORDAN, 1986; SHALABY, 1989; KOHASE, 1987).

Assim como a IL-6, o seu receptor, IL-6R também é produzido e expresso em diversos tipos celulares (YAMASAKI, 1988; KISHIMOTO 1989). A IL-6, cuja síntese é regulada pelo fator de transcrição NF-kB, liga-se ao seu receptor solúvel IL-6R e, em seguida, ligam-se à proteína de membrana gp130, que é a responsável pela transdução do sinal (revisado por NAUGLER et al., 2008).

Estudos com camundongos deficientes em IL-6, demonstraram que esta é essencial para a indução de resposta de fase aguda, assim como para a resposta de anticorpo antiviral (KOPF et al., 1994) e que esse tipo de animal não desenvolveu febre após estímulo com LPS ou IL-1 β (CHAI et al., 1996).

A IL-6 é uma citocina que possui múltiplas funções biológicas. Entretanto, a produção exacerbada de IL-6 pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes como a artrite reumatoide (KISHIMOTO et al., 1989; CROSTEIN et al., 2007). Também possui importante papel na instalação do quadro de anemia da inflamação crônica por inibir a secreção de ferro pelos macrófagos e a sua absorção pelo intestino (LEE, P et al., 2005, NEMETH, E. et al., 2003, 2004, 2006).

A administração de IL-6 a pacientes portadores de doenças neoplásicas induz resposta febril através da indução da síntese da enzima ciclooxigenase (COX) -2 e síntese de prostaglandinas (NAKAHARA et al., 2003). Em infecções como a sepse, níveis elevados de

IL-6 estão relacionados à severidade e mortalidade por sepse (NASRAWAY et al., 2003). Outro estudo mostra que ratos com sepse apresentaram níveis elevados de IL-6, IL-1 β e TNF- α no exsudato peritoneal, plasma e hipotálamo (FIGUEIREDO et al., 2010). Estudo realizado por Soares et al. (2012) mostrou que as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α também estão elevadas no sangue e no exsudato peritoneal após a administração sistêmica de colônias de *E. coli* a ratos, sendo que apenas a IL-6 e IL-1 β aumentaram no CSF e no hipotálamo. Ainda, a resposta febril induzida pela administração central de IL-6 foi inibida após pré-tratamento com indometacina, dipirona, nimesulida e AM251 (De SOUZA et al., 2002; WERNER et al., 2006; FRAGA et al., 2016).

O TNF- α é sintetizado por macrófagos, mas também por outros tipos celulares como, linfócitos, células de Kupffer, células NK e adipócitos (BEUTLER; CERAMI, 1989; YOSHIKA et al., 1998; CAWTHORN; SETHI, 2008). A síntese de TNF pode ser induzida por pirogênios exógenos como o LPS, vírus, parasitas, etc (De FORGE et al., 1990).

A produção exacerbada de TNF ou a sua sinalização prolongada está presente em diversas patologias, como doenças autoimunes, autoinflamatórias (McDERMOTT et al., 1999; PALLADINO et al., 2003). Além de funções no sistema imune, o TNF também regula funções fisiológicas como apetite, febre, metabolismo energético e atividade endócrina (KLASING et al., 1988).

A sinalização do TNF ocorre através de dois tipos de receptores, TNFR1 ou p55 e TNFR2 ou p75, que podem ser encontrados ligados à membrana ou como homotrímeros solúveis. TNFR1 é expresso constitutivamente em diversos tipos celulares, enquanto TNFR2 é encontrado principalmente em células do sistema imune (revisado por STOJANOV et al., 2005). Em relação à resposta febril, o receptor p55 apresenta maior envolvimento do que o receptor p75 (BENIGNI et al., 1996; SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998). Quando administrado por via central ou periférica, o TNF- α induziu resposta febril em ratos (KETTELHUT; GOLDBERG, 1988; De SOUZA et al., 2002), em humanos (MICHIE et al., 1988) e em coelhos (DINARELLO et al., 1986).

1.3.2 Prostaglandinas e fator liberador de corticotropina

Em 1971 foi observado que a injeção de prostaglandina E₂ (PGE₂) no terceiro ventrículo de gato induziu resposta febril (MILTON; WEDLANDT, 1971). Na mesma época, estudos realizados por Feldberg e Saxena (1971) e Stitt (1973) mostraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de PGs induziu febre em ratos e coelhos.

A síntese dos eicosanóides inflamatórios ocorre por ação enzimática da endoperoxidase PGH-sintase (PGHS) que utiliza o ácido araquidônico (AA) proveniente da membrana fosfolipídica como substrato. A PGHS, também denominada como ciclooxigenase (COX), possui duas atividades importantes: a de ciclooxigenação por adicionar molécula de oxigênio ao ácido araquidônico para formar a PGG₂, e a de peroxidação ao converter a PGG₂ em uma forma mais estável, a PGH₂. Por ação de isomerases específicas, a PGH₂ é transformada em seus respectivos eicosanóides, PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}, tromboxano A₂ (OHKI et al., 1979; SMITH et al., 2002; HECKER et al., 1995).

A COX-1 e COX-2 são produtos de dois genes distintos que são localizados nos cromossomos 9 e 1 em humanos (FUNK et al., 1991; YOKOYAMA et al., 1989). Estas isoenzimas possuem estruturas homologas e ambas catalisam a síntese de PGH₂ a partir do AA com análogas propriedades cinéticas (KUJUBU et al., 1991; OTTO; SMITH, 1995). A principal diferença entre COX-1 e COX-2 está relacionada à sua regulação e distribuição no tecido.

A COX-1 é expressa constitutivamente no trato gastrointestinal, rins, músculo liso vascular e plaquetas. Possui atividades citoprotetoras, de agregação plaquetária, e manutenção da perfusão renal. Por outro lado, a COX-2 é expressa apenas após contato com estímulo inflamatório, sendo comumente referida como a isoforma induzível da COX. Por isso acredita-se que a enzima induzível COX-2 é a isoforma envolvida na síntese de prostaglandina durante respostas inflamatórias, enquanto a COX-1 está envolvida na manutenção de funções fisiológicas desses eicosanóides (Revisado por CLARIA, 2003). Entretanto, há estudos que mostram a expressão constitutiva de COX-2 nos rins, pulmões, útero e cérebro de ratos (revisado por VANE; BOTTING, 1998).

Estudo realizado por Chandrasekharam et al. (2002) mostrou a existência de uma terceira isoenzima da ciclooxigenase formada a partir do mesmo gene da COX-1, denominada de COX-3, expressa principalmente no córtex cerebral de cães e humano e no coração humano.

A PGE₂ é considerada o mediador essencial da febre por ser a isoforma mais predominante no cérebro (BLATTEIS et al., 1997). Estudos em ratos que visavam investigar os sítios de ação onde a prostaglandina produz febre determinaram que o local com atividade fibrogênica induzida pela PGE₂ está na área antero ventral do terceiro ventrículo e compreende o *organum vasculosum da laminae terminalis* (OVLT) e área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO-HA) (WILLIAMS et al., 1977; STITT, 1991; SCAMMELL et al., 1966; OKA et al., 1997).

Na década de 90 foram identificados quatro subtipos de receptores para prostaglandinas, EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. Os receptores EPs são acoplados a proteína G, mas cada um possui diferentes vias de transdução. O subtipo EP₁ aumenta os níveis intracelulares de cálcio, EP₂ e EP₄ estimulam a adenilato ciclase e EP₃ inibem a adenilato ciclase (USHIKUBI et al., 1998; BOIE et al., 1997; KIRIYAMA et al., 1997).

Os níveis de PGE₂ no CSF e hipotálamo estão aumentados durante a resposta febril induzida por LPS e o tratamento com o inibidor da COX, indometacina, reduz tanto a resposta febril quanto os níveis de PGE₂ (MALVAR et al., 2011).

A PGE₂ também é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril induzida por endotoxina, embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a PGF_{2α}, também possam induzir febre em ratos (MORIMOTO et al., 1988; COELHO et al., 1993; De SOUZA et al., 2002). Quando administrada por via i.c.v., a PGF_{2α} induz aumento da temperatura corporal em ratos e coelhos (MORIMOTO et al. 1988; FRAGA et al., 201) e há aumento dos níveis desse prostanóide no CSF de ratos injetados perifericamente com endotoxina (COELHO et al., 1995). A resposta febril induzida por PGF_{2α} é inibida quando administrado um antagonista de CRF, o que não ocorre na febre causada pela PGE₂ (ROTHWELL, 1990).

Nesse contexto, a injeção i.c.v. de CRF aumenta a atividade simpática (BROWN et al. 1982), estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (LeFEUVRE et al. 1987) e eleva a temperatura corporal em ratos (DIAMANT; DE WIED, 1991). Rothwell (1991) sugeriu que a PGF_{2α} poderia mediar os efeitos de certas citocinas (IL-1β e IL-6) estimulando a liberação de CRF, ao contrário da PGE₂ que induz febre por estimulação direta da termogênese.

Fabício e colaboradores (2006a) evidenciaram a participação da endotelina na resposta febril induzida pelo CRF, uma vez que o antagonista não seletivo de receptores ET, bosentana, e o antagonista seletivo de receptores ET_B, BQ788, reduziram a resposta febril induzida pela administração central de CRF. Soares et al. (2009) demonstraram que o mesmo ocorre com a resposta febril induzida pelo MIP-1α, sugerindo o envolvimento do CRF no desenvolvimento dessa resposta.

Tem sido proposto que o CRF participa como mediador da resposta febril induzida por IL-1β (ROTHWELL, 1989), IL-6 (ROTHWELL et al., 1991) e IL-8 (ROTHWELL et al., 1990a), pois o tratamento com antagonista de receptores de CRF, α-helicoidal CRF₍₉₋₄₁₎, ou de anticorpos anti-CRF atenuam significativamente a resposta pirogênica induzida por essas citocinas. Por outro lado, as respostas febris induzidas por IL-1α, TNF-α e ET-1 não são

alteradas pelo tratamento com antagonista de CRF (ROTHWELL, 1989, FABRICIO et al., 2006a).

O CRF induz febre via receptor CRF_1 , enquanto que a urocortina, UCN1, induz hipertermia via receptores CRF_2 , sendo que nenhuma dessas respostas parecem depender de prostaglandina derivada de COX, já que os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), celecoxibe e indometacina, não foram capazes de inibir a febre do CRF e a hipertermia do UCN1 (FIGUEIREDO et al., 2010). Estes resultados confirmam estudos prévios onde o tratamento com indometacina e dipirona foram ineficazes para reduzir a resposta febril induzida pelo CRF (De SOUZA et al., 2002).

Trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que há duas vias de mediação da resposta febril induzida pelo LPS (Figura 1). Uma via dependente de prostaglandinas, resultante da produção e/ou liberação de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, bradicinina e $PGF_{2\alpha}$, onde a PGE_2 , o CRF e os opióides endógenos atuam como mediadores finais (De SOUZA et al., 2002; TALBOT et al., 2012; FRAGA et al., 2008). A segunda via independe de prostaglandinas em resposta ao PFPF, CRF e ET-1, envolvendo a síntese de $IL-1$ e opióides endógenos no sistema nervoso central (SNC) (ZAMPRONIO et al., 1994; FABRÍCIO et al., 2005a; 2006b; FRAGA et al., 2008).

Figura 1: Representação esquemática das vias envolvidas na febre induzida por LPS em ratos. O LPS estimula a liberação de pirogênicos endógenos por 2 vias pirogênicas. Uma dependente de PGs (elipses abertas). A outra insensível a indometacina e ao celecoxib e dependente de ET-1, $IL-1$ e/ou OE (opióide endógeno) (elipses hachuradas). O CRF é implicado em ambas as vias. (Modificado de FABRICIO et al., 2005a). BK: Bradicinina.

1.3.3 Canabinóides

A planta *Cannabis sativa* (canábis) foi uma das primeiras plantas usadas pelo homem para obter fibras têxteis, medicamentos e em rituais religiosos e sociais (SCHULTZ, 1969). O primeiro registro do uso de canábis como medicamento foi na China, há cerca de 5000 anos, e era recomendada para tratamento de dores reumáticas, constipação, malária, trabalho de parto e quando misturada com vinho, era utilizada como analgésico cirúrgico (MECHOULAM, 1986). De acordo com Robson (2001) há registros do uso de canábis pela Ásia, Oriente Médio, África do Sul e América do Sul.

Os canabinóides podem ser classificados em 3 tipos: endocanabinóides quando são produzidos pelo próprio corpo humano; fitocanabinóides que estão presentes naturalmente na planta *Cannabis sativa*, e canabinóides sintéticos que são sintetizados em laboratório (revisado por KATCHAN et al, 2016). Mais de 60 compostos derivados da canábis foram identificados. O principal princípio psicoativo canabinóide presente na canábis é o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), que foi isolado na década de 60 (MECHOULAM et al., 1965). Os efeitos predominantes do Δ^9 -THC no sistema nervoso central incluem analgesia, antiêmiase, alterações na cognição e memória, sensação de euforia, diminuição da função motora, sedação entre outros (HOLLISTER, 1986; DEWEY, 1986).

Devane et al (1988) descobriram que os canabinóides exercem seus efeitos através da interação com receptores endógenos específicos. O receptor canabinóide CB₁ foi inicialmente isolado e clonado do cérebro de ratos (MATSUDA et al., 1990) e do tronco cerebral humano (GERARD et al., 1991). Além do cérebro de ratos, os receptores CB₁ também foram clonados de tecidos de camundongos e humanos e apresentam uma semelhança de 97 a 99% dos seus aminoácidos entre as espécies (HOWLETT et al., 2002). Posteriormente, em 1993, um segundo receptor canabinóide (CB₂) foi identificado em uma linhagem de células promielocíticas de leucemia humana HL60 e o RNA transcrito para CB₂ foi encontrado no baço, mas não no cérebro de ratos (MUNRO et al., 1993). Os receptores CB₂ apresentam uma homologia de 48% com os receptores CB₁ e a estrutura de ambos é indicativa de receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G (HOWLETT; FLEMING, 1984).

Os receptores canabinóides são classificados como receptores acoplados à proteína Gi/o e quando ativados inibem a enzima adenilato ciclase. Consequentemente, há diminuição dos níveis intracelulares de AMPc e um aumento da ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (PERTWEE, 2006; DI MARZO, 2008). Os receptores CB₁ e CB₂ também estão acoplados a canais iônicos na membrana celular podendo aumentar a

condutância de canais de potássio (HENRY; CHAVKIN, 1995; MACKIE et al., 1995; PAGOTTO et al., 2006) ou diminuir a condutância de canais de cálcio atuando indiretamente pela ativação de proteína G e produção de segundos mensageiros (FELDER et al., 1993; MACKIE et al., 1995; GEBREMEDHIN et al., 1999).

Os receptores CB₁ são expressos em neurônios periféricos e centrais e em algumas células não neuronais (PERTWEE, 1997 e 2005; HOWLETT et al., 2002). No sistema nervoso central, os receptores CB₁ são distribuídos de forma heterogênea e de acordo com a sua função no córtex cerebral, hipocampo, substância nigra reticulata, globo pálido, núcleo entopeduncular e cerebelo, bem como em outras áreas do cérebro e da medula espinhal (PERTWEE, 1997, 2000 e 2005; IVERSEN, 2003). Baseado em sua localização, os receptores CB₁ possuem um importante papel na modulação da analgesia, temperatura corporal, humor e coordenação motora (LEDENT et al., 1999; HOWLETT et al., 2002).

O RNAm de receptor CB₁ é encontrado principalmente no tecido neural, mas também pode ser encontrado em tecidos periféricos incluindo células do sistema imune, glândula adrenal, medula óssea, coração, pulmão, próstata, testículos, timo, amígdalas e baço (KAMINSKI et al., 1992; BOUABOULA et al., 1993; GALIEGUE et al., 1995; NOE et al., 2000; PERTWEE, 2005).

Os receptores CB₂ são expressos principalmente em células do sistema imune e apresentam um importante papel na imunomodulação (HOWLETT et al., 2002; PERTWEE, 1997). Estudos demonstraram a existência de RNAm para os receptores CB₂ no baço, timo, amígdalas, medula óssea, pâncreas, assim como em macrófagos, monócitos e em uma ampla variedade de células imunes em cultura (BOUABOULA et al., 1993; MUNRO et al., 1993; FACCI et al., 1995; GALIÈGUE et al., 1995; SCHATZ et al., 1997). O RNAm para os receptores canabinóides CB₂ também foi encontrado em tecido glial de córtex retirados de ratos recém-nascidos, inclusive em concentrações mais elevadas do que os níveis encontrados para os receptores CB₁ na mesma preparação, demonstrando uma possível função dos receptores CB₂ no desenvolvimento cerebral (CARLISLE et al., 2002).

Após a descoberta dos receptores, iniciou-se a procura pelos seus ligantes canabinóides endógenos. Surpreendentemente, o primeiro ligante endógeno isolado foi um lipídeo e não um peptídeo, como esperado. Tal substância foi isolada de cérebros de porco e identificada como araquidoniletanolamida e foi denominada anandamida (DEVANE et al., 1992). A anandamida (AEA) liga-se em ambos receptores CB₁ e CB₂ (GLASS; NORTHUP, 1999), mas a afinidade para receptores CB₁ é 4 vezes maior do que para os receptores CB₂ (FELDER et al., 1995). Além dos receptores canabinóides, a AEA também ativa o receptor

vanilóide de potencial transiente (TRPV1), considerada como um agonista total, mas com afinidade de ligação relativamente baixa (ZYGMUNT et al., 1999). Estudos mostraram que a ativação de receptor TRPV1 pela anandamida induz a liberação de substância P e de calcitonina gene-relacionada, que possuem efeitos pró-inflamatório e vasodilatador local. Ações benéficas como proteção cardíaca e efeitos anti-hipertensivos também foram relatados (ZYGMUNT et al., 1999; TOGNETTO et al., 2001; SHIN et al., 2002; HWANG et al., 2000).

Em 1995, um segundo ligante endógeno denominado 2-araquidonilglicerol (2-AG) foi identificado. Este é capaz de ativar os receptores CB₁ e CB₂ (MECHOULAM et al., 1995; STELLA et al., 1997) e possui atividade intrínseca relativa maior que a anandamida para ambos os receptores (PERTWEE, 1999; SAVINAINEN et al., 2001).

Tanto a AEA e 2-AG diferem dos neurotransmissores clássicos por não serem estocados e liberados por vesículas (GAETANI et al., 2003). Eles são sintetizados e liberados rapidamente pelos neurônios em decorrência da atividade elétrica induzida por despolarização e consequente influxo de íons cálcio (DI MARZO et al., 1994; STELLA et al., 1997). Existem evidências de que a ativação de receptores metabotrópicos possa induzir a síntese neuronal de anandamida independente de influxo iônico (GIUFFRIDA et al., 1999).

De modo geral, os endocanabinóides são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana que são hidrolisados por fosfolipases às respectivas formas finais dos neurotransmissores (BISOGNO et al., 2005).

A formação de AEA ocorre através da hidrólise de uma N-acil-fosfatidiletanolamina por uma fosfolipase D específica (DI MARZO et al., 1998), enquanto o 2-AG é formado pela hidrólise de um acilglicerol contendo o araquidonato na posição 2, e é catalisado por uma hidrolase de diacilgliceróis (BISOGNO et al., 2005).

Ainda não se tem certeza se a liberação dos endocanabinóides a partir da membrana neuronal ocorre por simples difusão ou se existe algum mecanismo de difusão passiva ou carreamento por proteínas envolvido neste processo (DI MARZO et al., 1994; PIOMELLI, 2003). Contudo, acredita-se que uma vez sintetizados, os endocanabinóides ajam como mensageiros retrógrados sendo liberados pela membrana pós-sináptica, difundindo-se para a membrana pré-sinapse e agindo nos receptores canabinóides, diminuindo a probabilidade de liberação de outros neurotransmissores, por interferirem em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesículas sinápticas (HOFFMAN; LUPICA, 2000).

O processo de inativação dos endocanabinóides ocorre por dois processos cooperativos: recaptação e degradação por hidrólise intracelular (CHICCA et al., 2012). Embora os endocanabinóides possam se difundir livremente através da membrana plasmática,

a receptação é facilitada por um sistema rápido e seletivo de carreamento presente em neurônios e em células gliais (DI MARZO et al., 1994; BELTRAMO et al., 1997a; HILLARD; CAMPBELL, 1997). Depois de recaptados, os endocanabinóides são metabolizados por enzimas de degradação específicas para cada ligante.

A AEA é clivada pela enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH) em etanolamina e ácido araquidônico (UEDA et al., 1999; KACZOCH, et al., 2010). O 2-AG pode ser clivado em glicerol e ácido araquidônico pela FAAH, embora a principal hidrolase seja a monoacilglicerol lipase responsável por aproximadamente 85% da hidrólise do 2-AG no cérebro de camundongos (BLANKMAN et al., 2007).

O principal efeito relatado sobre a temperatura corporal após a administração do Δ^9 -THC é a redução da temperatura corporal. O Δ^9 -THC produz uma resposta hipotérmica significativa quando administrado por via i.c.v. ou no quarto ventrículo de camundongos (FITTON; PETERWEE, 1982), e quando administrado sistemicamente em ratos (TAFTE et al., 2015). Este efeito pode ser revertido pelo antagonista de receptores CB₁ SR141716A (COMPTON et al., 1996; TAFTE et al., 2015).

OVADIA et al. (1995) relataram que a administração direta do agonista canabinóide sintético HU-210 na APO-HA de ratos induziu hipotermia. A administração do WIN 55212-2, um agonista mais potente que o Δ^9 -THC, na APO-HA também induziu hipotermia de forma dose dependente em ratos. Esta resposta parece ser mediada por receptores CB₁, pois foi abolida pela administração do antagonista de receptores CB₁ SR141716A, por via intramuscular (i.m.), e não foi alterada pelo antagonista de receptores CB₂ SR144528 (RAWLS et al., 2002). Benamar et al. (2007) mostraram que apenas altas doses de WIN 55212-2, quando administrado por via intraperitoneal, induziram hipotermia em ratos e quando administrados 30 min antes da administração periférica de LPS atenuaram a resposta febril induzida pelo LPS, sugerindo o envolvimento do sistema canabinóide na prevenção da instalação desta resposta febril.

CRAWLEY et al., (1993) observaram que a administração periférica de altas doses do endocanabinóide anandamida em ratos diminuiu a temperatura corporal. Por outro lado, estudos recentes mostraram que a administração i.c.v. de anandamida em ratos induziu resposta febril via receptores CB₁ (FRAGA et al., 2009), e tal aumento de temperatura é reduzido perante o tratamento com indometacina e celecoxibe (FRAGA et al., 2016).

1.4 Controle farmacológico da resposta febril

A origem da terapia antipirética ainda é desconhecida. Em 323 a.C., o banho gelado foi indicado para Alexandre O Grande como tratamento para uma febre misteriosa com a finalidade de reduzir a temperatura. Este procedimento de resfriamento para aliviar a febre é utilizado até hoje. Escritas do período Sumeriano descrevem o uso de folhas do salgueiro por médicos assírios para o tratamento de doenças reumáticas. Os antigos egípcios também tinham conhecimento das propriedades antipiréticas das folhas do salgueiro e as usavam como tratamento para diversas doenças inflamatórias. Hipócrates, influenciado pela medicina egípcia, indicava o uso do extrato da casca do salgueiro para aliviar as dores do parto e reduzir a febre (revisado por MACKOWIAK, 2000).

A primeira aplicação clínica de extratos de plantas com atividade antipirética é atribuída ao Reverendo Edward Stone que enviou uma carta, em 1763, para a Sociedade Real de Londres descrevendo a eficácia antipirética da casca do salgueiro para tratamento da malária (STONE, 1973). Em 1829, o farmacêutico francês Leroux isolou pela primeira vez a salicilina das folhas do salgueiro e demonstrou sua atividade antipirética, desencadeando diversos estudos que levaram a obtenção do composto ácido acetilsalicílico por Felix Hoffman. Este composto foi registrado pelo chefe dos laboratórios de farmacologia da Bayer, Heinrich Dreser, como aspirina em 1899 (VANE et al., 1990). Em seguida, novos compostos com efeito antipirético foram descobertos e incorporados na farmacopéia clínica como a antipirina (1884), antifebrina (1886), fenacetina (1887), acetominofeno (1888), piramidona (1896), fenilbutazona (1949) e indometacina (1963) (revisado por MACKOWIAK, 2000).

Em 1971, Vane mostrou que o mecanismo de ação da aspirina e outras drogas similares como a indometacina estaria relacionado com a diminuição da produção de prostaglandinas (VANE, 1971). Neste mesmo ano, Milton e Wendlandt (1971) propuseram que substâncias pirogênicas poderiam induzir febre por meio da síntese de prostaglandinas específicas e que as drogas antipiréticas reduziriam a febre por meio do bloqueio da sua síntese. Estudos posteriores demonstraram que os AINEs exercem seus efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos através da inibição das enzimas COX responsáveis pela síntese dos eicosanoides (VANE, 1971; De SOUZA et al., 2002; FABRÍCIO et al., 2005a).

No entanto, estudos do nosso grupo e da literatura sugerem que os AINEs atuam através de mecanismos adicionais à inibição das enzimas COXs. Foi demonstrado que a aspirina, o salicilato de sódio, a indometacina e o ibuprofeno inibem a expressão gênica da

forma induzida da enzima óxido sintase (iNOS) (AEBERHARD et al., 1995; AMIN et al., 1995; DI GIROLAMO et al., 2003); que a aspirina e o salicilato de sódio inibem a ativação do fator de transcrição NF- κ B (KOPP; GHOSH, 1994; TAKADA et al., 2004) e de um fator nuclear à região promotora de TNF- α (TAKASHIBA et al., 1995); que a indometacina e etoricoxibe diminuem os níveis da subunidade p65 do NF- κ B em ratos com câncer de pulmão (SETIA; SANYAL, 2012). Ainda, existem evidências de que o efeito antipirético da indometacina, salicilato e ibuprofeno seja inibido pelo antagonista de receptores V₁ da arginina-vasopressina (AVP) (ALEXANDER et al., 1989; WILKINSON; KASTING, 1985; De SOUZA et al., 2002; SOARES et al., 2011).

A dipirona é uma pró-droga com potente efeito analgésico e antipirético, porém desprovida de atividade anti-inflamatória (LORENZETTI; FERREIRA, 1985). Como mostrado na figura 2, após sua administração, a dipirona é convertida por hidrólise em 4-metilaminoantipirina (4-MAA), que é metabolizado em 4-formilaminoantipirina (4-FAA), 4-aminoantipirina (4-AA) e 4-acetilaminoantipirina (4-AAA) (COHEN et al., 1998; WESSEL et al., 2006).

Figura 2: Sequência da formação dos quatro principais metabólitos da dipirona: 4-metilaminoantipirina (4-MAA), 4-aminoantipirina (4-AA), 4-formilaminoantipirina (4-FAA) e 4-acetilaminoantipirina (4-AAA) (modificado de WESSEL et al., 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que a dipirona inibe a enzima COX tanto *in vitro* (ABBATE et al., 1990; CHANDRASEKHARAM et al., 2002) quanto *in vivo* (LEVY et al., 1998; AYOUB et al., 2004). Baseado nesses resultados foi proposto que os efeitos analgésicos e antipiréticos da dipirona sejam, em parte, devido à inibição da enzima COX e da consequente diminuição da síntese de prostaglandinas (GELGOR et al., 1992; WARNER; MITCHELL, 2002).

De Souza et al. (2002) demonstraram que a dipirona inibiu a resposta febril induzida por LPS e por mediadores que participam desta resposta como IL-1 β , PFPF, TNF- α , IL-6, PGF_{2 α} . Entretanto, a dipirona não alterou a resposta febril induzida pela injeção i.c.v. de PGE₂ e CRF. Posteriormente, nosso grupo demonstrou que a dipirona exerceu efeito antipirético sobre a febre induzida por ET-1 e LPS, sem alterar a concentração hipotalâmica de PGE₂, sugerindo que o seu mecanismo de ação está relacionado a uma via independente da inibição da síntese de prostaglandinas (MALVAR et al. 2011).

Também foi demonstrado que a resposta febril e o aumento da concentração de PGE₂ induzidos pelo LPS, no fluido cerebrospinal e hipotálamo foram reduzidos pelo tratamento com os metabólitos 4-MAA e 4-AA demonstrando que a atividade antipirética destes metabólitos está diretamente relacionada com sua concentração no hipotálamo. Entretanto, neste mesmo estudo foi observado que o metabólito 4-MAA também inibe a resposta febril induzida pelo veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (vTs), que não induz síntese de PGE₂ no CSF e hipotálamo (MALVAR et al., 2014). Estes resultados demonstram haver outro mecanismo de ação independente da inibição da síntese de prostaglandinas.

Em vista do exposto e objetivando abrir perspectivas para o tratamento seletivo de respostas febris de diferentes origens e que utilizam diversos mediadores, investigamos neste trabalho o efeito antipirético da dipirona e seus metabólitos 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e por mediadores envolvidos nesta resposta como as citocinas, as prostaglandinas, o CRF e a anandamida.

Objetivos

---

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos antipiréticos dos metabolitos 4-MAA e 4-AA da dipirona sobre a resposta febril induzida pelos mediadores que são sintetizados e/ou liberados após a administração sistêmica de LPS.

2.2 Objetivos específicos

Comparar:

1. O efeito antipirético do tratamento com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril dependente da síntese de PGE_2 induzida pelos mediadores $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 ;
2. O efeito antipirético do tratamento com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril independente da síntese de PGE_2 induzida pelos mediadores CRF e $\text{PGF}_{2\alpha}$;
3. O efeito antipirético do tratamento com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGE_2 ;
4. O efeito antipirético do tratamento com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela AEA.

Materiais e Métodos

---

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos Wistar machos pesando entre 180-200g, mantidos na temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sobre ciclo claro-escuro de 12:12 h, com livre acesso a água e comida. Protocolo Comitê de Ética nº 14.1.676.53.0 – CEUA Campus de Ribeirão Preto-USP.

3.2 Esterilização

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C por 30 min (material plástico e soluções), esterilizados por calor seco a 180°C por 2 h (material de vidro e metal) ou ainda por luz violeta.

3.3 Soluções, drogas e reagentes

a. Solução de corante de Azul de Evans

- Azul de Evans (Merck) 2,50 g
- Água deionizada q.s.p. 100 ml
- A solução foi filtrada em filtros Whatman nº 2

b. Drogas e reagentes

- Dipirona – Cayman Chemical Co., USA.
- 4-AA – Sigma, St Louis, MO, USA.
- 4-MAA – Sintetizado no Departamento de Física e Química da FCFRP pelo Prof. Giuliano Cesar Clososki.
- Interleucina-1beta recombinante murina – R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA.
- Interleucina-6 recombinante murina – R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA.
- Fator de necrose tumoral alfa recombinante de rato – R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA.
- Fator liberador de corticotropina recombinante de humano e de rato – Bachem, Torrance, CA, USA.

- Prostaglandina E₂ – Sigma, St Louis, MO, USA.
- Prostaglandina F_{2α} – Sigma, St Louis, MO, USA.
- Anandamida – Tocris, UK.
- Kit de Elisa para dosagem de PGE₂ – Cayman Chemical Co., USA.
- LPS (endotoxina de *E. coli* 0111:B4) – Sigma, St Louis, MO, USA.
- Terramicina® - Zoetis, Girona, ESP.
- Dopaser (xilazina) – Hertape Calier, Barcelona, ESP.
- Ketamina Agener (cloridrato de cetamina) 10% - Agener União, São Paulo, BRA.
- Flunixin Meglumina – Shering-Plough, USA.

c. Vias de administração

- **Intracerebroventricular (i.c.v.):**
- As drogas foram administradas em um volume de 3 µl no ventrículo lateral direito por meio de uma agulha de microinjeção (30G) conectada a uma seringa Hamilton (25 µl) por um tubo de polipropileno P20. A agulha excedeu a cânula em 2,5 mm.
- **Intraperitoneal (i.p.):**
- As drogas foram administradas por via intraperitoneal em volume de 1 ml/kg, utilizando agulhas 20 x 5,5 e seringas de 1 ml.
- **Intramuscular (i.m.):**
- As drogas foram administradas por via intramuscular em um volume de 1 ml/kg, utilizando agulhas 13 x 4,5 e seringas de 1 ml.

3.4 Síntese do metabólito 4-metilaminoantipirina

O metabólito 4-metilaminoantipirina (4-MAA) foi sintetizado a partir da dipirona no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP pelo Professor Doutor Giuliano Cesar Clososki.

O 4-MAA foi sintetizado a partir da dipirona pela reação direta com hidróxido e sódio em água, tomando como base a metodologia por Sinning et al. (2008). Esta reação consiste na hidrólise do sal dipirona e é tido como o primeiro passo no metabolismo desta pró-droga, com a diferença que, no organismo, a molécula sofre hidrólise ácida na luz do estômago, em contraste com a hidrólise alcalina aqui realizada. Após a extração, o composto obtido foi purificado em coluna flash utilizando AcOEt/MeOH 95:5 como fase móvel sendo isolado em

50% de rendimento. O composto foi caracterizado através de análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono.

3.5 Implantação de cânulas no ventrículo lateral

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina 58 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via i.p. As implantações das cânulas seguiram a metodologia já padronizada em nosso laboratório (FABRÍCIO et al., 2005a; MACHADO et al., 2007). Assumindo o bregma como ponto de referência, as coordenadas utilizadas para a implantação da cânula i.c.v. foram: AP: -1,5 mm, L: -1,6 mm, com uma inclinação da barra incisal de -2,5 mm. As cânulas foram introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas utilizadas foram determinadas com base no Atlas de Paxinos & Watson (1986). Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 10 mg/kg e cetamina 58 mg/kg e 3 µl de corante azul de Evans foram injetados no local correspondente à microinjeção. Em seguida os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram extraídos para localização histológica da cânula e do local da microinjeção. Os animais cujos ventrículos laterais não estavam corados tiveram suas medidas de temperatura desconsideradas durante o cálculo dos resultados.

3.6 Implante do transmissor de temperatura na cavidade abdominal

Anteriormente à cirurgia, os transmissores foram esterilizados em solução de glutaraldeído 2% (v/v; imersão por 24 h). Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 58 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via i.p. Após a tricotomia e antissepsia da pele, foi executada uma incisão de aproximadamente 2cm na pele e músculos abdominais. O transmissor foi então lavado com solução salina estéril e inserido na cavidade peritoneal. Os músculos e a pele foram suturados separadamente (fio de sutura Catgut simples) e os animais receberam 0,2 ml de terramicina (400 mg/kg) para uso veterinário e injeção intramuscular de flunixin megluine 2,5 mg/kg.

3.7 Determinação da variação da temperatura retal por telemetria

A temperatura retal dos animais será medida por inserção de sonda, conectada a um teletermômetro, a 4,0 cm de profundidade no reto dos animais, seguindo metodologia já padronizada por nosso laboratório (Fabrício et al., 2005a). As medidas serão feitas de 30 em 30 minutos por 6 horas.

Durante os experimentos, a temperatura ambiente será controlada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. As temperaturas basais dos animais serão determinadas por três ou mais medidas antes da administração de qualquer estímulo pirogênico. Somente os animais com temperatura estável e na faixa de $36,8$ a $37,4^\circ\text{C}$ serão utilizados. As medidas serão feitas a intervalos de 30 min a partir da administração dos estímulos.

3.8 Determinação da variação da temperatura corporal por radiotelemetria

No processo de leitura da temperatura corporal por radiotelemetria, transmissores operados por bateria (Data Science) foram implantados na cavidade abdominal conforme descrito anteriormente e acionados no dia anterior ao experimento. A frequência de saída (Hz) do transmissor é monitorizada por uma antena montada em uma mesa receptora situada abaixo da caixa de contenção de cada animal e conectada a um processador periférico (Dataquest Sistem LabPro versão 3.1) conectado, por sua vez, a um computador pessoal. As frequências foram amostradas a intervalos de 15 min e convertidas para graus Celsius ($^\circ\text{C}$) pelo processador por 6 horas após a administração do estímulo. O procedimento que foi utilizado para as injeções e os parâmetros de temperatura ambiente foram os mesmos descritos para a medida por telemetria (item 3.7).

3.9 Coleta do hipotálamo

Por ocasião da coleta do hipotálamo, os animais foram submetidos às condições descritas acima, quanto à temperatura ambiente e leitura da temperatura corporal. O animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina 58 mg/kg e xilazina 10 mg/kg e eutanasiado por decapitação. O hipotálamo foi dissecado do cérebro com os seguintes limites: a borda anterior do quiasma óptico, a borda anterior dos corpos mamilares e o sulco hipotalâmico lateral, com uma profundidade de 2 mm. O hipotálamo foi congelado em metanol 50% e estocado a -70°C (FABRÍCIO et al., 2006b).

3.10 Determinação da concentração de PGE₂ no hipotálamo.

O hipotálamo, aproximadamente 90 mg de tecido, foi homogeneizado em 1 ml de RPMI contendo indometacina (2 mg/ml), utilizando um sonicador (Virsonic 100® - VirTis Company/USA) e acidificado (pH = 3,5 – 4,0) com HCl 1N. Os tubos contendo o homogenato foram centrifugados a 20000 g ($\cong$ 15000 rpm) por 10 min a 4°C e o sobrenadante (800 μ l) foi coletado. A PGE₂ foi extraída do sobrenadante usando uma mini coluna de C18 e eluída da coluna com 2 ml de etanol absoluto. As amostras foram secas em speed vacuum (Hetovac® modelo CT110) por 18 horas. No dia da dosagem, as amostras secas foram ressuspendidas em 1 ml de Tampão EIA (tampão próprio do kit de ELISA para dosagem de PGE₂) e a concentração de PGE₂ foi determinada por ELISA, procedendo ao ensaio enzimático como determinado no manual do kit. A quantidade de PGE₂ foi normalizada de acordo com o peso do hipotálamo.

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio do kit ELISA de PGE₂ utilizado neste estudo foi de menos de 10%. O limite de detecção do kit foi de 15 pg/ml. Os dados de reatividade cruzada foram os seguintes: 43% com PGE₃; 18,7% de PGE₁; 1% com 6-keto-PGF_{1 α} ; 0,25% com 8-iso-PGF_{2 α} e menos de 0,01% com todos os outros prostanóides.

3.11 Análise estatística

Todas as variações da temperatura dos animais foram expressas como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) a partir da temperatura corporal basal média (°C). Os dados relativos à variação da temperatura corporal dos animais foram submetidos à análise de variância Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ao passo que os dados relativos à concentração de PGE₂ foram submetidos à análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

---

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento intraperitoneal com dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a variação da temperatura retal em ratos

A administração sistêmica de DIP (120 mg/kg, i.p.), 4-AA e 4-MAA (90 mg/kg, i.p.) não alterou a temperatura basal dos animais, demonstrando que as doses escolhidas não induzem hipotermia nos animais tratados.

Figura 3. Efeito do tratamento intraperitoneal com dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a variação da temperatura retal em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.p. de salina estéril (0,5 ml). Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. das variações da temperatura de 5 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C.

4.2 Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratos

A resposta febril induzida pelo LPS (50 $\mu\text{g/kg}$, i.p.) teve duração de aproximadamente 4h ($p < 0,05$; 2,25h – 6h), sendo a fase inicial a partir da 2,25h ($\Delta T = 1,18 \pm 0,14^\circ\text{C}$) e a fase tardia a partir da 4,25h ($\Delta T = 1,60 \pm 0,09^\circ\text{C}$).

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.) (Figura 4A) reduziu apenas a fase inicial da resposta (VEI/LPS $\Delta T = 1,18 \pm 0,14^\circ\text{C}$ vs DIP/LPS $\Delta T = 0,06 \pm 0,10^\circ\text{C}$, $p < 0,05$), o que também ocorreu com o 4-AA (90 mg/kg, i.p.) (VEI/LPS $\Delta T = 1,18 \pm 0,14^\circ\text{C}$ vs 4-AA/LPS $\Delta T = 0,18 \pm 0,17^\circ\text{C}$, $p < 0,05$) (Figura 4B).

Por outro lado, o metabólito 4-MAA (90 mg/kg, i.p.) reduziu tanto a fase inicial (VEI/LPS $\Delta T = 1,18 \pm 0,14^\circ\text{C}$ vs 4-MAA/LPS $\Delta T = 0,06 \pm 0,14^\circ\text{C}$, $p < 0,05$) quanto a fase tardia (VEI/LPS $\Delta T = 1,60 \pm 0,09^\circ\text{C}$ vs 4-MAA/LPS $\Delta T = 0,90 \pm 0,27^\circ\text{C}$, $p < 0,05$) da resposta febril induzida pelo LPS (Figura 4C).

Figura 4. Efeito antipirético da dipirona, 4-AA e 4-MAA sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratos. Dpirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.p. de LPS (50 µg/kg) ou salina estéril (0,5 ml). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 5 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/ LPS.

4.3 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos

A resposta febril induzida pela IL-1 β (3,12 ng/rato, i.c.v.) teve duração de aproximadamente 4,5h ($p < 0,05$, 1,25h – 5,75h) com pico na 2,5h ($\Delta T = 1,38 \pm 0,19^\circ\text{C}$). O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.) (Figura 5A) aboliu esta resposta (3h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,38 \pm 0,19^\circ\text{C}$ vs DIP/IL-1 β $\Delta T = 0,2 \pm 0,17^\circ\text{C}$, $p < 0,05$).

Assim como a dipirona, o 4-MAA (90 mg/kg, i.p.) (Figura 5C) também aboliu a resposta febril induzida pela IL-1 β (3h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,38 \pm 0,19^\circ\text{C}$ vs 4-MAA/IL-1 β $\Delta T = 0,15 \pm 0,13^\circ\text{C}$, $p < 0,05$).

Entretanto, o metabólito 4-AA (90 mg/kg, i.p.) (Figura 5B) reduziu apenas a fase inicial da resposta (2h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,30 \pm 0,18^\circ\text{C}$ vs 4-AA/IL-1 β $\Delta T = 0,42 \pm 0,09^\circ\text{C}$, $p < 0,05$), a qual se reestabeleceu na 2,5h (VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,38 \pm 0,19^\circ\text{C}$ vs 4-AA/IL-1 β $\Delta T = 1,10 \pm 0,20^\circ\text{C}$, $p < 0,05$).

Figura 5. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-1 β em ratos. Dpirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de IL-1 β (3,12 ng/rato) ou salina estéril (3 μ l). Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. das variações da temperatura de 4 – 6 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/ IL-1 β .

4.4 Efeito da administração sistêmica de dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre o aumento da síntese de PGE₂ no hipotálamo induzido pela IL-1 β em ratos

Como observado nos resultados do item 4.3, apenas o pré-tratamento com DIP e 4-MAA aboliram a resposta febril induzida pela IL-1 β , enquanto o metabólito 4-AA reduziu apenas a fase inicial da resposta. Em vista destes resultados investigamos se a redução da resposta febril induzida pela IL-1 β ocorreria devido à redução da síntese de PGE₂ no hipotálamo.

A Figura 6A mostra que o pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.) aboliu a resposta febril (3h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,24 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs DIP/IL-1 β $\Delta T = 0,72 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$) enquanto o 4-MAA (90 mg/kg, i.p.) reduziu esta resposta (3h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,24 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs 4-MAA/IL-1 β $\Delta T = 0,64 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$). Já o metabólito 4-AA (90 mg/kg, i.p.) reduziu apenas a fase inicial desta resposta (3h; VEI/IL-1 β $\Delta T = 1,24 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/ IL-1 β $\Delta T = 1,41 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$).

Em relação ao aumento dos níveis de PGE₂ no hipotálamo, é possível observar que tanto a DIP, 4-MAA quanto o 4-AA foram capazes de reduzir esse aumento induzido pela IL-1 β (Figura 6B).

Figura 6. Efeito da administração sistêmica de dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre o aumento da síntese de PGE₂ no hipotálamo induzido IL-1β em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de IL-1β (3,12 ng/rato) ou salina estéril (3μl). O hipotálamo foi coletado 3 h após a injeção de LPS ou salina. A concentração de PGE₂ foi determinada pelo método ELISA. Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura corporal e da concentração de PGE₂ no hipotálamo (pg/g de tecido) de 4 - 9 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo Vei/IL-1β.

4.5 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-6 em ratos

A resposta febril induzida pela IL-6 (300 ng/rato, i.c.v.) iniciou-se uma hora após sua administração i.c.v e perdurou até a quinta hora.

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.; Figura 7A) reduziu a resposta febril induzida pela IL-6 (1,75h; VEI/IL-6 $\Delta T = 1,00 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ vs DIP/IL-6 $\Delta T = 0,04 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$). O metabólito 4-AA (90 mg/kg, i.p.; Figura 7B) também reduziu esta resposta (VEI/IL-6 $\Delta T = 1,00 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/IL-6 $\Delta T = 0,07 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$). Assim como o 4-AA, o metabólito 4-MAA (90 mg/kg, i.p.; Figura 7C) reduziu significativamente a resposta febril induzida pela IL-6 (VEI/IL-6 $\Delta T = 1,00 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ vs 4-MAA/IL-6 $\Delta T = 0,14 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$).

Figura 7. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela IL-6 em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de IL-6 (300 ng/rato) ou salina estéril (3μl). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 7 – 9 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo Vei/IL-6.

4.6 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α em ratos

A resposta febril induzida pelo TNF- α (250 ng/rato, i.c.v.) teve duração de 4h ($p < 0,05$; 1,5h – 3,25h) com pico na 2,25h ($\Delta T = 1,18 \pm 0,03^\circ\text{C}$).

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.; Figura 8A) reduziu a resposta febril induzida por esta citocina (2,25h; VEI/TNF- α $\Delta T = 1,18 \pm 0,03^\circ\text{C}$ vs DIP/TNF- α $\Delta T = 0,24 \pm 0,09^\circ\text{C}$, $p < 0,05$). O metabólito 4-AA (90 mg/kg, i.p.; Figura 8B) e o 4-MAA (90 mg/kg, i.p.; Figura 8C), também reduziram essa resposta (VEI/TNF- α $\Delta T = 1,18 \pm 0,03^\circ\text{C}$ vs 4-AA/TNF- α $\Delta T = 0,22 \pm 0,12^\circ\text{C}$; 4-MAA/TNF- α $\Delta T = -0,02 \pm 0,07^\circ\text{C}$, $p < 0,05$).

Figura 8. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo TNF- α em ratos. Dpirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de TNF- α (250 ng/rato) ou salina estéril (3 μ l). Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. das variações da temperatura de 4 – 6 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/TNF- α .

4.7 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGE₂ em ratos

A resposta febril induzida pela PGE₂ (250 ng/rato, i.c.v.) têm característica intensa e de curta duração apresentando um pico aos 30 minutos ($\Delta T = 1,62 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$) que em seguida declina até 2,25h ($\Delta T = 0,38 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$) após a administração. O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.; Figura 9A) não alterou a resposta febril induzida pela PGE₂ (0,5h; VEI/PGE₂ $\Delta T = 1,62 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ vs DIP/PGE₂ $\Delta T = 1,34 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$). Os metabólitos 4-AA ou 4-MAA (90 mg/kg, i.p.; Figura 9B e 9C) também não modificaram esta resposta (VEI/PGE₂ $\Delta T = 1,62 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/PGE₂ $\Delta T = 1,86 \pm 0,24^{\circ}\text{C}$; 4-MAA/PGE₂ $\Delta T = 1,70 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$).

Figura 9. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGE₂ em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de PGE₂ (250 ng/rato) ou salina estéril (3μl). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 5 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. * $p > 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/PGE₂.

4.8 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ em ratos

A resposta febril induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (750 ng/rato, i.c.v.) teve duração de 1h ($p < 0,05$, 0,5h – 1,5h) com pico em 1h após a injeção ($\Delta T = 0,76 \pm 0,06^\circ\text{C}$).

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.; Figura 10A) reduziu a resposta febril (1h; $\text{VEI/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,76 \pm 0,06^\circ\text{C}$ vs $\text{DIP/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,22 \pm 0,10^\circ\text{C}$, $p < 0,05$). O 4-AA (90 mg/kg, i.p.; Figura 10B) aboliu esta resposta (1h, $\text{VEI/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,76 \pm 0,06^\circ\text{C}$ vs $4\text{-AA/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,06 \pm 0,13^\circ\text{C}$, $p < 0,05$) enquanto o metabólito 4-MAA (90 mg/kg, i.p.; Figura 10C), reduziu por curto período esta resposta (dos 30 aos 45 minutos), $\text{VEI/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,76 \pm 0,06^\circ\text{C}$ vs $4\text{-MAA/PGF}_{2\alpha} \Delta T = 0,35 \pm 0,07^\circ\text{C}$, $p < 0,05$).

Figura 10. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela PGF_{2α} em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de PGF_{2α} (750 ng/rato) ou salina estéril (3 µl). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 8-10 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. *p<0,05 quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/ PGF_{2α}.

4.9 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo CRF em ratos

A resposta febril induzida pela CRF (5 µg/rato, i.c.v.) teve duração de 2h ($p < 0,05$, 4h – 6h), iniciando-se na 4h e pico na 4,75h ($\Delta T = 0,94 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$).

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.; Figura 11A) não alterou a resposta febril (4,75h; VEI/CRF $\Delta T = 0,94 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs DIP/CRF $\Delta T = 0,53 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$). O 4-AA (90 mg/kg, i.p.; Figura 11B) também não reduziu essa resposta (VEI/CRF $\Delta T = 0,94 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/CRF $\Delta T = 0,65 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$). O metabólito 4-MAA (90 mg/kg, i.p.; Figura 11C), bem como a DIP e o 4-AA, também não reduziu esta resposta (VEI/CRF $\Delta T = 0,94 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs 4-MAA/CRF $\Delta T = 0,48 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$).

Em contrapartida, observou-se uma resposta hipotérmica nas primeiras horas do experimento em todos os grupos tratados como segue: DIP (1h; VEI/CRF $\Delta T = 0,22 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs DIP/CRF $\Delta T = -0,38 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$), 4-AA (VEI/CRF $\Delta T = 0,22 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/CRF $\Delta T = -1,00 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$) e 4-MAA (VEI/CRF $\Delta T = 0,22 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs 4-MAA/CRF $\Delta T = -0,80 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$).

Figura 11. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo CRF em ratos. Dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de CRF (5 µg/rato) ou salina estéril (3 µl). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 6 – 9 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. # $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/SAL.

4.10 Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela AEA em ratos

A resposta febril induzida pela AEA (10 µg/rato, i.c.v.) foi observada durante todo o experimento com pico na 3,75h ($\Delta T = 0,71 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$).

O pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, i.p.) (Figura 12A) reduziu apenas o início da resposta (VEI/AEA $\Delta T = 0,71 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs DIP/AEA $\Delta T = 0,50 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$);, o que também ocorreu com o 4-AA (90 mg/kg, i.p.) (1h, VEI/AEA $\Delta T = 0,71 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs 4-AA/AEA $\Delta T = 0,42 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$) (Figura 12B).

Por outro lado, o metabólito 4-MAA (90 mg/kg, i.p.) reduziu a resposta febril induzida pela AEA até a quinta hora (VEI/AEA $\Delta T = 0,71 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ vs 4-MAA/AEA $\Delta T = 0,09 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$, $p > 0,05$; Figura 12C)

Figura 12. Efeito antipirético da dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pela AEA em ratos. Dpirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) ou veículo (salina estéril, 0,5 ml) foram administrados i.p. 30 minutos antes da injeção i.c.v. de AEA (10 µg/rato) ou salina estéril (3µl). Os valores representam a média ± E.P.M. das variações da temperatura de 5 – 8 animais por grupo. As temperaturas basais anteriores ao tratamento ficaram entre 36,8 e 37,4°C. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo VEI/AEA.

Discussão

---

5 DISCUSSÃO

A dipirona é uma pró-droga com potente efeito analgésico e antipirético, porém desprovida de atividade anti-inflamatória (LORENZETTI; FERREIRA, 1985). Após sua administração, a dipirona é rapidamente convertida em seu principal metabólito, 4-metilaminoantipirina (4-MAA) por hidrólise no suco gástrico e absorvido nesta forma. O 4-MAA pode ser oxidado em 4-formilaminoantipirina (4-FAA), ou demetilado em 4-aminoantipirina (4-AA). Este último pode ser acetilado pela enzima polimórfica N-acetiltransferase em 4-acetilaminoantipirina (4-AAA) (COHEN et al., 1998; WESSEL et al., 2006). Nenhum dos 4 metabólitos ligam-se às proteínas plasmáticas (ZYLBER-KATZ et al., 1985) e cerca de 65% a 70% dos metabólitos são excretados pelos rins após administração de dipirona (VOLZ; KELLNER, 1980).

Estudo realizado por Cohen et al. (1998) mostrou que 1 hora após a administração oral de dipirona em humanos já é possível detectar 4-MAA no CSF e os demais metabólitos são detectados de acordo com a sua formação hepática. Cohen também sugere que há a possibilidade da formação de 4-AA no CSF, já que a enzima CYP3A4, responsável pela metabolização do 4-MAA, está presente em tecidos do SNC em humanos (GHERSI-EGLA et al., 1993; GEISSLINGER et al., 1996).

Malvar et al. (2014) avaliaram a quantidade de metabólitos que é detectada após a administração intraperitoneal da dipirona, 4-MAA e 4-AA no plasma, CSF e hipotálamo de ratos. Foi possível observar que após 30 min da administração de dipirona (120 mg/kg) é detectado uma maior concentração de 4-MAA em relação aos demais metabólitos no plasma, CSF e hipotálamo, seguido do metabólito 4-AA, 4-AAA e 4-FAA. Após administração i.p. de 4-MAA (90 mg/kg), a concentração deste metabólito e de 4-AA no plasma, CSF e hipotálamo é superior quando comparado à injeção de dipirona, o que sugere que há maior biodisponibilidade central dos metabólitos quando eles mesmos são administrados.

Malvar e colaboradores (2014) demonstraram também que a administração de 120 mg/kg de dipirona não alterou a temperatura basal de ratos, e que doses superiores (240-360 mg/kg) induziram hipotermia. Além disso, o metabólito da dipirona responsável por essa resposta hipotérmica é o 4-MAA (nas doses 240-360 mg/kg) (MALVAR et al., 2014). Confirmamos esses resultados quando a administração de dipirona (120 mg/kg), 4-MAA e 4-AA (90 mg/kg) também não alterou a temperatura basal dos animais (Figura 3).

Os AINEs tradicionais inibem as enzimas COXs por competir pelo sítio de ligação ativo da enzima com o ácido araquidônico (SMITH; DEWITT, 1996; MARNETT et al.,

1999). Diversos estudos têm demonstrado que a dipirona inibe a enzima COX tanto *in vitro* (ABBATE et al., 1990; CHANDRASEKHARAM et al., 2002) quanto *in vivo* (LEVY et al., 1998; AYOUB et al., 2004).

Pierre et al. (2007) mostrou que o 4-MAA não compete pelo sítio catalítico das COXs. De acordo com os achados de Pierre et al. (2007) é possível que o 4-MAA oxide doadores de radicais bloqueando o início da reação catalítica e/ou o progresso de um novo ciclo catalítico pela redução do elevado estado oxidativo da enzima, mecanismo similar proposto para o paracetamol (ARONOFF et al., 2003; LUCAS et al., 2005).

De Souza et al. (2002) demonstraram que a dipirona inibiu a resposta febril induzida por LPS, IL-1 β , PFPF, PGF_{2 α} , TNF- α , IL-6, entretanto não alterou a resposta febril induzida pela injeção i.c.v. de PGE₂ e CRF. Ainda, resultados obtidos em nosso grupo por Malvar et al. (2011) mostraram que a dipirona apresentou efeito antipirético sobre a febre induzida por ET-1 e LPS, sem alterar a concentração hipotalâmica de prostaglandina E₂, sugerindo que o seu mecanismo de ação antipirético esteja relacionado a uma via independente da inibição da síntese de prostaglandinas. Tal sugestão é reforçada pelo fato de que a dipirona e o 4-MAA são capazes de reduzir a resposta febril induzida pelo vTs, que é caracterizada pela ausência de produção de PGE₂ no CSF e hipotálamo (MALVAR et al., 2014), regiões encefálicas altamente relacionada com a termorregulação e resposta febril (MORRISON; NAKAMURA, 2011).

Experimentalmente, a resposta febril é, em geral, induzida pela injeção de toxinas bacterianas, por exemplo, o LPS, um constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas, entre elas a *E. coli* (BLATTEIS, 2006, 2010).

A administração sistêmica de LPS induz febre em diversas espécies animais tais como ratos (MALVAR et al., 2011), bode (MPHAHLELE et al., 2004), ovelha (BLATTEIS et al., 1987), coelhos (NAKAMORI et al., 1994), entretanto, doses elevadas de LPS também podem causar hipotermia (KAPLANSKI et al., 2014).

Estudo realizado por De Souza et al. (2002) mostrou que a dipirona e indometacina apresentaram efeito antipirético sobre a resposta febril induzida pelo LPS em ratos. Estes dados foram confirmados por Malvar e colaboradores (2011) que demonstraram que a indometacina possuiu efeito prolongado (6h), enquanto a dipirona teve efeito mais curto (até 3,5h). Neste mesmo estudo foi observado que apenas a dipirona reduz a resposta febril induzida pela ET-1, que não foi alterada pela indometacina, sugerindo que o efeito antipirético da dipirona ocorre de maneira independente da inibição de COX. Soares (2004) que a dipirona reduz a resposta febril do MIP-1 α sem alterar significativamente o aumento do

nível de PGE_2 no CSF após a administração i.c.v. desta quimiocina, o que também sugere um mecanismo antipirético independente da inibição da síntese de PGE_2 . Malvar et al. (2014) demonstraram que o metabólito 4-MAA possui efeito antipirético mais duradouro que o da dipirona. Nossos resultados (Figura 4) mostraram que a dipirona e o 4-AA reduziram apenas a fase inicial da resposta febril induzida por LPS, enquanto que o pré-tratamento com 4-MAA reduz as duas fases desta resposta, o que sugere que o 4-MAA seja um antipirético mais efetivo que a dipirona e o 4-AA.

A IL-1 β é uma das citocinas envolvidas na resposta febril induzida pelo LPS (ROTH; DE SOUZA, 2001). Está bem descrito na literatura que a IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória (CONTI et al., 2004) e quando administrada a ratos (De SOUZA et al., 2002), coelhos (PALMI et al., 1994) e humanos (NEMUNAITIS et al., 1994) é capaz de induzir resposta febril. A resposta febril induzida pela administração i.c.v. de IL-1 β em ratos é reduzida pelo tratamento com dipirona e indometacina (De SOUZA et al., 2002) e pelo antagonista IL-1ra (FABRÍCIO et al., 2006a). A IL-1 β também pode ser considerada como mediador da febre induzida pelo PFPF, CRF e ET-1 (FABRÍCIO et al., 2006a).

Nossos resultados demonstraram que a administração i.c.v. de IL-1 β induziu uma resposta febril duradoura, e o pré-tratamento com dipirona e 4-MAA aboliu essa resposta (Figura 5A e 5B). Entretanto, o efeito antipirético do 4-AA foi apenas parcial, sendo que a febre se reestabeleceu 2,5h após o estímulo com IL-1 β (Figura 5C).

Na resposta febril que acompanha a artrite induzida pelo zymozan em ratos, foi observado aumento da concentração de PGE_2 no CSF. A concentração de PGE_2 foi diminuída após tratamento com dipirona, indometacina e paracetamol (KANASHIRO et al., 2009). A administração intravenosa de LPS e i.c.v. de ET-1 promovem aumento de PGE_2 no CSF e hipotálamo, e o tratamento com dipirona e indometacina foi capaz de reduzir este aumento no CSF, mas não no hipotálamo (MALVAR et al., 2011). Entretanto, quando os animais foram tratados com os metabólitos 4-MAA e 4-AA, a concentração de PGE_2 foi reduzida tanto no CSF quanto no hipotálamo, o que pode ser explicado pelo aumento da concentração destes metabólitos quando comparado ao tratamento com dipirona (MALVAR et al., 2014).

Como a IL-1 β está envolvida tanto na via dependente e independente da síntese de PGE_2 da cascata de mediadores envolvidos na resposta febril induzida pelo LPS (FABRÍCIO et al., 2006), investigamos se a dipirona, o 4-AA e o 4-MAA reduzem a concentração de PGE_2 no hipotálamo após este estímulo.

Observamos que 3 horas após a administração de IL-1 β ocorreu redução da resposta febril apenas nos animais tratados com dipirona e 4-MAA (Figura 6A). Apesar de reduzir

somente a fase inicial da resposta febril induzida pela IL-1 β , o metabólito 4-AA à semelhança da dipirona e do 4-MAA, reduziu a concentração de PGE₂ no hipotálamo (Figura 6B), o que sugere que a redução da febre induzida pela IL-1 β não esteja relacionada somente com a redução deste prostanóide no SNC.

A IL-6 é uma citocina sintetizada após administração periférica de LPS (ROTH et al., 1993; COELHO et al., 1995). A IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória e a sua administração central induz resposta febril em ratos, que pode ser reduzida após administração sistêmica de indometacina e dipirona (De SOUZA, 2002), flurbiprofeno, antagonista CRF (ROTHWELL et al., 1991a) e anticorpo anti-IL-6 (SOARES et al., 2012).

Soares e colaboradores (2012) demonstraram que os níveis de IL-6 e IL-1 β , mas não de TNF- α , estão elevados no CSF e hipotálamo de ratos, 3 horas após administração sistêmica de colônias de *E. coli* e que a resposta febril observada foi reduzida após tratamento com soro anti-IL-6, sugerindo um importante papel da IL-6 na resposta febril induzida por administração de colônias de *E. coli*.

Estudos demonstraram que camundongos deficientes de IL-6 não desenvolveram febre após administração periférica de baixas doses (50 μ g/kg) de LPS (CHAI et al., 1996; KOZAK et al., 1998), enquanto que após administração de altas doses (2,5 mg/kg) levam ao desenvolvimento de febre em camundongos controle (KOZAK et al., 1998). Esses dados sugerem que o papel da IL-6 como mediador da febre induzida pelo LPS seja dependente da dose (LEON, 2002). Mediante tais evidências, a IL-6 parece ser uma citocina produzida no SNC após injeção periférica de LPS e seu efeito pirogênico parece depender da liberação de prostaglandinas e CRF. Nossos resultados mostraram que a dipirona e os metabólitos 4-AA e 4-MAA inibiram a febre induzida pela IL-6 (Figura 7).

O TNF também está presente entre as citocinas sintetizadas após a administração periférica de LPS (BLATTEIS; SEHIC, 1997). O TNF não é comumente detectado em indivíduos saudáveis, mas são observados níveis elevados no plasma e nos tecidos em condições inflamatórias ou infecciosas (ROBAK et al., 1998; NUMBERGER et al., 1995). Os efeitos pró-inflamatórios do TNF pode ser explicado baseado nos seus efeitos no endotélio vascular e interação com leucócitos endoteliais (BRADLEY, 2008) e também na capacidade de induzir apoptose celular (WAJANT et al., 2003).

O TNF compartilha muitas propriedades biológicas com a IL-1. Ambas IL-1 e TNF são capazes de estimular células sinoviais a produzir prostaglandina e collagenase e liberar fator de ativação plaquetário. São citotóxicas para certas células tumorais e induzem a

produção de proteínas de fase aguda. Entretanto, os receptores para TNF são distintos dos receptores para IL-1 (revisado por DINARELLO, 1999).

Experimentos com camundongos deficientes de IL-1 β desenvolveram resposta febril após administração de TNF- α , enquanto que camundongos deficientes de IL-6 falharam em desenvolver esta resposta, sugerindo que a IL-6 é essencial para desenvolvimento da resposta febril induzida pelo TNF- α (SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998).

O tratamento com dipirona e indometacina reduz a resposta febril induzida pela injeção i.c.v. de TNF- α (DE SOUZA et al., 2002). Em nosso estudo, mostramos que os metabólitos 4-AA e 4-MAA também são capazes de inibir a resposta febril induzida pelo TNF- α (Figura 8).

As prostaglandinas, principalmente a PGE₂, são consideradas os mediadores finais da resposta febril (ROTH et al., 2009). Li et al. (1999) demonstraram que camundongos deficientes de COX-2, mas não COX-1, não apresentam resposta febril após administração de LPS. A injeção de PGE₂ na APO-HA induziu resposta febril, e a injeção de inibidor de COX nesta mesma região reduz a resposta febril induzida pela administração periférica de LPS (SCAMELL et al., 1998).

Alguns estudos mostram que cada receptor EP possui distribuição distinta nas regiões OVLT e APO-HA (NAKAMURA, et al., 2000; EK et al., 2000; OKA et al., 2000) e que cada receptor possui um papel diferente na resposta de fase aguda, incluindo a febre (OKA et al., 1997; ENGBLOM et al., 2003).

Estudos realizados com animais deficientes de receptores EP₁ e EP₃ mostraram a importância desses receptores no desenvolvimento da resposta febril, pois animais desprovidos de receptores EP₃ não desenvolveram febre. Entretanto, esta resposta foi apenas atenuada em animais deficientes para EP₁ (OKA et al., 2003, 2004).

Estudo realizado por Malvar (2008) demonstrou que o receptor EP₃ não possui papel na instalação da resposta febril induzida pelo LPS, mas que está envolvido na manutenção desta resposta.

A resposta febril induzida após administração i.c.v. de PGE₂ é caracterizada por uma resposta monofásica meia hora após a administração. Estudo realizado por De Souza et al. (2002) mostrou que a resposta febril induzida pela PGE₂ é insensível a ação de anti-inflamatórios não-esteroidais e da dipirona. No presente estudo, também demonstramos que assim como a dipirona, os metabólitos 4-AA e 4-MAA não reduziram essa resposta, sugerindo que estes metabólitos não agem diretamente nos receptores para PGE₂ (Figura 9).

A PGE₂ é considerada o principal eicosanóide envolvido na resposta febril induzida por endotoxina (*E. coli*), embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a PGF_{2α}, também participem da resposta febril em ratos (MORIMOTO et al., 1988; COELHO et al., 1993; DE SOUZA et al., 2002; FABRÍCIO et al., 2005b).

Quando administrada pela via i.c.v., a PGF_{2α} induz aumento da temperatura corporal em ratos e coelhos (MORIMOTO et al. 1988; FRAGA et al., 2016) e houve aumento dos níveis desse prostanóide no CSF de ratos injetados perifericamente com endotoxina e ET-1 (COELHO et al., 1995; FABRÍCIO et al., 2005b). Entretanto, a resposta febril induzida por PGF_{2α} foi inibida quando os animais foram tratados com um antagonista de CRF, o que não ocorreu na febre causada pela PGE₂ (ROTHWELL, 1990b).

Estudo realizado por De Souza e colaboradores (2002) demonstrou que somente o tratamento com dipirona foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela PGF_{2α}, e que esta foi insensível ao tratamento com indometacina. Werner et al. (2006) mostrou que a nimesulida foi capaz de reduzir apenas a segunda fase da febre induzida pela PGF_{2α}, sugerindo que a nimesulida possui um mecanismo de ação adicional à inibição de COX.

No presente estudo, confirmamos o resultado anterior demonstrando que a dipirona reduz a febre induzida pela PGF_{2α} (Figura 10A) e que apenas o 4-AA apresentou uma resposta semelhante à da dipirona (Figura 10B), pois o 4-MAA reduziu apenas o início desta resposta (Figura 10C), com a febre sendo reestabelecida 1 hora após a administração da PGF_{2α}. Estes resultados demonstraram que a atividade antipirética da dipirona sobre a resposta febril induzida pela PGF_{2α} ocorreu à custa da formação do metabólito 4-AA.

Vários estudos sugerem a participação do CRF na indução da termogênese em ratos, pois a injeção i.c.v. de CRF aumenta a atividade simpática (BROWN et al. 1982), estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (LeFEUVRE et al. 1987) e eleva a temperatura corporal (DIAMANT; DE WIED, 1991).

Trabalho realizado por Fabricio et al. (2006a) mostrou que a endotelina, via receptor ET_B, participa da resposta febril induzida por PFPF e CRF, mas não por IL-6, PGE₂ e PGF_{2α}. A resposta febril induzida por endotelina não foi alterada após administração de antagonista de receptor CRF, mostrando que ET-1 não induz a síntese/liberação do CRF. Por outro lado, o tratamento com IL-1ra foi capaz de reduzir a resposta febril induzida por ET-1, PFPF e CRF, mostrando que a IL-1β é um mediador envolvido nessa resposta.

O CRF induz febre via receptor CRF₁, enquanto que a UCN1 induz hipertermia via receptores CRF₂, sendo que nenhuma destas respostas parecem depender de prostaglandina derivada de COX, já que os AINEs, celecoxibe e indometacina, não foram capazes de inibir a

febre causada pelo CRF e a hipertermia induzida pelo UCN1 (FIGUEIREDO et al., 2010). Estes resultados confirmam estudo prévio, no qual o tratamento com indometacina e dipirona foram ineficazes em reduzir a resposta febril induzida pelo CRF (De SOUZA et al., 2002).

No presente estudo, a resposta febril induzida por CRF não foi reduzida após o pré-tratamento com dipirona, 4-AA e 4-MAA. Entretanto, foi observado hipotermia nas primeiras horas, com intensidade maior nos grupos tratados com 4-AA e 4-MAA (Figura 11).

Outro agente indutor de febre estudado é a anandamida (AEA). Porém, seu papel como indutor de resposta febril é contraditório. Benamar et al. (2007) descreveram o efeito da anandamida como antipirético quando administrada sistemicamente, tanto por via intraperitoneal quanto subcutânea. Por outro lado, Fraga et al. (2009) demonstraram que a anandamida possui efeito pirogênico quando administrada centralmente (FRAGA et al., 2009).

Estudo realizado por Benamar e colaboradores (2007) mostrou que doses altas do agonista canabinóide WIN 55,212-2 provocou hipotermia em ratos. O pré-tratamento com dose não-hipotérmica de WIN 55,212-2 atenuou a resposta febril induzida pelo LPS. Este efeito foi bloqueado na presença do antagonista seletivo CB1, SR141716, mas não do antagonista seletivo CB2, SR144528, sugerindo que o efeito antipirético observado pelo WIN 55,212-2 ocorre via receptor CB1.

Estudo do nosso grupo mostrou que a AEA, quando administrada i.c.v., apresentou um efeito pirogênico via receptor CB1, pois os antagonistas de receptor CB2 e TRPV1 não foram capazes de reduzir a resposta febril induzida pela AEA. Também foi observado o envolvimento da AEA como mediador da resposta febril induzida pelo LPS através do uso do antagonista de receptor CB1, AM251 (FRAGA et al., 2009).

Em outro estudo de Fraga et al. (2016), foi investigado o envolvimento da AEA na via de sinalização que participa da resposta febril induzida pelo LPS. O tratamento com o antagonista AM251 reduziu a resposta febril induzida pela IL-1 β , IL-6, TNF- α , CRF e ET-1, entretanto, foi ineficaz na redução da febre induzida pela PGE₂ e PGF_{2 α} . Estes autores demonstraram também que a resposta febril induzida pela AEA é sensível aos inibidores das COXs, indometacina e celecoxibe, e que esta resposta é acompanhada de aumento da concentração de PGE₂ no CSF, que foi reduzido na presença de AM251. Além disso, a naloxona, antagonista de receptores opióides, foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pela AEA. Esta resposta foi acompanhada pelo aumento dos níveis de β -endorfina no CSF, que foram reduzidos após administração de AM251, sugerindo que, além das prostaglandinas,

a síntese/liberação de opióides endógenos é necessária para a promoção do efeito pirogênico da anandamida (FRAGA et al., 2016).

Em nosso estudo, mostramos que a administração i.c.v. de AEA induziu resposta febril e que a dipirona e o 4-AA reduziram apenas o início da resposta enquanto que o 4-MAA se mostrou mais efetivo por bloquear a resposta febril até a quinta hora de experimento (Figura 12). Estes dados sugerem que apenas o 4-MAA seja capaz de inibir a síntese/liberação dos opióides endógenos, uma via que deve ser investigada como possível alvo farmacológico do 4-MAA.

Em resumo, nossos resultados sugerem que, dependendo do estímulo, a dipirona, 4-MAA e 4-AA podem, além de inibir a síntese de PGE_2 , inibir a síntese/liberação de CRF e/ou de opióides endógenos.

Sumário de Resultados

---

6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

Os resultados do presente estudo demonstraram que:

- A dipirona e 4-MAA inibiram até a 6^a. hora a resposta febril induzida pela IL-1 β , enquanto o 4-AA reduziu somente até a segunda hora de experimento. Além disso, a redução da concentração de PGE₂ no hipotálamo não está diretamente relacionada com o efeito antipirético desses fármacos.
- Assim como a dipirona, os metabólitos 4-MAA e 4-AA inibiram a resposta febril induzida pela IL-6 e TNF- α .
- A dipirona, 4-MAA e 4-AA apresentaram efeito antipirético através de um mecanismo adicional à inibição da síntese de prostaglandinas, pois inibiram a resposta febril induzida pela PGF_{2 α} .
- A dipirona, 4-MAA e 4-AA não alteraram a resposta febril induzida pelo CRF e PGE₂.
- O 4-MAA e 4-AA induziram hipotermia nos animais tratados com CRF.
- Apenas o 4-MAA aboliu a resposta febril induzida pela anandamida, enquanto a dipirona e 4-AA reduziram apenas o início da resposta.

Tabela 1. Resultados dos tratamentos com dipirona, 4-MAA e 4-AA sobre a resposta febril induzida pelo LPS e seus mediadores.

Estímulo/Tratamento	Dipirona	4-MAA	4-AA
LPS	+	++	+
IL-1β	++	+++	+
IL-6	+++	+++	+++
TNF-α	+++	+++	+++
PGE₂	—	—	—
PGF_{2α}	+++	+	+++
CRF	—	—	—
AEA	+	++	+

+ indica que o tratamento reduziu apenas o início da resposta febril; ++ indica que o tratamento reduziu a resposta febril; +++ indica que o tratamento aboliu a resposta febril; — indica que o tratamento não alterou a resposta febril.

Conclusão

---

7 CONCLUSÃO

O 4-MAA reduziu as respostas febris induzidas pela IL-6, TNF- α , IL-1 β , PGF_{2 α} , mas não aquelas induzidas pela PGE₂ e CRF sugerindo que, como a dipirona, o 4-MAA pode inibir a síntese/liberação de CRF. Ainda, o 4-MAA reduziu a febre induzida pela AEA, que também participa da resposta febril induzida pelo LPS e promove a síntese de PGE₂ e opióides. Este conjunto de dados sugere que o 4-MAA reduz a resposta febril induzida pelo LPS por culminar na inibição da síntese de PGE₂ e opióides.

De forma semelhante a dipirona, o 4-AA reduziu as febres induzidas pela AEA, IL-6, TNF α , PGF_{2 α} . Assim como a dipirona e o 4-MAA, também não modificou as febres induzidas por PGE₂ e CRF, além de ser menos efetivo na redução da febre induzida pela IL-1 β , sugerindo que seu efeito antipirético ocorre pela inibição da síntese de prostaglandinas e da síntese/liberação de CRF.

Referências Bibliográficas

---

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, R. et al. Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: *in vitro* effect of dipyrene. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 41, p. 89-93, 1990.

AEBERHARD, E.E.; et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 208, n. 3, p. 1053-9, 1995.

AKIRA, S. TLR signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 311, p. 1-16, 2006.

ALEXANDER, S.J.; COOPER, K.E.; VEALE, W.L. Sodium salicylate: alternate mechanism of central antipyretic action in the rat. **Pflugers Arch.** v. 413, n. 5, p. 451-5, 1989.

AMIN, A.R. et al. The mode of action of aspirin-like drugs: Effect on inducible nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, p. 7926-7930, 1995.

ARANOFF, D.M. et al. Inhibition of prostaglandin H2 synthases by salicylate is dependent on the oxidative state of the enzymes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, p. 589-595, 2003.

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

AYOUB, S.S. et al. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 11165-11169, 2004.

BELTRAMO, M. et al. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. **Science**, v. 277, p. 1094-1097, 1997.

BENAMAR, K. et al. A novel role of cannabinoids: implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, p. 1127-1133, 2007.

BENIGNI, F.R. et al. 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, p. 5563-5568, 1996.

BENNETT, Jr.; BEESON, P.B. Studies on the pathogenesis of fever. I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. **J. Exp. Med.** v. 98, n. 5, p. 477-492, 1953a.

BENNETT, Jr.; BEESON, P.B. Studies on the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. **J. Exp. Med.** v. 98, n. 5, p. 493-508, 1953b.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. **Annual Review of Immunology.** v. 7, p. 625-65, 1989.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, p. 224-238, 2005.

BLANKMAN, J.L.; SIMON, G.M.; CRAVATT, B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Chem Biol.** v. 14, p. 1347-56, 2007.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacol Ther.** v. 111, n. 1, p. 194-223, 2006.

BLATTEIS, C.M. The onset of fever: new insights into its mechanism. **Prog Brain Res.** v. 162, p. 3-14, 2007.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Prostaglandin E₂: A putative fever mediator. In: PA MACKOWIAK, **Fever basic mechanisms and management.** Ed: Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 117-145, 1997.

BLATTEIS CM. Fever as a host defense mechanism. In: ARNASON, B.G., editor, **The Brain and Host Defense. Neuroimmune Biology**, v. 9, p. 213-235, 2010.

BLATTEIS, C.M. et al. Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 65, p. 1255-1260, 1987.

BOIE, Y. et al. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E₂ prostanoid receptor subtypes. **Eur J Pharmacol.** v. 340, p. 227-241, 1997.

BOUABOULA, M. et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. **Eur J Biochem**, v. 214, p. 173-180, 1993.

BOULANT, J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infect Dis**, v. 31, p. S157-S61, 2000.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 2, p. 149-160, 2008.

BROWN, M.R. et al. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. **Life Sci**, v. 30, p. 207-210, 1982.

CARLISLE, S.J. et al. Differential expression of the CB₂ cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **Int Immunopharmacol**, v. 2, p. 69-82, 2002.

CAWTHORN, W.P.; SETHI, J.K. TNF- α and adipocyte biology. **FEBS Letters**, v. 582, p. 117-131, 2008.

CHAI, Z. et al. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. **J Exp Med**, v. 183, p. 311-316, 1996.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHICCA, A. et al. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. **J Biol Chem**, v. 287, p. 34660-82, 2012.

CLARIA, J. Cyclooxygenase-2 biology. **Current Pharm Design**, v. 9, p. 2177-190, 2003.

COELHO, M.M. et al. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. **Am J Physiol**, v. 239, p. R527-R535, 1995

COELHO, M.M.; PELA, I.R.; ROTHWELL, N.J. Dexamethasone inhibits the pyrogenic activity of prostaglandin F₂ α , but not prostaglandin E₂. **Eur J Pharmacol**, v. 238, p.391-394, 1993.

COHEN, O. et al. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyrrone metabolites after a single oral dose of dipyrrone. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 54, n. 7, p. 549-53, 1998.

COMPTON, D.R. et al. In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 277, p. 586-594, 1996.

CONTI, B. et al. Cytokines and fever. **Frontiers in Biosci**, v. 9, p. 1433-1449, 2004.

CRAWLEY, J.N. et al. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, p. 967-972, 1993.

CRONSTEIN, B.N. Interleukin-6: a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. **Bull. NYU Hosp. Jt. Dis**, v. 65, n. 1, p. S11–S15, 2007.

DE FORGE, L.E. et al. Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 116, p. 429–438, 1990.

DE SOUZA, G.E.P. et al. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrrone in rats. **Inflam. Res**, v. 51, n. 1, p. 24-32, 2002.

DEVANE, W.A. et al. Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, p. 605-613, 1988.

DEVANE, W.A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science Wash DC**, v. 258, p. 1946-1949, 1992.

DEWEY, W.L. Cannabinoid pharmacology. **Pharmacol. Rev**, v. 38, p. 151-178, 1986.

DIAMANT, M.; De WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropina-releasing factor in rats. **Endocrinology**, v. 129, n.1, p. 466-454, 1991.

DI GIROLAMO, G. et al. Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum. **Br J Pharmacol**, v. 139, p. 1164-1170, 2003.

DI MARZO, V. CB1 receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. **Drug Discov Today**, p. 1–16, 2008.

DI MARZO, V. et al. Polyunsaturated-fatty-acid oxidation in Hydra: regioselectivity, substrate-dependent enantioselectivity and possible biological role. **Biochem J**, v. 300, n. 2, p. 501-507, 1994.

DI MARZO, V. et al. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. **FEBS Lett**, v. 436, p. 449-454, 1998.

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

DINARELLO, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res**, v. 10 n. 8, p. 201-22, 2004.

DINARELLO, C.A.; SAVAGE, N. Interleukin-1 and its receptor. **Crit Rev Immunol**, v. 9, p. 1-20, 1989.

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. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J Exp Med**, v. 163, p. 1433-1450, 1986.

EK, M. et al. Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J Comp Neurol**, v. 428, p. 5-20, 2000.

ENGBLOM, D. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. **Nat Neurosci**, v. 6, p. 1137-1138, 2003.

FABRÍCIO, A.S. et al. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 92-100, 2005b.

FABRÍCIO, A.S. et al. Central endothelin ET_B receptors mediate IL-1-dependent fever induced by preformed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 1, p. 164-71, 2006a.

FABRÍCIO, A.S. et al. Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and prostaglandin production in the preoptic area of rats. **Am J Physiol**, v. 290, n. 6, p. R1515-23, 2006b.

FABRÍCIO, A.S. et al. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **Am J Physiol**, v. 288, n. 3, p. R671-7, 2005a.

FACCI, L. et al. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoyl ethanolamide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 3376-3380, 1995.

FELDBERG, W.; SAXENA, P.N. Fever produced by prostaglandin E₂. **J Physiol**, v. 217, p. 547-556, 1971.

FELDER, C.C. et al. Anandamide, and endogenous cannabinoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulate receptor-mediated signal transduction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 7656-7660, 1993.

FELDER, C.C. et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. **Mol Pharmacol**, v. 48, p. 443-450, 1995.

FIGUEIREDO, M.J. et al. Increase of core temperature induced by corticotropina-releasing factor and urocortin: A comparative study. **Regul Peptides**, v. 165, p. 191-199, 2010.

FITTON, A.G.; PERTWEE, R.G. Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of delta 9-tetrahydrocannabinol. **Br J Pharmacol**, v. 75, p. 409-414, 1982.

FRAGA, D. et al. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. **Am J Physiol**, v. 294, n. 2, p. R411-20, 2008.

FRAGA, D. et al. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB₁ receptors. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 1494-1501, 2009.

FRAGA, D. et al. Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. **Brain Behav Immun**, v. 51, p. 204-211, 2016.

FREI, K. et al. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. **Eur J Immunol**, v. 19, p. 689-694, 1989.

FUNK, C.D. et al. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. **FASEB J**, v. 5, p. 2304-231, 1991.

GAETANI, S.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs? **Trends Mol Med**, v. 9, n. 11, p. 474-478, 2003.

GALIEGUE, S. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Eur J Biochem**, v. 232, p. 45-61, 1995.

GEBREMEDHIN, D. et al. Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. **Am J Physiol**, v. 276, p. H2085-H2093, 1999.

GEISSLINGER, G.; BOCKER, R.; LEVY, M. High-performance liquid chromatographic analysis of dipyrone metabolites to study their formation in human liver microsomes. **Pharm Res**, v. 13, p. 1272-1275, 1996.

GELGOR, L.; CARTMELL, S.; MITCHELL, D. Intracerebroventricular micro-injections of non-steroidal anti-inflammatory drugs abolish reperfusion hyperalgesia in the rat's tail. **Pain**, v. 50, p. 323-329, 1992.

GERARD, C. M; MOLLEREAU, C; VASSART, G; PARMENTIER, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. **Biochem. J.** 279: 129–134, 1991.

GHERSI-EGLA JF; PERRIN R; LENINGER-MULLER B; GRASSIOT MC; JEANDEL C; FLOQUET J; CUNY G; SIEST G; MINN A. Subcellular localization of xytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. **Biochem Pharmacol.** 45: 647-658, 1993.

GIUFFRIDA, A. et al. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nat Neurosci**, v. 2, p. 358-363, 1999.

GLASS, M.; NORTHUP, J.K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. **Mol Pharmacol**, v. 56, p. 1362-1369, 1999.

GOURINE, A.V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. **Gen Pharmacol.** 26(4):835-41, 1995.

HECKER, M.; FOEGH, M.L.; RAMWELL, P.W. The eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and related compounds. In KATZUNG, B.G. **Basic and Clinical Pharmacology**. Eds; Appleton & Lange, Norwalk, CT, p. 90-304, 1995.

HENRY, D.J.; CHAVKIN, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. **Neurosci Lett**, v. 186, p. 91-94, 1995.

HILLARD, C.J.; CAMPBELL, C.B. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. **J Lipid Res**, v. 38, p. 2383-2398, 1997.

HOFFMAN, A.F.; LUPICA, C.R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, p. 2470-2479, 2000.

HOLLISTER, L.E. Health aspects of cannabis. **Pharmacol. Rev**, v. 38, p. 1-20, 1986.

HOWLETT, A.C.; FLEMING, R.M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Mol Pharmacol**, v. 26, p. 532-538, 1984.

HOWLETT, A.C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, p. 161– 202, 2002.

HWANG, S.W. et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 6155–60, 2000.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, p. 1252–70, 2003.

JUTTLE, E.; TARABIN, V.; SCHWANINGER, M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. **Neuroscientist**, v. 8, p. 268-275, 2002.

KACZOCHA, M. et al. Lipid droplets are novel sites of N-acyl ethanolamine inactivation by fatty acid amide hydrolase-2. **J Biol Chem**, v. 285, p. 2796–806, 2010.

KAMINSKI, N.E. et al. Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. **Mol Pharmacol**, v. 42, p. 736-742, 1992.

KAPLANSKI, J. et al. Lithium attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, p. 1829-1837, 2014.

KETTELHUT, I.C.; GOLDBER, A.L. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 81, p. 1384-1389, 1988.

KIRIYAMA, M. et al. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Br J Pharmacol**, v. 122, p. 217-224, 1997.

KLASING, K.C. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1436–1446, 1988.

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

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood**, v. 74, n. 1, p. 1-10, 1989.

KOHASE, M. et al. A cytokine network in human diploid fibroblasts: Interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 1, p. 273-80, 1987.

KOPF, M. et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, p. 339-344, 1994.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, v.265, n. 5174, p. 956-9, 1994.

KOZAK, W. et al. IL6 and IL1 in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. **Ann NY Acad Sci**, v. 856, p. 33–47, 1998.

KUJUBU, D.A. et al. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. **J Biol Chem**, v. 266, p. 12866-12872, 1991.

LEE, P. et al. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 102, p. 1906-10, 2005.

LEDENT, C. et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. **Science**, v. 283, p. 401–404, 1999.

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. 1217-1221, 1987.

LEGRAND, E.K.; ALCOCK, J. Turning up the heat: immune brinksmanship in the acute-phase response. **Q Rev Biol**, v. 87, n. 1, p. 3-18, 2012.

LEON, L.R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 6, p. 2648-2655, 2002.

LEVY, M. et al. Cerebrospinal fluid prostaglandins after systemic dipyron intake. **Clin Pharmacol Ther**, v. 64, p. 117-122, 1998.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol**, v. 114, p. 375-81, 1985.

LUCAS, R. et al. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. **FASEB J**, v. 6, p. 635-367, 2005.

LYTE, M. Regulation of interleukin-1 production in murine macrophages and human monocytes by a normal physiological constituent. **Life Sci**, v. 38, p. 1163-1170, 1986.

MACHADO, R.R. et al. CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (E. coli) and RANTES in rats. **Brain Res**, v. 1161, p. 21-31, 2007.

MACKIE, K. et al. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. **J Neurosci**, v. 15, p. 6552-6561, 1995.

MACKOWIAK, P.A. Brief history of antipyretic therapy. **Clin Infect Dis**, v. 31, Suppl 5, p. S154-156, 2000.

MAIMONE, D. et al. Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. **J Neuroimmunol**, v. 47, p. 73-87, 1993.

MALVAR, DD. Estudo do envolvimento da PGE₂ na resposta febril induzida por LPS, endotelina-1 e veneno de *Tityus serrulatus*. Dissertação de Mestrado apresentada a FMRP/USP. 2008.

MALVAR, D.D. et al. The antipyretic effect of dipyrrone is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 6, p. 1401-9, 2011.

MALVAR, D.D. et al. Dipyrrone metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE₂-dependent and independent fever while 4-AA only blocks PGE₂-dependent fever. **Br. J Pharmacol**, v. 171, p. 3666-3679, 2014.

MARNETT, L.J. et al. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. **J Biol Chem**, v. 274, p. 22903-22906, 1999.

MATSUDA, L.A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature Lond**, v. 346, p. 561-564, 1990.

McDERMOTT, M. F. et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. **Cell**, v. 97, p. 133-144, 1999.

MEANS, T.K.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. Structure and function of Toll-like receptor proteins. **Life Sci**, v. 68, p. 241-258, 2000.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. A total synthesis of d1-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. **J Am Chem Soc**, v. 87, p. 3273-3275, 1965.

MECHOULAM, R. The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. In: *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, ed. Mechoulam, R. p. 1-19, 1986.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 50, p.83-90, 1995.

MICHIE, H.R. et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v. 104, p. 280-286, 1988.

MILTON, A.S.; WEDLANT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanesthetized cats and rabbits. **J Physiol**, v. 218, p. 325-336, 1971.

MPHAHLELE NR; FULLER A; ROTH J; KAMERMAN PR. Body temperature, behaviour, and plasma cortisol changes induced by chronic infusions of *Staphylococcus aureus* in goats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 287: R863-R869, 2004.

MORIMOTO, A. et al. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. **Am J Physiol**, v. 254, p. R633-R640, 1988.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front Biosci**. 16:74-104, 2011.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature Lond**, v. 365, p. 61-65, 1993.

NAKAHARA, H. et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 48, p. 1521-29, 2003.

NAKAMORI, T. et al. Interleukin-1 β production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever. **J Physiol**, v. 476, p. 177-186, 1994.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, p. R1207-R1228, 2011.

NAKAMURA, K. et al. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. **J Comp Neurol**, v. 421, p. 543-569, 2000.

NAUGLER, W.E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Cell Press**, v. 14, n. 3, p. 109-119, 2008.

NASRAWAY, S.A. The problems and challenges of immunotherapy in sepsis. **Chest**, v. 123, p. 451S-459S, 2003.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annu Rev Nutr** v. 26, p. 323-42, 2006.

NEMETH, E. et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. **Blood**, v. 101, p. 2461-2463, 2003.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest**, v. 113, p. 1271-1276, 2004.

NEMUNAITIS, J. et al. Phase I study of recombinant interleukin-1 beta in patient undergoing autologous bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 83, p. 3473-3479, 1994.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6: From bench to bedside. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, n. 11, p. 619-26, 2006.

NOE, S.N. et al. Anti-CD40, anti-CD3 and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. **J Neuroimmunol**, v. 110, p. 161-167, 2000.

NORDAN, RP; POTTER, M. A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. **Science**. 233(4763):566-9, 1986.

NUMBERGER, W. et al. Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. **Eur J Pediatr**, v. 154, n. 11, p. 896-800, 1995.

OHKI, S. et al. Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J Biol Chem**, v. 254, p. 829-836, 1979.

OKA, K.; OKA, T.; HORI, T. Prostaglandin E2 may induce hyperthermia through EP1 receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. **Brain Res**, v. 767, p. 92-99, 1997.

OKA, T. et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v. 428, p.20-32, 2000.

OKA, T. et al. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. **J Physiol**, v. 551, n. 3, P. 945-954, 2003.

OKA, T. Prostaglandin E₂ as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. **Front Biosci**, v. 9, p. 3046-3057, 2004.

OTTO, J.C.; SMITH, W.L. Prostaglandin endoperoxidase synthases-1 and 2. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v. 12, p. 139-156, 1995.

OVADIA, H. et al. Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. **Neuropharmacology**, v. 34, p. 175-180, 1995.

PAGOTTO, U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. **Endocr Rev**, v. 27, n. 1, p. 73–100, 2006.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 736-746, 2003.

PALMI, M. et al. Increase of extracellular brain calcium involved in interleukin-1 β -induced pyresis in the rabbit: antagonism by dexamethasone. **Br J Pharmacol**, v. 112, p. 449-452, 1994.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd, edn. Academic Press, Sydney, 1986.

PERTWEE, R.G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **Br J Pharmacol**, v. 147, Suppl. 1, p. S163–71, 2006.

PERTWEE, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacol Ther**, v. 74, p. 129–80, 1997.

PERTWEE, R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. **Handb Exp Pharmacol**, v. 168, p. 1–51, 2005.

PERTWEE, R.G. et al. O-1057, a potent water-soluble cannabinoid receptor agonist with antinociceptive properties. **Br J Pharmacol**, v. 129, p. 1577–84, 2000.

PIERRE, S.C. et al. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. **Br J Pharmacol**, v. 151, p. 494-503, 2007.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, p. 873-884, 2003.

RAWLS, S.M. et al. CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1ij]quinolin-6-one]-induced hypothermia. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 301, p. 963-968, 2002.

ROBAK, T.; GLADALSKA, A.; STEPIEN, H. The tumor necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. **Eur Cytokine Netw**, v. 9, n. 2, p. 145-154, 1998.

ROBSON, P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. **Br J Psychiatry**, v. 178, p. 107-115, 2001.

ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurol Clin**, v. 24, n. 3, p. 421-39, 2006.

ROTH, J.; SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 3, p. 301-14, 2001.

ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol Allergy Clin N Am**, v. 29, p. 229-245, 2009.

ROTH, J. et al. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in the guinea pig. **Am J Physiol**, v. 265, p. R653-R658, 1993.

ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 β in the rat. **Am J Physiol**, v. 256, p. E111-E115, 1989.

ROTHWELL, N.J. et al. 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. Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. **Horm Metab Res**, v. 22, p. 616-618, 1990.

ROTHWELL, N.J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. **Horm Metab Res**, v. 22, p. 595-596, 1990a.

ROTONDO, D. et al. Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. **Eur J Pharmacol**, v. 154, p. 145-52, 1988.

SAVINAINEN, J.R. et al. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB₁ receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. **Br J Pharmacol**, v. 134, p. 664-672, 2001.

SCAMMELL, T.E. et al. Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. **J Neurosci**, v. 16, p. 6246- 6254, 1996.

SCAMMELL, T.E. et al. Microinjection of ciclooxigenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. **Am J Physiol**, v. 274, p. R783-R789, 1998.

SCHATZ, A.R. et al. Cannabinoid receptor CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylyl cyclase modulation within the immune system. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 142, p. 278-287, 1997.

SCHULTES, R.E. Hallucinogens of plant origin. **Science**, v. 163, p. 245-254, 1969.

SEHGAL, P.B. et al. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. **J Exp Med**, v. 167, n. 6, p. 1951-6, 1988.

SETIA, S.; SANYAL, S.N. Nuclear factor kappa B: a pro-inflammatory, transcription factor-mediated signaling pathway in lung carcinogenesis and its inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 31, n. 1, p. 21-37, 2012.

SHALABY, M.R.; WAAGE, A.; ESPEVIK, T. Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. **Cell Immunol**, v. 121, n. 2, p. 372-82, 1989.

SHIN, J. et al. Bradykinin-12-lipoxygenase VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 10150-5, 2002.

SINNING, C. et al. Dopamides, vanillylamides, ethanolamides, and arachidonic acid amides of anti-inflammatory and analgesic drug substances as TRPV1 ligands. **Chem Med Chem**, v. 3, p. 1956-1964, 2008.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv Immunol**, v. 62, p. 167-215, 1996.

SMITH, W.L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 115-28, 2002.

SOARES, DM. A injeção central de MIP-1 α (CCL3) induz resposta febril independente da síntese de PGE₂ em ratos. Dissertação de Mestrado apresentada a FMRP/USP. 2004.

SOARES, D.M. et al. Cyclooxygenase-independent mechanism of ibuprofen-induced antipyresis: the role of central vasopressin V₁ receptors. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 25, n. 6, p. 670-81, 2011.

SOARES, D.M. et al. CCL3/macrophage inflammatory protein-1 α induces fever and increases prostaglandin E2 in cerebrospinal fluid of rats: effect of antipyretic drugs. **Brain Res**, v. 1109, n. 1, p. 83-92, 2006.

SOARES, D.M. et al. A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live *E. coli*. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, p. 47-60, 2012.

SOARES, D.M. et al. CCL3/MIP-1 α is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. **Brain Res**, v. 1269, p. 54-60, 2009.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature Lond**, v. 388, p. 773-778, 1997.

STITT, J.T. Prostaglandin E₁ fever induced in rabbits. **J Physiol Lond**, v. 232, p. 163-179, 1973.

STITT, J.T. Differential sensitivity in the sites of fever production by prostaglandin E1 within the hypothalamus of the rat. **J Physiol (Lond)**, v. 432, p. 99-110, 1991.

STOJANOV, S.; McDERMOTT, M. F. The tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. **Exp Rev Mol Med**, v. 7, n. 22, p. 1-18, 2005.

STONE, E. An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. **Philos Trans R Soc Lond**, v. 53, p. 195-200, 1973.

SUNDGREEN-ANDERSSON, A. K.; ÖSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF- α -induced fever. **Am J Physiol**, v. 275, n. 6, p. R2028-34, 1998.

TAFFE, M.A.; CREEHAN, K.M.; VANDEWATER, S.A. Cannabidiol fails to reverse hypothermia or locomotor suppression induced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Sprague-Dawley rats. **Br J Pharmacol**, v. 172, p. 1783-1791, 2015.

TAKADA, Y. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 57, p. 9247-58, 2004.

TAKASHIBA, S. et al. Lipopolysaccharide-inducible and salicylate-sensitive nuclear factor(s) on human tumor necrosis factor alpha promoter. **Infect Immun**, v. 63, n. 4, p. 1529-34, 1995.

TALBOT, S. et al. Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 9, p. 214, 2012.

TOGNETTO, M. et al. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. **J Neurosci**, v. 21, p. 1104-9, 2001.

UEDA, N. et al. Enzymological and molecular biological studies on anandamide amidohydrolase. **Adv Exp Med Biol**, v. 469, p. 513-8, 1999.

UM, J. Y. et al. Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 115, p. 50-54, 2003.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 395, p. 281-284, 1998.

VANE, J.R.; FLOWER, R.J. BOTTING, R.M. History of aspirin and its mechanisms of action. **Stroke**, v. 21, suppl. 4, p. IV12-23, 1990.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, n. 25, p. 232-5, 1971.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm Res**, v. 47, p. S78-S87, 1998.

VIRTA, M.; HURME, M.; HELMINEN, M. Increased plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. **Epilepsia**, v. 43, p. 920-923, 2002.

VOLZ M; KELLNER HM. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyrone). **Br J Clin Pharmacol**. 10:299S-308S, 1980.

WAJANT, H.; PFEIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v. 1, p. 45-65, 2003.

WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 13371-13373, 2002.

WEBB, A.C.; COLLINS, K.L.; AURON, P.E. et al. Shows: Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. **Lymphokine Res**, v. 5, p. 77-85, 1986.

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

WESSEL, J.C. et al. Characterization of oxalic acid derivatives as new metabolites of metamizol (dipyrone) in incubated hen's egg and human. **Eur J Pharm Sci**, v. 28, n. 1-2, p. 15-25, 2006.

WILKINSON, M.F.; KASTING, N.W. Central vasopressin V1-blockade prevents salicylate but not acetaminophen antipyresis. **J Appl Physiol**, v. 68, n. 5, p.1793-98, 1985.

WILLIAMS, J.W. et al. An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. **Brain Res**, v. 120, p. 251-262, 1977.

YAMASAKI, K. et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. **Science**, v. 241, n. 4867, p. 825-8, 1988.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 165, p. 888-8, 1989.

YOSHIOKA, M. et al. The release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, interleukin-6 and prostaglandin E2 in bovine Kupffer cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, p. 301-307, 1998.

ZAMPRONIO, A.R. et al. A pré-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. **M. Inflam**, v. 3, p. 365-73, 1994.

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

ZHANG, Y.H.; LIN, J.X.; VILCEK, K. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. **Mol Cell Biol**, v. 10, p. 3818-3823, 1990.

ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L.; LEVY, M. Plasma protein binding of dipyrone metabolites in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 29, p. 67-7, 1985.

ZYGMUNT, P.M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, p. 452-7, 1999.

Anexo

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.676.53.0), intitulado "Efeito antipirético dos metabólitos da dipirona sobre resposta febril induzida pela ET-1 e o envolvimento deste peptídeo na febre causada pelo veneno do escorpião *T. serrulatus* em ratos", de autoria de **Marina Mihomens de Queiroz** e **Glória Emília Petto de Souza**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP**, foi aprovado em reunião da CEUA de 05/02/2015.

Colaboradores: Débora Ramos; Miriam Melo

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.676.53.0), entitled: "Efeito antipirético dos metabólitos da dipirona sobre resposta febril induzida pela ET-1 e o envolvimento deste peptídeo na febre causada pelo veneno do escorpião *T. serrulatus* em ratos", by **Marina Mihomens de Queiroz** and **Glória Emília Petto de Souza** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, February, 26 2015.

Duração prevista do projeto: 02/03/2015 a 20/06/2016

Ribeirão Preto, 02 de março de 2015.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA