

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E  
ANTIPIRÉTICO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE  
MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR  
*Saccharomyces cerevisiae***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ana Paula de Oliveira Ferreira**

**Porto Alegre, RS, Brasil  
2009**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E  
ANTIPIRÉTICO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE MODELO DE  
PERITONITE INDUZIDA POR *Saccharomyces cerevisiae***

**por**

**Ana Paula de Oliveira Ferreira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica**

Orientador: Carlos Fernando Mello

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

*Esta dissertação é dedicada aos meus pais e irmãos que sempre deram todo o suporte necessário às minhas conquistas.*

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre abriu os meus caminhos, iluminou as minhas decisões e me encheu de força e coragem para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo, carinho, amor, conselhos, pela paciência e compreensão que os fez entender as minhas muitas ausências nestes dois anos. Faço um agradecimento especial para minha irmã que abriu mão de suas férias para auxiliar-me na fase final de redação desta dissertação.

Vocês são os alicerces da minha vida!

Ao meu namorado, que ouviu todas as minhas angústias e apoiou todos os meus passos nestes dois anos, mesmo tendo que ficar sem namorada por muitas vezes.

“More”, te amo muito!

Ao meu orientador, Professor Carlos Fernando Mello, por acolher-me e por acreditar em mim ainda quando eu era apenas uma “bixo” do primeiro semestre da Farmácia.

Aprendi muito nestes 7 anos de Laboratório!

Faço um agradecimento especial ao Professor Juliano Ferreira pela atenção, disponibilidade e auxílio intelectual e técnico que, gratuitamente, dispensou a mim nos meus momentos de dificuldade!

Aos colegas e amigos do grupo da Pirexia, André, Rosália, Velcir e Vivi pela amizade, dedicação e ajuda nos finais de semana. Ao amigo Mateus, pelo auxílio técnico e pelas discussões muito proveitosas para este trabalho. Ao colega Régis, sempre disponível para realizar as nossas liofilizações. Faço ainda um agradecimento especial à Juliana Pasin pelo companheirismo e amizade presentes não só durante a elaboração deste trabalho.

A ajuda de vocês foi FUNDAMENTAL!

Aos demais colegas de Laboratório, Ana Flávia, Daniele, Leandro, Lelê, Léo, Mauren, Mauro, e Luís Fernando (Xará) pela convivência agradável, ajuda e momentos compartilhados.

Agradeço ainda aos funcionários Srs. Florindo e Paulino pela simpatia e pelo excelente suporte técnico dispensado.

E finalmente ao CNPq pela bolsa concedida, que muito me auxiliou neste dois anos de mestrado.

*“O homem é assombrado pela vastidão da eternidade. Por isso nos perguntamos... Nossas ações ecoarão através dos séculos? Não sabemos. Resta-nos o precioso ofício de investigar e fornecer aos séculos que virão ao menos um mapa de nossas tentativas...”*

***Guilherme de Oliveira Ferreira, 2008***

---

**ÍNDICE****PARTE I**

<b>RESUMO</b> .....	<b>02</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>03</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>04</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>06</b>
<b>Termorregulação</b> .....	<b>07</b>
<b>Febre</b> .....	<b>08</b>
<i>Modelos Experimentais de Pirexia</i> .....	09
<i>Resposta Imunológica Inata</i> .....	11
<i>Transmissão do sinal inflamatório e desencadeamento da febre</i> .....	16
<i>Ciclooxigenases, Prostaglandina E<sub>2</sub> e suas ações no processo febril</i> .....	21
<b>N-acetilcisteína (NAC)</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>Objetivo geral</b> .....	<b>28</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>28</b>

**PARTE II**

<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>30</b>
<b>Situação do artigo</b> .....	<b>31</b>
<b>Manuscrito</b> .....	<b>33</b>

**PARTE III**

<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

# PARTE I



## 1. RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIPIRÉTICO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE MODELO PERITONITE INDUZIDA POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

AUTORA: Ana Paula de Oliveira Ferreira  
Data e Local da Defesa: Porto Alegre, 26 de fevereiro de 2009.

A resposta febril é um processo dependente de inflamação, desencadeado pela produção de citocinas pró-inflamatórias a partir de fagócitos ativados. Estes mediadores podem ser liberados na corrente sanguínea ou ainda estimular nervos sensoriais e, desta forma, transmitir o sinal inflamatório até o centro termo controlador cerebral e, assim, elevar a temperatura corporal. A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante e um precursor de glutatona que modula a sinalização intracelular durante a inflamação, resultando na diminuição da síntese e liberação de moléculas pró-inflamatórias incluindo as citocinas e a prostaglandina  $E_2$ . Embora a resposta febril dependa de um processo inflamatório estabelecido, e a atividade antiinflamatória da NAC já seja bastante conhecida, ainda pouco se sabe sobre a ação desta pequena molécula em infecções fúngicas e processos como a febre. Desse modo, nesse trabalho, privilegiou-se a investigação dos efeitos da NAC sobre a febre, a resposta inflamatória local (cavidade peritoneal) e sobre a sinalização inflamatória no centro termorregulatório (hipotálamo) induzidas por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*, na dose de 135 mg/kg, i.p. A administração sistêmica da NAC (500 mg/kg, s.c.) preveniu, mas não reverteu a febre induzida pela levedura. Ademais, verificou-se que a NAC produziu um efeito de diminuição da migração leucocitária, do extravasamento plasmático, da liberação de interleucina (IL)-1 $\beta$  e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  no lavado peritoneal, e, por fim, diminuiu a liberação de IL-1 $\beta$  no tecido hipotalâmico, ressaltando-se a ação do *Saccharomyces cerevisiae* como indutor de todas as respostas referidas. A administração sistêmica de NAC também aumentou o conteúdo de grupos tióis não protéicos presentes no lavado peritoneal e no hipotálamo, ao mesmo tempo em que reverteu a oxidação dos grupos SH no local da inflamação. A administração central de NAC (50  $\mu$ g, i.t., 120 min depois da administração do *Saccharomyces cerevisiae*) também preveniu a febre induzida pelo fermento de pão, sem, contudo, alterar a migração leucocitária para a cavidade peritoneal. Finalmente, a administração sistêmica da NAC não alterou a resposta febril provocada por prostaglandina  $E_2$  (PGE $_2$ ; 300 ng, i.t.). Logo, estes resultados sugerem, não só um papel anti-inflamatório para a NAC em peritonites causadas por fungos, mas também, uma atividade antipirética que envolve a inibição da liberação da IL-1 $\beta$  no hipotálamo, provavelmente antes da produção de PGE $_2$ .

**Palavras-chave:** N-acetilcisteína; *Saccharomyces cerevisiae*; peritonite; febre; ratos jovens; citocinas; migração leucocitária.

## 2. ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON BAKER YEAST-INDUCED PERITONITIS

AUTHOR: Ana Paula de Oliveira Ferreira  
Date and place of dissertation: Porto Alegre, February 26<sup>th</sup>, 2009.

Febrile response is an inflammation-dependent process that started with the production of pyrogenic cytokines by activated mononuclear phagocytes. These mediators are released into bloodstream or stimulate local sensory nerves and transmit the inflammatory signal to the preoptic-anterior hypothalamic area, the brain thermoregulatory center. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant and a glutathione precursor that modulates intracellular signaling in inflammatory response resulting in a decreased synthesis and release of pro-inflammatory molecules, including cytokines and prostaglandin E<sub>2</sub>. However, it is poorly known whether NAC interferes with other inflammation-dependent processes, such as fever. Therefore, in this study we investigated the effects of NAC on fever, local inflammatory response (peritoneal cavity) and inflammatory signalization in thermoregulatory center (hypothalamus) induced by intraperitoneal administration of baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae* suspension, 135 mg/kg, i.p.). Systemic administration of NAC (500 mg/kg, s.c.) prevented, but did not revert established fever induced by baker yeast. In addition, NAC decreased leukocyte migration, plasma protein extravasation and decreased tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  release induced by baker yeast in peritoneal lavage and IL-1 $\beta$  release in hypothalamus. NAC also increased nonprotein thiol content in peritoneal lavage and hypothalamus, and prevented baker yeast-induced decrease of nonprotein thiol content in same samples. The central administration of NAC (50  $\mu$ g, i.t., 120 min after baker yeast) also prevented baker yeast-induced fever, but did not alter leukocyte migration to peritoneal cavity. In addition, the systemic administration of NAC did not alter the febrile response elicited by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> 300 ng, i.t.). These results suggest an anti-inflammatory role for NAC on yeast-induced peritonitis and that its antipyretic effect may be due to inhibition of inflammatory IL-1 $\beta$  production in hypothalamus.

**Keywords:** N-acetylcysteine; *Saccharomyces cerevisiae*; fever; young rats; cytokines; leukocyte migration.

---

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APOH -</b>	Área pré-óptica do hipotálamo
<b>BHE -</b>	Barreira hematoencefálica
<b>C3b -</b>	Componente 3b do complemento
<b>C5a -</b>	Componente 5a do complemento
<b>cK -</b>	Células de Kupffer
<b>COX -</b>	Ciclooxigenase
<b>e.v. -</b>	Endovenoso
<b>EP -</b>	Receptores de prostanóides da série E
<b>ERK -</b>	Quinases ativadas por receptores extracelulares 1 e 2
<b>ERNs -</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROs-</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GSH -</b>	Glutathiona reduzida
<b>GSSG -</b>	Glutathiona oxidada dissulfeto
<b>i.p. -</b>	Intraperitoneal
<b>i.t.</b>	Intratecal
<b>ICAM -</b>	Moléculas de adesão intracelular
<b>IKK -</b>	I $\kappa$ B quinase
<b>IL -</b>	Interleucina
<b>INF-</b>	Interferon
<b>iNOS -</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>IRAKs -</b>	Quinases associadas ao receptor da IL-1
<b>I<math>\kappa</math>B -</b>	Proteína inibitória do NF- $\kappa$ B
<b>JNK -</b>	Quinase terminal c-Jun-N
<b>LPS -</b>	Lipopolissacarídeo bacteriano
<b>MAPK -</b>	Quinase ativadas por mitógenos
<b>MIP -</b>	Proteína inflamatória de macrófago
<b>mPGES-1 -</b>	Prostaglandina E sintase microsomal 1
<b>NA -</b>	Noradrenalina
<b>NAC -</b>	N-acetilcisteína
<b>NADPH -</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NF-<math>\kappa</math>B -</b>	Fator nuclear $\kappa$ B
<b>NTS -</b>	Núcleo do trato solitário

---

<b>OVLT -</b>	Órgão vasculoso da lâmina terminal
<b>PG -</b>	Prostaglandina
<b>SNC -</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TLR -</b>	Receptor “Toll-like”
<b>TNF -</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRAF -</b>	Fator associado ao receptor do TNF
<b>VCAM -</b>	Moléculas de adesão vascular
<b><math>\gamma</math>GCS -</b>	$\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase

---

## 4. INTRODUÇÃO

#### 4.1. Termorregulação

Os animais homeotérmicos mantêm sua temperatura corporal interna controlada, mesmo quando expostos às variações da temperatura ambiente. Isso é possível devido à existência de um complexo sistema que coleta informações provindas de sensores térmicos neuronais presentes na pele, mucosas (oral e urogenital) e vísceras (esôfago, estômago e grandes veias intra-abdominais) (Romanovsky, 2007). Essas células respondem rapidamente a mudanças de temperatura, enviando seus sinais até o corno dorsal da medula espinhal (Nomoto et al., 2004). Por meio de uma rota spino-retículo-hipotalâmica, estas informações chegam às estruturas hipotalâmicas termocotroladoras (Romanovsky, 2007).

A área pré-óptica do hipotálamo (APOH) é considerada o centro termorregulatório do organismo (Romanovsky, 2007). Esta área é responsável por receber e computar todas as informações referentes à termorregulação e compará-las a uma faixa de temperatura estabelecida como normal (conhecida como *set point* termorregulatório). Ao integrar as informações recebidas dos sensores térmicos da periferia com o *set point* termorregulatório, a APOH forma uma sensação e, por meio de neurônios eferentes, envia ordens aos órgãos termoeferores (Romanovsky, 2007). Assim, toda vez que a temperatura corpórea torna-se diferente daquela estabelecida na APOH, uma sensação de frio ou calor é gerada, desencadeando respostas termoeferoras que visam ao restabelecimento da temperatura normal. A faixa de temperatura normal varia de acordo com a espécie animal (IUPS *Thermal Commission*). Em humanos, esta faixa insere ainda uma variação circadiana que oscila entre 36,4°C pela manhã, e 36,9°C no final da tarde (Mackowiac, 1997). Em ratos, a variação circadiana é diferenciada e suas temperaturas mais elevadas são alcançadas à noite (Branco, Steiner, Bicego, 2004).

## 4.2. Febre

A febre pode ser definida como um aumento regulado da temperatura corpórea acima da variação circadiana normal (Gelfand, Dinarello, Wolff, 1997; Dinarello, 1999; Zeisberger, 1999). O aumento da temperatura resulta de uma alteração nos disparos dos neurônios da APOH, (Besedovsky et al., 1997; Boulant, 2000; Ranelis & Griffin, 2003,) que é capaz de deslocar o *set point* termorregulatório para valores mais altos que os normais. Assim, estabelece-se uma diferença entre a temperatura corporal e a nova temperatura criada pela APOH. A partir de então, o organismo reage como se estivesse em hipotermia, ativando medidas termofetoras de produção e conservação de calor (Störr, Roth, Zeisberger, 1995). As ações termofetoras desencadeadas durante a febre compreendem inúmeras respostas autonômicas e comportamentais que incluem a piloereção, a vasoconstrição cutânea (que em ratos é representada pela vasoconstrição das artérias caudais), a inibição da sudorese, o aumento na produção de calor por tremor ou via oxidação do tecido adiposo marrom (principal órgão produtor de calor em roedores) e a procura por ambientes quentes (Zeisberger, 1999, Beutler e Beutler, 2001, Blatteis et al., 2005).

O aumento da temperatura presente na febre é distinto daquele obtido em hipertermias, não em termos de valores, mas em relação às respostas termofetoras ativas nos dois processos. (Liebermeister, 1987). A hipertermia é um evento patológico, onde o ganho de temperatura é passivo e excede a capacidade do organismo de dissipar o calor (Blatteis 2006). Diferentemente da febre, na hipertermia, o “*set point*” encontra-se em seu valor normal, entretanto, a temperatura corporal está acima desta faixa considerada normal pelo centro termorregulatório (Beutler & Beutler, 1992) e as respostas efetoras ativadas visam, portanto, dissipar o excesso de calor. Essas respostas incluem vasodilatação periférica, sudorese e procura por ambientes mais frescos (Beutler & Beutler, 2001). Além disso, o processo febril, normalmente, vem acompanhado de um

---

comportamento característico de doenças infecciosas, conhecido como *sickness behavior* (hiperalgesia, letargia, sonolência, anorexia, diminuição da atividade motora, etc.) (Blatteis, 2003) que não está presente na hipertermia.

#### 4.2.1. Modelos Experimentais de Pirexia

Para melhor entender a febre, seus mecanismos, seus benefícios e malefícios, bem como desenvolver novas terapias antipiréticas, os pesquisadores utilizam modelos animais de indução de febre, fazendo uso, principalmente, de coelhos, de porcos da índia e de ratos. Esses modelos experimentais podem se dividir em dois grandes grupos, dependendo da classe do pirógeno utilizado: modelos de febre induzida por pirógenos endógenos ou modelos de febre induzida por pirógenos exógenos (Zeisberger, 1999).

As repostas febris induzidas por pirógenos exógenos são freqüentemente resultado de processos inflamatórios generalizados causados por bactérias (Zeisberger, 1999; Blatteis, 2006) ou fungos vivos (Kobayashi & Friedmam, 1964; Bruguerolle, Roucoules, 1994; Tomazetti et al., 2005). Existem ainda modelos que utilizam os produtos da parede celular de patógenos como estímulos pirogênicos. Dentre estes, podemos citar: os lipopolissacarídeos (LPS), macromoléculas de parede celular de bactérias gram-negativas, (Zeisberger, 1999; Blatteis, 2006) e as mananas (Nagase et al., 1984) e o zimosan, (Freedman and Sultzer, 1961) derivados de paredes celulares de fungos. Esses modelos caracterizam-se por promover a ativação completa de todos os eventos neuro-humorais envolvidos no desenvolvimento da febre, conferindo-lhes resultados mais próximos da febre clínica. Entretanto, tal característica traz também desvantagens, pois, em um processo infeccioso ocorrem inúmeras alterações não relacionadas à febre que podem dificultar a determinação dos verdadeiros processos envolvidos na febre. Dentre estas alterações, pode-se citar a liberação de substâncias como glicocorticóides, neuropeptídeos, óxido nítrico, algumas citocinas com propriedades



---

antipiréticas e antiinflamatórias e alguns hormônios liberadas em consequência da ativação do eixo (Roth, 2006).

Os pirógenos endógenos, por sua vez, constituem todas as substâncias que, em consequência da estimulação com pirogênos exógenos, são produzidas e secretadas endogenamente e dispõem da capacidade de induzir febre e ativar as respostas termogênicas (Kluger, 1991). Embora nem todos o sejam, a maioria desses mensageiros são chamados citocinas e são as interleucinas (ILs), os interferons (INFs), o fator de necrose tumoral (TNF) –  $\alpha$ , a proteína inflamatória do macrófago (MIP), entre outras (Kluger, 1991). Atualmente, os pirógenos endógenos mais utilizados no estudo da febre incluem a IL-1 $\beta$ , a IL-6, o TNF- $\alpha$  e a prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> (Kluger, 1991), os quais são empregados em experimentação visando ao esclarecimento do mecanismo pelo qual a febre se desenvolve, já que estão livres de alguns interferentes presentes no processo infeccioso completo.

Embora o LPS seja o indutor de febre mais empregado e estudado nas últimas décadas, (Roth et al., 2006), sabe-se que alguns animais, como os camundongos, não respondem com aumento da temperatura após injeção de LPS (Kluger, 1991; Fraifeld & Kaplanski, 1998) e, quando desenvolvem febre, esta é discreta e com aumento de 0,5 a 0,7°C na temperatura retal (Souza et al., 2002). Devido a estas características negativas, este grupo de pesquisa padronizou e validou um novo modelo experimental onde a febre é induzida em ratos machos pré-púberes pela injeção intraperitoneal (i.p.) de uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (Tomazetti et al., 2005). O trabalho de Tomazetti demonstrou que a administração intraperitoneal de suspensão de *S. cerevisiae* induz febre consistente, com latência de 3 horas, pico máximo em 4 horas e sensibilidade aos antipiréticos clássicos. Outros trabalhos também têm mostrado que a injeção intraperitoneal de zimosan (carboidratos insolúveis preparados a partir da parede celular de *S. cerevisiae*) é capaz de induzir peritonite caracterizada por aumento da permeabilidade vascular (Forrest, Jose, Williams, 1986; Kolaczowska et al., 2002), grande infiltração de polimorfonucleares (Forrest & Williams, 1986) e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Kolaczowska et al., 2006, 2008). Assim, o

---

modelo experimental de pirexia padronizado por Tomazetti e colaboradores, além de servir como instrumento para o estudo da febre, poderia ainda permitir a avaliação do processo inflamatório local desencadeador da mesma resposta. Desta forma, este modelo foi escolhido como alvo desta pesquisa.

#### 4.2.2. Resposta Imunológica Inata

A febre é um dos sinais mais conhecidos de infecção ou inflamação (Blatteis et al., 2005; Steiner, et al., 2006a; Romanovsky, Steiner, Matsumura, 2006). O processo febril pertence a um mecanismo fisiológico complexo de defesa, conhecido como resposta de fase aguda. Este processo é desencadeado pela resposta imunológica inata de um organismo, e visa combater a invasão do mesmo por microorganismos patogênicos ou por outros estímulos danosos (Hanson, 1997; Zeisberger, 1999; Blatteis, 2006, Roth, 2006).

A resposta inflamatória, termo geral utilizado para denominar a reação imunológica inata (Blatteis, 2006), é iniciada pela ativação de células sentinelas residentes em tecidos periféricos chamadas de mastócitos, resultando em degranulação e liberação de mediadores vasoativos, quimiotáticos (Luster, Alon, Andrian, 2005). O aumento da permeabilidade vascular decorrente da ação destas substâncias promove o extravasamento de plasma e de fatores circulantes solúveis como imunoglobulinas e componentes da cascata do complemento (Blatteis, 2006).

Os mediadores quimiotáticos recém liberados, como o fator de agregação plaquetária, os fatores da cascata do complemento (Componente 3b do complemento [C3b], Componente 5a do complemento [C5a]) e uma série de quimiocinas [IL-8, MIP e *regulated upon activation, Normal T-cell expressed and secreted* (RANTES)] auxiliam no recrutamento de neutrófilos circulantes, macrófagos residentes e células dendríticas para o local da injúria (Dale, Boxer, Liles 2008). O processo de migração leucocitária depende ainda da expressão de moléculas de adesão como as

---

selectinas, as integrinas e as moléculas de adesão intracelular (ICAMs) e vascular (VCAMs) (Luster, Alon, Andrian, 2005).

As selectinas compreendem três grandes famílias de lectinas: as L-selectinas, as P-selectinas e as E-selectinas. Essa classe de moléculas de adesão consiste em receptores de superfície celular expressos em células endoteliais (exceto a L-Selectina que é expressa em leucócitos) com afinidade por carboidratos de superfície presentes nos leucócitos. Por meio de interações leucócito-endotélio, que se fazem e se desfazem em segundos, as selectinas propiciam o frenamento e a rolagem dos leucócitos circulantes sobre o leito vascular (McEver, 2002) caracterizando o processo de rolamento.

As integrinas, por sua vez, são receptores transmembrana glicoprotéicos (Carman & Springer, 2003) responsáveis, em um primeiro momento, por estabilizar as ligações leucócito-endotélio mediadas pelas selectinas e, conseqüentemente, reduzir a velocidade de rolamento (Berlin et al., 1995). Durante o processo de estabilização do rolamento, o leucócito sofre ainda uma alteração desencadeada pela ligação de quimiocinas aos seus receptores. Esta interação desencadeia a expressão de outro grupo de integrinas, que, através de interações com as ICAMs, levam à fixação do leucócito ao endotélio. (Shamri et al., 2005).

As ICAMs e VCAMs são receptores de superfície da superfamília das imunoglobulinas que, além do processo de frenamento, também participam da diapedese, passagem do leucócito através da parede do vaso sangüíneo, por meio da promoção do rearranjo juncional mediado por ICAMs e VCAMs apicais e juncionais (Barreiro et al., 2002; Carman & Springer, 2004). O processo de migração celular encontra-se sumarizado nonexo A.

Uma vez no interior do sítio inflamatório, as células mononucleares (macrófagos e células dendríticas) e os neutrófilos reconhecem os microorganismos invasores a partir de receptores para padrões moleculares recorrentes e específicos de cada tipo de patógeno (Han & Ulevitch, 2005). Os principais receptores de patógenos estudados atualmente pertencem à família dos receptores “Toll like” (TLR)s (Miyake, 2004; Netea et al., 2004). Estes consistem em proteínas de um único domínio

transmembrana, cuja característica geral é conter, na porção citoplasmática, um domínio sinalizador chamado receptor “Toll IL-1” (TIR) que apresenta atividade pró-inflamatória (O’Neill & Dinarello, 2000; Miyake, 2004) - ver Anexo B. Embora os diferentes subtipos de TLR compartilhem um alto grau de semelhança estrutural, cada um reconhece padrões moleculares bastante específicos. O TLR-4 detecta a porção lipídica do LPS (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999), enquanto o TLR-2 reconhece lipoproteínas de bactérias gram positivas (Matsuguchi et al., 2003) e o polissacarídeo zimosan de paredes celulares de fungos (Zähringer et al., 2008) Estas diferenças são importantes pois, dependendo do subtipo de TLR ativado, diferentes moléculas adaptadoras são recrutadas, para interagir com quinases ou fatores associadas aos receptores de citocinas [como as quinases associadas ao receptor da IL-1 (IRAKs) (Suzuki et al., 2002) e o fator associado ao receptor do TNF (TRAF) (Wu & Arron, 2003)], e assim desencadear o processo de sinalização intracelular. De acordo com a sinalização desencadeada, o leucócito responde com mediadores quali e quantitativamente diferentes para cada tipo de invasor (Netea et al., 2004).

Os primeiros trabalhos a avaliarem o reconhecimento de fungos revelaram que o zimosan derivado de *S. cerevisiae* utiliza o heterodímero TLR-2/TLR-6 (Roeder et al., 2004; Netea et al., 2004), enquanto que as mananas do mesmo fungo parecem ser detectadas pelo TLR-4 (Tada et al., 2002; Netea et al., 2004). Estudos posteriores realizados com *Cândida albicans*, cujo zimosan assemelha-se ao do *S. cerevisiae*, mostraram que o TLR-2 medeia a secreção de mediadores antiinflamatórios, permitindo aos fungos escapar da resposta inata do hospedeiro, enquanto o TLR-4 ativa a resposta inflamatória responsável pela defesa do organismo contra o fungo (van der Graaf et al., 2005).

A ativação dos TLRs e o conseqüente recrutamento das moléculas adaptadoras e das IRAKs e TRAFs resultam na ativação das cascatas das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs): p38, quinase terminal c-Jun-N (JNK) e quinases ativadas por receptores extracelulares 1 e 2 (ERK) (van der Bruggen et al., 1999; van den Blink et al., 2001; Kawai & Akira, 2005) e na ativação de fatores

de transcrição caracteristicamente pró- inflamatórios, como o fator regulatório do INF (IRF)-3 (Doyle et al., 2002; Yamamoto et al., 2002) e, principalmente, do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Han & Ulevitch, 2005; Doyle & O'Neill, 2006; Fischer, Suire, Hale-Donze, 2008). Este último é conhecido por ser o principal fator de transcrição envolvido na resposta inflamatória. Isto porque ele é responsável por aumentar a expressão de inúmeras proteínas pró-inflamatórias, entre as quais podem-se citar as citocinas (Ghosh & Karin, 2002; Fischer, Suire, Hale-Donze, 2008), as enzimas como a ciclooxigenase (COX) 2 (Ghosh & Karin, 2002; Nadjar et al., 2005) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Chen et al., 1995; Ghosh & Karin, 2002), as quimiocinas e as moléculas de adesão (Ghosh & Karin, 2002).

Em condições normais, o NF- $\kappa$ B encontra-se sequestrado no citoplasma devido a sua associação com uma proteína da família das proteínas inibitórias do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), dentre as quais a mais importante é a I $\kappa$ B- $\alpha$ . Essa proteína é a principal responsável por bloquear a seqüência de ligação ao DNA do NF- $\kappa$ B e impedir sua translocação ao núcleo. Conforme demonstrado no anexo C, a exposição da célula a estímulos inflamatórios resulta na fosforilação e ativação de um complexo chamado I $\kappa$ B quinase (IKK), composto por três enzimas: a IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  e a IKK- $\gamma$ . O complexo IKK é capaz de fosforilar a I $\kappa$ B $\alpha$ , sinalizando para a sua ubiquitinação e degradação o que, conseqüentemente, ativa o NF- $\kappa$ B e a síntese de mediadores inflamatórios (Ghosh & Karin, 2002).

Desta forma, a resposta inflamatória depende grandemente do reconhecimento dos patógenos, sendo por isso que processos dependentes de inflamação, como a febre induzida por LPS, são amplamente prejudicados em animais nocauteados para o TLR-4 (Steiner et al., 2006b) e que agonistas dos TLR-2 conseguem precipitar processos febris (Hübschle et al., 2006).

Embora os TLRs estejam diretamente envolvidos no reconhecimento das moléculas de superfície dos microorganismos, a fagocitose e a eliminação dos patógenos dependem ainda da opsonização dos mesmos. A opsonização é um processo onde os anticorpos, em indivíduos imunizados, ou os fatores da cascata do complemento (C3b, Complemento 3b inativado [iC3b] e

---

Componente 1q do complemento [C1q]), em indivíduos não imunizados, provenientes da corrente sanguínea, ligam-se à superfície do agente invasor, facilitando sua fagocitose. Este processo só é possível porque o fagócito possui receptores tanto para as imunoglobulinas quanto para os fatores do complemento (Kobayashi, Voyich, DeLeo, 2003) e a ativação destes por seus ligantes, desencadeia uma série de modificações moleculares envolvendo segundos mensageiros, fosforilações e o citoesqueleto que resultam na emissão de pseudópodos e na fagocitose (Dale, Boxer, Liles, 2008).

O processo de fagocitose também ocasiona a ativação de uma enzima chamada nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) - oxidase que é constituída de 4 subunidades citoplasmáticas e uma subunidade de membrana (Bedard & Krause, 2007). Durante a fagocitose, as quatro subunidades citoplasmáticas translocam-se para as proximidades da subunidade de membrana, ativando a enzima. Esta, então, passa a catalisar a redução do oxigênio molecular ao radical superóxido à custa da oxidação do NADPH citoplasmático (Bedard & Krause, 2007). O superóxido produzido é, então, liberado no meio extracelular ou mantido no interior de um novo compartimento chamado fagossomo (Bedard & Krause, 2007). Esta estrutura resulta da união do vacúolo fagocítico com um grânulo intracelular que contém, na membrana, a NADPH-oxidase e, no interior, diversas enzimas com atividade antimicrobiana. No fagossomo, o superóxido é rapidamente convertido em outras espécies reativas potencialmente mais tóxicas como o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (Kobayashi, Voyich, DeLeo, 2003). A mieloperoxidase ainda, no fagossomo, converte o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, que, em conjunto com as demais espécies reativas, constitui uma das maiores armas utilizadas para destruir os microorganismos invasores (Kobayashi, Voyich, DeLeo, 2003). Todo este processo consumidor de O<sub>2</sub> e produtor de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) característico da resposta de fagócitos a agentes invasores é chamado de explosão respiratória (Dahlgren & Karlsson, 1999).

As ERO e ERN produzidas durante a inflamação também são utilizadas na sinalização pró-inflamatória intracelular. Existem inúmeros trabalhos demonstrando que a p38, as ERK1 e 2, e a

translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo são ativados por  $H_2O_2$  (Guyton et al., 1996; Takada et al., 2003; Strassheim et al., 2004d) e pelo radical superóxido (Mitra & Abraham, 2006), levando ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (Mitra & Abraham, 2006). Da mesma forma, estudos envolvendo neutrófilos (Asehnoune et al., 2004) e células epiteliais alveolares (Haddad & Land, 2002) estimulados com LPS mostraram que antioxidantes são capazes de abolir a ativação das quinases IRAKs, P38, ERK e a translocação do NF- $\kappa$ B induzidas pelo LPS, bem como a liberação de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MIP (Asehnoune et al., 2004). Além disso, um estudo mais recente verificou que a inibição específica da NADPH-oxidase de células mononucleares sangüíneas acaba com a ativação do NF- $\kappa$ B induzida por enterotoxina de *Staphylococcus* (Su et al., 2007). Embora o papel sinalizador das EROs e ERNs na inflamação seja bem conhecido, o mecanismo pelo qual esta regulação redox se estabelece ainda não é totalmente entendido. Existem inúmeros trabalhos sugerindo ativação de várias quinases atuantes sobre as moléculas envolvidas na ativação das MAPKs e do NF- $\kappa$ B (Kabe et al., 2005).

Durante o processo acima descrito, os restos celulares formados e os mediadores químicos liberados na área infectada são drenados pelos vasos linfáticos e levados até os linfonodos onde são filtrados por ação dos macrófagos antes de entrar na corrente sangüínea. Entretanto, alguns destes materiais podem estimular nervos sensoriais ou escapar do processo de filtração e entrar na corrente sangüínea resultando em uma série de reações sistêmicas coletivamente chamadas de resposta de fase aguda. A resposta de fase aguda constitui um quadro complexo de alterações neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais que tem a febre como um dos seus principais sinais (Blatteis, 2006).

#### 4.2.3. Transmissão do sinal inflamatório e desencadeamento da febre

A teoria mais clássica de indução de febre mostra que esta é resultado de uma transmissão *humoral* de sinais imunológicos entre o sítio inflamatório e o Sistema Nervoso Central (SNC) (Zeisberger, 1999, Roth, 2006). Segundo essa hipótese, as citocinas pró-inflamatórias liberadas

---

pelos fagócitos na corrente sanguínea e no local do dano (Beeson, 1948; Givalois et al., 1994; Ross et al., 1999) seriam levadas até à APOH ou às suas proximidades, onde estimulariam a expressão da COX-2 e da prostaglandina E sintase microsossomal 1 (mPGES-1) (Cao et al., 1995), que são enzimas catalisadoras da síntese de PGE<sub>2</sub>. Altos níveis de PGE<sub>2</sub>, na APOH, seriam capazes de induzir mudanças nos circuitos termorregulatórios do SNC e assim produzir febre (Zeisberger, 1999; Blatteis, 2004, 2006; Blatteis et al., 2005).

Dentre as principais citocinas envolvidas na reposta pirogênica podem-se citar o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6 (Saper & Breder, 1994; Luheshi, 1998; Dinarello, 1999). As evidências experimentais que demonstram o papel sinalizador dessas proteínas incluem: o aumento dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  após estimulações periféricas com LPS (Roth et al., 1993; Klir et al., 1993, Conti, 2004) e o efeito pirético da administração sistêmica de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Dinarello, 1988; Blatteis et al., 1990; Goldbach et al., 1997).

O mecanismo pelo qual as citocinas circulantes alcançam o SNC ainda não é totalmente entendido. Entretanto, inúmeros estudos que levam em consideração a baixa penetrabilidade desses mediadores na barreira hematoencefálica (BHE) (Blatteis, 2004) têm demonstrado diferentes rotas pelas quais essa transmissão é possível. Banks e colaboradores descobriram a existência de transportadores saturáveis específicos para cada uma dessas moléculas, por meio dos quais elas poderiam chegar ao hipotálamo (Banks & Kastin, 1991; Banks, Kastin, Gutierrez, 1994; Banks, Plotkin e Kastin, 1995). Outros trabalhos defendem a possibilidade das citocinas entrarem na APOH através do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (Stitt & Shimada, 1989, Blatteis, 1992; Roth et al., 2004), um órgão circunventricular com capilares fenestrados e ausência de BHE que permite a transmissão do sinal de vários hormônios e mediadores circulantes até o SNC. Também foi proposto que as citocinas poderiam ligar-se aos seus receptores específicos nas células endoteliais da microvasculatura cerebral (Matsumura & Kobayashi, 2004), ou da microglia perivascular ou em macrófagos de meninges (Schiltz & Sawchenko, 2003). A partir da interação com seus receptores,



---

as citocinas poderiam estimular sua própria liberação no interior do SNC e assim ativar as células vizinhas espalhando o sinal imunológico no cérebro.

Mais recentemente, surgiu um modelo de transmissão *neural* dos sinais sistêmicos que desencadeiam a febre. Segundo essa teoria, o LPS, independente da sua via de administração, ativaria macrófagos hepáticos [células de Kupffer (cK)], ou pulmonares (Steiner, et al., 2006a) fazendo-os liberar mediadores inflamatórios que rapidamente excitariam os aferentes vagais (Blatteis, 2006). Corroborando essa hipótese, foi evidenciado que as cK são essenciais às reações termorregulatórias em resposta à administração endovenosa (e.v.) (Sehic, et al, 1998; Li, Feleder, Blatteis, 2004; Li et al., 2006) e i.p. de LPS (Vismont & Shust, 2000, Li & Blatteis, 2004). Além disso, foi visto que os mesmos procedimentos causam a ativação dos neurônios aferentes primários do vago (Ek et al., 1998; Gaykema et al., 1998; Goehler et al., 1998) e que a vagotomia subdiafragmática bloqueia a febre induzida por LPS e IL-1 $\beta$  (Ek et al., 1998; Zeisberger, 1999; Székely, et al., 2000; Romanovsky, 2000).

O mediador inflamatório responsável pela excitação vagal seria a PGE<sub>2</sub>, pois seus receptores foram descobertos nos neurônios sensoriais vagais (Ek et al., 1998; Engblom et al., 2002; Oka, 2004), bem como, elevados níveis desse mediador foram encontrados no sangue venoso logo após a administração e.v. de LPS (Skarnes et al., 1981; Rotondo et al., 1988; Perlik et al., 2005; Steiner et al., 2006a). Somado a isso, sua injeção e.v. causa um rápido aumento da temperatura corporal (Romanovsky, Ivanov, Székely, 2000, Steiner et al., 2006a), sem aparentemente passar para o SNC (Steiner et al., 2006a). Suportando essa a idéia, Li e colaboradores (2006) mostraram que as cK produzem e liberam PGE<sub>2</sub> na corrente sangüínea em correlação temporal com a febre após administração e.v. de LPS. A rápida liberação que possibilita a correlação temporal seria possível devido à ação de fatores do complemento, como C5a, (Blatteis et al., 2004b; Perlik et al., 2005), que é rapidamente liberado em resposta ao LPS (Vukajlovich, 1992) e causa imediata liberação de PGE<sub>2</sub> in vitro (Puschel et al., 1993). Interessantemente, trabalhos recentes realizados em ratos indicam que

---

a vagotomia não bloqueia a resposta febril induzida pela injeção e.v. de PGE<sub>2</sub> (Ootsuka et al., 2008), embora o mesmo grupo já tenha afirmado a importância dos aferentes abdominais vagais ou não vagais em diferentes fases da resposta febril (Székely et al., 2000).

Sabe-se que o núcleo do trato solitário (NTS) é uma das principais vias de entrada dos sensores viscerais vagais ao SNC. Juntamente com o NTS (Elmqvist et al., 1996; Wan et al., 1994), as projeções adrenérgicas de A1 e A2 do bulbo (Wan et al., 1994; Swiergiel et al., 1996) têm sido apontados como sendo a ponte transmissora dos sinais inflamatórios entre o vago e a APOH. Realmente, existem inúmeros trabalhos demonstrando que a vagotomia (Fleshner et al., 1995; Wiczorek et al., 2005) e o pré-tratamento com indometacina, (Wiczorek & Dunn, 2006a) inibidor não seletivo da síntese de prostaglandinas, inibem a liberação de noradrenalina (NA) no hipotálamo após a administração sistêmica de diferentes estímulos piréticos (Dun & Wang, 1995; Linthorst et al., 1995; MohanKumar, MohanKumar, Quadri, 2000; Wiczorek et al., 2005; Wiczorek & Dunn, 2006 a,b, Feleder, Perlik, Blatteis, 2007).

Além disso, a microinjeção de NA na APOH apresenta efeitos hipertérmicos (Quan & Blatteis, 1989; Feleder, Perlik, Blatteis, 2004) e induz a liberação de PGE<sub>2</sub> em tecido cerebral *in vitro* (Bergström, Farnebo, Fuxe, 1973) e *in vivo* (Feleder, Perlik, Blatteis, 2004) causando dois momentos de aumento de temperatura. O primeiro independente de PGE<sub>2</sub> é mediado por receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  (Feleder, Perlik, Blatteis, 2004) e o segundo causado pela ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  é pela conseqüente síntese *de novo* da PGE<sub>2</sub> via COX-2 (Feleder, Perlik, Blatteis, 2004; 2007; Blatteis et al., 2004a).

Dessa forma, segundo Blatteis (2006) a PGE<sub>2</sub> produzida periféricamente envia seu sinal até o SNC através do nervo vago (não é consenso entre todos os autores). O NTS e as projeções adrenérgicas do bulbo enviam o sinal vagal à APOH na forma de um estímulo adrenérgico que aumenta a temperatura e induz a síntese e a liberação de PGE<sub>2</sub> no sítio termorregulatório.

---

O mais provável é que ambas as formas de transmissão, sumarizadas no anexo D, ocorram durante os processos de indução de febre. Entretanto, dependendo da via de administração, da escala temporal e do pirógeno utilizado, uma pode se sobressair à outra (Zeisberger, 1999). Como exemplo, pode-se citar a febre induzida por LPS em ratos, cujo aumento da temperatura se estabelece em 3 picos (aproximadamente 1, 2 e 4 h pós injeção) (Székely et al., 2000), cada um com padrão molecular diferenciado (Ivanov et al., 2002; Ivanov, Scheck, Romanovsky, 2003; Ivanov & Roamanovsky, 2004). Talvez, neste modelo, a via neural dependente das fibras aferentes primárias abdominais seja preponderante na primeira fase, enquanto que a via humoral seja essencial na segunda e terceira fases, onde o tempo necessário à síntese dos mediadores humorais já transcorreu (Blatteis et al., 2004b; Székely et al., 2000).

Tanto para modelo neural como no modelo humoral, a PGE<sub>2</sub> apresenta uma ação fundamental no desenvolvimento da resposta febril. Durante muitos anos, acreditou-se que todas as alterações desencadeadoras da febre ocorridas na APOH seriam resultado do aumento da síntese da PGE<sub>2</sub> na mesma área (Blatteis & Sehic, 1997; Davidson et al, 2001, Ivanov & Roamanovsky, 2004). De fato, as oscilações nos níveis de PGE<sub>2</sub>, no fluido cérebro espinhal e intersticial acompanham a resposta febril induzida por citocinas (Dinarello, 2004), assim como a induzida por LPS (Blatteis & Sehic, 1997) nas suas fases mais tardias (Feleder, Perlik, Blatteis, 2007). Também não há dúvidas de que a micro-injeção de PGE<sub>2</sub> na APOH causa aumento da temperatura (Milton & Wendlant, 1971; Osaka, 2008) e que animais tratados com inibidores da COX central (Scammel et al., 1998) ou periféricamente (Vane, 1971; Aronof & Neilson, 2001) não apresentam febre. Por tais evidências, a maioria dos estudiosos da febre considerava a PGE<sub>2</sub> o mediador final da resposta febril. Atualmente, já se sabe que a primeira fase da resposta pirética ao LPS, bem como algumas substâncias como MIP- 1 $\beta$  (Li et al., 2003), IL-8 e substância P conseguem induzir febre de maneira independente desta molécula.

#### 4.2.4. Ciclooxygenases, Prostaglandina E<sub>2</sub> e suas ações no processo febril.

A PGE<sub>2</sub> é um prostanóide pertencente a um grande grupo de ácidos graxos poliinsaturados hormonalmente ativos, conhecidos como eicosanóides. Sua síntese tem como substrato o ácido aracdônico em uma rota que envolve três passos seqüenciais: 1) hidrólise dos glicerofosfolídeos de membrana pelas isoformas citoplasmática e/ou secretora da fosfolipase com conseqüente liberação de aracdonato; 2) oxigenação do aracdonato pelas COXs e produção da PGH<sub>2</sub>; 3) e a conversão da PGH<sub>2</sub> à PGE<sub>2</sub> através da mPGES-1 (Smith, Garavito, Dewitt, 1996; Smith, Dewitt, Garavito, 2000; Murakami & Kudo, 2004).

O passo limitante na biossíntese da PGE<sub>2</sub> reside na reação catalisada pelas enzimas COXs (passo 2) também chamadas de prostaglandina endoperóxido H sintases (PGHS), que apresentam-se sob duas isoformas, COX-1 e COX-2 (Smith, Garavito, Dewitt, 1996; Smith, Dewitt, Garavito, 2000; Simmons, Botting, Hla, 2004). A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e apresenta funções de manutenção da homeostase, como proteção da mucosa gástrica, manutenção do fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária (Simmons, Botting, Hla, 2004). A COX-2 é considerada induzível, pois tem sua expressão aumentada por estímulos inflamatórios como citocinas pirogênicas e LPS (Simons, Botting, Hla, 2004). No entanto, sabe-se que a COX-2 é também constitutiva no cérebro (Yamagata et al., 1993), rim (Harris et al., 1994) e epitélio traqueal (Walenga et al., 1996). Existe, ainda, a COX-3 que foi clonada, pela primeira vez, por Chandrasekharan e colaboradores em 2002 sendo caracterizada como uma variante de “splicing” da COX-1.

O mecanismo catalítico desta enzima envolve dois passos: a bioxigenação do aracdonato à PGG<sub>2</sub> e a sua redução a PGH<sub>2</sub> que ocorrem em sítios catalíticos diferentes, sítio ciclooxygenase e sítio peroxidase respectivamente (Smith, Garavito, Dewitt, 1996; Smith, Dewitt, Garavito, 2000; Simmons, Botting, Hla, 2004). Há indícios de que o início da atividade catalítica de COXs recém sintetizadas requer a presença de radicais endógenos como peroxinitritos, peróxilídeos ou da

---

própria PGG<sub>2</sub> para a formação de resíduo tirosil oxidado crucial para atividade ciclooxigenase (Simmons, Botting, Hla, 2004).

Como citado anteriormente, a PGE<sub>2</sub> é um mediador essencial para a resposta pirogênica no SNC. A produção hipotalâmica desse eicosanóide durante a febre é catalisada pela isoforma induzível da COX e pela sintase terminal, mPGES-1, conforme evidenciado por estudos envolvendo inibidores altamente seletivos da COX-1 e COX-2 (Zhang et al., 2003; Dogan, Ataoglu, Akarsu, 2002) e camundongos transgênicos carecendo das duas isoformas da COX (Li et al., 1999; Steiner et al., 2005) ou ainda da mPGES-1 (Engblom et al., 2003). As células endoteliais da vasculatura cerebral, bem como a microglia perivascular (células fagocíticas importantes no reconhecimento e apresentação de antígenos no SNC), parecem ser o sítio produtor de PGE<sub>2</sub>, pois super expressam COX-2 e mPGES-1 (Yamagata et al., 2001) em resposta à IL-1 (Cao et al., 1996; Schiltz & Sawchenko, 2002, 2003), ao TNF- $\alpha$  (Cao et al., 1998) e ao LPS (Cao et al., 1995; Matsumura et al., 1998) em correlação temporal com a febre (Cao et al., 1995; Inoue et al., 2002). A PGE<sub>2</sub> produzida por estes grupos celulares atua sobre a região imediatamente adjacente ao OVLT no núcleo pré-óptico ventromedial (Matsumura et al., 1990; Scammell et al., 1996), causando alterações nos neurônios hipotalâmicos, necessárias ao aumento da temperatura.

Sabe-se que a PGE<sub>2</sub> exerce suas funções através de um grupo de receptores de membrana pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G. Estes receptores são conhecidos como receptores de prostanóides da série E (EP), dentre os quais já foram clonados os subtipos EP1, EP2, EP4 e três variantes de *splicing* do EP3: EP3 $\alpha$ , EP3 $\beta$  e a EP3 $\gamma$  (Sugimoto et al., 1993; Irie et al., 1993, Sugimoto & Narumiya, 2007). Pelo menos três destes subtipos são encontrados na APOH: o EP1, o EP4 e o EP3 (Oka et al., 2000). Agonistas dos receptores EP1 e EP3 apresentam ação hipertérmica, enquanto que agonistas do receptor EP4 causam queda de temperatura (Oka, Oka Saper, 2003). A participação dos receptores EP3 e EP1 durante a febre foi confirmada quando pesquisadores demonstraram que camundongos nocauteados para os receptores EP3 não

apresentavam aumento de temperatura em resposta à PGE<sub>2</sub>, à IL-1β ou ao LPS (Ushikubi et al., 1999; Oka et al., 2003) e que a ausência dos receptores EP1 atenuava a primeira fase da resposta ao LPS (Oka et al., 2003). Atualmente, acredita-se que a ação pirética da PGE<sub>2</sub> seja mediada principalmente pela isoforma EP3α e, em menor proporção, pela EP3γ (Vasilache, Andersson, Nilsberth, 2007) expressas em soma e dendritos de neurônios da área pré-óptica medial e do núcleo pré-óptico mediano do hipotálamo (Nakamura et al., 1999, 2000; Lazarus et al., 2007).

### 4.3. N-acetilcisteína (NAC)

A NAC é um doador de grupos sulfidrila muito semelhante ao aminoácido cisteína, embora apresente um substituinte acetil no nitrogênio do grupo amino que reduz a reatividade do seu grupo tiol, conferindo à molécula uma menor toxicidade e menor susceptibilidade à oxidação (Atkuri et al., 2007). Suas características farmacocinéticas, estimadas em humanos, indicam uma meia vida plasmática de 2,5 h e um metabolismo de primeira passagem que torna a sua forma livre totalmente indetectável no plasma 10-12 h após sua administração (De Caro et al., 1989). A metabolização deste fármaco libera o aminoácido cisteína que atua como precursor direto da síntese da glutatona reduzida (GSH) (Santangelo, 2003).

Na prática clínica, a NAC é amplamente utilizada devido as suas características mucolíticas e detoxificantes no envenamento com paracetamol (Zafarullah et al., 2003; Atkuri et al., 2007). Seu uso como mucolítico é justificado pela capacidade de romper pontes dissulfeto presentes nas cadeias mucoprotéicas e, assim, diminuir a viscosidade das secreções. Na intoxicação com paracetamol, a NAC age como uma fonte de cisteínas necessárias à síntese *de novo* da GSH, molécula amplamente depletada durante a detoxificação do metabólito hepático do paracetamol (Atkuri et al., 2007). Outros estudos também demonstram para NAC uma atividade complexante de metais (Atkuri et al., 2007). Entretanto, a ação farmacológica mais estudada da NAC reside na sua capacidade de

---

rapidamente elevar os níveis de GSH *in vitro* sobre diferentes linhagens celulares e, em humanos e ratos sob diferentes vias de administração (Sadowska, Keenoy, Backer, 2007).

A GSH é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, glicina e cisteína e desempenha um importante papel na manutenção do balanço redox intracelular (Haddad & Harb, 2005). Sua síntese, a partir da cisteína proveniente da NAC, envolve três passos enzimáticos ocorridos nos citosol. O primeiro é catalisado pela enzima glutamato-cisteína ligase e consiste na condensação do glutamato com a L-cisteína. O segundo é o passo limitante desta rota sintética e converte resíduo de glutamato a  $\gamma$ -glutamil em uma reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase ( $\gamma$ GCS). O terceiro e último passo é catalisado pela glutamil sintase e converte o  $\gamma$ -glutamil-cisteína no tripeptídeo  $\gamma$ -glutamil-cisteínil-glicina também conhecido como GSH (Haddad & Harb, 2005).

Endogenamente, a GSH é utilizada pela enzima glutationa peroxidase (GPx) para a conversão do peróxido de hidrogênio à água, bem como, para redução de hidroperóxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes. Durante essa reação, duas moléculas de GSH são convertidas em glutationa oxidada dissulfeto (GSSG) a qual é reciclada novamente em duas GSH por ação da glutationa redutase (GR) (Hayes & McLellan, 1999).

A NAC, além de ser um poderoso precursor de GSH, também apresenta atividade antioxidante *per se*, por ser capaz de seqüestrar radicais hidroxil e superóxido (Aruoma et al., 1989; Benrahmoune, Therond, Abedinzadeh, 2000). Como consequência destas propriedades, ela pode restaurar o status redox, modificado em algumas patologias e, assim, modular a sinalização intracelular (Zafarullah et al., 2003; Sadowska, Keenoy, Backer, 2007).

Como citado anteriormente, durante o processo de explosão respiratória, as células de defesa produzem e liberam uma grande quantidade de ERO e ERN que, além da eliminar o agente invasor, ainda atuam como segundos mensageiros na expansão do processo inflamatório. Vários estudos realizados *in vitro* têm relatado um efeito inibitório da NAC sobre a explosão respiratória de polimorfonucleares humanos (Stolarek, Białasiewicz, Nowak, 2002; Sadowska et al., 2006),

especificamente sobre a produção do radical hidroxil e de ácido hipocloroso (Gressier et al., 1994). Da mesma forma, estudos realizados *in vivo*, utilizando doses de 250-500 mg/kg de NAC mostram uma significativa inibição da explosão respiratória de neutrófilos sangüíneos humanos (Sadowska et al., 2006). Em concordância com esses achados, a ação inibitória da NAC sobre a enzima mieloperoxidase de neutrófilos já foi demonstrada em diferentes modelos de sepse (Ozdulger et al., 2003; Demiralay, Gürsan, Erdem, 2006) e inflamação (Cuzzocrea et al., 2001; Ancha et al., 2008). Em conjuntos, esses dados indicam uma ação neutralizante da NAC sobre as espécies reativas produzidas durante a inflamação, propriedade que poderia alterar a modulação redox presente nesse processo e, conseqüentemente, exercer efeitos antiinflamatórios.

Suportando a idéia da modulação redox da NAC sobre quinases e fatores de transcrição, pesquisadores evidenciaram que a ativação do NF- $\kappa$ B induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células endoteliais (Bowie, Moynagh, O'Neill, 1997) ou por LPS em polimorfonucleares (Peterson, Galley, Webster, 2003) pode ser reduzida por altas concentrações de NAC. Além disso, a ativação das MAPK (P38, ERK e JNK) também é reduzida pela NAC (Haddad & Land, 2002; Asehnoune et al., 2004), enquanto que o tratamento sistêmico com L-buthionina-(S,R)-sulfoximina (um inibidor seletivo da  $\gamma$ GCS) é capaz de ativá-las (Limón-Pacheco et al., 2007).

Como conseqüência das evidências acima citadas, essa pequena molécula antioxidante tem demonstrado inúmeros benefícios em patologias que apresentam quadros inflamatórios associados, como afecções do sistema respiratório e oftálmico, câncer, doenças cardiovasculares, artrites, infecções, etc (Zafarullah et al., 2003). Os benefícios da NAC nas diferentes patologias inflamatórias citadas acima incluem: 1) a redução da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Cuzzocrea et al., 2001; Victor, Rocha, Fuente, 2003; Zhang et al., 2007); 2) a diminuição da migração leucocitária (Cuzzocrea et al., 2001; Zhang et al., 2007); 3) a diminuição da expressão de enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 (Ancha et al., 2008) e iNOS (Bergamini et al., 2001; Zhang et al., 2007), e a diminuição da produção de seus produtos: PGE<sub>2</sub> (Ancha et al.,



---

2008) e óxido nítrico (NO) (Bergamini et al., 2001; Ancha et al., 2008); 4) a diminuição do extravasamento plasmático para áreas inflamadas (Cuzzocrea et al., 2001; Zhang et al., 2007); 5) a diminuição da fagocitose de macrófagos ativados (Victor, Rocha, Fuente, 2003); 6) e a diminuição da apoptose celular (Ozdulger et al., 2003; Demiralay, Gürsan, Erdem, 2006).

Embora a ação antiinflamatória da NAC já esteja bem estabelecida, poucos trabalhos têm avaliado o seu efeito sobre a resposta febril. Como descrito nesta dissertação, a febre caracteriza-se por ser uma resposta dependente de processo inflamatório, assim, todo e qualquer agente que consiga interferir neste processo pode exercer ações antitérmicas. De fato, alguns autores já reportaram que drogas antioxidantes, como azul de metileno e ácido lipóico (Riedel et al., 2003), e drogas redutores de grupos tióis (ditiotreitól) (Riedel & Maulik, 1999; Canini et al., 2001) são capazes de reverter a febre induzida por LPS. Entretanto, pouquíssimos trabalhos, realizados em coelhos, utilizando LPS (Huang, Lin, Chang, 2006) ou enterotoxina de *Staphylococcus* (Shao et al., 2004) como estímulo, versam sobre a interação *in vivo* entre a NAC e a resposta febril. Além disso, estes estudos ou não avaliam o componente antiinflamatório inerente a este fármaco (Huang, Lin, Chang, 2006), ou o fazem em cultura de células humanas (Lee et al., 2003; Shao et al., 2004). Levando em conta os fatos acima citados, a ausência de literatura que indique um potencial antiinflamatório da NAC sobre infecções causadas por fungos e o crescente número de infecções micóticas disseminadas que afetam pessoas imunodeprimidas, torna-se pertinente avaliação do potencial antipirético e antiinflamatório da NAC em modelos experimentais de pirexia que utilizem fungos como pirógenos exógenos.

---

## **5.,OBJETIVOS**

## 5.1. Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo geral avaliar o potencial antiinflamatório e antipirético da n-acetilcisteína sobre um modelo de peritonite induzida por *Saccharomyces cerevisiae*.

## 5.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar o efeito da NAC sobre a temperatura retal normal de ratos jovens.
- 2) Avaliar o efeito da NAC sobre a resposta febril e sobre o processo inflamatório local, ambos induzidos pela administração intraperitoneal de *S. cerevisiae*.
- 3) Avaliar se o *S. cerevisiae* altera o perfil de citocinas pirogênicas presentes no hipotálamo, no momento do pico da febre e, posteriormente, determinar os efeitos da NAC sobre esta mesma resposta.
- 4) Avaliar o efeito de NAC sobre o conteúdo total de grupos sulfidrilas livres presentes no hipotálamo e no lavado peritoneal de animais pirogenicamente estimulados com *S. cerevisiae*
- 5) Avaliar se a ação sistêmica de NAC apresenta efeitos centrais que possam alterar a resposta pirogênica induzida por *S. cerevisiae*.
- 6) Determinar se ação da NAC pode ocorrer em passos posteriores ao acúmulo de PGE<sub>2</sub> no tecido hipotalâmico.

# PARTE II

---

**1. ARTIGO CIENTÍFICO**

### 1.1. Situação do Artigo

O presente trabalho foi submetido ao periódico *Pharmacological Research* no dia 06 de janeiro de 2009, conforme demonstrado pelos comprovantes que seguem:

Ms. Ref. No.: YPHRS-D-09-00009

Title: N-acetylcysteine prevents baker yeast-induced inflammation and fever  
Pharmacological Research

Dear Mello,

Your submission entitled "N-acetylcysteine prevents baker yeast-induced inflammation and fever" will be handled by Receiving Editor I. Ceserani.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/yphrs/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Pharmacological Research

**Comprovante de submissão 1.**

Elsevier Editorial System - Windows Internet Explorer  
 http://ees.elsevier.com/ynhs/default.asp

Pharmacological RESEARCH

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Contact us Help ?  
 Username: Carlos\_Mello  
 Role: Author

Version: 6.0

**Submissions Being Processed for Author Carlos Fernando Mello, M.D., Ph.D.**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View QC Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>		N-acetylcysteine prevents baker yeast-induced inflammation and fever	Jan 06, 2009	Jan 06, 2009	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

© 2006 - 2008 Elsevier BV.

Pharmacological RESEARCH

Entrada (1095) - Y...  
 Pharmacological ...  
 Elsevier Editorial S...  
 Dissertação

Internet | Modo Protegido Ativado  
 13 - Artigo - Micro...  
 PT

22:29

Comprovante de submissão 2.

---

## 1.2. Manuscrito

### **N-acetylcysteine prevents baker yeast-induced inflammation and fever**

Ana Paula O. Ferreira<sup>a,b</sup>, Juliana Saibt Martins Pasin<sup>a,b</sup>,  
André Luis Lopes Saraiva<sup>b</sup>, Velcir Rubenich Schirmer<sup>b</sup>, Viviane Ratzlaff<sup>b</sup>,  
Régis Adriel Zanette<sup>c</sup>, Jânio Morais Santurio<sup>c</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>c</sup>  
Mateus Sortes Rossato<sup>d</sup>, Rosália Andrighetto<sup>d</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>d</sup>, Juliano Ferreira<sup>d</sup>  
Carlos Fernando Mello<sup>\*a,b</sup>

<sup>a</sup>Biological Sciences: Biochemistry Graduation Program  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Department of Physiology and Pharmacology,

<sup>c</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Center of Health Sciences;

<sup>d</sup>Department of Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences;  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

\*Corresponding author: Carlos Fernando Mello, MD, PhD

E-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

E-mail (alternative): mello.cf@gmail.com

Address: Department of Physiology and Pharmacology,

Center of Health Sciences

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Phone: +55 55 3220 9378

FAX: +55 55 3220 8241



---

**Abstract**

N-acetylcysteine (NAC) is a glutathione precursor that modulates intracellular signaling and inflammatory response. However, it is poorly known whether NAC interferes with other inflammation-dependent processes, such as fever. Therefore, in this study we investigated the effects of NAC on fever and inflammatory response induced by intraperitoneal administration of baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae* suspension, 135 mg/kg, i.p.) in young rats. Systemic administration of NAC (500 mg/kg, s.c.) prevented, but did not revert established fever induced by baker yeast. In addition, NAC decreased leukocyte migration, plasma protein extravasation and decreased tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  release induced by baker yeast in peritoneal lavage and IL-1 $\beta$  release in hypothalamus. NAC also increased, and prevented baker yeast-induced decrease of, nonprotein thiol content in peritoneal lavage and hypothalamus. The central administration of NAC (50  $\mu$ g, i.t., 120 min after baker yeast) also prevented baker yeast-induced fever, but did not alter leukocyte migration to peritoneal cavity. In addition, the systemic administration of NAC did not alter the febrile response elicited by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 300 ng, i.t.). These results suggest an anti-inflammatory role for NAC on yeast-induced peritonitis and that its antipyretic inhibition of inflammatory IL-1 $\beta$  production in hypothalamus.

**Keywords:**

N-acetylcysteine; *Saccharomyces cerevisiae*; fever; inflammation; young rats; cytokines; leukocyte migration.

## 1. Introduction

The febrile response comprehends a complex array of neurological, endocrine and immunological changes that elevate body temperature over the normal circadian variations [1], which depends on the host inflammatory response. In infectious fever, pathogens are detected by receptors present on immune cells, such as macrophages or neutrophils cells [2-4]. The pathogen-induced activation of these cells triggers the transcription of soluble innate immune proteins, including cytokines [5, 6] which induce cyclooxygenase-2 (COX-2) and consequent prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> production in the anterior hypothalamus, ensuing fever [7-11].

Several studies have demonstrated that n-acetylcysteine (NAC) protects against inflammatory diseases such as atherosclerosis, arthritis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cancer and sepsis [12]. This small molecule is a precursor of glutathione (GSH) that has been widely used as a mucolytic in respiratory inflammatory diseases [13] and for countering acetaminophen liver toxicity [14], bearing important cellular antioxidant activity [15, 16]. Besides generating GSH, NAC directly scavenges reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid [17, 18] decreasing oxidative damage [19]. In addition, NAC decreases the synthesis and release of proinflammatory molecules, including cytokines [20-22] PGE<sub>2</sub> [23] and NO [21, 23] as well the expression of enzymes such nitric oxide synthase (iNOS) [19, 22] and COX-2 [23].

Although NAC has been known as an anti-inflammatory compound, no study has addressed whether it alters fungal peritonitis-induced inflammation and fever. In fact, initial evidence for the anti-inflammatory and antipyretic effects of NAC derive from studies in which LPS is used as exogenous pyrogen and rabbits as experimental animals [25-27]. Since fever [28] and its molecular mechanisms vary depending on the species [29] and the pyrogenic stimulus [28, 30, 31], we decided to investigate whether the systemic and central administration of NAC alters the fever and inflammatory response induced by intraperitoneal administration of baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae* suspension) in young rats.

---

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Drugs

Commercially available dried baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Saf do Brasil Produtos Alimentícios Ltda, Brazil), pyrogen-free 0.9% NaCl. N-acetylcysteine, bovine serum albumin, dimethylsulfoxide (DMSO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), trichloroacetic acid (TCA) 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and Tris were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

### 2.2. Subjects and maintenance

Male wistar rats (26-28 days of age, 60-70 g) provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria were used. Animals were housed in groups of 9 per cage (8 pups and mother), and maintained in a room with controlled temperature (24°C ± 1°C), 12h light/dark cycle (lights on at 6:00), and standard laboratory chow and tap water *ad libitum*. The experiments were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University.

### 2.3. Temperature measurements and fever induction

The T<sub>R</sub> was measured by the insertion of a lubricated thermistor probe (external diameter: 3 mm) 2.8 cm into the rectum of animal. The probe was linked to a digital device, which displayed the temperature at the tip of the probe with a 0.1°C precision. The values displayed were manually recorded.

Febrile response was induced and monitored along time according to Tomazetti et al. (2005) [32]. Briefly, immediately after measuring the basal rectal temperature (T<sub>Rb</sub>) at 08:00 a.m., the animals were injected with baker yeast (135 mg/kg, i.p., 10 mL/kg) or vehicle (pyrogen-free 0.9% NaCl, 10 mL/kg). Rectal temperature (T<sub>R</sub>) was recorded every hour for 8 hours

In those experiments designed to evaluate the effect of NAC on PGE<sub>2</sub> induced-fever, immediately after measuring the basal rectal temperature (bT<sub>R</sub>) at 08:00 a.m., the animals were injected with PGE<sub>2</sub> (300 ng/ 100 µL/site, i.t.) or vehicle (pyrogen free 0.15%

---

DMSO in 0.9% NaCl, 100  $\mu$ L/site, i.t.).  $T_R$  was recorded every 30 min for 4 hours.  $T_R$  changes are expressed as the difference from the basal value.

#### 2.4. Peritoneal lavage and cell count

Immediately after the behavioral evaluation, the animals were sacrificed by decapitation and the abdominal skin below the sternum was nicked. Peritoneal lavage was performed by injecting (i.p.) 5 mL of a Tris-HCl buffer containing EGTA (2 mM) EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM). The abdominal wall was gently massaged for 1 min and peritoneal lavage was harvested with a syringe. The procedure was repeated, generating 10 mL peritoneal lavage. Samples were discarded when hemorrhage was detected in the cavity. 300  $\mu$ L aliquots of peritoneal lavage were diluted in Türk solution and transferred to a Neubauer chamber for cell counting. Results are presented as number of cells/ $\text{mm}^3$ . The remaining volume was centrifuged (2000  $g$  for 10 min), and 6 mL of supernatant was lyophilized for cytokine determination.

#### 2.5. IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ immunoassay

The content of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined in both hypothalamus homogenates and lyophilized peritoneal lavage. Before assay, a pool of two frozen hypothalamus (-70°C) were homogenized in 500  $\mu$ L of a solution containing bovine serum albumin (BSA 10 mg/ml), EGTA (2 mM), EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Lyophilized peritoneal lavage samples were resuspended in 1000  $\mu$ L of BSA (10 mg/mL) in PBS. Cytokine levels were measured using a commercially available ELISA Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN), according to the manufacturer's protocol. The results are expressed in pg/ml for peritoneal lavage assays and pg/mg of protein for hypothalamus homogenate assays.

#### 2.6. Plasma protein extravasation

Plasma protein extravasation to the peritoneal cavity was monitored as total protein content in lyophilized peritoneal lavage, as described by Getting et al. (1997) [33]. Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) [34] and bovine serum albumin (1 mg/mL) was used as standard.

#### 2.7. Determination of nonprotein sulfhydryl groups content

In a subset of animals, nonprotein sulfhydryl groups were determined in the peritoneal lavage and hypothalamic tissue 1 and 4 hours after the injection of the pyrogenic stimulus. Peritoneal lavage in this set of animals was performed by injecting 6 mL of EDTA (200 mM). Nonprotein sulfhydryl groups determination in the hypothalamus was carried out as follows. The dissected hypothalamus was rapidly homogenized in 1.6 ml of EDTA (200 mM) and centrifuged at 6000 x g for 15 minutes. Samples were sonicated for 3 min and incubated with TCA (50%) at 4°C for 1 hour. Samples were centrifuged at 12000 x g for 7 minutes and total nonprotein sulfhydryl groups were determined spectrophotometrically (412 nm) in the supernatant, using 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as chromogenic reagent according to Sedlak and Lindsay (1968) [35]. Results are presented as nmol of SH/mg of protein.

## 2.8. Experimental protocols.

### 2.8.1. Experiment 1: Effect of NAC on rectal temperature.

After determining the basal rectal temperature, the animals were subcutaneously (s.c.) injected with vehicle (pyrogen-free 0.9% NaCl, 5 mL/kg) or NAC (50, 150, or 500 mg/kg, 5 mL/kg) and  $T_R$  was followed up for six hours at 1-h intervals.

### 2.8.2. Experiment 2: Effect of NAC on fever development.

In order to determine whether NAC prevented baker yeast induced-fever, animals were injected with vehicle (pyrogen-free 0.9% NaCl, 5 mL, s.c.) or NAC (500 mg/kg, s.c.), one hour before baker yeast administration.  $T_R$  changes were recorded every hour for 9 hours. Protein extravasation, leukocyte number and cytokine content were evaluated in peritoneal lavage and hypothalamus 4 hours after yeast injection. The content of total nonprotein sulfhydryl groups were determined in peritoneal lavage and hypothalamic tissue 1 and 4 hours after the injection of the pyrogen.

### 2.8.3. Experiment 3: Effect of intrathecal (i.t) injection of NAC on $T_R$ and on baker yeast -induced fever

In order to evaluate whether the antipyretic effect of NAC was centrally-mediated, we injected NAC (i.t.) and evaluated whether it prevented baker yeast-induced fever. The i.t. route of administration was selected because it does not require previous cannula implantation, reducing the unavoidable inflammatory response due to previous surgery.

Initially, we determined the effect of NAC (5, 15, 50 µg or vehicle 100 µL/site) on  $T_R$ . The dose of NAC of 50 µg/site was selected for the subsequent assays because it did not alter  $T_R$  *per se*. In this set of experiments,  $T_R$  was recorded every 30 min up to 4 hours.

NAC (50 µg/site) or vehicle (pyrogen free 0.9% NaCl; 100 µL/site) was injected i.t. 1 or 2 hours after the administration of baker yeast (before  $T_R$  increase).  $T_R$  was recorded every hour for 9 h after yeast injection. We also evaluated whether centrally-administered NAC altered baker yeast-induced increase of leukocytes in peritoneal lavage.

#### 2.8.4. Experiment 4: Effect of NAC on established baker yeast-induced fever

In this experiment we determined whether NAC reverted established baker yeast-induced fever. Animals were injected the pyrogen and  $T_R$  change was monitored at 1-h intervals. Fever peaked between 3 and 4 hours after baker yeast injection. Three hours after pyrogen administration, the animals were injected with vehicle or NAC (500 mg/kg, s.c.) and  $T_R$  followed up for additional 6 hours.

#### 2.8.5. Experiment 5: Effect of NAC on PGE<sub>2</sub>-induced fever

In this experiment we investigated whether systemic NAC prevented the fever induced by the central administration of PGE<sub>2</sub>. Immediately after measuring basal  $T_R$ , the animals were injected with vehicle or NAC (500 mg/kg, s.c.). One hour later,  $T_R$  was measured and animals were injected with vehicle (DMSO 0.15%) or PGE<sub>2</sub> (300 ng/100 µL, i.t.) and  $T_R$  was recorded every 30 min for 4 hours.

### 2.9. Data analysis

Rectal temperature changes and biochemical parameters are expressed as means ± S.E.M. Data were analyzed by two or three-way analysis of variance (ANOVA), with time treated as within subject factor, depending on the experimental design. *Post hoc* analyses were carried out by the F test for simple effect or by the Duncan's multiple comparisons test, when appropriate. F values are shown only if  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Systemic NAC attenuates peritoneal inflammation and baker yeast-induced fever.

After determining that the subcutaneous injection of 50, 150 or 500 mg/kg NAC did not alter the rectal temperature of young rats (data not shown), we investigated whether the systemic administration of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before the pyrogenic stimulus) altered baker yeast-induced increase of  $T_R$  (Fig 1). Statistical analysis of  $T_R$  changes along time revealed that NAC significantly attenuated baker yeast-induced fever [ $F(7,259) = 2.14$ ;  $p < 0.05$ ] and peritoneal inflammation, assessed by total leukocyte count [ $F(1,21) = 8.44$ ;  $p < 0.01$ , Fig. 2A], plasma protein extravasation [ $F(1,14) = 9.05$ ;  $p < 0.01$ , Fig. 2D], IL-1 $\beta$  [ $F(1,21) = 5.68$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2B] and TNF- $\alpha$  levels [ $F(1,21) = 4.39$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2C] in peritoneal lavage. These results support an anti-inflammatory action for NAC in this animal model, which is possibly related to the antipyretic action of this drug.

### 3.2. NAC increases the content of nonprotein sulfhydryl groups in peritoneal lavage and hypothalamic tissue.

The effect of NAC (500 mg/kg, s.c.) and baker yeast (135 mg/kg, i.p.) injections on nonprotein SH content of the peritoneal lavage and hypothalamus are shown in Fig. 3A and 3B, respectively. Statistical analysis showed that NAC increased [ $F(1,35) = 46.85$ ;  $p < 0.001$ ] the levels of total non protein SH in the peritoneal lavage two hours after its injection (one hour after yeast injection – Figure 3A). Such an increase persisted up to 5 hours in those animals that were not injected with baker yeast. The figure also shows that baker yeast decreased [ $F(1,35) = 20.97$ ;  $p < 0.001$ ] GSH in peritoneal lavage one hour after its injection, and such a decrease was fully prevented by NAC.

NAC also increased the nonprotein SH content of the hypothalamus [ $F(1,40) = 15.99$ ;  $p < 0.001$ ] two hours after its injection (one hour after yeast injection – Figure 3B). Such an increase also persisted up to 5 hours in those animals that were not injected with baker yeast. Although baker yeast injection did not alter total nonprotein SH levels in the hypothalamus *per se*, it prevented the persistence of the NAC-induced SH increase. These data suggest that yeast injection may increase nonprotein SH utilization in the hypothalamus.

### 3.3. NAC prevents baker yeast-induced IL-1 $\beta$ increase in hypothalamus.

Baker yeast injection increased IL-1 $\beta$  levels in the hypothalamus 4 hours after its injection [ $F(1,15) = 11.71$ ;  $p < 0.01$ , Fig. 4A] and systemic administration of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before the yeast injection) prevented baker yeast-induced IL-1 $\beta$  increase

[F(1,15)= 4.77;  $p < 0.05$ , Fig 4A]. On the other hand, baker yeast injection did not alter TNF- $\alpha$  levels in the hypothalamus (Fig. 4B). These data support a role for IL-1 $\beta$  in baker yeast-induced fever.

### 3.4. Central administration of NAC prevents baker yeast-induced fever.

In order to determine the relative participation of central and peripheral mechanisms in the preventive effect of NAC against baker yeast-induced fever, we investigated whether the central (i.t.) administration of NAC altered baker yeast-induced fever. NAC (5, 15 and 50  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) did not alter basal rectal temperature (Fig 5), but prevented baker yeast-induced fever [F(1,18)= 12.02;  $p < 0.01$ , Fig 6A]. However, the central administration of NAC did not alter peritoneal leukocyte migration (Fig. 6B). Since anti-inflammatory effect of NAC (measured in this experiment by leukocyte migration) was dissociated from its antipyretic action, we may suggest that the preventive action of NAC against baker yeast-induced fever is mediated by central mechanisms.

### 3.5. NAC does not reverse established fever induced by baker yeast or PGE<sub>2</sub>-induced fever.

Figures 7 and 8 summarize the results of experiments 4 and 5, respectively. This figure reveals that NAC does not reverse established fever induced by baker yeast or PGE<sub>2</sub>-induced fever. Such a lack of effect of NAC suggests that the antipyretic action of this thiol compound involves the modulation of inflammatory signaling at steps before PGE<sub>2</sub> release.

## 4. Discussion

In this study we showed that systemic NAC impairs fever development, but does not revert established fever induced by the intraperitoneal injection of baker yeast. The systemic injection of NAC increased the nonprotein SH content in peritoneal lavage and hypothalamus, and prevented baker yeast-induced decrease of nonprotein SH content in peritoneal lavage samples. Baker yeast-induced fever coincided with an increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , total leukocytes and plasma protein extravasation in the peritoneal cavity, and with an increase of IL-1 $\beta$  levels in the hypothalamus, which were all significantly attenuated by



---

NAC. The central administration of NAC also inhibited baker yeast-induced fever, but did not alter the peripheral consequences of pyrogen injection, namely peritoneal leukocyte increase. In addition, NAC did not prevent PGE<sub>2</sub>-induced fever.

It is generally acknowledged that pathogen induced-fever is triggered by the production of pyrogenic cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) by activated mononuclear phagocytes. These mediators are released into bloodstream or stimulate local sensory nerves and transmit the inflammatory signal to the preoptic-anterior hypothalamic area, the brain thermoregulatory center [36]. In line with this view, a number of studies have shown that *Saccharomyces cerevisiae* [32, 37] and constituents of its cell wall, such as mannans, cause fever that is accompanied by a putative increase in the plasma levels of TNF- $\alpha$  [31, 38], IL-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$  [31]. In line with this view, Okawa et al., (2002) [39] have shown that mannans increase the production of IL-1 $\beta$  *in vitro*. It has been reported that acute systemic administration of *Cryptococcus neoformans* does not increase TNF- $\alpha$  levels in the murine brain [40]. However, to our knowledge, no study has addressed whether the systemic administration of *Saccharomyces cerevisiae* (or its derived mannans) increases IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  levels in the hypothalamus, the key cerebral structure for thermoregulation. This is of particular interest, since the increase of plasma cytokines induced by mannans seems to depend on the yeast species from which it was obtained [31]. Therefore, it is possible that infection with different yeast species cause also a different profile of cytokine increase in the brain. Interestingly, we have found that systemic *Saccharomyces cerevisiae* injection acutely increased the levels of IL-1 $\beta$ , but not of TNF- $\alpha$  in the hypothalamus (4 hours after yeast injection, which corresponded to the time window in which the maximal febrile response was observed). These data constitute circumstantial evidence that hypothalamic IL-1 $\beta$ , but not TNF- $\alpha$ , are involved in baker yeast-induced fever. Further experimental evidence supporting the involvement of IL-1 $\beta$  in baker yeast-induced fever comes from the experiment that revealed that NAC, at doses capable of reducing IL-1 $\beta$  hypothalamic levels, also blunted yeast-induced fever (Figure 4A), indicating that these phenomena (IL-1 $\beta$  increase and fever development) are related. However, one must be aware that our results do not allow concluding that there is a cause-effect relationship between IL-1 $\beta$  increase and fever, or that this cytokine is the main trigger of baker yeast-induced fever in the hypothalamus, since it may involve other cytokines or mediators that were not assessed in this study. However, since there is strong evidence supporting a role

---

for IL-1 $\beta$  in the fever induced by other pyrogens, such as LPS, it is very possible that this constitutes a convergent pathway for fever triggering, which includes baker yeast-induced fever.

In this study we also found that systemic *Saccharomyces cerevisiae* injection increased the local levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (in the peritoneal lavage). Assuming that increased peritoneal levels may increase cytokine plasma levels, our findings are, to some extent, in agreement with the data reported by Dogan and co-workers [31], who have reported a putative increase of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the plasma of animals injected with mannans from *S. cerevisiae*. It is also remarkable that NAC decreased baker yeast-induced increase of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  levels in the peritoneum lavage (Fig 2A and 2B). These effects of NAC, together with the currently reported decrease of leukocyte migration and protein extravasation to the peritoneal cavity, support an anti-inflammatory role for this thiol compound. Leukocyte migration and plasma protein extravasation represent major events leading to the onset of inflammation. Their occurrence in zymosan (an insoluble carbohydrate, obtained from the cell walls of *S. cerevisiae*)-induced peritonitis depend on the production/action pro-inflammatory mediators such cytokines and prostaglandins [41, 42], whose release is prevented by NAC in several models of inflammation [20-23]. In addition, it has been shown that NAC inhibitory effect on vascular permeability and leukocyte migration is mediated by a decrease of the expression of important adhesion molecules such intracellular adhesion molecule (ICAM), P-selectin and E-selectin [20, 22]. According to Morimoto et al (1986) [43], leukocyte migration is also important for the development of the febrile response. Therefore, it is possible that the anti-inflammatory action of systemically administered NAC may have significantly contributed for its antipyretic effect. The mechanisms by which NAC decreases inflammation are not completely understood, but accumulating evidence suggests that its decreases expression of pro-inflammatory molecules by inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK pathways [22, 44-48].

The activation NF- $\kappa$ B and MAPK pathways increase the cytokine production and expression of other inflammatory molecules such iNOS, COX<sub>2</sub>, adhesion molecules and chemokine [49-52]. Interestingly, in vivo GSH depletion also activates NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, in liver and kidney [53] and increases the LPS-induced release of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in different cells cultures [54, 55]. In line with this view, we showed that NAC increases total nonprotein SH content in the peritoneal lavage and hypothalamus (Fig 3A

---

and 3B), and by this redox regulatory mechanism it could reduce cytokine release and the associated inflammatory response, including fever.

One remarkable finding of this study is that the central administration of NAC reduced baker yeast-induced fever, with no impact on peritoneal leukocyte migration (Fig 6A and 6B). These findings suggest that the increase in central SH availability may be more relevant for the antipyretic effect of NAC than its peripheral anti-inflammatory action, and may include an effect of NAC on central PGE<sub>2</sub> synthesis. This is in agreement with the studies that have shown that TNF and IL-1 $\beta$  induce COX-2 expression in brain micro vessels [7-11] and that prostaglandins are considered the final mediators of baker yeast-induced fever [32, 38]. The findings that NAC does not alter baker yeast established fever and PGE<sub>2</sub>-induced fever (Figs 7A and 7B, respectively) further supports that NAC affects early steps of fever triggering, which may include IL-1 $\beta$ -induced expression of cyclooxygenase 2.

### **Conclusions**

In this study, we show that NAC prevents the baker yeast-induced peritoneal inflammation and fever. We suggest that anti-inflammatory and preventive effect of NAC on baker yeast-induced fever is probably due to a redox inhibition of inflammatory IL-1 $\beta$  production.

### **Acknowledgements**

The authors thank Paulino Aguiar and Florindo Duarte for competent technical support. Research supported by CNPq, CAPES and FAPERGS. C.F.M. and M.A.R. are the recipients of CNPq fellowships, grant numbers 301552/2007-0 and 301558/2007-8, respectively.

### **References**

- [1] Zeisberger E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 1999; 24: 286-326.

- 
- [2] Dalpke A, Heeg K. Signal integration following Toll-like receptors triggering. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 217-250.
- [3] Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 2-10.
- [4] Miyake M. Innate recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 2004; 12: 186-194.
- [5] Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikame T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H. *Saccharomyces cerevisiae* - and *Candida albicans* - derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14 - and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 503-512.
- [6] Yang QW, Mou L, Lv FL, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX, Wang JZ. Novel TLR4-antagonizing peptides inhibit LPS-induced release of inflammatory mediators by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 846-854.
- [7] Feldeberg W, Gupta KP, Milton AS, Wendlandt S. Effect of pyrogen and antipyretics on prostaglandin activity in cisternal CSF of unanaesthetized cats. *J. Physiol (Lond)* 1975; 249: 601-615.
- [8] Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res* 1996; 733: 263-272.
- [9] Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 56: 45-56.
- [10] Schiltz JC, Sawchenko PE. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* 2002; 22: 5606-5618.
- [11] Schiltz JC, Sawchenko PE. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front. Biosci* 2003; 8: 1321-1329.
- [12] Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 6-20.

- 
- [13] Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20: 9-22.
- [14] Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 355-359.
- [15] Grinberg L, Fibach E, Amer J, Atlas D, N-acetylcystein amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 136-145.
- [16] Santagelo F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2599-2610.
- [17] Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-597.
- [18] Benrahmoune M, Therond P, Abedinzadeh Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 775-782.
- [19] Çağlıkülekcı M, Pata C, Apa DD, Dirlik M, Tamer L, Yaylak F, Kanik A, Aydın S. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Pharmacol Res* 2004; 49: 227-238.
- [20] Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T, De Sarro A, Caputi AP. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *FASEB J* 2001; 15: 1187-1200.
- [21] Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M, Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 97-106.
- [22] Zhang XY, Hayasaka S, Hayasaka Y, Cui HS, Chi ZL. Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51: 14-20.
- [23] Ancha H.R., Kurella R.R., McKimmey, C.C., Lightfoot S., Harty R.F.(2008) Effects of N-Acetylcysteine Plus Mesalamine on Prostaglandin Synthesis and Nitric Oxide Generation in TNBS-Induced Colitis in Rats. *Dig Dis Sci*. DOI 10.1007/s10620-008-0438-0.

- 
- [24] Bergamini S, Rota C, Canali R, Staffieri M, Daneri F, Bini A, Giovannini F, Tomasi A, Lannone A. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2001; 5: 349-360.
- [25] Lee JJ, Huang WT, Shao DZ, Liao JF, Lin MT. Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy. *Jpn J Physiol* 2003; 53: 367-375.
- [26] Shao DZ, Lee JJ, Huang WT, Liao JF, Lin MT. Inhibition of nuclear factor-kappa B prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever. *Mol Cell Biochem* 2004; 262:177-185.
- [27] Huang WT, Lin MT, Chang CP. An NMDA receptor-dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever. *Neuropharmacology* 2006; 50: 504-511.
- [28] Doğan MD, Ataoglu H, Akarsu ES. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sci* 2000; 67: 2319-2329.
- [29] Fraifeld V, Kaplanski J. Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences. *Prog Brain Res* 1998; 115: 141-157.
- [30] Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R759-R766.
- [31] Doğan MD, Ataoğlu H, Ataoğlu O, Akarsu ES. Polysaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. *Brain Res Bull* 1999; 48: 509-512.
- [32] Tomazetti J, Avila DS, Ferreira APO, Martins JS, Souza FR, Royer C, Antonello MR, Olivera MR, Bonacorso HG, Martins MAP, Zanatta N, Mello CF. Baker yeast-induced fever in young rats : Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Meth* 2005; 147: 29-35.
- [33] Getting SJ, Flower RJ, Parente L, de Medicis R, Lussier A, Wolitzky BA, Martins MA, Perretti M. Molecular determinants of monosodium urate crystal-induced murine peritonitis: a role for endogenous mast cells and a distinct requirement for endothelial-derived selectins. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 123-130.
- [34] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248-254.

- 
- [35] Sedlak J, Lindsay R H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagents. *Anal Biochem* 1968; 25: 193-205.
- [36] Blatteis CM. Endotoxic fever: New concepts of this regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111: 194-223.
- [37] Bruguerolle B, Roucoules X. Time-dependent changes in body temperature rhythm induced in rats by brewer's yeast injection. *Chronobiol Int* 1994; 11: 180-186.
- [38] Ataoğlu H, Doğan MD, Mustafa F, Akarsu ES. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines. *Life Sci* 2000; 67: 2247-2256.
- [39] Okawa Y, Abe K, Watanabe T, Sasaki H, Suzuki M. Production of interleukin-1 activity of Kupffer cells from mice treated with the acidic mannan fraction of baker's yeast. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:1506-1508.
- [40] Rayhane N, Lortholary O, Fitting C, Callebert J, Huerre M, Dromer F, Cavaillon JM. Enhanced sensitivity of tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha-deficient mice to *Cryptococcus neoformans* infection despite increased levels of nitrite/nitrate, interferon-gamma, and interleukin-12. *J Infect Dis* 1999; 180: 1637-1647.
- [41] Kolaczowska E, Shahzidi S, Seljelid R, van Rooijen N, Plytycz B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 2002; 26: 61-71.
- [42] Kolaczowska E, Scislowska-Czarnecka A, Chadzinska M, Plytycz B, van Rooijen N, Opdenakker G, Arnold B. Enhanced early vascular permeability in gelatinase B (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of COX-1-derived PGE2 of macrophage origin. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 125-132.
- [43] Morimoto A, Murakami N, Watanabe T. Dehydration enhances endotoxin fever by increased production of endogenous pyrogen. *American Journal of Physiology* 1986; 251: 41-47.
- [44] Haddad JJ, Land SC. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 520-536.
- [45] Hsu HY, Wen MH. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 22131-22139.

- 
- [46] Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol* 2004; 172: 2522-2529.
- [47] Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, Ernst PB. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004; 72: 2123-2130.
- [48] Sadowska AM, Manuel-y-Keenoy B, Vertongen T, Schippers G, Radomska-Lesniewska D, Heytens E, De Backer WA. Effect of N-acetylcysteine on neutrophil activation markers in healthy volunteers: in vivo and in vitro study. *Pharmacol Res* 2006; 53: 216-225.
- [49] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NFk-B puzzle. *Cell* 2002; 109: S81–S96.
- [50] Fischer J, Suire C, Hale-Donze H. Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF-kappaB and subsequent inflammatory responses. *Infect Immun* 2008; 76: 4737-4744, 2008.
- [51] Chen F, Sun SC, Kuh DC, Gaydos LJ, Demers LM. Essential role of NF-kappa B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages. *Biochem Biophys. Res Commun* 1995; 214: 985-992.
- [52] Nadjar A, Tridon V, May MJ, Ghosh S, Dantzer R, Amedee T, Parnet P. NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1047–1059.
- [53] Limón-Pacheco JH, Hernández NA, Fanjul-Moles ML, Gonsebatt ME. Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice, *Free Radic Biol Med* 2007; 43:1335-1347.
- [54] Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Fourneau C. Thiol regulation of the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999; 14:98-105.
- [55] Haddad JJ. Glutathione depletion is associated with augmenting proinflammatory signal: evidence for antioxidant/prooxidant mechanism regulating cytokine in alveolar epithelium. *Cytokines Cell. Moll. Ther* 2000; 6:177-182.



Figures :

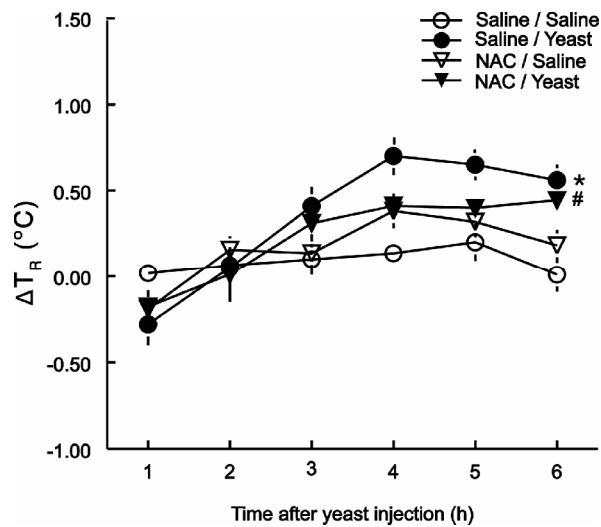


Figure 1. Effect of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before yeast injection) on baker yeast-induced fever (135 mg/kg, i.p.), the last three measurements were omitted for easy viewing. Rectal temperature ( $T_R$ ) changes are expressed as difference from basal rectal temperature. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 9-11$  per group. \* $P < 0.05$  compared with respective saline/saline-treated group. # $P < 0.05$  compared with saline/yeast-treated group (F- test for simple effect).

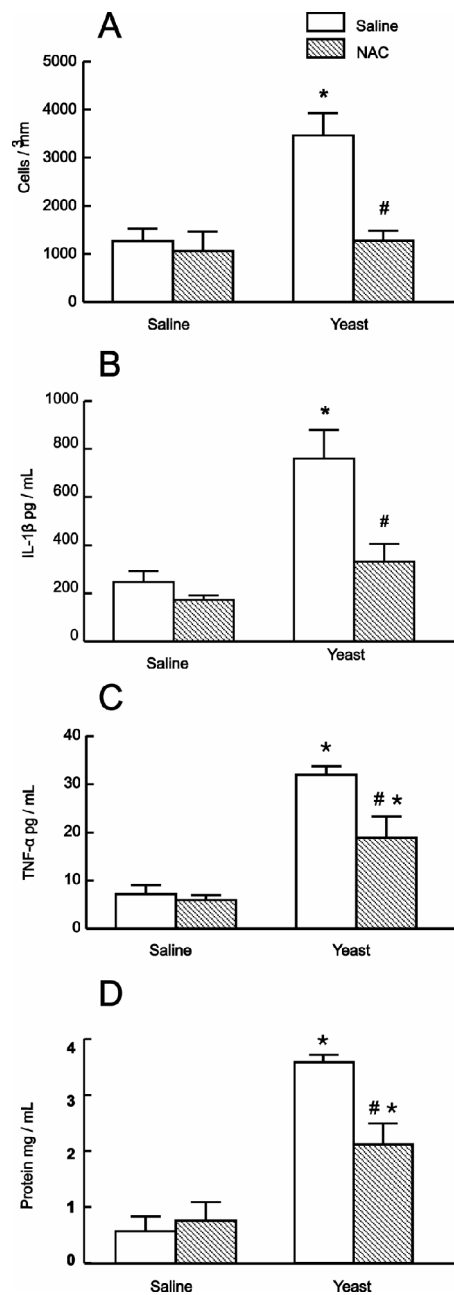


Figure 2. Effect of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before yeast injection) on baker yeast-induced (A) leukocyte migration, (B) IL-1 $\beta$  release, (C) TNF- $\alpha$  release and (D) plasma protein extravasation in peritoneal lavage. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 4-7$  per group. \* $P < 0.05$  compared with saline/saline-treated group. #  $P < 0.05$  compared with saline/yeast-treated group (Duncan's multiple range test).

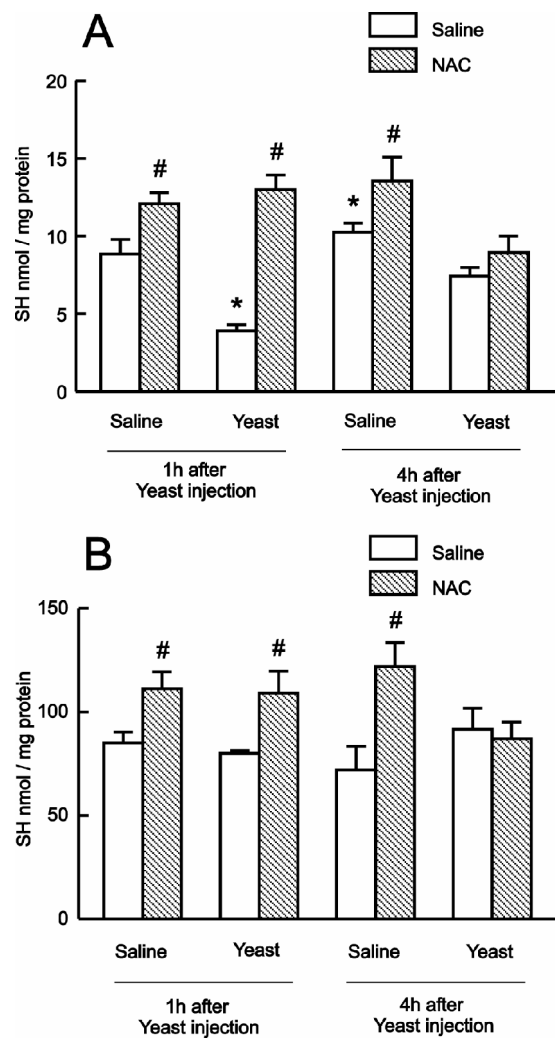


Figure 3. Effect of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before yeast injection) on (A) nonprotein SH content in peritoneal lavage and (B) hypothalamus. Values represent mean  $\pm$  S.E.M for  $n= 5-6$  per group. \*  $P < 0.05$  compared with saline/saline-treated group. #  $P < 0.05$  compared with their respective control groups (Duncan's multiple range test).

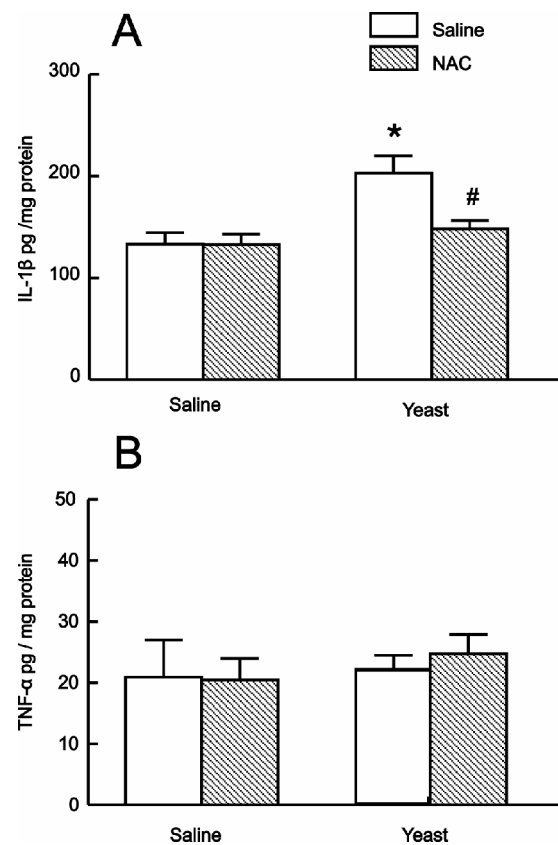


Figure 4. Effect of NAC (500 mg/kg, s.c., 1 hour before yeast injection) on baker yeast-induced (A) IL-1 $\beta$  and (B) TNF- $\alpha$  levels in hypothalamus. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for n = 4-5 per group. \* P < 0.05 compared with saline/saline-treated group. # P < 0.05 compared with saline/yeast-treated group (Duncan's multiple range test).

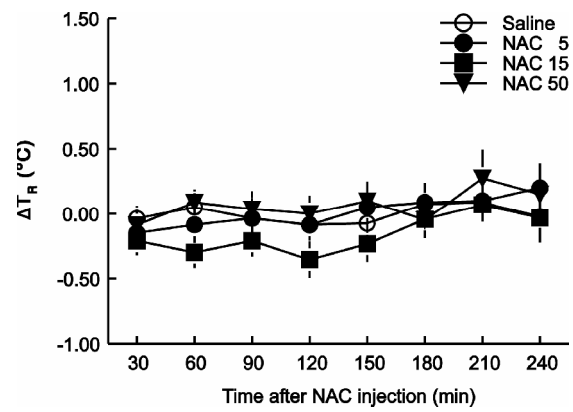


Figure 5. NAC (5, 15 or 50  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ , i.t.) does not alter rectal temperature along time.  $T_R$  changes are expressed as difference from basal rectal temperature. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=6$  per group.

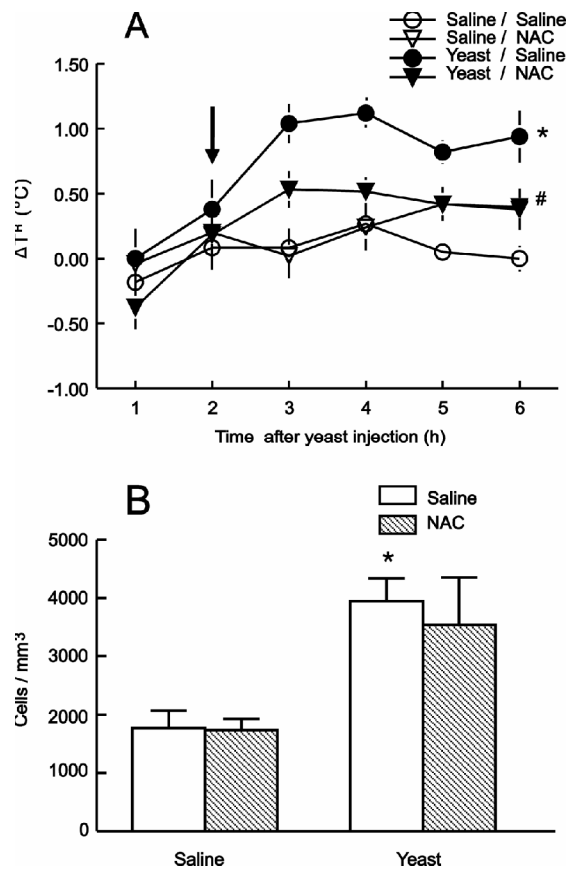


Figure 6. NAC (50  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}/\text{site}$ ; i.t.; 2 hours after yeast injection) decreases baker yeast-induced (135 mg/kg; i.p) fever (A) but not leukocyte migration to peritoneal cavity (B).  $T_R$  changes are expressed as difference from basal rectal temperature and the last three measurements were omitted for easy viewing. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n= 5-6$  per group. \* $P < 0.05$  compared with saline/saline-treated group. #  $P < 0.05$  compared with saline/yeast-treated group (F- test for simple effect or Duncan's multiple comparisons test).

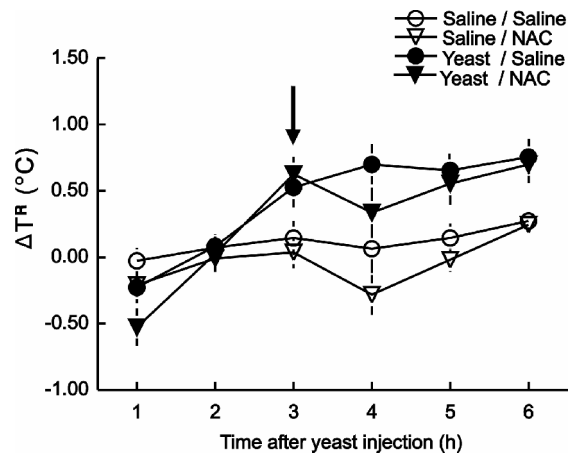


Figure 7. Lack of effect of NAC (500 mg/kg, s.c.) on established fever induced by baker yeast (135 mg/kg, i.p.).  $T_R$  changes are expressed as difference from basal rectal temperature and the last three measurements were omitted for easy viewing. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=11$  per group.

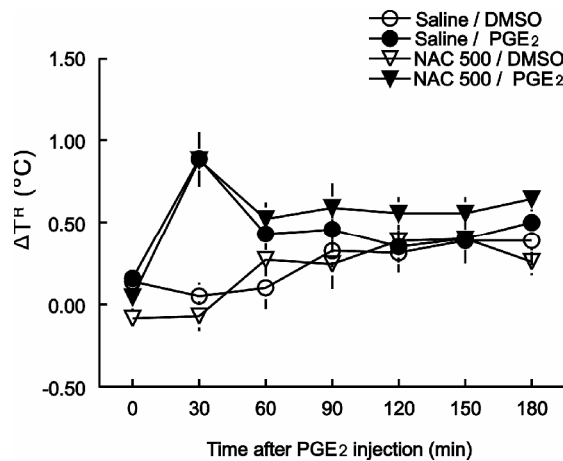


Figure 8. Lack of effect of NAC (500 mg/kg, s.c.) on PGE<sub>2</sub>-induced fever (300 ng/site, i.t.).  $T_R$  changes are expressed as difference from basal rectal temperature. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=7-9$  per group.

# **PARTE III**



---

## **1. DISCUSSÃO**

---

O presente estudo mostra que a administração subcutânea de NAC (500 mg/kg), 1 hora antes da injeção do fermento de padeiro (*S.cerevisae*), consegue atenuar a resposta febril e, ao mesmo tempo, aumentar o conteúdo de grupos sulfidrilas não protéicos presentes no lavado peritoneal e no tecido hipotalâmico. Neste mesmo experimento, ainda foi possível perceber que a NAC reverte a oxidação dos grupos SH causada pelo fermento no lavado peritoneal. Entretanto, o mesmo composto falhou em reverter a febre induzida por fermento e, em alterar a temperatura basal dos animais (dados não mostrados). Este trabalho ainda apresenta dados que demonstram que a febre induzida pela levedura coincide com o aumento da migração leucocitária, do extravasamento plasmático e dos níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  presentes no lavado peritoneal, bem como com o aumento de IL-1 $\beta$  no hipotálamo. A NAC por sua vez, demonstra um efeito inibitório sobre todas essas respostas pró-inflamatórias. Fica também evidente que a administração central (intratecal) da NAC é capaz de prevenir a resposta febril, conseqüente da peritonite fúngica sem, no entanto, alterar a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Além disso, a febre induzida pela administração intratecal de PGE<sub>2</sub> não foi alterada pela administração sistêmica de NAC.

Como já descrito neste trabalho, a teoria que explica a gênese da febre induzida por patógenos mostra que este processo se inicia pela produção e liberação de citocinas pirogênicas por macrófagos e neutrófilos ativados. Em seguida, esses mediadores seriam liberados na corrente sangüínea (transmissão humoral) ou estimulariam sensores nervosos (transmissão neural), transportando o sinal inflamatório até a POA, sinalizando para um aumento da temperatura (Blatteis, 2006). Reafirmando a importância das citocinas na sinalização presente em infecções fúngicas, vários trabalhos têm mostrado que leveduras (Bruguerolle & Roucoules, 1994; Tomazetti et al., 2005) ou mananas (constituíntes das paredes celulares de fungos) de *S. cerevisae* causam febre (Ataoglu et al 2000) acompanhada de aumento nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  (Ataoglu et al 2000; Dogan et al., 1999). Por outro lado, Rayhane e colaboradores (1999) evidenciaram que a administração sistêmica aguda de *Cryptococcus neoformans* não aumenta os níveis de TNF- $\alpha$  no

cérebro. Sabendo que o aumento dos níveis plasmáticos de citocinas parece depender da espécie de origem da manana e (Dogan et al., 1999) da espécie do animal experimental (Fraifeld & Kaplanski, 1998), seria possível que diferentes espécies de fungos produzissem diferentes perfis de secreção de citocinas no tecido cerebral. Interessantemente, os achados deste trabalho mostraram que a administração intraperitoneal de *S. cerevisiae* aumenta agudamente os níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$ , sem, no entanto, alterar os níveis basais de TNF- $\alpha$  na mesma estrutura, quatro horas após administração do fermento (momento em que a resposta febril atinge seu ponto máximo). Estes resultados constituem uma forte evidência para um papel sinalizador da IL- $\beta$  no sistema nervoso central durante a febre induzida por fermento de padeiro.

Este trabalho também demonstrou que a NAC, além de prevenir a febre, reduz o aumento dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$  (Figura 4 do manuscrito), demonstrando que, de alguma maneira, estes dois processos podem estar relacionados, fornecendo uma evidência adicional para o envolvimento da secreção central de IL- $\beta$  no desenvolvimento da resposta febril induzida por *S. cerevisiae*. Embora as conclusões acima sejam bastante pertinentes, ainda não é possível concluir se existe alguma relação de causa e consequência entre os dois eventos (aumento dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$  e febre) e nem se a IL-1 $\beta$  é a principal citocina envolvida na sinalização da febre causada por fermento. Esta lacuna surge do fato que a febre causada por outros pirógenos também envolve a secreção de IL-6, cuja participação não foi avaliada neste trabalho. Por outro lado, como descrito na introdução desta dissertação, existem inúmeras evidências que suportam a participação da IL- $\beta$  na febre induzida por outros patógenos como LPS. Assim, seria bastante provável que a IL-1 $\beta$  produzida centralmente tivesse uma participação no desenvolvimento da resposta febril induzida por *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, o presente estudo mostrou que a administração intraperitoneal de fermento (*S. cerevisiae*) eleva os níveis locais de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ . Assumindo que o aumento nos níveis locais destas citocinas pode elevar os níveis plasmáticos destes mesmos mediadores, os resultados

aqui reportados estariam, em parte, de acordo com os achados de Dogan e colaboradores que demonstraram que mananas de *S. cerevisiae* elevam os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$ . Além disso, este estudo demonstrou que a NAC apresenta uma atividade antiinflamatória sobre a peritonite induzida por fungos. Como previamente citado, esta droga reduz drasticamente a migração leucocitária, o extravasamento plasmático e a elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação. Tanto a migração leucocitária, como o extravasamento plasmático representam os maiores eventos desencadeadores da inflamação. Sabe-se que a ocorrência de ambos os processos em peritonites induzidas por zimosan dependem da produção e da ação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e prostaglandinas, (Kolaczowska et al., 2002, 2006) cuja liberação é prevenida pela NAC em vários modelos de inflamação (Cuzzocrea, et al., 2001; Victor, Rocha, Fuente, 2003; Zhang, et al, 2007, Ancha, et al., 2008). Esta ação da NAC, que também foi corroborada neste trabalho, pode sugerir um mecanismo de ação para o efeito antiinflamatório apresentado por este antioxidante tiólico. Outros estudos também ligam o efeito inibitório da NAC sobre a migração de leucócitos à diminuição da expressão de importantes moléculas de adesão como ICAM, P-selectina e E-selectina (Cuzzocrea, et al., 2001; Zhang, et al, 2007). Além disso, em 1986, Morimoto, Murakami e Watanabe também demonstraram que a migração leucocitária exerce um importante papel na indução da febre e, portanto, a ação preventiva da NAC sobre a resposta febril poderia dever-se a sua ação antiinflamatória.

A administração sistêmica da NAC também foi capaz de aumentar o conteúdo de grupos sulfidrilas não protéicos no lavado peritoneal e no tecido hipotalâmico. Sabendo que a maior parte dos grupos SH presentes em amostras biológicas deriva da GSH (Sedlák & L' Hanus, 1982; Bentler & Dale, 1988), pode-se inferir que a NAC é capaz de elevar os níveis locais e centrais deste tripeptídeo endógeno. Logo, os resultados aqui demonstrados estão de acordo com a literatura que apresenta a NAC como uma droga precursora de GSH e, conseqüentemente, elevadora da razão GSH/GSSG (Haddad & Land 2002; Haddad & Harb, 2005). Ademais, é de se ressaltar que a

injeção de intraperitoneal de fermento de padeiro provoca uma redução nos grupos SH livres presentes no local da inflamação (Figura 3 do manuscrito) e que a NAC reverte completamente essa resposta oxidativa. Uma análise mais profunda da figura 3 também revela que, em ambas as amostras biológicas (lavado peritoneal e tecido hipotalâmico), o aumento nos grupos SH característico da NAC desaparece quatro horas após a injeção do pirógeno nos animais tratados com fermento. Este resultado sugere que a peritonite fúngica aumenta a utilização do SH não protéico tanto no local da inflamação quanto no sítio termorregulador. De fato, Victor e colaboradores (2003), bem como Cuzzocrea e colaboradores (2001) já haviam reportado que estímulos inflamatórios são capazes de reduzir a quantidade de GSH presente em tecidos inflamados ou em células inflamatórias. Além disso, sabe-se que as rotas moleculares desencadeadoras da expressão de mediadores inflamatórios (MAPK e a ativação do NF- $\kappa$ B) podem ser ativadas por peróxido de hidrogênio (Bowie et al., 1997), bem como pela depleção sistêmica de GSH (Limón-Pacheco, et al., 2007). Somado a isso, a literatura ainda revela que antioxidantes como alfa-tocoferol, NAC e dimetiluréia são capazes de inibir estas rotas moleculares e a secreção de citocinas pró-inflamatórias em diferentes culturas de células (Haddad & Land, 2002, Asehnoune, et al 2004). Assim, é bastante provável que a ação preventiva da NAC sobre os parâmetros inflamatórios avaliados neste trabalho devam-se a suas propriedades antioxidantes e precursoras da síntese de GSH.

Outro importante resultado apresentado neste estudo é o efeito preventivo da NAC sobre a febre induzida pelo *S. cerevisiae* quando administrada intratecalmente (em uma dose 1000 vezes inferior a dose sistêmica). Conforme demonstra a figura 6 do manuscrito, o efeito antipirético da NAC ocorre de forma independente da diminuição da resposta migratória. Além disso, a análise das figuras 1 e 6 do manuscrito revela ainda que o efeito preventivo central se sobressai ao efeito sistêmico da mesma droga. Assim, avaliando conjuntamente os efeitos centrais causados pela injeção sistêmica de NAC (aumento do conteúdo de SH livres 1h depois da injeção de fermento e prevenção da elevação dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$ ) e as conclusões tiradas dos resultados

---

acima relatados, pode-se inferir que a disponibilidade central de grupos SH nas fases iniciais da sinalização hipotalâmica da febre pode ser mais relevante para o efeito antipirético que o efeito antiinflamatório local desempenhado por esta pequena molécula. Este provável mecanismo descrito para atividade antipirética da NAC está de acordo com resultados apresentados por Huang e colaboradores (2006) que demonstraram que a administração sistêmica de NAC é capaz de alterar a resposta pirogênica de coelhos estimulados com LPS, ao mesmo tempo que impede secreção de PGE<sub>2</sub> no cérebro. Sabendo da importância das citocinas pirogênicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) para a indução da COX-2 na microvasculatura cerebral (Cao et al., 1996; Cao et al., 1998; Matsumura et al., 1998; Yamagata et al., 2001; Schiltz & Sawchenko, 2002) e da necessidade de PGE<sub>2</sub> para o aumento de temperatura induzida por fermento (Tomazetti et al., 2005; Ataoglu et al., 2000), pode-se inferir que a ação preventiva da NAC sobre a resposta febril poderia resultar do efeito antioxidante/antiinflamatório que levaria à prevenção do aumento dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$ . Além disso, os achados que demonstram a falta de efeito da NAC, na febre já estabelecida e na febre induzida por PGE<sub>2</sub>, suportam que a NAC atue sobre os passos iniciais do desenvolvimento do processo febril, os quais podem incluir a expressão da COX-2 induzida por IL-1 $\beta$ .

---

## **2. CONCLUSÃO**

1) A NAC não apresenta efeitos sobre o controle normal da temperatura corporal quando administrada central ou sistemicamente em ratos jovens.

2) A NAC apresenta ação preventiva sobre a febre e sobre vários processos inflamatórios locais desencadeados pela infecção peritoneal induzida por *S. cerevisiae*. Entretanto, ela não apresenta efeitos sobre a febre já instalada.

3) O fermento de padeiro eleva os níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$  sem alterar os níveis de TNF- $\alpha$  na mesma estrutura. A NAC, por sua vez, previne esse aumento, indicando uma ação antiinflamatória central para esta molécula antioxidante.

4) A injeção sistêmica de NAC eleva o conteúdo total de grupos sulfidrilas livres presentes no hipotálamo e no lavado peritoneal e apresenta atividade doadora de GSH e/ou antioxidante, pois é capaz de reverter a diminuição no conteúdo de grupos SH livres causada pela inflamação induzida por *S. cerevisiae*.

5) A NAC apresenta efeitos centrais que podem ser mais importantes para seu efeito antipirético que sua atividade antiinflamatória local. Isso porque sua ação antipirética central (quando administrada i.t.) é mais efetiva que a resposta causada pela administração sistêmica e, também porque efeito antipirético central é totalmente dissociado da resposta migratória.

6) A NAC parece atuar em passos anteriores à liberação de PGE<sub>2</sub> no parênquima cerebral, pois não é capaz de alterar a resposta pirogênica causada por este mesmo mediador.

Levando em conta as conclusões acima citadas, pode-se, de uma maneira geral, concluir que a n-acetilcisteína dispõe de uma atividade antiinflamatória efetiva sobre peritonites fúngicas e que a sua atividade antipirética deve-se a uma ação central que, provavelmente, resida na diminuição dos níveis hipotalâmicos de IL-1 $\beta$ .



---

### **3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANCHA, H.R., KURELLA, R.R., MCKIMMEY, C.C., LIGHTFOOT, S., HARTY, R.F., Effects of N-Acetylcysteine Plus Mesalamine on Prostaglandin Synthesis and Nitric Oxide Generation in TNBS-Induced Colitis in Rats., **Dig Dis Sci**, *In Press*, 2008.
- ARONOFF, D.M., NEILSON, E.G., Antipyretics: Mechanisms of Action and Clinical Use in Fever Suppression., **Am J Med**.,111:304-315, 2001.
- ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J., The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid., **Free Radic Biol Med**., 6:593-597, 1989.
- ASEHNOUNE, K., STRASSHEIM, D., MITRA, S., KIM, J.Y., ABRAHAM, E., Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B., **J Immunol**.,172:2522-2529, 2004.
- ATAOĞLU H, DOĞAN M.D., MUSTAFA F., AKARSU E.S., Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines., **Life Sci**., :2247-2256, 2000.
- ATKURI, K.R., MANTOVANI, J.J., HERZENBERG, L.A., HERZENBERG, L.A., N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency., **Curr Opin Pharmacol**., 7:355-359, 2007.
- BANKS, W.A., KASTIN, A.J., Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems., **Life Sci**., 48:PL117-PL121,1991.
- BANKS, W.A., KASTIN, A.J., GUTIERREZ, E.G., Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier., **Neuroscience Letters**., 179:53-56, 1994.
- BANKS, W.A., PLOTKIN, S.R., KASTIN, A.J., Permeability of the blood–brain barrier to soluble cytokine receptors., **Neuroimmunomodulation**., 2:161–165, 1995.
- BARREIRO, O., YANEZ-MO, M., SERRADOR, J.M., MONTOYA, M.C., VICENTE-MANZANARES, M., TEJEDOR, R., FURTHMAYR, H., SANCHEZ-MADRID, F., Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes., **J Cell Biol**., 157:1233-1245, 2002.
- BEDARD, K., KRAUSE, K.H., The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology., **Physiol Rev**., 87:245–313, 2007.
- BEESON, P.B., Temperature elevating effect of substance obtained from polyorphonuclear leukocytes., **J Clin Invest**., 27: 524, 1948.
- BENRAHMOUNE, M., THÉRON, P., ABEDINZADEH, Z., The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine., **Free Radic Biol Med**., 29:775-782, 2000.
- BENTLER, E., DALE, G., L., Erythrocyte glutathione: Function and metabolism. In: DOLPHIN, D.; AVRAMOVIĆ, O., POULSON, R., (Eds). **Coenzymes and cofactors, vol. 3: Glutathione**. New York: Wiley & Sons, 1988. p. 291-317.
- BERGAMINI, S., ROTA, C., CANALI, R., STAFFIERI, M., DANERI, F., BINI, A., GIOVANNINI, F., TOMASI, A., IANNONE, A., N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase., **Nitric Oxide**., 5:349-360, 2001.
- BERGSTRÖM, S., FARNEBO, L.O., FUXE, K., Effect of prostaglandin E2 on central and peripheral catecholamine neurons., **Eur J Pharmacol**., 21:362-368, 1973.

- BERLIN, C., BARGATZE, R.F., CAMPBELL, J.J., VON ANDRIAN, U.H., SZABO, M.C., HASSLEN, S.R., NELSON, R.D., BERG, E.L., ERLANDSEN, S.L., BUTCHER, E.C., alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow., **Cell**, 80:413-422, 1995.
- BESEDOVKY, H., SORKIN, E., FELIX, D., HASS, H., Hypothalamic changes during immune response., **Eur J Immunol.**, 7:323-325, 1997.
- BEUTLER, B., BEUTLER, S. M., The pathogenesis of fever. In: WYNGAARDEN J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. (Eds). **Cecil Textbook of Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992. p. 1568-1573.
- BEUTLER, B., BEUTLER, S. M., A patogênese da febre. In: GOLDMAN, L., AUSIELLO, D., (Eds.), **Cecil, Tratado de Medicina Interna**, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 2019-2022, 2001.
- BLATTEIS, C. M., Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial?, **J Therm Biol.**, 28:1-13, 2003.
- BLATTEIS, C. M., Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens., **Prog Brain Res.**, 91:409-412, 1992.
- BLATTEIS, C. M., SEHIC, E., Prostaglandin E2: a putative fever mediator. In: Mackowiak P. A., (Ed), **Fever: Basic Mechanisms and Management**, Lippincott- Raven, New York, pp. 117-145, 1997.
- BLATTEIS, C.M., Endotoxic fever: New concepts of this regulation suggest new approaches to its management., **Pharmacology & Therapeutics.**, 111:194-223, 2006.
- BLATTEIS, C.M., FELEDER, C., PERLIK, V., LI, S., Possible sequence of pyrogenic afferent processing in the POA., **J Therm Biol.**, 20:391-400, 2004a.
- BLATTEIS, C.M., LI, S., LI, Z., FELEDER, C., PERLIK, V., Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment., **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, 76:1-18, 2005.
- BLATTEIS, C.M., LI, S., LI, Z., PERLIK, V., FELEDER, C., Signaling the brain in systemic inflammation: the role of complement., **Front Biosci.**, 9:915-931, 2004b.
- BLATTEIS, C.M., QUAN, N., XIN, L., UNGAR, A.L., Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs., **Brain Res Bull.**, 25:895-901, 1990.
- BLATTEIS, C.M., The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy., **J Therm Biol.**, 29:359-368, 2004.
- BOULANT, J.A., Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever., **Clin Infect Dis.**, 31:S157-S161, 2000.
- BOWIE, A.G., MOYNAGH, P.N., O'NEILL, L.A., Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H2O2 in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells., **J Biol Chem.**, 272:25941-52590, 1997.
- BRANCO, L.G.S., STEINER, A.A., BÍCEGO K.C., Regulação Neuroendócrina da Temperatura Corporal. In: RODRIGUES, J. A., MOREIRA, A.C., ELIAS L. L. K., CASTRO, M., (Eds.) **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, pp. 64-80, 2004.
- BRUGUEROLLE, B., ROUCOULES, X., Time-dependent changes in body temperature rhythm induced in rats by brewer's yeast injection., **Chronobiol Int.**, 11:180-186, 1994.

- CANINI, F., BRÉJOT, T., D'ALÉO, P., MERCIER, S., BOURDON, L., NMDA receptors are involved in dithiothreitol-induced hypothermia., **Eur J Pharmacol.**, 426:179-183, 2001.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., WATANABE, Y., Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor., **Brain Res Mol Brain Res.**, 56:45-56, 1998.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., WATANABE, Y., Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever., **Brain Res.**, 733:263-272, 1996.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., WATANABE, Y., Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response., **Brain Res.**, 697:187-96, 1995.
- CARMAN, C.V., SPRINGER, T.A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?, **Curr Opin Cell Biol.**, 15:547-556, 2003.
- CARMAN, C.V., SPRINGER, T.A., A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them., **J Cell Biol.**, 167:377-388, 2004.
- CHANDRASEKHARAN N.V., DAI, H., ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression., **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 99:13926-13931, 2002.
- CHEN, F., SUN, S.C., KUH, D.C., GAYDOS, L.J., DEMERS, L.M., Essential role of NF-kappa B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages., **Biochem Biophys Res Commun.**, 214:985-992, 1995.
- CONTI, B., Tabarean, I., Andrei, C., Bartfai, T., Cytokines and fever. **Front Biosci.**, 9:1433-1449, 2004.
- CUZZOCREA, S., MAZZON, E., DUGO, L., SERRAINO, I., CICCOLO, A., CENTORRINO, T., DE SARRO, A., CAPUTI, A.P., Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat., **FASEB J.**, 15:1187-1200, 2001.
- DALE D.C., BOXER, D.C., L., LILES, W.C., The phagocytes: neutrophils and monocytes., **Blood.**, 112:935-945, 2008.
- DAVIDSON, J., ABUL, H. T., MILTON, A. S., ROTONDO, D., Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain., **Pflugers Arch.**, 442:526-533, 2001.
- DAHLGREN C, KARLSSON A., Respiratory burst in human neutrophils., **J Immunol Methods.**, 232:3-14, 1999.
- DE CARO, L., GHIZZI, A., COSTA, R., LONGO, A., VENTRESCA, G.P., LODOLA, E., Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers., **Arzneimittelforschung.**, 39:382-326, 1989.
- DEMIRALAY, R., GÜRSAN, N., ERDEM, H., Regulation of sepsis-induced apoptosis of pulmonary cells by posttreatment of erdosteine and N-acetylcycteine., **Toxicology.**, 228:151-161, 2006.
- DINARELLO, C.A., Biology of Interleukin-1., **J Infect Dis.**, 2:108-115, 1988.

- DINARELLO, C.A., Cytokines as endogenous pyrogens., **J Infect Dis.**, 179:S294–304,1999.
- DINARELLO, C.A., Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed., **J Endotoxin Res.**, 10:201-22, 2004.
- DOĞAN, M.D., ATAÖĞLU, H., ATAÖĞLU, O., AKARSU, E.S., Polysaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats., **Brain Res Bull.**, 48:509-512 ,1999.
- DOGAN, M.D., ATAOGU, H., AKARSU, E,S., Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats., **Brain Res Bull.**, 57:179-185, 2002.
- DOYLE, S., VAIDYA, S., O'CONNELL, R., DADGOSTAR, H., DEMPSEY, P., WU, T., RAO, G., SUN, R., HABERLAND, M., MODLIN, R., CHENG, G., IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program., **Immunity.**, 17:251-263, 2002.
- DOYLE, S.L., O'NEILL, L.A., Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity., **Biochem Pharmacol.**, 72:1102-1113, 2006.
- DUNN, A.J., WANG, J., Cytokine effects on CNS biogenic amines., **Neuroimmunomodulation.**, 2:319-328, 1995.
- EK, M., KUROSAWA, M., LUNDEBERG, T., ERICSSON, A., Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins., **J Neurosci.**, 18:9471-9479, 1998.
- ELMQUIST, J.K., SCAMMELL, T.E., JACOBSON, C.D., SAPER, C.B., Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration., **J Comp Neurol.**, 371:85-103, 1996.
- ENGBLOM, D., EK, M.M., SAHA, S., ERICSSON-DAHLSTRAND, A., JAKOBSSON, P.J., LOMQVIST, A., Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood–brain-barrier., **J Mol Med.**, 80:5–15, 2002.
- ENGBLOM, D., SASHA, S., ENGSTRÖN, L., WESTMAN, M., AUDOLY, L.P., JAKOBSSON, P.J.,BLOMQVIST,A., Microsomal prostaglandin E synthase -1 is the central switch during immune-induced pyresis., **Nature neuroscience.**, 6:137-1138, 2003.
- FELEDER, C., PERLIK, V., BLATTEIS, C.M., Preoptic  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-noradrenergic agonists induce, respectively, PGE2-independent and PGE2-dependent hyperthermic responses in guinea pigs., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 286: R1156–R1166, 2004.
- FELEDER, C., PERLIK, V., BLATTEIS, C.M., Preoptic norepinephrine mediates the febrile response of guinea pigs to lipopolysaccharide., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 293: R1135–R1143, 2007.
- FISCHER, J., SUIRE, C., HALE-DONZE, H., Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF-kappaB and subsequent inflammatory responses., **Infect Immun.**, 76:4737-4744, 2008.
- FLESHNER, M., GOEHLER, L.E., HERMANN, J., RELTON, J.K., MAIER, S.F., WATKINS, L.R., Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated., **Brain Res Bull.**, 37:605-610, 1995.

- FORREST, M.J., JOSE, P.J., WILLIAMS, T.J., Kinetics of the generation and action of chemical mediators in zymosan-induced inflammation of the rabbit peritoneal cavity., **Br J Pharmacol.**, 89:719-730, 1986.
- FRAIFELD, V., KAPLANSKI, J., Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences., **Prog Brain Res.**115:141-157, 1998.
- FREEDMAN, H.H., SULTZER, B.M., Modification of lethality of endotoxin in mice by zymosan., **Proc Soc Exp Biol Med.**, 106:495-498, 1961.
- GAYKEMA, R.P., GOEHLER, L.E., TILDERS, F.J., BOL, J.G., MCGORRY, M., FLESHNER, M., MAIER, S.F., WATKINS, L.R., Bacterial endotoxin induces fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve., **Neuroimmunomodulation.**, 5:234-40, 1998.
- GELFAND, J. A., DINARELLO, C. A., WOLFF, S. M., Fever, including fever of unknown origin. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. (Eds.), **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 13. ed. New York: McGraw-Hill, 81-87, 1997.
- GHOSH, S., KARIN, M., Missing pieces in the NF $\kappa$ -B puzzle., **Cell.**, 109:S81-S96, 2002.
- GIVALOIS, L., DORNAND, J., MEKAOUICHE, M., SOLIER, M.D., BRISTOW, A.F., IXART, G., SIAUD, P., ASSENMACHER, I., BARBANEL, G., Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats., **Am J Physiol.**, 267:R164-70, 1994.
- GOEHLER, L.E., GAYKEMA, R.P., HAMMACK, S.E., MAIER, S.F., WATKINS, L.R., Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve., **Brain Res.**, 804:306-310, 1998.
- GOLDBACH, J.M., ROTH, J., STÖRR, B., VOIGT, K., ZEISBERGER, E., Changes of abdominal temperature and circulating levels of cortisol and interleukin-6 in response to intra-arterial infusions of tumor necrosis factor- $\alpha$  or tumor necrosis factor- $\beta$  in guinea pigs., **Eur J Pharmacol.**, 334: 249-254, 1997.
- GRESSIER, B., CABANIS, A., LEBEGUE, S., BRUNET, C., DINE, T., LUYCKX, M., CAZIN, M., CAZIN, J.C., Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs., **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, 16:9-13, 1994.
- GUYTON, K.Z., LIU, Y., GOROSPE, M., XU, Q., HOLBROOK, N.J., Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>., **J Biol Chem.**, 271:4138-4142, 1996.
- HADDAD, J.J., HARB, H.L., L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)?, **Mol Immunol.**,42:987-1014, 2005.
- HADDAD, J.J., LAND, S.C., Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis., **Br J Pharmacol.**, 135:520-536, 2002.
- HAN, J., ULEVITCH, R.J., Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity., **Nat Immunol.**,6:1198-1205, 2005.
- HANSON, D.F., Fever, temperature, and the immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, 15;3:453-64,1997.

- HARRIS, R.C., MCKANNA, J.A., AKAI, Y., JACOBSON, H.R., DUBOIS, R.N., BREYER, M.D., Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction., **J Clin Invest.**, 94:2504-2510, 1994.
- HAYES, J.D., MCLELLAN, L.I., Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress., **Free Radic Res.**, 31:273-300, 1999.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K., AKIRA, S., Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product., **J Immunol.**, 162:3749-3752, 1999.
- HUANG, W.T., LIN, M.T., CHANG, C.P., An NMDA receptor-dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever., **Neuropharmacology.**, 50:504- 511., 2006.
- HÜBSCHLE, T., MÜTZE, T., MÜHLRADT, P.T., KORTE, S., GERSTBERGER, R., ROTH, J., Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 290:R180-R187, 2006.
- INOUE, W., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., TAKEMIYA, T., SHIRAKI, T., KOBAYASHI, S., Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever., **Neurosci Res.**, 44:51-61, 2002.
- INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES (IUPS), The Commission for Thermal Physiology, Glossary of terms for thermal physiology. 3<sup>rd</sup> edition. **Jpn Physiol.**, 51:245-280, 2001.
- IRIE, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., HARAZONO, A., HONDA, A., WATABE, A., NEGISHI, M., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase., **Eur J Biochem.**, 217:313-318, 1993.
- IVANOV, A.I., PERO, R.S., SCHECK, A.C., ROMANOVSKY, A.A., Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 283:R1104-R1117, 2002.
- IVANOV, A.I., ROMANOVSKY, A.A., Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism., **Front Biosci.**, 9: 1977-1993, 2004.
- IVANOV, A.I., SCHECK, A.C., ROMANOVSKY, A.A., Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 284:R698-R706, 2003.
- KABE, Y., ANDO, K., HIRAO, S., YOSHIDA, M., HANDA, H., Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus., **Antioxid Redox Signal.**, 7:395-403, 2005.
- KAWAI, T., AKIRA, S., Toll-like receptor downstream signaling., **Arthritis Res Ther.**, 7:12-19, 2005.
- KLIR, J.J., ROTH, J., SZELÉNYI, Z., MCCLELLAN, J.L., KLUGER, M.J., Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat., **Am J Physiol.**, 265:R512-R517, 1993.
- KLUGER, M.J., Fever: role of pyrogens and cryogens., **Physiol Rev.**, 71:93-127, 1991.

- KOBAYASHI, G.S., FRIEDMAN, L., Characterization of pyrogenicity of *Candida Albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Cryptococcus neoformans*., **J Bacteriol.**, 88:660-666, 1964.
- KOBAYASHI, S.D., VOYICH, J.M., DELEO, F.R., Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection., **Microbes and Infection.**, 5:1337–1344, 2003.
- KOLACZKOWSKA, E., BARTECZKO, M., PLYTYCZ, B., ARNOLD, B., Role of lymphocytes in the course of murine zymosan-induced peritonitis., *Inflamm Res.*, 57:272-278, 2008.
- KOLACZKOWSKA, E., SCISLOWSKA-CZARNECKA, A., CHADZINSKA, M., PLYTYCZ, B., VAN ROOIJEN, N., OPDENAKKER, G., ARNOLD, B., Enhanced early vascular permeability in gelatinase B (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of COX-1-derived PGE2 of macrophage origin., **J Leukoc Biol.**, 80:125-132, 2006.
- KOLACZKOWSKA, E., SHAHZIDI, S., SELJELID, R., VAN ROOIJEN, N., PLYTYCZ, B., Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is comediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes., **Inflammation.**, 26:61–71, 2002.
- LAZARUS, M., YOSHIDA, K., COPPARI, R., BASS, C.E., MOCHIZUKI, T., LOWELL, B.B., SAPER, C.B., EP3 prostaglandin receptor in the median preoptic nucleus are critical for fever response., **Nature neuroscience.**, 10:1131-1133, 2007.
- LEE, J.J., HUANG, W.T., SHAO, D.Z., LIAO, J.F., LIN, M.T., Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy. **Jpn J Physiol.**, 53:367-375, 2003.
- LI, S., GOORHA, S., BALLOU, L.R., BLATTEIS, C.M., Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 and IL-18: pyrogenic and PGE2-mediated., **Brain Res.**, 992:76-84, 2003.
- LI, S., WANG, Y., MATSUMURA, K., BALLOU, L.R., MORHAM, S.G., BLATTEIS, C.M., The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2<sup>-/-</sup>, but not in cyclooxygenase-1<sup>-/-</sup> mice., **Brain Res.**, 825:86–94, 1999.
- LI, Z., PERLIK, V., FELEDER, C., TANG, I., BLATTEIS, C.M., Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 290: R1262–R1270, 2006.
- LI, Z., BLATTEIS, C.M., Fever onset is linked to the appearance of lipopolysaccharide in the liver. **J Endotoxin Res.**, 10:39-53. 2004.
- LI, Z., FELEDER, C., BLATTEIS, C.M., Lipopolysaccharide challenge causes exaggerated fever and increased hepatic lipopolysaccharide uptake in vinblastine-induced leukopenic guinea pigs., **Crit Care Med.** 32:2131-2134, 2004.
- LIEBERMEISTER, C., Vorlesungen uber spezielle pathologie und therapie., **Leipzig, Germany: Verlag-Vogel**, 1987.
- LIMÓN-PACHECO, J.H., HERNÁNDEZ, N.A., FANJUL-MOLES, M.L., GONSEBATT, M.E., Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice., **Free Radic Biol Med.**, 43:1335-1347, 2007.
- LINTHORST, A.C, FLACHSKAMM, C., HOLSBOER, F., REUL, J.M., Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat



---

preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis., **Eur J Neurosci.**, 7: 2418–2430, 1995.

- LUHESHI, G. N., Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, 856:83-89, 1998.
- LUSTER, A.D., ALON, R., ANDRIAN, U.H.V., Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets., **Nature Immunol.**, 6:1182-1190, 2005.
- MACKOWIAK, P.A., BARTLETT, J.G., BORDEN, E.C., GOLDBLUM, S.E., HASDAY, J.D., MUNFORD, R.S., NASRAWAY, S.A., STOLLEY, P.D., WOODWARD, T.E., Concepts of fever: recent advances and lingering dogma., **Clin Infect Dis.**, 25:119-38, 1997.
- MATSUGUCHI, T., TAKAGI, A., MATSUZAKI, T., NAGAOKA, M., ISHIKAWA, K., YOKOKURA, T., YOSHIKAI, Y., Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2., **Clin Diag Lab Immunol.**, 10:259–266, 2003.
- MATSUMURA, K., CAO, C., OZAKI, M., MORII, H., NAKADATE, K., WATANABE, Y., Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies., **J Neurosci.**, 18:6279–6289, 1998.
- MATSUMURA, K., KOBAYASHI, S., Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells., **Front Biosci.**, 9:2819-2826, 2004.
- MATSUMURA, K., WATANABE, Y., ONOE, H., WATANABE, Y., HAYAISHI, O., High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action., **Brain Res.**, 533:147-151, 1990.
- MCEVER, R.P., Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow., **Curr Opin Cell Biol.**, 14:581–586, 2002.
- MILTON, A.S., WENDLANDT, S., Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits., **J Physiol.**, 218:325-36, 1971.
- MITRA, S., ABRAHAM, E., Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production., **Biochim Biophys Acta.**, 1762:732-741, 2006.
- MIYAKE, K., Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4–MD-2., **Trends in Microbiol.**, 12:186-191, 2004.
- MOHANKUMAR, S.M., MOHANKUMAR, P.S., QUADRI, S.K., Effects of bacterial lipopolysaccharide on central monoamines and fever in the rat: involvement of the vagus., **Neurosci Lett.**, 284:159-162, 2000.
- MORIMOTO, A., MURAKAMI, N., WATANABE, T., Dehydration enhances endotoxin fever by increased production of endogenous pyrogen., **Am J Physiol.**, 251:41-47, 1986.
- MURAKAMI, M., KUDO, I., Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. **Prog Lipid Res.**, 43:3-35, 2004.
- NADJAR, A., TRIDON, V., MAY, M.J., GHOSH, S., DANTZER, R., AMEDEE, T., PARNET, P., NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain., **J Cereb Blood Flow Metab.**, 25:1047–1059, 2005.
- NAGASE, T., MIKAMI, T., SUZUKI, S., SUZUKI, M., Pyrogenicity of yeast mannans in rabbits., **Microbiol Immunol.**, 28:651-657, 1984.

- NAKAMURA, K., KANEKO, T., YAMASHITA, Y., HASEGAWA, H., KATOH, H., ICHIKAWA, A., NEGISHI, M., Immunocytochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat hypothalamus., **Neurosci Lett.**, 260:117-120, 1999.
- NAKAMURA, K., KANEKO, T., YAMASHITA, Y., HASEGAWA, H., KATOH, H., NEGISHI, M., Immunohistochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat nervous system., **J Comp Neurol.**, 421: 543-569, 2000.
- NETEA, M.G., VAN DER GRAAF, C., VAN DER MEER, J.W., KULLBERG, B.J., Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system., **J Leukoc Biol.**, 75:749-755, 2004.
- NOMOTO, S., SHIBATA, M., IRIKI, M., RIEDEL, W., Role of afferent pathways of heat and cold in body temperature regulation., **Int J Biometeorol.**, 49:67-85, 2004.
- O'NEILL, L.A., DINARELLO, C.A., The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense., **Immunol Today.**, 21:206–209, 2000.
- OKA, T., OKA, K., SAPER, C.B., Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats., **Brain Res.**, 968: 256–262, 2003.
- OKA, T., OKA, K., KOBAYASHI, T., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S., SAPER, C.B., Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors., **J Physiol.**, 551:945-54,2003.
- OKA, T., OKA, K., SCAMMELL, T.E., LEE, C., KELLY, J.F., NANTEL, F., ELMQUIST, J.K., SAPER, C.B., Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses., **J Comp Neurol.**, 428:20-32, 2000.
- OKA, T., Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors., **Front Biosci.**, 9:3046–3057, 2004.
- OOTSUKA, Y., BLESSING, W.W., STEINER, A.A., ROMANOVSKY, A.A., Fever response to intravenous prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 294:R1294-303, 2008.
- OSAKA, T., Prostaglandin E<sub>2</sub> fever mediated by inhibition of the GABAergic transmission in the region immediately adjacent to the organum vasculosum of the lamina terminalis., **Eur J Physiol.**, 56:837–846, 2008.
- OZDULGER, A., CINEL, I., KOKSEL, O., CINEL, L., AVLAN, D., UNLU, A., OKCU, H., DIKMENGIL, M., ORAL, U., The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model., **Shock.**, 19:366-372, 2003.
- PERLIK, V., LI, Z., GOORHA, S., BALLOU, L.R., BLATTEIS, C.M., LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE<sub>2</sub> by Kupffer cells., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 289: R332–R339, 2005.
- PETERSON, R.L., GALLEY, H.F., WEBSTER, N.R., The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis., **Crit Care Med.**, 31:2574-2578, 2003.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B., BEUTLER, B., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene., **Science.**, 82:2085-2088, 1998.

- PUSCHEL, G.P., HESPELING, U., OPPERMANN M, DIETER, P., Increase in prostanoid formation in rat liver macrophages (Kupffer cells) by human anaphylatoxin C3a., **Hepatology**, 18:1516–1521, 1993.
- QUAN, N., BLATTEIS, C.M., Intrapreoptically microdialyzed and microinjected norepinephrine evokes different thermal responses., **Am J Physiol**, 257:R816-821, 1989.
- RANELS, H.J., GRIFFIN J.D., The effect of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermo sensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of rat hypothalamus., **Brain Res.**, 964: 42-50, 2003.
- RAYHANE, N., LORTHOLARY, O., FITTING, C., CALLEBERT, J., HUERRE, M., DROMER, F., CAVAILLON, J.M., Enhanced sensitivity of tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha-deficient mice to *Cryptococcus neoformans* infection despite increased levels of nitrite/nitrate, interferon-gamma, and interleukin-12. **J Infect Dis.**, 180:1637-1647, 1999.
- RIEDEL W, LANG U, OETJEN U, SCHLAPP U, SHIBATA M., Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever., **Mol Cell Biochem.**, 247:83-94, 2003.
- RIEDEL, W., MAULIK, G., Fever: an integrated response of the central nervous system to oxidative stress., **Mol Cell Biochem.**, 196:125-132, 1999.
- ROEDER, A., KIRSCHNING, C.J., RUPEC, R.A., SCHALLER, M., WEINDL, G., KORTING, H.C., Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity., **Med Mycol.**, 42:485-498, 2004.
- ROMANOVSKY, A.A., IVANOV, A.I., SZE'KELY, M., Neural Route of Pyrogen Signaling to the Brain., **Clin Infect Dis.**, 31:S162–S167, 2000.
- ROMANOVSKY, A.A., STEINER, A.A., MATSUMURA, K., Cells That Trigger Fever., **Cell Cycle.**, 19: 2195-2197, 2006.
- ROMANOVSKY, A.A., Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 292:R37-R36, 2007.
- ROMANOVSKY, A.A., Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy., **Auton Neurosci.**, 85:39-48. 2000.
- ROSS, G., GOLDBACH, J.M., ROTH, J., STÖRR, B., VOIGT, K., ZEISBERGER, E., Local induction of cytokines in subcutaneous air pouch or artificial subcutaneous chambers and fever: activation of humoral and neural signals to the brain., **Pflügers Arch Eur J Physiol** 437 (suppl), R133, 1999.
- ROTH, J., CONN, C.A., KLUGER, M.J., ZEISBERGER, E., Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs., **Am J Physiol.**, 265:R653-R658, 1993.
- ROTH, J., HARRÉ, E.M., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T., Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs., **Front Biosci.**, 9:290–300, 2004.
- ROTH. J., Endogenous antipyretics., **Clin Chim Acta.**, 371:13–24, 2006.

- ROTONDO, D., ABUL, H.T., MILTON, A.S., DAVIDSON, J., Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. **Eur J Pharmacol.**, 154:145–152, 1988.
- SADOWSKA, A.M., MANUEL-Y-KEENOY, B., DE BACKER, W.A., Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review., **Pulm Pharmacol Ther.**, 20:9-22, 2007.
- SADOWSKA, A.M., MANUEL-Y-KEENOY, B., VERTONGEN, T., SCHIPPERS, G., RADOMSKA-LESNIEWSKA, D., HEYTENS, E., DE BACKER, W.A., Effect of N-acetylcysteine on neutrophil activation markers in healthy volunteers: in vivo and in vitro study., **Pharmacol Res.**, 53:216-225, 2006.
- SANTANGELO, F., Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach., **Curr Med Chem.**, 10:2599-2610, 2003.
- SAPER, C.B., BREDER, C.D., The neurologic basis of fever., **N Engl J Med.**, 330:1880–1886, 1994.
- SCAMMELL, T.E., ELMQUIST, J.K., GRIFFIN, J.D., SAPER, C.B., Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways., **J Neurosci.**, 16:6246-6254, 1996.
- SCAMMELL, T.E., GRIFFIN, J.D., ELMQUIST, J.K., SAPER, C.B., Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever., **Am J Physiol.**, 274:R783-R789, 1998.
- SCHILTZ, J. C., SAWCHENKO, P. E. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells., **Front. Biosci.**, 8: 1321-1329, 2003.
- SCHILTZ, J. C., SAWCHENKO, P. E., Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults., **J Neurosci.**, 22:5606-18, 2002.
- SEDLÁK, J., L' HANUS., Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress., **Endocrinol Exp.**, 16:103-9, 1982.
- SEHIC, E., LI, S., UNGAR, A.L., BLATTEIS, C.M., Complement reduction impairs the febrile response of guinea pigs to endotoxin., **Am J Physiol.**, 274:R1594-603, 1998.
- SHAMRI, R., GRABOVSKY, V., GAUGUET, J.M., FEIGELSON, S., MANEVICH, E., KOLANUS, W., ROBINSON, M.K., STAUNTON, D.E., VON ANDRIAN. U.H., ALON, R., Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines., **Nat Immunol.**, 6:497-506, 2005.
- SHAO, D.Z., LEE, J.J., HUANG, W.T., LIAO, J.F., LIN, M.T., Inhibition of nuclear factor-kappa B prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever., **Mol Cell Biochem.**, 262:177-185, 2004.
- SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M., HLA, T., Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis e inhibition., **Pharmacol Rev.**, 56:387-437, 2004.
- SKARNES, R.C., BROWN, S.K., HULL, S.S., MCCRACKEN, J.A., Role of prostaglandin E in the biphasic fever response to endotoxin., **J Exp Med.**, 154:1212-24, 1981.

- SMITH, W.L., DEWITT, D.L., GARAVITO, R.M., Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology., **Annu Rev Biochem.**, 69:145-82, 2000.
- SMITH, W.L., GARAVITO, R.M., DEWITT, D.L., Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2., **J Biol Chem.**, 271:33157-33160, 1996.
- SOUZA, F. R., SOUZA, V. T., RATZLAFF, V., BORGES, L. P., OLIVEIRA, M. R., BONACORSO, H. G., ZANATTA, N., MARTINS, M. A. P., MELLO, C. F., Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice., **Eur. J. Pharmacol.**, 451:141-147, 2002.
- STEINER, A.A., RUDAYA, A.Y., ROBBINS, J.R., DRAGIC, A.S., LANGENBACH, R., ROMANOVSKY, A.A., Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses., **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** , 289:R1253-1257, 2005.
- STEINER, A.A., CHAKRAVARTY, S., RUDAYA, A.Y., HERKENHAM, M., ROMANOVSKY, A.A., Bacterial lipopolysaccharide fever is initiated via Toll-like receptor 4 on hematopoietic cells., **Blood.**, 107:4000-4002, 2006b.
- STEINER, A.A., IVANOV, A.I., SERRATS, J., HOSOKAWA, H., PHAYRE, A.N., ROBBINS, J.R., ROBERTS, J.L., KOBAYASHI, S., MATSUMURA, K., SAWCHENKO, P.E., ROMANOVSKY, A.A., Cellular and molecular bases of the initiation of fever., **PLoS Biol** **4(9): e284. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040284**, 2006a.
- STITT, J.T., SHIMADA, S.G., Enhancement of the febrile responses of rats to endogenous pyrogen occurs within the OVLT region., **J Appl Physiol.**, 67:1740-1746, 1989.
- STOLAREK, R., BIAŁASIEWICZ, P., NOWAK, D., N-acetylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes., **Pulm Pharmacol Ther.**, 15:385-392, 2002.
- STÖRR, B., ROTH, J., ZEISBERGER, E., Thermoregulatory vasomotor reactions during endotoxin fever in guinea pigs., **J Therm Biol.**, 20: 431-436, 1995.
- STRASSHEIM, D., ASEHNOUNE, K., PARK, J.S., KIM, J.Y., HE, Q., RICHTER, D., MITRA, S., ARCAROLI, J., KUHN, K., ABRAHAM, E., Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression., **Am J Physiol Cell Physiol.**, 286:C683-C692, 2004.
- SU, C.L., CHENG, C.C., LIN, M.T., YEH, H.C., LEE, M.C., LEE, J.C., WON, S.J., Staphylococcal enterotoxin C1-induced pyrogenic cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells is mediated by NADPH oxidase and nuclear factor-kappa B., **FEBS J.**, 274:3633-3645, 2007.
- SUGIMOTO, Y., NARUMIYA, S., Prostaglandin E Receptors., **J Biol Chem.**, 282:11613–11617, 2007.
- SUGIMOTO, Y., NEGISHI, M., HAYASHI, Y., NAMBA, T., HONDA, A., WATABE, A., HIRATA, M., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins., **J Biol Chem.**, 268:2712-2718, 1993.
- SUZUKI, N., SUZUKI, S., DUNCAN, G.S., MILLAR, D.G., WADA, T., MIRTOS, C., TAKADA, H., WAKEHAM, A., ITIE., A., LI, S., PENNINGER, J.M., WESCHE, H., OHASHI, P.S., MAK, T.W., YEH, W.C., Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4., **Nature.**, 416:750–756, 2002.

- SWIERGIEL, A.H., DUNN, A.J., STONE, E.A., The role of cerebral noradrenergic systems in the Fos response to interleukin-1., **Brain Res Bull.**, 41:61-64, 1996.
- SZÉKELY, M., BALASKÓ, M., KULCHITSKY, V.A., SIMONS, C.T., IVANOV, A.I., ROMANOVSKY, A.A., Multiple neural mechanisms of fever., **Autonomic neuroscience.**, 85:78-82, 2000.
- TADA, H., NEMOTO, E., SHIMAUCHI, H., WATANABE, T., MIKAMI, T., MATSUMOTO, T., OHNO, N., TAMURA, H., SHIBATA, K., AKASHI, S., MIYAKE, K., SUGAWARA, S., TAKADA, H., *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner., **Microbiol Immunol.**, 46:503-512, 2002.
- TAKADA, Y., MUKHOPADHYAY, A., KUNDU, G.C., MAHABELESWAR, G.H., SINGH, S., AGGARWAL, B.B., Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase., **J Biol Chem.**, 278:24233-24241, 2003.
- TOMAZETTI, J., AVILA, D.S., FERREIRA, A.P.O., MARTINS, J.S., SOUZA, F.R., ROYER, C., ANTONELLO, M.R., OLIVEIRA, M.R., BONACORSO, H.G., MARTINS, M.A.P., ZANATTA, N., MELLO C.F., Baker yeast-induced fever in young rats : Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening., **J Neurosci methods.**, 147:29-35, 2005.
- USHIKUBI, F., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., MURATA, T., MATSUOKA, T., KOBAYASHI, T., HIZAKI, H., TUBOI K., KATSUYAMA M., ICHIKAWA, A., TANAKA, T., YOSHIDA, N., NARUMIYA, S., Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3., **Letters to Nature.**, 395:281-284, 1999.
- VAN DEN BLINK, B., BRANGER, J., WEIJER, S., DEVENTER, S.H., VAN DER POLL, T., PEPPELENBOSCH, M.P., Human endotoxemia activates p38MAP kinase and p42/44 MAP kinase, but not c-Jun N-terminal kinase., **Mol. Med.**, 7: 755–760, 2001.
- VAN DER BRUGGEN, T., NIJENHUIS, S., VAN RAAIJ, E., VERHOEF, J., VAN ASBECK, B.S., Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway., **Infect Immun.**, 67:3824–3829, 1999.
- VAN DER GRAAF, C.A., NETEA, M.G., VERSCHUEREN, I., VAN DER MEER, J.W., KULLBERG, B.J., Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae., **Infect Immun.**, 73:7458-7464, 2005.
- VANE, J.R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs., **Nat New Biol.**, 231:232-235 1971.
- VASILACHE A.M, ANDERSSON, J., NILSBERTH, C., Expression of PGE2 EP3 receptor subtypes in the mouse preoptic region., **Neuroscience Lett.**, 423 179–183, 2007.
- VICTOR, V.M., ROCHA, M., DE LA FUENTE, M., Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin., **Int Immunopharmacol.**, 3:97-106, 2003.
- VISMONT, F.I., SHUST, O.G., Role of alpha 1- antitrypsin and the detoxification functions of the liver in the pathogenesis of endotoxin-induced fever., **Bull Esp Biol Med.**, 130: 645–636, 2000.

- VUKAJLOVICH, S.W., Interaction of LPS with serum complement. In: RYAN, J.L., MORRISON, D.C. (Eds). **Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides**, Boca Raton: F.L. CRC., p. 213–235, 1992.
- WALENGA, R.W., KESTER, M., CORONEOS, E., BUTCHER, S., DWIVED, R., STATT, C., Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in hum an tracheal epithelial cells in vitro., **Prostaglandins.**, 52:341-359, 1996.
- WAN, W., WETMORE, L., SORENSEN, C.M., GREENBERG, A.H., NANCE, D.M., Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain., **Brain Res Bull.**, 34:7-14, 1994.
- WIECZOREK, M., DUNN, A.J., Effect of subdiaphragmatic vagotomy on the noradrenergic and HPA axis activation induced by intraperitoneal interleukin-1 administration in rats., **Brain Res.**, 1101: 73-84, 2006b.
- WIECZOREK, M., DUNN, A.J., Relationships among the behavioral, noradrenergic, and pituitary–adrenal responses to interleukin-1 and the effects of indomethacin., **Brain Behav Immun.**, 20:477–487, 2006a.
- WIECZOREK, M., SWIERGIEL, A.H., POURNAJAFI-NAZARLOO, H., DUNN, A.J., Physiological and Behavioral Responses to Interleukin-1 $\beta$  and LPS in Vagotomized Mice., **Physiol Behav.**, 85:500–511, 2005.
- WU, H., ARRON, J.R., TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology., **Bioessays.**, 25:1096-1105, 2003.
- YAMAGATA, K., ANDREASSON, K.I., KAUFMANN, W.E., BARNES, C.A, WORLEY, P.F., Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids., **Neuron.**, 11:371-86, 1993.
- YAMAGATA, K., MATSUMURA, K., INOUE, W., SHIRAKI, T., SUZUKI, K., YASUDA, S., SUGIURA, H., CAO, C., WATANABE, Y., KOBAYASHI, S., Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever., **J Neurosci.**, 21:2669-2677, 2001.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., MORI, K., HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., AKIRA, S., Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the toll-like receptor signaling., **J Immunol.**, 169: 6668–6672, 2002.
- ZAFARULLAH, M., LI, W.Q., SYLVESTER, J., AHMAD, M., Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions., **Cell Mol Life Sci.**, 60:6-20, 2003.
- ZÄHRINGER, U., LINDNER, B., INAMURA, S., HEINE, H., Alexander, C., TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity., **Immunobiology.**, 213:205-24, 2008.
- ZEISBERGER, E., From humoral to neuroimmunological control of fever., **J Therm Biol.**, 24:287-326, 1999.
- ZHANG, X.Y., HAYASAKA, S., HAYASAKA, Y., CUI, H.S., CHI, Z.L., Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats., **Jpn J Ophthalmol.**, 51:14-20, 2007.

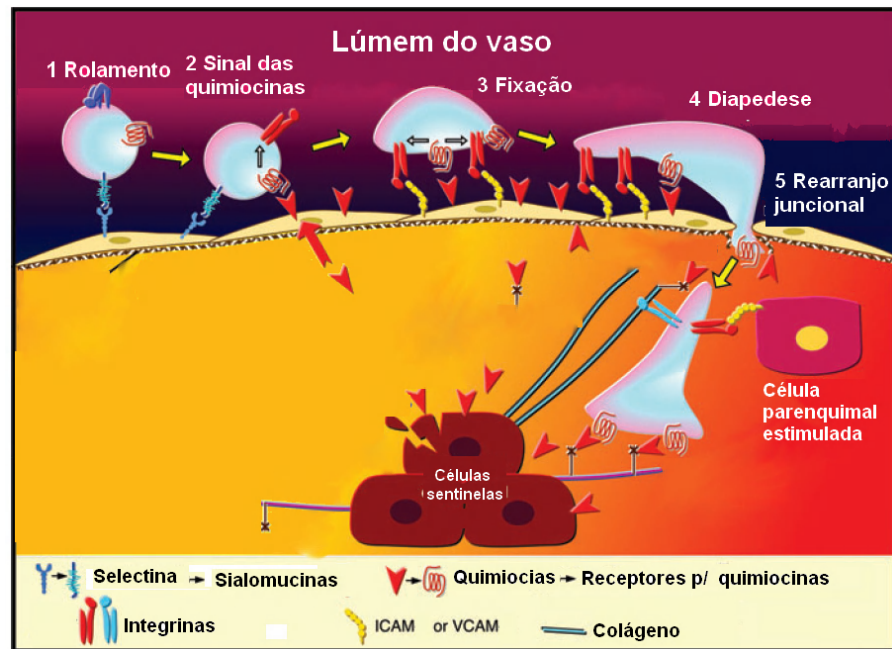
---

ZHANG, Y.H., LU, J., ELMQUIST, J.K., SAPER, C.B., Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain., **J Comp Neurol.**, 463:3-12, 2003.



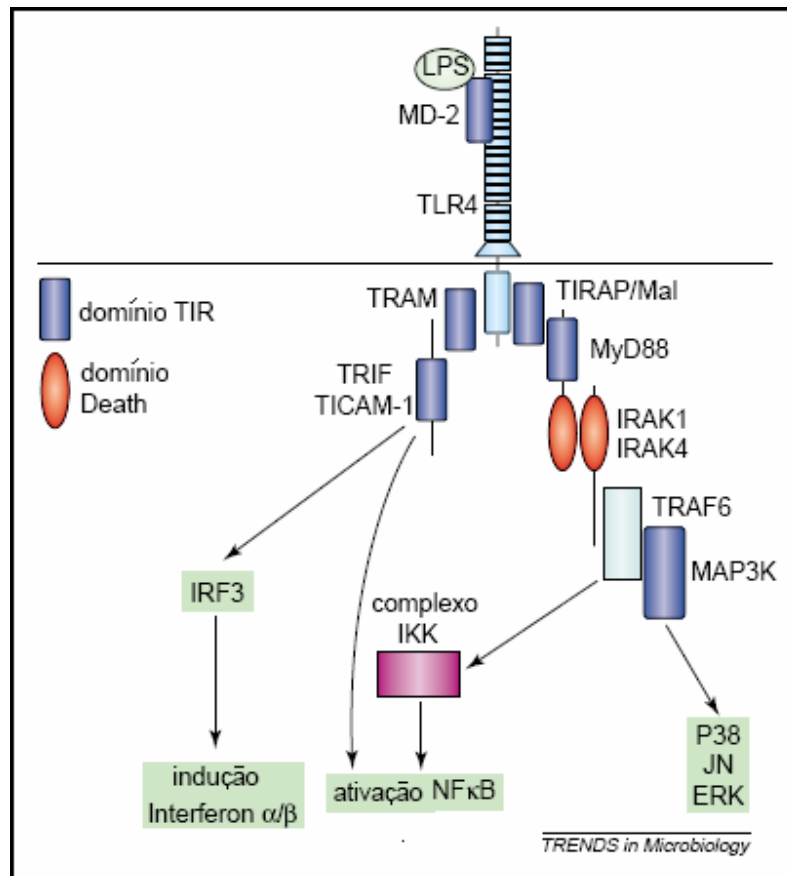


### Anexo A - Passos do processo de migração celular até o sítio inflamatório



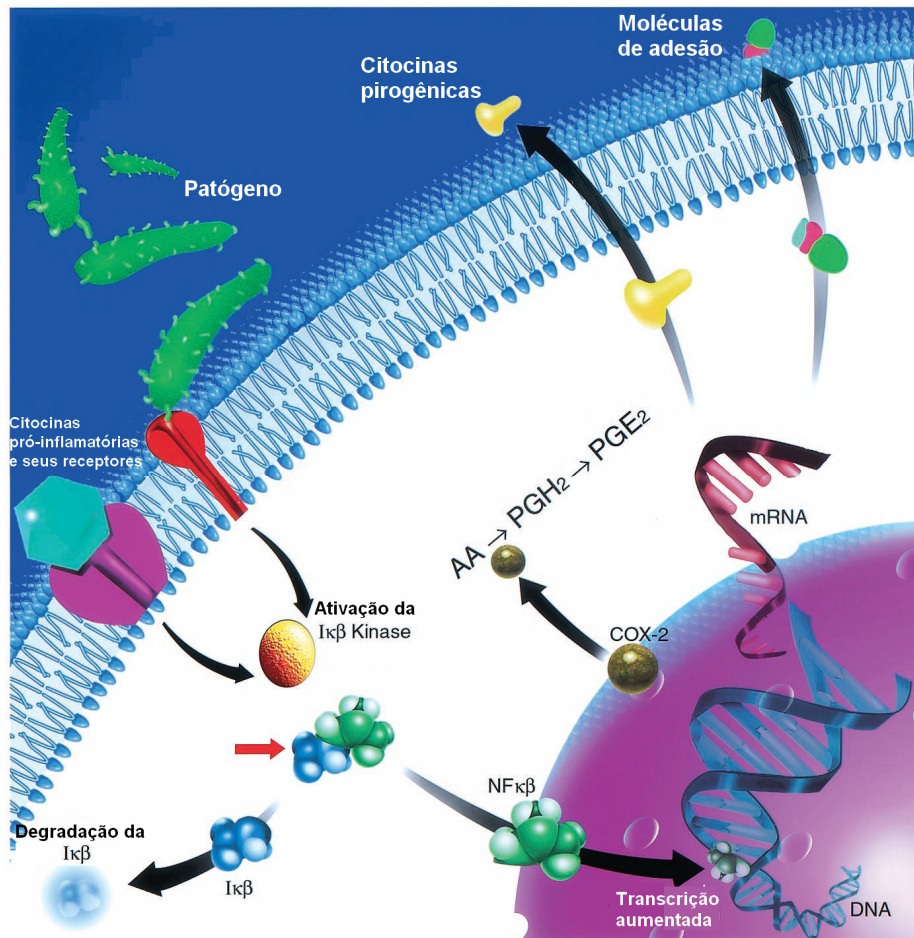
A inflamação causada pela infecção induz a liberação de citocinas e quimiocinas pelas células sentinelas como os mastócitos. O sinal inflamatório induz o aumento da expressão de selectinas, ICAMs e VCAMs. As quimiocinas (setas vermelhas) produzidas pelas células endoteliais ou pelas células sentinelas são apresentadas aos leucócitos em rolamento no lúmen do vaso sanguíneo. Esses leucócitos, então, expressam um grupo apropriado de moléculas de adesão que possibilitam a realização dos passos 1-3, então a célula polariza-se e move-se por diapedese através da parede vascular (passos 4 e 5). A diapedese envolve um rearranjo transitório das junções endoteliais e a penetração através da membrana basal do vaso. Adaptado de Luster, Alon, Andrian, *Nature Immunology*, 2005.

### Anexo B - Rota de sinalização dos receptores “Toll like” (TLRs)



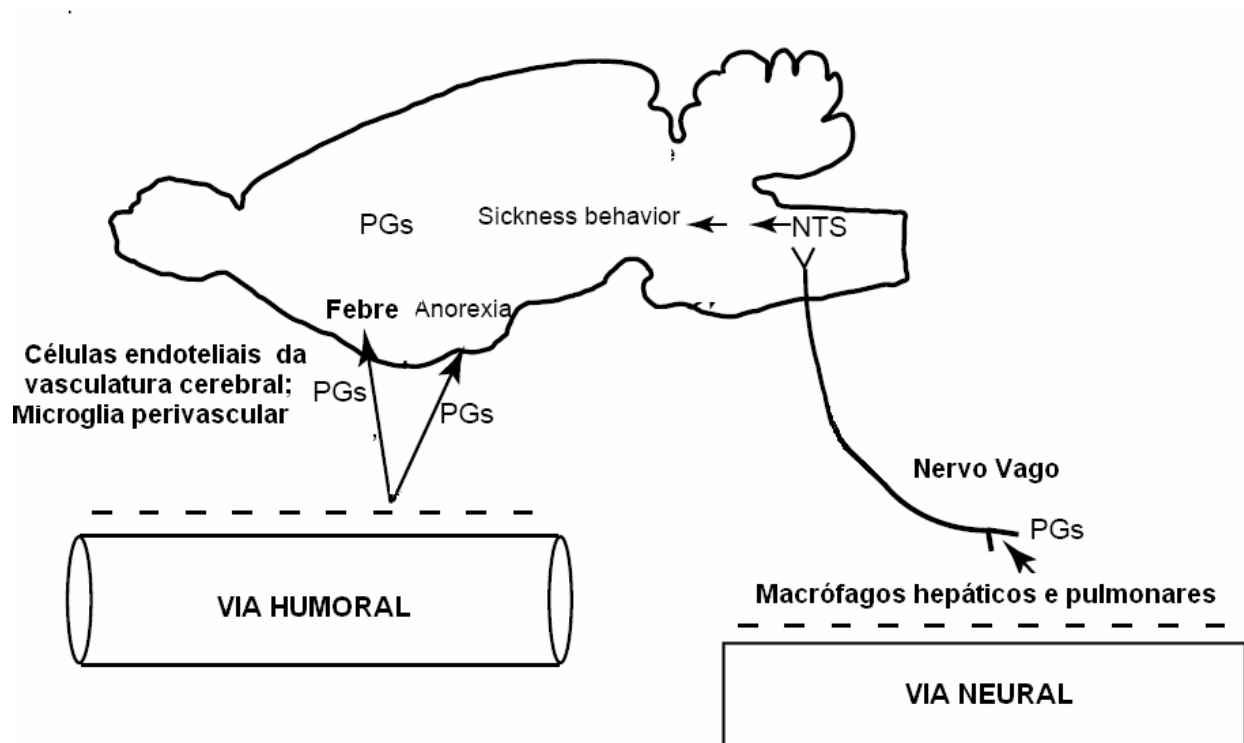
A ligação do receptor com seu ligante desencadeia duas rotas distintas de sinalização. Uma dependente de do domínio TIR, contém a proteína adaptadora (TIRAP) e MyD88. A outra é dependente da molécula adaptadora relacionada ao TRIF. A rota dependente de MyD88 utiliza as quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs) e o fator associado ao receptor do TNF (TRAF6) para finalmente ativar a cascata das MAPK e o NF- $\kappa$ B. As rotas mediadas por TRAM e TRIF ativam não somente NF- $\kappa$ B mas também o fator de transcrição INF 3 (IRF3). Adaptado de Miyake, *TRENDS in Microbiology*, 2004.

### Anexo C - Rota de ativação do NF- $\kappa$ B



Quando os leucócitos são estimulados via receptores de patógenos ou citocinas a enzima I $\kappa$ B quinase (IKK) é fosforilada e ativada. A IKK por sua vez fosforila a I $\kappa$ B (proteína inibidora do NF- $\kappa$ B) causando sua degradação. O NF- $\kappa$ B torna-se livre para se translocar até o núcleo e promover a expressão da ciclooxygenase (COX-2), das citocinas, das moléculas de adesão entre outros. Adaptado de Aronoff & Neilson, Am J Méd, 2001.

**Anexo D - Modelo de ativação do sistema nervoso central (CNS) após infecções.**



As citocinas circulantes podem interagir diretamente com as células endoteliais ou com a microglia perivascular, causando a produção e difusão no CNS de mediadores como a prostaglandina (PG) e outras citocinas. Além disso, infecções mais localizadas como peritonites podem ativar nervos sensoriais locais como o vago através de um mecanismo dependente de  $PGE_2$ . Adaptado de Elmquist, Scammell, Saper, Trends Neurosci, 1999.