



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

**ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DE DERIVADOS 5-  
TRIFLUORMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-CARBOXIAMIDA PIRAZOL  
EM RATOS**

**JULIANA SAIBT MARTINS PASIN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

**Porto Alegre, RS**

**2010**

**ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DE DERIVADOS 5-  
TRIFLUORMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-CARBOXIAMIDA PIRAZOL  
EM RATOS**

**por**

**JULIANA SAIBT MARTINS PASIN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Tese apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito parcial à obtenção do  
grau de Doutor em Ciências Biológicas –  
Bioquímica

Porto Alegre, RS

2010

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DE DERIVADOS 5-  
TRIFLUORMETIL-4,5-DIIDRO-1H- 1-CARBOXIAMIDA PIRAZOL  
EM RATOS**

Elaborada por  
**Juliana Saibt Martins Pasin**

**Comissão Examinadora:**

---

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

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Dalmaz (UFRGS) relatora**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela de Almeida Cabrini (UFPR)**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Michele Rechia Fighera (UFSM)**

**Porto Alegre, 19 de novembro de 2010.**

*Dedico esta tese à minha família,  
fonte inesgotável de amor.*

*“Desconfie do destino e acredite em você.  
Gaste mais horas realizando que sonhando,  
fazendo que planejando, vivendo que esperando...  
Porque, embora quem quase morre esteja vivo,  
quem quase vive, já morreu...”*

*Luiz Fernando Veríssimo*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus, alicerce da minha existência e presença silenciosa em todos os momentos!*

*Aos meus pais, Marino e Teresinha, pelo apoio e lição de amor que me ensinaram durante toda a vida. Obrigada pela generosidade e por entenderem que minhas escolhas muitas vezes demandaram momentos de ausência!*

*Aos meus irmãos Eduardo e Gustavo e suas famílias, agradeço pelo apoio, incentivo, carinho, e, principalmente por encher de alegria o meu dia-a-dia!*

*Ao Marcelo, que acompanhou cada passo da minha trajetória acadêmica com amor e paciência... Obrigada por estar sempre ao meu lado e me incentivar!*

*Ao prof. Carlos Fernando Mello, meu orientador, agradeço por ter me acolhido em seu grupo, mesmo sabendo que eu desconhecia pipetas, ponteiras e afins... Obrigada pelos ensinamentos e oportunidade de crescimento; pela amizade e confiança depositada durante todos esses anos!*

*Aos profs. Juliano Ferreira e Adair dos Santos, agradeço pela disponibilidade, apoio e auxílio técnico e intelectual.*

*Agradeço à Vivi, ao André e à Ana Paula pela amizade, pela companhia de muitos anos, pelo conhecimento compartilhado e pelo auxílio nos experimentos, inclusive aos domingos e feriados. Obrigada também pelos inúmeros momentos descontraídos! Vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui... Guardo vocês em meu coração!*

*Ao Pablo Machado, que realizou a síntese dos compostos, agradeço pela competência e interesse.*

*Às ex-colegas e amigas Flávia, Valéria, Alessandra, Julie e Marinei agradeço o incentivo e por compartilharem comigo as dúvidas, as angústias e as muitas alegrias!*

*Agradeço à Sara, pela amizade, competência e ajuda em etapas importante deste trabalho. Ao Mauro e à Ana Flávia, sempre dispostos a ajudar... Ao Nando e à Michele, exemplos de dedicação e persistência.*

*Aos colegas Cris, Dani, Mauren, Kelly, Léo, Samurai, Luis Fernando, Fred e Mateus obrigada pelo carinho! Suas presenças tornam o laboratório um ambiente alegre e agradável.*

*Faço um agradecimento especial aos meus familiares e amigos que, com suas palavras de incentivo e manifestações de afeto, foram importantes para que eu atingisse meus objetivos.*

*Agradeço aos colegas docentes da Fisioterapia pelo interesse, compreensão e amizade.*

*Ao Centro Universitário Franciscano, em especial às Irs. Irani Ruppolo e Inacyr Pederiva, agradeço a compreensão e o apoio Institucional.*

*Agradeço o suporte técnico dos funcionários da UFSM Srs. Florindo e Paulino.*

*Aos professores que se disponibilizaram a avaliar este trabalho, agradeço as valiosas contribuições.*

*Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS, que muito contribuíram para a minha formação. Um agradecimento especial à funcionária Cléia, sempre disponível e prestativa.*

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul agradeço pela oportunidade de aprendizado e crescimento.*



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

### ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DE DERIVADOS 5-TRIFLUORMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-CARBOXIAMIDA PIRAZOL EM RATOS

AUTOR: JULIANA SAIBT MARTINS PASIN  
ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS FERNANDO DE MELLO  
Local e data da defesa: Porto Alegre, 19 de novembro de 2010

A febre é um aumento regulado da temperatura corporal central, caracterizada por uma alteração no centro termorregulatório, a qual resulta da interação entre o sistema nervoso central e o imunológico. Enquanto a febre caracteriza lesão celular, infecção e inflamação, ela tem sido considerada o mais importante componente da resposta de fase aguda. Embora existam evidências de que a febre aumenta a defesa do hospedeiro, alguns estudos têm sugerido que o aumento da temperatura central a níveis febris pode ser prejudicial. Portanto, nas situações clínicas nas quais os riscos associados com a febre superam os benefícios, o tratamento antipirético é formalmente indicado. Os derivados pirazolínicos constituem um importante grupo de compostos orgânicos que têm sido extensivamente estudados devido às suas inúmeras atividades biológicas, que incluem atividade antipirética. Recentemente uma série de derivados pirazolínicos inéditos foi avaliada quanto à atividade antiedematogênica e antinociceptiva em camundongos. Estes compostos causam antinocicepção no teste da formalina e no modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund, bem como diminuem o edema induzido por carragenina. Dados os efeitos antiinflamatórios descritos para estes compostos, o objetivo do estudo foi investigar o efeito de oito derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-pirazol-1-carboxiamida (TFDPs) sobre a temperatura corporal basal, a febre induzida por *S. cerevisiae* (0.135 g/Kg, i.p.) e a inflamação peritoneal em ratos Wistar machos de 28 dias de idade. Somente os compostos 3Et- e 3Pr-TFDP (140 e 200  $\mu\text{mol/kg}$  respectivamente, s.c., 4 h após a injeção do *S. cerevisiae*) atenuaram a febre em 61.0% e 82.4%, respectivamente. Estes dois compostos foram selecionados para a investigação dos mecanismos de ação. Os efeitos sobre a atividade da ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e COX-2), a oxidação *in vitro* do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e influxo de leucócitos na cavidade peritoneal dos ratos injetados com *S. cerevisiae* foram determinados. Enquanto 3Et- e 3Pr-TFDP não alteraram o aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzido por *S. cerevisiae*, o derivado 3Et-TFDP causou uma redução de 42% na contagem de leucócitos na cavidade peritoneal. 3Et- e 3Pr-TFDP não alteraram a atividade da COX-1 e COX-2 *in vitro*, mas apresentaram atividade antioxidante no ensaio do DPPH, com  $\text{CI}_{50}$  de 39.3 (25.0-62.0) mM e 162.9 (135.6-195.7) mM, respectivamente. Em outro grupo de experimentos, foi avaliado o efeito do pré-tratamento dos animais com os compostos 3Et- e 3Pr-TFDP sobre a inflamação peritoneal induzida por *S. cerevisiae* em ratos. O pré-tratamento com 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) preveniu significativamente o aumento no influxo de leucócitos, a permeabilidade vascular peritoneal e a atividade da mieloperoxidase (MPO), mas não teve efeito sobre os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Por outro lado, 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) não apresentou efeito sobre nenhum desses parâmetros inflamatórios. O presente estudo descreve dois novos derivados pirazolínicos com atividade antipirética, cujos mecanismos de ação não envolvem inibição da COX ou inibição da liberação de citocinas pirogênicas. Além disso, foi demonstrado que o composto 3Et-TFDP apresenta potencial antiinflamatório, atuando sobre o influxo de leucócitos, permeabilidade

vascular peritoneal e aumento da atividade da MPO induzidos por *S. cerevisiae*. Em conjunto, nossos dados sugerem que os derivados pirazolínicos 3Et- e 3Pr-TFDP parecem ser compostos antipiréticos e antiinflamatórios promissores.

Palavras chave: febre, inflamação, derivados pirazolínicos, antipiréticos, antiinflamatórios

## ABSTRACT

PhD thesis

PostGraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry

Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

### ANTIPYRETIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF 5-TRIFLUOROMETHYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLES IN RATS

AUTHOR: JULIANA SAIBT MARTINS PASIN

ADVISOR: PROF. DR. CARLOS FERNANDO DE MELLO

Place and date of defense: November 19<sup>th</sup>, 2010, Porto Alegre

Fever is a regulated increase of body core temperature characterized by a raised thermoregulatory set point, which results from the interaction of the central nervous and immune systems. While fever is a hallmark of injury, infection and inflammation, it has also been considered the most important component of acute-phase response. Although there is evidence supporting the idea that fever enhances host defenses, some studies have suggested that raising core temperature to the febrile range may be harmful. Therefore, in the clinical situations in which fever-associated risks outweigh benefits, antipyretic treatment is formally indicated. Pyrazoles constitute an important group of organic compounds that have been extensively studied due to their numerous biological activities. Recently a series of pyrazole derivatives have been screened for antinociceptive and antiedematogenic activity in mice. These compounds cause antinociception in the formalin test and in the Freund's adjuvant (CFA) animal model of arthritis and decrease carrageenin-induced edema. Given the effects reported for these compounds, we decided to investigate the effect of eight 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles (TFDPs) on body temperature, baker's yeast-induced fever and peritoneal inflammation in 28 days-old male Wistar rats. Only 3ethyl- and 3propyl-TFDP (140 and 200  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively, s.c., 4 h after *S. cerevisiae* injection) attenuated baker's yeast-induced fever by 61.0% and 82.4%, respectively. These two effective antipyretics were selected to investigate the mechanisms of action. The effects on cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) activities, on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) oxidation *in vitro*, on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels and on leukocyte counts in the washes of peritoneal cavities of rats injected with baker's yeast were determined. While 3ethyl- and 3propyl-TFDP did not reduce baker's yeast-induced increases of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  levels, 3ethyl-TFDP caused a 42% reduction in peritoneal leukocyte count. 3ethyl- and 3propyl-TFDP did not alter COX-1 and COX-2 activities *in vitro*, but presented antioxidant activity in the DPPH assay with an  $\text{IC}_{50}$  of 39.3 (25.0-62.0) mM and 162.9 (135.6-195.7) mM, respectively. In a other set of the experiments, we investigate the effect of 3-ethyl- and 3-propyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles on *S.cerevisiae*-induced peritoneal inflammation in rats. Pre-treatment with 3ethyl-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg) significantly prevented *S.cerevisiae*-induced increase in leukocyte influx, peritoneal vascular permeability and myeloperoxidase activity, but had no effect on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. On the other hand, 3propyl-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg) had no effect on these inflammatory parameters. The current study describes two novel antipyretic pyrazole derivatives, whose mechanisms of action do not involve the classic inhibition of the COX pathway or pyrogenic cytokine release. In addition, it is shown that 3ethyl-TFDP presents antiinflammatory potential, since it reduces leukocyte influx, peritoneal vascular permeability and MPO activity. Taken together, our data suggest that the pyrazole derivatives 3ethyl- and 3propyl-TFDP seems a promising antipyretic and anti-inflammatory compounds.

Key words: fever, inflammation, pyrazole derivatives, antipyretics, anti-inflammatory

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
AINEs	anti-inflamatórios não-esteroidais
AMG0347	antagonista dos receptores de potencial transitório tipo vanilóide
APOH	área pré-óptica do hipotálamo
APOM	área pré-óptica medial
AVE	acidente vascular encefálico
BHE	barreira hematoencefálica
3Bu-TFDP	3butil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
B50	2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol
CFA	adjuvante completo de Freund
CK	células de Kupffer
COX	Ciclooxygenase
CTAP	D-Phe-Cys-Try-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
EP	receptores prostaglandinérgicos
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
3Et-TFDP	3etil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
FPCA	3-fenil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida
FR140423	3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil
FR188582	3-cloro-5-[4-(metilsulfonil)fenil]-1-fenil-1H-pirazol
GABA	ácido gama-aminobutírico
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HOCl	ácido hipocloroso
3H-TFDP	5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
ICAMs	moléculas de adesão intracelular
IL	interleucina

IONS	óxido nítrico sintase induzível
IRAK	quinase associada ao receptor da IL-1
LABNEURO	Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia
LBP	proteína ligante de lipopolissacarídeo bacteriano
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
3Me-TFDP	3metil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
4Me-TFDP	4metil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
MIP	proteína inflamatória de macrófagos
MPCA	3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida
MPF4	4-metil-5-trifluorometil-5-hidroxi-4,5-diidro-1H-pirazol metil ester
mPGES-1	prostaglandina E sintase microssomal
$\text{NO}_2^-$	nitrito
$\text{NO}_3^-$	nitrato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NE	norepinefrina
NF- $\kappa$ B	fator nuclear- $\kappa$ B
NMR	núcleo magno da rafe
NPH	núcleo paraventricular do hipotálamo
NPOM	núcleo pré-óptico medial
NPR	núcleo pálido da rafe
NPSs	neurônios pré-ganglionares simpáticos
NTS	núcleo do trato solitário
NUQUIMHE	Núcleo de Química de Heterociclos
$\text{ONOO}^-$	peroxinitrito
NOS	óxido nítrico sintase
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
mNOS	óxido nítrico sintase de macrófagos e neutrófilos
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
$\text{O}_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
$\text{}^{\bullet}\text{OH}$	radical hidroxil

OVLT	órgão vascular da lâmina terminal
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PECAM-1	moléculas de adesão plaqueta-célula endotelial tipo 1
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	hidroperoxi endoperóxido
PGH <sub>2</sub>	prostaglandina H <sub>2</sub>
PGES	prostaglandina E-sintase
3Ph-TFDP	3fenil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
3Pr-TFDP	3propil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
3iPr-TFDP	3iso-propil-5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazol
PZ2	3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1H-pirazol
PZ3	3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1H-pirazol
RANTES	quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
SNC	Sistema Nervoso Central
TAM	tecido adiposo marrom
T <sub>c</sub>	temperatura corporal
TCE	traumatismo crânio-encefálico
TIR	região homóloga ao receptor Toll/IL-1
TLRs	receptores <i>TOLL-like</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TRAF6	receptor do fator de necrose tumoral
TRP	receptor de potencial transitório
TRPA	receptor de potencial transitório tipo anquirina
TRPM	receptor de potencial transitório tipo melastatina
TRPM8 <sup>-/-</sup>	camundongos geneticamente modificados que não expressam o receptor TRPM8
TRPV	receptor de potencial transitório tipo vanilóide
TRPV1 <sup>-/-</sup>	camundongos geneticamente modificados que não expressam o receptor TRPV1
VCAMs	moléculas de adesão vascular

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

- Figura 1:** Mecanismos de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia de leucócitos. 29
- Figura 2:** Via da COX. 33
- Figura 3:** Vias neuronais eferentes envolvidas na febre induzida por PGE<sub>2</sub> na APOH. 37
- Figura 4:** Estrutura química do anel pirazol 47
- Figura 5:** Estrutura química da dipirona 48

### Artigo aceito para publicação

- Figure 1:** Chemical structure of TFDPs 76
- Figure 2:** Effect of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or TFDPs (60, 200 or 600  $\mu\text{mol/kg}$ , *sc*) on rectal temperature ( $T_R$ ) change. Data are reported as means  $\pm$  SEM change from baseline  $T_R$  (N = 5-9 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles. Significant dose by time interactions for: TFDP [F(12,56) = 2.24; P < 0.05], 3Me-TFDP [F(12,76) = 2.78; P < 0.05], 3Et-TFDP [F(12,48) = 4.26; P < 0.05], 3Pr-TFDP [F(12,68) = 7.85; P < 0.05], 3iPr-TFDP [F(3,29) = 4.66; P < 0.05], 3Bu-TFDP [F(12,68) = 3.92; P < 0.05], 3Ph-TFDP [F(12,80) = 2.37; P < 0.05], 4Me-TFDP [F(12,68) = 3.18; P < 0.05]. \*P < 0.05 compared to vehicle (F-test for a simple effect). In this set of experiments the mean basal temperature was  $36.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . 77
- Figure 3:** Effect of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or TFDP (at the highest dose administered *sc* that had no effect on rectal temperature, 4 h after yeast injection) on baker's yeast-induced fever (0.135 g/kg). Baker's yeast was injected *ip* at zero time. The arrow indicates the time of injection of the drugs tested. Data are reported as means  $\pm$  SEM change from baseline rectal temperature (N = 6-12 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5- 78

dihydro-1H-1-carboxamidepyrazole. \* P < 0.05 compared to vehicle (F-test for the simple effect). Significant dose by time interactions for: 3Et-TFDP [F(1,36) = 6.97; P < 0.05], 3Pr-TFDP [F(1,43) = 9.66; P < 0.05], 3Ph-TFDP [F(1,29) = 4.99; P < 0.05], and 4Me-TFDP [F(1,18) = 4.58; P < 0.05]. In this set of experiments the mean basal temperature was 36.8 ± 0.16 °C.

**Figure 4:** Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140 µmol/kg; 4A), 3Pr-TFDP (200 µmol/kg; 4B) or dipyrone (140 µmol/kg) on baker's yeast-induced fever (0.135 g/kg, *ip*). Baker's yeast was injected *ip* at zero time. The arrow indicates the time of injection of the drugs tested. Data are reported as means ± SEM change from baseline rectal temperature (N = 6-12 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles. \*P < 0.001 compared to vehicle. #P < 0.05 compared to dipyrone (F-test for the simple effect). In this set of experiments the mean basal temperature was 36.8 ± 0.14 °C. 79

**Figure 5:** Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140 µmol/kg; 5A) or 3Pr-TFDP (200 µmol/kg; 5B) on the number of total cells present in rat cavity washes in the presence or absence of baker's yeast. Values represent the mean number of cells/mm<sup>3</sup> (N = 5-7 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles. \*P < 0.05 compared to saline; # P < 0.05 compared to yeast-vehicle. 79

**Figure 6:** Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140 µmol/kg, 4 h after yeast injection) or 3Pr-TFDP (200 µmol/kg, 4 h after yeast injection) on TNF-α (Figure 6A-B) and IL-1β (Figure 6C-D) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of baker's yeast (N = 5-7 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles. \*P < 0.05 compared to saline (two-way ANOVA). 80



## Manuscrito

**Figure 1:** Chemical structure of TFDPs 98

**Figure 2:** Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 2A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 2B) on the number of total cells present in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae*. The peritoneal fluid was collected at 4 h after *S.cerevisiae* injection. Values represent the mean number of cells/ $\text{mm}^3$  (n=9 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA). 99

**Figure 3:** Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) on the number of total cells present in rat cavity washes in the presence of *S.cerevisiae*. The peritoneal fluid was collected at 4 h after *S.cerevisiae* injection. Values represent the mean number of cells/ $\text{mm}^3$  (n=7-8 per group). \*P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA). 100

**Figure 4:** Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 4A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 4B) on Evans Blue dye content in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae*. Values represent the mean number of cells/ $\text{mm}^3$  (n=4-7 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA). 101

**Figure 5:** Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 5A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 5B) on MPO activity in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n=8-11 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA). 102

**Figure 6:** Lack of effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) on TNF- $\alpha$  (Fig. 6A-B) and IL-1 $\beta$  (Fig. 6C-D) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n= 6-8 per group). \* P<0.05 103

compared with saline (two-way ANOVA).

**Figure 7:** Lack of effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 104 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) on nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n= 7-10 per group). \* P<0.05 compared with saline (two-way ANOVA).

## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	21
<b>1.1 Regulação da temperatura corporal nos mamíferos</b>	21
1.1.1 Termorregulação em ambientes quentes	23
1.1.2 Termorregulação em ambientes frios	23
1.1.3 Envolvimento dos receptores de potencial transitório (TRP) na termorregulação	24
<b>1.2 Febre como parte da resposta de fase aguda</b>	26
1.2.1 Participação dos receptores <i>TOLL-like</i>	29
1.2.2 Pirógenos endógenos e PGE <sub>2</sub> na febre	30
1.2.3 Via simpática eferente como efetora da febre e neurotransmissores	34
1.2.4 Transmissão do sinal inflamatório periférico para o cérebro: vias humoral e neural	38
1.2.5 Produção de espécies reativas	41
1.2.6 Febre: benefícios versus riscos	43
<b>1.3 Atividade biológica de derivados pirazolínicos</b>	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	51
<b>PARTE II</b>	
Capítulo I – Artigo aceito para publicação	54
Capítulo II – Manuscrito	80
<b>PARTE III</b>	
<b>3. DISCUSSÃO</b>	106
<b>4. CONCLUSÕES</b>	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese apresenta os resultados sob a forma de artigo publicado (capítulo 1) e manuscrito submetido à publicação (capítulo 2).

O item Discussão apresenta interpretação e comentários gerais dos resultados obtidos nos dois artigos que compõem esse trabalho.

O item Conclusões apresenta as conclusões finais do trabalho, considerando os artigos científicos (capítulos 1 e 2).

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que são apresentadas nos itens Introdução e Discussão.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Regulação da temperatura corporal nos mamíferos

A temperatura corporal ( $T_c$ ) de animais homeotérmicos é mantida dentro de uma faixa de normalidade necessária para as funções celulares e moleculares adequadas, independentemente de oscilações na temperatura do ambiente (Nakamura e Morrison, 2008). No ser humano a  $T_c$  normal possui uma variação circadiana, oscilando entre aproximadamente  $36,4^\circ\text{C}$  durante a manhã e  $36,9^\circ\text{C}$  à tarde (Mackowiak, 1997). Os processos termorregulatórios dos mamíferos, dentre todos os vertebrados, são os mais investigados devido ao seu significado clínico (Seebacher, 2009).

A termorregulação é um processo coordenado pelo sistema nervoso central (SNC) (Simon, 1974, Boulant, 2000, Dimicco e Zaretsky, 2007) e compreende vários estágios (Nakamura e Morrison, 2008). A área pré-óptica do hipotálamo (APOH) é considerada o centro termorregulatório do organismo ou o “termostato central”, já que esta região é capaz de reconhecer as variações na temperatura do fluxo sanguíneo das áreas adjacentes e ativar as respostas termorregulatórias requeridas para manter a homeostase térmica (Bartfai e Conti, 2010). A  $T_c$  média é determinada pelo equilíbrio das atividades dos neurônios sensíveis à temperatura, presentes na APOH (Romanovsky, 2007).

Três diferentes classes de neurônios termorregulatórios têm sido identificadas na APOH (Boulant, 2000), os quais são conhecidos como termorreceptores centrais. Os neurônios sensíveis ao calor, os quais existem em maior número (Romanovsky, 2007, Bartfai e Conti, 2010), aumentam sua taxa de disparo em resposta a aquecimento local ou periférico e, quando ativados, estimulam a perda e inibem a produção de calor. Assim, a diminuição da taxa de disparo destes neurônios pode ser considerada uma resposta de defesa contra o frio (McGaraughty et al., 2009). Geralmente, estes neurônios aumentam sua taxa de disparo em temperaturas acima de  $25^\circ\text{C}$ . Por outro lado, os neurônios sensíveis ao frio, que existem em menor quantidade, são ativados por resfriamento local ou periférico, geralmente abaixo de  $35^\circ\text{C}$  (Nomoto et al., 2004), estimulando a produção de calor. No entanto, o papel termorregulatório destes últimos

ainda está sendo investigado, e sua sensibilidade ao frio parece ocorrer devido à aferências sinápticas inibitórias vindas de neurônios sensíveis ao calor localizados nas adjacências (Romanovsky, 2007). A terceira classe é composta pelos neurônios não-responsivos às alterações da temperatura, cujo papel na termorregulação ainda não foi esclarecido (Chen et al., 1998).

Neste contexto, durante muito tempo aceitou-se que o papel dos neurônios sensíveis ao frio e daqueles sensíveis ao calor seria recíproco, ou seja, todas as respostas termorregulatórias poderiam ser desencadeadas pela ativação de uma dessas classes ou pela inibição da outra (Bligh, 2006). No entanto, estudos envolvendo estimulação térmica e química de células da APOH mostraram que tanto as respostas autonômicas de defesa contra o frio, quanto aquelas de defesa contra o calor são iniciadas por alterações correspondentes na atividade dos neurônios sensíveis ao calor. Desta forma, a atividade aumentada dos neurônios sensíveis ao calor desencadeia respostas de defesa contra o calor, enquanto a diminuição na sua atividade dispara respostas contra o frio (Chen et al., 1998).

Além dos termorreceptores centrais, há ainda os sensores térmicos periféricos, que podem ser superficiais ou profundos. Os primeiros detectam a temperatura da pele e das mucosas, já os profundos respondem à temperatura do centro do corpo e estão localizados no esôfago, estômago e grandes veias abdominais, entre outros (Romanovsky, 2007). Estes termorreceptores são rapidamente sensibilizados quando há variação na temperatura ambiental, enviam as informações para o corno anterior da medula espinhal (Nomoto et al., 2004), as quais alcançam o hipotálamo por meio da rota espino-retículo-hipotalâmica (Romanovsky, 2007). As informações térmicas provindas da periferia são, então, comparadas com a temperatura estabelecida como normal e, se necessário, a APOH envia sinais descendentes para os efetores periféricos (Nagashima et al., 2000), a fim de evocar respostas comportamentais, autonômicas, somáticas e hormonais que objetivam a manutenção e a estabilidade da T<sub>c</sub> (Boulant, 2000). Desta forma, para manter a normotermia, sinais eferentes originados na APOH regulam a taxa de dissipação de calor através da superfície corporal e o metabolismo em tecidos termogênicos específicos (Morrison et al., 2008).

### **1.1.1 Termorregulação em ambientes quentes**

Quando há exposição a ambientes quentes inicia-se o processo de sudorese (Sessler, 2009), que é um importante mecanismo de dissipação de calor em humanos, juntamente com o relaxamento dos músculos piloerectores, permitindo maior circulação de ar sobre a pele (Gavva, 2008). Adicionalmente, respostas comportamentais contribuem para a perda de calor (Boulant, 2000).

O tônus vasomotor também exerce função relevante na termorregulação. Em ambientes quentes ocorre vasodilatação e conseqüente aumento da perfusão da pele, facilitando a perda de calor, já que o sangue transporta o calor do centro do corpo para a pele (Gavva, 2008).

Além disso, espécies como os ratos facilitam a perda de calor espalhando saliva na sua pele, em uma reação conhecida como “grooming” (Stricker e Hainsworth, 1970).

### **1.1.2 Termorregulação em ambientes frios**

A termogênese adaptativa em mamíferos é definida como a produção de calor em resposta à variação da temperatura ambiental, a qual protege o organismo contra a exposição ao frio. O principal componente efetor desta resposta é o sistema nervoso simpático, o qual inerva alvos termogênicos como o tecido adiposo marrom (TAM) e o músculo esquelético (Lowell e Spiegelman, 2000).

Embora a APOH exerça um papel semelhante em todos os mamíferos, os meios pelos quais a normotermia é alcançada diferem entre as espécies (DiMicco et al., 2006). Em ratos, por exemplo, a normotermia em um ambiente frio é mantida, em parte, através da vasoconstrição cutânea e da ativação metabólica do TAM, sendo este último o mecanismo mais importante para produção de calor em roedores (Cannon e Nedergaard, 2004). Embora Nedergaard e colaboradores (2007) tenham evidenciado a presença de TAM em regiões como a do pescoço, supraclavicular e mediastinal em humanos adultos, sua existência e significância ainda são alvo de controvérsias (Dimicco e Zaretsky, 2007).



A exposição a ambientes frios aumenta a atividade simpática causando vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo para a pele, especialmente nas extremidades do corpo (Gavva, 2008), a fim de minimizar a perda de calor para o ambiente, através de convecção (Thompson et al., 2005). Os neurônios do núcleo pálido da rafe (NPR) do bulbo exercem papel importante na regulação do metabolismo mediado simpaticamente, bem como na termogênese no TAM (Madden e Morrison, 2010). De fato, é consenso de que o NPR ativa os neurônios pré-ganglionares simpáticos controlando respostas termorregulatórias como a vasoconstrição da pele, respostas cardiovasculares e alterações metabólicas (Nakamura et al., 2004).

Estudo recente mostrou também o envolvimento de receptores serotoninérgicos na regulação da termogênese no TAM (Madden e Morrison, 2010).

Embora a vasoconstrição represente um importante ajuste fisiológico em resposta ao frio, para manter o equilíbrio térmico é necessário, também, que o corpo aumente sua taxa de produção de calor, o que é obtido pelo tremor dos músculos esqueléticos (Weller, 2005). Há evidências de que esta reação seja capaz de aumentar a produção de calor do organismo em 15 a 50% (Mackowiak, 1997). A termogênese por tremor é uma resposta involuntária da musculatura esquelética (Weller, 2005), embora possa ser inibida, em algum grau, por controle voluntário. Há décadas a importância do hipotálamo posterior no controle do tremor tem sido evidenciada. Neste sentido, acredita-se que neurônios desta região gerem sinais excitatórios estimulando o tremor (Nagashima et al., 2000).

### **1.1.3 Envolvimento dos receptores de potencial transitório (TRP) na termorregulação**

Como descrito previamente, para que a temperatura corporal dos mamíferos mantenha-se relativamente constante, a percepção das temperaturas ambiental e interna, bem como a transmissão destas informações para o cérebro (Nakamura e Morrison, 2008) são processos importantes.

Neste contexto, os mecanismos moleculares de termorrecepção cutânea têm sido recentemente investigados. Estudos têm sugerido que alguns dos receptores de

potencial transitório (TRP) são ativados por variações de temperatura, sendo denominados receptores termo-TRP. Desses, o TRPV (receptor de potencial transitório tipo vanilóide) 1, 2, 3 e 4 e o TRPM (receptor de potencial transitório tipo melastatina) 2, 4 e 5 são ativados pelo calor. Por outro lado, o TRPM 8 e o TRPA (receptor de potencial transitório tipo anquirina) 1 são ativados pelo frio (Patapoutian et al., 2003, Dhaka et al., 2006, Caterina, 2007).

Embora alguns autores defendam que, pelo menos, os canais TRPM8 e TRPV1 sejam ativados por voltagem, já que uma mutação nos sensores de tensão da membrana pode levar à alteração da sensibilidade térmica desses canais (Voets et al., 2004), os mecanismos pelos quais o calor ou frio ativam esses canais iônicos ainda não foram completamente entendidos.

Sabe-se que os receptores TRP possuem diferentes limiares de ativação (Patapoutian et al., 2003) e, embora cada um deles seja ativado dentro de uma estreita faixa de temperatura, a escala que eles podem abranger é muito extensa, indo do frio ao calor nocivos (Romanovsky, 2007). O TRPV1, por exemplo, é um sensor de temperatura alta, acima de 40°C (Caterina, 2007).

O envolvimento dos receptores TRP na termorregulação tem sido alvo de diversos estudos. Gavva e colaboradores (2007) evidenciaram o papel do TRPV1 na termorregulação de ratos através do bloqueio farmacológico deste receptor. No referido ensaio, os animais desenvolveram hipertermia, a qual, segundo os autores, ocorreu porque na ausência de sensores para temperatura alta, a temperatura ambiental é percebida como mais fria do que verdadeiramente é e, assim, uma resposta termorregulatória proporcional é iniciada. Outro estudo demonstrou que a administração endovenosa ou intraperitoneal de AMG0347, um antagonista TRPV1 altamente específico, induz hipertermia em ratos e camundongos. Além disso, este mesmo antagonista não causa hipertermia em camundongos TRPV1<sup>-/-</sup> (Steiner et al., 2007).

Além disso, Dhaka e colaboradores (2006) evidenciaram que o receptor TRPM8 está envolvido na detecção de temperaturas frias, já que camundongos TRPM8<sup>-/-</sup> mostraram não ter preferência por uma zona térmica confortavelmente quente quando expostos a ambientes frios.

## 1.2 Febre como parte da resposta de fase aguda

A febre é definida como um aumento regulado da Tc central, desencadeada por alteração no centro termorregulatório (Kluger, 1991, Boulant et al., 1997), a qual resulta de complexa interação entre respostas neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais coordenadas pelo hipotálamo (Saper e Breder, 1994).

Embora a febre seja reconhecida, desde a antiguidade, como uma manifestação de infecção (Atkins, 1984), ela pode ocorrer durante doenças auto-imunes ou neoplásicas, na trombose vascular, no infarto agudo do miocárdio e no estresse, entre outras condições (Blatteis, 2006).

Há evidências de que quando uma resposta inflamatória excede uma intensidade-limite, quantidades significativas de mediadores endógenos entram na circulação sistêmica e são disseminados a vários órgãos. Este resultado é um complexo arranjo de reações sistêmicas, coletivamente chamado de reação ou resposta de fase aguda, a qual é considerada a primeira linha de defesa do organismo (Zeisberger, 1999, Blatteis, 2006, Roth, 2006). Assim, é amplamente aceito que a febre é uma alteração neuroendócrina característica da reação de fase aguda (Blatteis e Sehic, 1997, Blatteis et al., 2005).

Os mastócitos, células sentinelas residentes em tecidos periféricos, quando ativados nos tecidos infectados ou injuriados, desencadeiam a resposta de fase aguda resultando em degranulação e liberação de quimiocinas (Luster, 1998), além de fatores de crescimento, citocinas, eicosanóides, cininas, aminas biogênicas e neuropeptídeos (Roth et al., 2009). No local da inflamação esses mediadores produzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo extravasamento de plasma e de fatores circulantes solúveis como imunoglobulinas e componentes da cascata do complemento (Blatteis, 2006), que consistem de aproximadamente vinte proteínas presentes no plasma sanguíneo (Blatteis e Sehic, 1997). A resposta de fase aguda inclui ainda alterações nas concentrações plasmáticas de metais-traços, proteínas de fase aguda, hormônios e uma série de sintomas não-específicos de doença chamados de *sickness behavior*, os quais incluem o desenvolvimento de febre, perda de apetite, diminuição da atividade motora, entre outros sinais (Dantzer et al., 2000).

O recrutamento de leucócitos é um dos eventos mais importantes na reação de fase aguda (Luster et al., 2005). Este processo compreende várias etapas, incluindo o rolamento e a adesão inicial dos leucócitos, que é dependente de selectinas; a ativação leucocitária induzida pelas quimiocinas; a adesão rígida mediada pelas integrinas e a migração transendotelial dos leucócitos (Rao et al., 2007).

Dentro deste contexto, mediadores quimiotáticos liberados como o fator de agregação plaquetária, os fatores da cascata do complemento (componentes 3b e 5a) e quimiocinas auxiliam no recrutamento de neutrófilos circulantes, macrófagos residentes e células dendríticas para o local da injúria, infecção ou inflamação (Dale et al., 2008). Além disso, a expressão de moléculas de adesão como as selectinas, as integrinas e as moléculas de adesão intracelular (ICAMs) e vascular (VCAMs) é imprescindível para a ocorrência de migração leucocitária (Luster et al., 2005).

As selectinas são glicoproteínas de membrana pertencentes a três grandes famílias: as L-selectinas, as P-selectinas e as E-selectinas (McEver, 2002), as quais são denominadas de acordo com o tipo celular no qual foram originalmente identificadas: leucócitos, plaquetas e endotélio, respectivamente (Kelly et al., 2007). As selectinas atuam em conjunto com outras moléculas para efetuar a adesão entre os leucócitos, as plaquetas e as células endoteliais (Bevilacqua e Nelson, 1993). A existência de grande afinidade das selectinas pelos carboidratos de superfície presentes nos leucócitos facilitam as interações leucócito-endotélio, as quais formam-se e desfazem-se em segundos, propiciando o rolamento dos leucócitos circulantes ao longo da parede vascular (McEver, 2002, Kelly et al., 2007).

A estabilização das ligações leucócito-endotélio mediadas pelas selectinas e a redução da velocidade de rolamento são efetuadas pelas integrinas (Carman e Springer, 2003). A subunidade beta-2, comum a todas as integrinas, são expressas na superfície dos neutrófilos e interagem com ligantes, particularmente com as ICAMs, que estão presentes na membrana da célula endotelial. Essas interações causam firme aderência do neutrófilo ao endotélio, a qual é necessária para a subsequente diapedese dos neutrófilos e quimiotaxia. Tanto a subunidade beta-2 das integrinas, quanto as ICAMs estão constitutivamente presentes sobre a superfície dos neutrófilos e células

endoteliais, porém sua expressão aumenta durante processos inflamatórios (Carlos e Harlan, 1990).

Após a aderência, os neutrófilos devem atravessar o endotélio para alcançar o espaço extravascular inflamatório, através da diapedese, processo rápido que perfaz aproximadamente 90 segundos *in vitro* e no qual o leucócito estende-se por um pseudópodo. A diapedese também é facilitada pelas moléculas de adesão plaqueta-célula endotelial tipo 1 (PECAM-1), que estão presentes na superfície lateral das células endoteliais, bem como nos neutrófilos. Sua ligação diminui a adesão do neutrófilo à ICAM, resultando em inibição da aderência e promoção da diapedese (Muller, 2003). Evidências experimentais têm mostrado que os neutrófilos migram através de estruturas juncionais específicas que unem as células endoteliais por suas bordas (Huang et al., 1993).

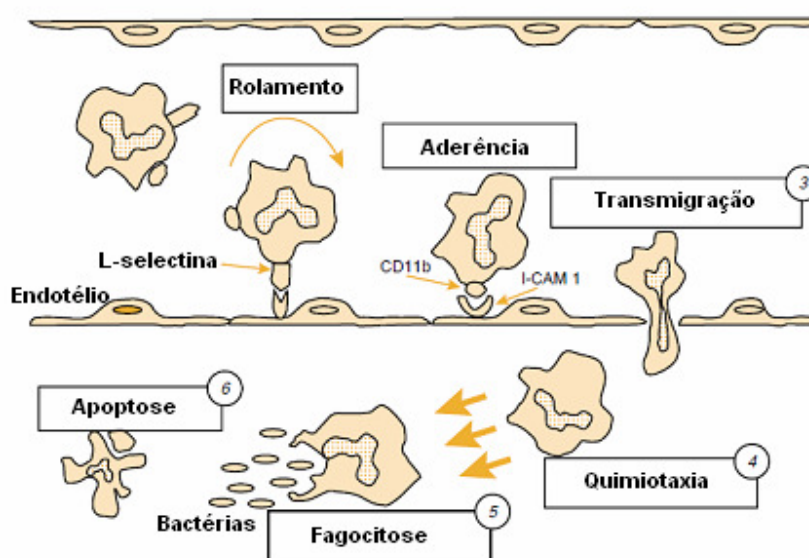


Figura 1: Mecanismos de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia de leucócitos. A inflamação induz migração de leucócitos marginais seguida pelo desenvolvimento de interações fracas entre as células endoteliais e os neutrófilos. Essas interações são mediadas pelas selectinas e seus ligantes, os quais facilitam o rolamento dos neutrófilos. A aderência dos neutrófilos é, então, potencializada pelas interações entre as beta-integrinas e as moléculas de adesão intercelulares (ICAMs). Os neutrófilos então migram para o sítio inflamatório por interações com moléculas quimioatrativas tais como as quimiocinas e produtos bacterianos. [Modificado de Seely et al., (2003)]

Os quimioatrativos, que são moléculas solúveis tais como alguns subprodutos bacterianos, componentes da cascata do complemento e quimiocinas têm o papel de atrair os leucócitos para os locais de injúria ou infecção. As quimiocinas constituem um grupo de mais de quarenta peptídeos, incluindo a interleucina-8 (IL-8), a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) e a quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES) (Zeisberger, 1999, Dale et al., 2008), as quais possuem afinidades específicas para cada tipo de leucócito. Assim, a característica do infiltrado inflamatório dentro do tecido injuriado é determinada pelo tipo de quimiocina secretada (Luster, 1998).

### **1.2.1 Participação dos receptores *TOLL-like***

Uma vez alcançando o sítio inflamatório, os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos, *natural killers* ou a microglia no SNC reconhecem componentes específicos dos microrganismos chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento de padrões (Anderson, 2000). Os PAMPs são produzidos pelos microrganismos patogênicos, mas não pelas células do hospedeiro (Takeda et al., 2003). Há evidências de que grande parte dos receptores de reconhecimento de padrões pertençam ao grupo dos receptores *TOLL-like* (TLRs) (Pavlov e Tracey, 2004). Essas proteínas possuem um único domínio transmembrana e compartilham domínios extracelulares semelhantes, os quais são também similares ao domínio citoplasmático do receptor da interleucina-1 (IL-1), o TIR (região homóloga ao receptor Toll/IL-1) (Anderson, 2000).

Cada subtipo de receptor TLR reconhece padrões moleculares específicos, como por exemplo, o TLR-4 detecta a porção lipídica do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e o TLR-2 reconhece o zimosan, um polissacarídeo presente na parede celular dos fungos (Takeda et al., 2003). Quando em combinação com o TLR-1, o TLR-2 reconhece lipoproteínas triaciladas e, em conjunto com o TLR-6, detecta lipoproteínas diaciladas de bactérias gram positivas (Baeuerle e Henkel, 1994).

Os TLRs, quando ativados, interagem com uma proteína adaptadora, a MyD88, a qual recruta a proteína quinase associada ao receptor da IL-1 (IRAK) (Suzuki et al.,

2002). A IRAK é ativada por fosforilação e então liga-se ao fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (TRAF6) (Wu e Arron, 2003). Essa associação induz a ativação de vias de sinalização celular distintas como a via do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), tais como a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a p38, regulando assim a expressão de citocinas e co-estimuladores nas células imunológicas e ativando respostas imunológicas adaptativas (Nathan, 2002).

O NF- $\kappa$ B é considerado o principal fator de transcrição envolvido na resposta inflamatória, já que é responsável por estimular a expressão de diversas proteínas pró-inflamatórias como as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), além de quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas (Nadjar et al., 2005). Estas últimas são comumente chamadas de pirógenos endógenos (Kluger, 1991, Luheshi e Rothwell, 1996, Dinarello et al., 1999) e fazem parte de um grupo de proteínas solúveis que agem como reguladores humorais modulando a função de células e tecidos (Roth et al., 2009). Segundo Zeisberger e Roth (1998), pirógeno é um termo genérico que designa qualquer substância, endógena ou exógena, que induz febre quando administrada dentro do organismo. Inúmeros estudos têm evidenciado que pirógenos exógenos, como as bactérias, quando em contato com o organismo do hospedeiro, provocam febre por induzir a síntese de pirógenos endógenos (Roth et al., 2009).

### **1.2.2 Pirógenos endógenos e PGE<sub>2</sub> na febre**

O TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a interleucina-6 (IL-6) constituem-se as principais citocinas envolvidas na resposta pirogênica (Saper e Breder, 1994, Luheshi, 1998, Dinarello et al., 1999). Evidências experimentais mostraram que o TNF- $\alpha$  e a IL-6 podem ser detectados na corrente sanguínea após estímulo inflamatório com LPS (Roth et al., 1993) e que a administração sistêmica de IL-1, TNF- $\alpha$  (Dinarello et al., 1986) e IL-6 (Blatteis et al., 1990) causam febre. Em outras pesquisas, o tratamento com antagonista para o receptor da IL-1, anticorpos anti-TNF- $\alpha$  (Roth e De Souza, 2001) e anti-IL-6

(Cartmell et al., 2000) atenuou a febre induzida por LPS. Além disso, camundongos que não expressam IL-1 não desenvolvem febre intensa (Kozak et al., 1998b).

Um significativo número de estudos tem sugerido que as citocinas estimulam a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) na APOH (Blatteis e Sehic, 1997). Essa e outras evidências experimentais suportam a idéia de que a PGE<sub>2</sub> é o mediador final da febre no SNC (Roth et al., 2009). Por exemplo, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de PGE<sub>2</sub> induz febre (Milton e Wendlandt, 1971) e seus níveis aumentam no sangue (Milton, 1998) e no cérebro (Sehic et al., 1996) concomitantemente com o aumento da temperatura corporal durante o processo febril. Além disso, drogas que bloqueiam a síntese de prostaglandinas também efetivamente inibem a febre (Milton, 1998, Zeisberger, 1999, Roth e De Souza, 2001).

A PGE<sub>2</sub> é sintetizada a partir do ácido araquidônico, o qual é liberado dos glicerofosfolipídios de membrana pela ação hidrolítica da fosfolipase A<sub>2</sub> (Figura 2). Em um segundo passo, o ácido araquidônico liberado é convertido em prostanóides intermediários instáveis por ação da prostaglandina H sintase, enzima chave na biossíntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, a qual possui atividade de ciclooxigenase (COX) e de hidroxidase (Kulmacz et al., 2003). O componente COX incorpora oxigênio ao ácido araquidônico, convertendo-o a PGG<sub>2</sub> e a porção hidroxidase reduz hidróperóxidos como a PGG<sub>2</sub> ao seu álcool correspondente, a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (Roth, 2006). A PGH<sub>2</sub> é, então, convertida a cinco prostanóides primários (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>) por sintases específicas (Hata e Breyer, 2004). A prostaglandina E-sintase (PGES) é responsável pela conversão da PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> (Blatteis et al., 2000, Aronoff e Neilson, 2001).



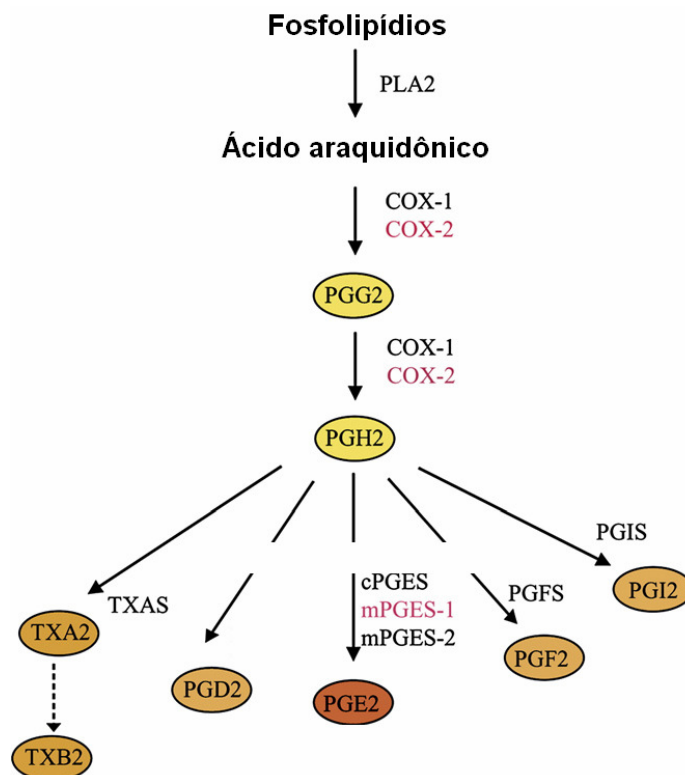


Figura 2: Via da COX. [Modificado de Pecchi e colaboradores (2009)]

A COX está presente sob três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3, que é derivada da COX-1 (Simmons et al., 2004). A COX-1 é expressa constitutivamente e origina prostanóides importantes para funções homeostáticas (Simon, 1999). Por outro lado, a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios tais como as citocinas pirogênicas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 ou por LPS, embora existam evidências de que ela também seja expressa constitutivamente no cérebro (Yamagata et al., 1993), rim (Harris et al., 1994) e epitélio traqueal (Walenga et al., 1996). Estudos utilizando camundongos geneticamente modificados que não expressam os genes da COX-1 ou da COX-2 demonstraram que esta última é a isoforma responsável pela produção de PGE<sub>2</sub> hipotalâmica durante a febre (Li et al., 1999). As células endoteliais microvasculares e as células microgliais perivasculares são responsáveis pela produção de PGE<sub>2</sub> no SNC, expressando grandes quantidades da proteína COX-2 (Elmqvist et al., 1997, Li et al., 1999).

Nas últimas duas décadas, inúmeras evidências sobre o papel mediador da PGE<sub>2</sub> na febre têm sido relatadas (Coceani e Akarsu, 1998, Saper, 1998, Dinarello et al., 1999). Pesquisas em modelos animais e humanos têm evidenciado que a COX-2 exerce papéis dinâmicos na geração da febre induzida por LPS, fermento e citocinas (Simmons et al., 2000). Neste contexto, estudos utilizando roedores evidenciaram que a COX-2 induz febre e que ocorre aumento na sua expressão em tipos celulares específicos do cérebro. A febre induzida por LPS, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  é acompanhada por indução de RNA mensageiro da COX-2 no endotélio cerebral de ratos (Quan et al., 1998), especificamente nas células endoteliais das veias e vênulas e de artérias no cérebro e cordão espinhal (Cao et al., 1997).

No processo febril, durante a síntese hipotalâmica de PGE<sub>2</sub>, a COX-2 acopla-se à PGE sintase microssomal (mPGES-1), formando um complexo. O fato de que ambas enzimas são induzidas por estímulos pirogênicos (Samuelsson et al., 2007) e que camundongos que não as expressam são incapazes de desenvolver febre (Li et al., 2001, Engblom et al., 2003), constituem evidências experimentais que suportam a participação das duas enzimas na síntese de PGE<sub>2</sub>. Além disso, estudos de hibridização *in situ* mostraram que a expressão da COX-2 e da mPGES-1 aumenta nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica de ratos após tratamento dos mesmos com IL-1 $\beta$  (Ek et al., 2001).

A PGE<sub>2</sub> exerce suas ações no hipotálamo pela interação com, pelo menos, quatro subtipos de receptores de membrana específicos, o EP<sub>1</sub>, o EP<sub>2</sub>, o EP<sub>3</sub> e o EP<sub>4</sub> (Sugimoto, 2000, Oka, 2004), os quais são codificados por genes distintos (Negishi et al., 1995). Estes receptores são acoplados à proteína G e apresentam sete domínios transmembrana, possuindo diferentes perfis de transdução de sinal e muitas vezes, ações celulares opostas (Hata e Breyer, 2004). Assim, o subtipo EP<sub>1</sub> está envolvido com a mobilização do cálcio intracelular através da ativação da fosfolipase C, via proteína Gq (Narumiya et al., 1999). O receptor EP<sub>3</sub>, por sua vez, está acoplado a uma proteína Gi, inibindo a atividade da adenilato ciclase e reduzindo, conseqüentemente, os níveis de AMP cíclico (Toh et al., 1995), o que parece estar envolvido na gênese da febre (Steiner et al., 2002). Já o receptor EP<sub>2</sub> e o EP<sub>4</sub> ativam a adenilato ciclase, via proteína Gs (Narumiya et al., 1999).

O subtipo EP<sub>3</sub> é abundantemente expresso no soma e dendritos de neurônios de sub-regiões específicas da APOH, o núcleo pré-óptico medial (NPOM) e a área pré-óptica medial (APOM) (Nakamura et al., 2000) e parece ser o principal receptor prostaglandinérgico envolvido na gênese da febre. Neste sentido, Ushikubi e colaboradores (1998) evidenciaram que camundongos que não expressam o receptor EP<sub>3</sub> não desenvolvem febre em resposta a injeção periférica ou central de LPS, IL-1 $\beta$  ou PGE<sub>2</sub>. Por outro lado, camundongos selvagens ou aqueles que não expressam os receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> exibem semelhante aumento na temperatura corporal quando injetados com os pirógenos citados acima. No entanto, estudo posterior mostrou que camundongos deficientes do receptor EP<sub>1</sub> exibiram atenuação da febre induzida por endotoxina (Oka et al., 2003a). Além disso, ensaios farmacológicos utilizando agonistas e antagonistas dos receptores EP sugeriram envolvimento dos subtipos EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> na febre induzida por PGE<sub>2</sub> (Oka et al., 2003b) e IL-1 $\beta$  (Oka et al., 1998).

### **1.2.3 Via simpática eferente como efetora da febre e neurotransmissores**

Como previamente descrito, a PGE<sub>2</sub> ao ativar os receptores localizados nos neurônios, estimula o circuito neuronal da febre (Elmqvist et al., 1997, Matsumura et al., 1998). O sistema nervoso simpático participa desse circuito regulando a Tc (Nakamura et al., 2004). Neste sentido, diversos estudos têm sugerido que a porção rostral do núcleo pálido da rafe (NPR) e o núcleo magno da rafe (NMR) contêm neurônios que medeiam a transmissão dos sinais pirogênicos, desencadeados pela PGE<sub>2</sub>, da APOH para os neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPSs) (Nakamura et al., 2002). Estes últimos, por sua vez, enviam as informações para os órgãos efetores termorregulatórios através dos neurônios pós-ganglionares (Nakamura et al., 2004). Dessa forma, Nakamura e colaboradores (2005) sugeriram que os neurônios da rafe representam os neurônios pré-motores simpáticos para a indução da febre.

Os terminais axonais dos neurônios da rafe estão distribuídos na coluna de células intermediolateral da medula espinhal torácica, onde se encontram os NPSs (Nakamura et al., 2005). O glutamato é o neurotransmissor envolvido na sinapse

excitatória entre os neurônios da rafe e os NPSs, participando tanto da indução da febre como da regulação da Tc (Nakamura et al., 2004). Neste sentido, inúmeras evidências têm suportado o envolvimento da via glutamatérgica na gênese do processo febril. Lin e colaboradores (1999) mostraram que a injeção sistêmica de LPS induz a liberação de glutamato e a expressão da proteína *c-fos* no núcleo do trato solitário de ratos. Outro estudo sugeriu a participação dos receptores glutamatérgicos na resposta febril e alterações comportamentais associadas com infecção por LPS em camundongos (Weiland et al., 2006). Além disso, Huang e colaboradores (2001) evidenciaram que a administração endovenosa de enterotoxina A produz febre e aumenta as concentrações de glutamato no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) de coelhos. No mesmo estudo, tanto o pré quanto o pós-tratamento dos animais com MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, atenuou significativamente o aumento da temperatura corporal e os níveis de glutamato.

Além do sistema glutamatérgico, aquele relacionado ao ácido gama-aminobutírico (GABA) também exerce papel importante na regulação da Tc (Nakamura et al., 2002). Estudos têm mostrado que antagonistas do receptor GABA<sub>A</sub> provocam a desinibição do rNPR e NMR, aumentando a atividade do TAM (Morrison et al., 1999) de ratos, enquanto a administração de agonistas GABA<sub>A</sub> bloqueiam as ações pirogênicas da PGE<sub>2</sub>, provavelmente por suprimir a excitação dos neurônios do rNPR. Essas evidências experimentais sugerem que os neurônios termorregulatórios da rafe são tonicamente inibidos por impulsos GABAérgicos oriundos da APOH e a liberação dessa inibição tônica, disparada pela PGE<sub>2</sub>, leva à estimulação do sistema simpático, a qual é necessária ao desenvolvimento da febre (Nakamura et al., 2002).

Recentemente, o papel do núcleo hipotalâmico dorsomedial (HDM) na termorregulação tem sido investigado (Cao et al., 2004). Acredita-se que o HDM contenha neurônios termogênicos e que sua atividade também seja controlada por inibição tônica GABAérgica (Nakamura et al., 2004, Nakamura et al., 2005). Além disso, é possível que esses neurônios sejam desinibidos em circunstâncias nas quais a termogênese seja requerida e enviem sinais excitatórios para que os neurônios da rafe estimulem o aumento da atividade no TAM (Madden e Morrison, 2003).

Existem indícios de que a origem dos sinais tônicos GABAérgicos às regiões da rafe e HDM esteja nos neurônios da APOH que expressam receptores EP<sub>3</sub>, os quais projetam-se diretamente ao rNPR e NMR e são positivos para um marcador neuronal GABAérgico (Nakamura et al., 2002, Yoshida et al., 2003). Assim, a PGE<sub>2</sub>, ao ligar-se nos receptores EP<sub>3</sub> na APOH, eliminaria a inibição tônica GABAérgica dos neurônios da rafe e/ou do HDM, ativando-os e estes, por sua vez, enviariam sinais excitatórios para o rNPR e NMR. Apesar das evidências que permitem propor possíveis rotas da APOH às regiões da rafe (figura 3), mais estudos são necessários para caracterizar essas vias (Nakamura et al., 2004).

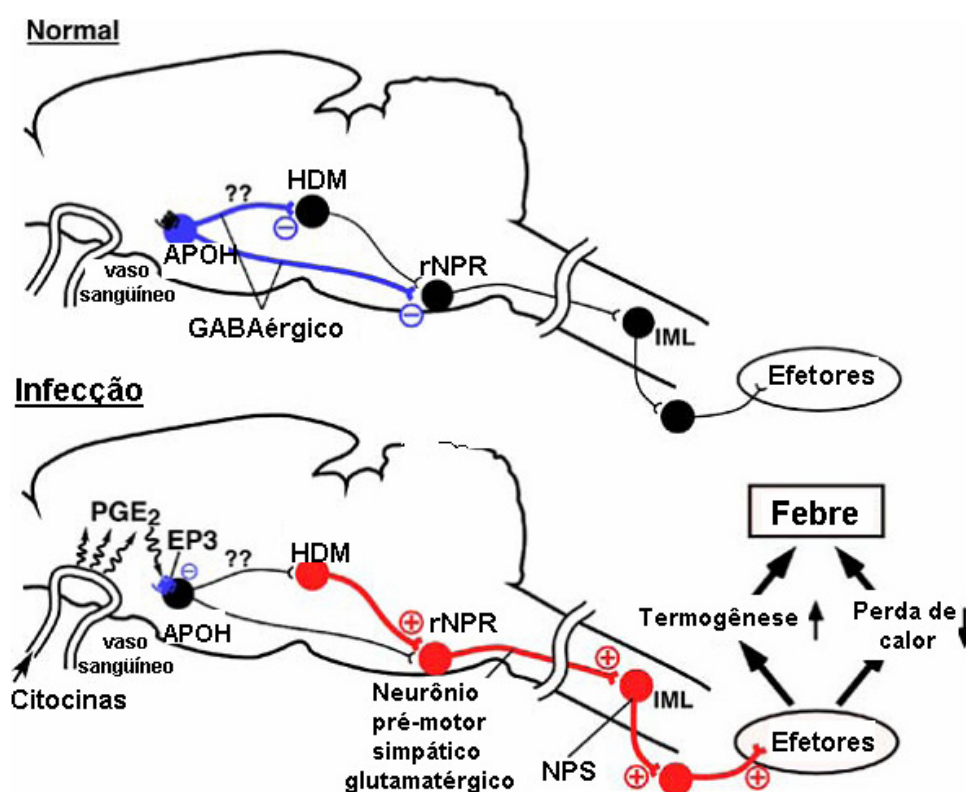


Figura 3: Vias neuronais eferentes envolvidas na febre induzida por PGE<sub>2</sub> na APOH. Em condições livres de PGE<sub>2</sub> (normal), os neurônios da porção rostral do núcleo pálido da rafe (rNPR) e do núcleo hipotalâmico dorsomedial (HDM) estão tonicamente inibidos por sinais dos neurônios da APOH que expressam receptores EP<sub>3</sub>, os quais podem ser GABAérgicos; a PGE<sub>2</sub> que é produzida centralmente

na infecção suprime o sinal tônico dos neurônios da APOH ativando o receptor EP<sub>3</sub>, e desinibe os neurônios do rNPR e do HDM. A desinibição dos neurônios do HDM poderia ativar os neurônios do rNPR, os quais, por sua vez, estimulam o sistema nervoso simpático e finalmente induzem febre. O receptor EP<sub>3</sub> é geralmente considerado um receptor supressor por estar acoplado a uma proteína inibitória ligada ao GTP. Note que a projeção dos neurônios que expressam o receptor EP<sub>3</sub> da APOH ao HDM ainda não foi estabelecida. Os círculos azuis, vermelhos e pretos denotam corpos celulares de neurônios inibitórios ativados, neurônios excitatórios ativados e neurônios suprimidos, respectivamente. [Modificado de Nakamura et al., 2002].

Há décadas vêm sendo evidenciado o envolvimento da norepinefrina (NE) na febre induzida por vários estímulos. Em porcos da Índia, por exemplo, a sua administração na APOH induz aumento da temperatura corporal (Zeisberger, 1999). A estimulação elétrica das vias noradrenérgicas ascendentes no tronco encefálico induz o mesmo resultado (Szelenyi et al., 1976), enquanto a simpatectomia química abole esta resposta (Szelenyi et al., 1977). A febre induzida por NE injetada intracerebroventricularmente em gatos pode ser prevenida por aspirina, sugerindo que a sua ação hipertérmica pode ser exercida através da PGE<sub>2</sub> (Lin, 1976), enquanto outro estudo não encontrou nenhuma interação mútua entre a NE e a PGE<sub>2</sub> (Myers e Waller, 1976).

Durante o processo de indução da febre, os pirógenos ativam as vias noradrenérgicas no cérebro (Dunn e Wang, 1995) e a NE é liberada na APOH (Linthorst et al., 1995). Neste sentido, Wieczorek e Dunn (2006) demonstraram que a administração i.p. de IL-1 $\beta$  induz febre em ratos, a qual é acompanhada de aumento concomitante da liberação de NE no hipotálamo medial e das concentrações plasmáticas do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Segundo os mesmos autores, o pré-tratamento com indometacina, um inibidor da COX, previne o aumento da temperatura corporal e da liberação de NE e somente atenua o aumento do ACTH, indicando a existência de uma relação entre a liberação de NE, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e a temperatura corporal.

O envolvimento do sistema opióide no controle da Tc e na febre tem sido, também, alvo de investigação. A naloxona, um antagonista não específico e o CTAP (D-Phe-Cys-Trp-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>), antagonista específico dos receptores  $\mu$ -

opióides bloqueiam a febre induzida por LPS (Blatteis et al., 1991). Estudo recente mostrou que camundongos que não expressam o receptor  $\mu$ -opióide não desenvolvem febre após administração prévia de LPS (Benamar et al., 2005). Estes resultados sugerem que a ativação do sistema opióide é necessária para o desenvolvimento da febre após administração do LPS.

Fraga e colaboradores (2008) mostraram que a administração s.c., i.c.v ou intra-hipotalâmica de morfina produz aumento dose-dependente na T<sub>c</sub>, o qual foi abolido pelo CTAP. Além disso, os mesmos autores verificaram que o antagonista supracitado reduz a febre induzida pela injeção i.c.v. de TNF- $\alpha$ , IL-6, endotelina-1 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP), mas não é capaz de interferir na febre causada por IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>. Outro estudo evidenciou previamente que antagonistas opióides são capazes de reverter a febre induzida por IL-1 $\beta$  (Tsai et al., 2003). Assim, dados conflitantes mostram que não há consenso entre os autores quanto à contribuição dos opióides endógenos na febre.

#### **1.2.4 Transmissão do sinal inflamatório para o cérebro: vias humoral e neural**

Sabe-se que as citocinas não atuam somente na periferia para coordenar a reação de fase aguda, mas também no cérebro para induzir febre, ativar o eixo HHA e desenvolver comportamentos de doença (Dantzer et al., 2000). No entanto, os mecanismos que permitem a esses peptídeos hidrofílicos, com peso molecular variando entre 15 e 25 Kd, estimular as estruturas termorregulatórias hipotalâmicas não estão completamente esclarecidos (Blatteis et al., 2000, Roth et al., 2009).

Alguns autores defendem que as citocinas seriam transportadas pela corrente sanguínea, podendo agir nos órgãos circunventriculares, que são estruturas cerebrais cujas células estão em contato com o sistema cerebroventricular e que possuem densa vascularização e falhas na barreira hematoencefálica (BHE) (Roth et al., 2009). Dentre os órgãos circunventriculares destaca-se o OVLT, estrutura adjacente à APOH, que possui capilares com endotélio fenestrado (Roth et al., 2004). Nestas estruturas, as citocinas induziriam a síntese e liberação de PGE, a qual poderia difundir-se livremente pelo parênquima cerebral alcançando estruturas como a APOH para induzir febre e o

núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH) para ativar o eixo HHA (Dantzer et al., 2000). Também foi proposto que as citocinas poderiam ligar-se aos seus receptores específicos nas células endoteliais da microvasculatura cerebral (Matsumura e Kobayashi, 2004) ou da microglia perivascular ou em macrófagos de meninges (Schiltz e Sawchenko, 2003) e, a partir dessa interação, estimular sua auto-liberação no interior do SNC. Essa liberação ativaria as células adjacentes, disseminando o sinal imunológico no cérebro (Matsumura e Kobayashi, 2004).

A hipótese humoral descrita acima começou a ser questionada quando pesquisadores apontaram a existência de citocinas (Gatti e Bartfai, 1993) e de seus receptores específicos dentro do SNC (Cunningham e De Souza, 1993). Além disso, estudos demonstraram que as citocinas expressas no cérebro são as mesmas identificadas na periferia (Dantzer et al., 2000) e que o bloqueio das ações desses mediadores no cérebro inibe a resposta do hospedeiro à infecção (Kent et al., 1992).

Dentro deste contexto, outros mecanismos foram propostos a fim de explicar como os pirógenos endógenos sinalizam as estruturas termorregulatórias hipotalâmicas. Alguns estudos sugeriram que as citocinas poderiam ser ativamente transportadas através da BHE por carreadores específicos (Banks et al., 1995). No entanto, algumas evidências experimentais contribuíram para a pouca aceitação desta hipótese, como por exemplo, a identificação imprecisa desses transportadores ou a falta de correlação entre os níveis de citocinas circulantes e o comportamento de doença (Dantzer et al., 2000). Além disso, o curso temporal e a quantidade de citocinas carreadas não justificam o início rápido da febre, principalmente após sua indução experimental através de administração intravenosa de pirógenos (Blatteis, 2006). A resposta febril ao LPS, por exemplo, possui uma latência muito curta, em torno de 10 minutos e manifesta-se de forma bi- ou multifásica (Romanovsky et al., 1998), sendo que a primeira dessas fases parece ser iniciada antes do aparecimento de quantidades suficientes de citocinas pirogênicas no sangue (Cannon et al., 1993, Blatteis e Sehic, 1997). De fato, os fagócitos mononucleares não possuem um estoque de citocinas disponível para liberação imediata, exceto os mastócitos, que armazenam TNF- $\alpha$  e IL-6 em pequenas quantidades (Malaviya e Georges, 2002).



Uma teoria envolvendo os neurônios aferentes foi, então, proposta a fim de explicar como a mensagem pirogênica seria transmitida de forma rápida da periferia para o cérebro. Neste sentido, Morimoto e colaboradores (1987) já especulavam que os nervos periféricos ocupavam papel de destaque no processo febril. A partir de então, diversos estudos evidenciaram que a febre poderia ser atenuada ou prevenida através da ressecção cirúrgica do ramo abdominal do nervo vago (Watkins et al., 1995, Blatteis e Sehic, 1997, Dantzer, 2001). Simons e colegas (1998) mostraram que a vagotomia hepática seletiva inibe o aumento da Tc e dos níveis de PGE<sub>2</sub> pré-óptica induzidos por LPS em ratos e cobaias. Em outro estudo, a administração de IL-1 na veia porta de ratos foi capaz de aumentar a taxa de disparo dos aferentes vagais hepáticos (Nijima, 1996). Além disso, a vagotomia subdiafragmática mostrou inibir a expressão da proteína c-fos nas áreas cerebrais que são ativadas em resposta à administração sistêmica de LPS (Wan et al., 1994). Diante desses resultados, sugeriu-se que o LPS ativaria os macrófagos hepáticos ou células de Kupffer (cK) causando a liberação de citocinas periféricas, as quais ativariam os aferentes vagais hepáticos, transmitindo rapidamente a mensagem pirogênica à APOH (Blatteis et al., 2004, Blatteis et al., 2005). De fato, foram identificados receptores para IL-1 $\beta$  no paraglânglio abdominal do nervo vago (Goehler et al., 1999).

No entanto, a existência de receptores para a PGE<sub>2</sub> nos neurônios sensoriais vagais levou alguns pesquisadores a sugerir que este mediador inflamatório seria o responsável pela ativação vagal (Oka, 2004). Além disso, logo após a administração e.v. de LPS níveis elevados de PGE<sub>2</sub> podem ser detectados no sangue venoso de coelhos (Rotondo et al., 1988), cobaias (Perlik et al., 2005) e em ratos (Steiner et al., 2006). Ainda neste contexto, evidenciou-se que o LPS alcança o fígado através da corrente sanguínea, onde interage com as cK através da proteína ligante de LPS (LBP), formando o complexo LPS-LBP, o qual liga-se aos receptores TLR4 e/ou CD-14. O estímulo pirogênico também induz a liberação de fatores do complemento, como o C5a, que estimulam as cK a produzir e liberar PGE<sub>2</sub> (Blatteis et al., 2004). De fato, essas células expressam constitutivamente ambas isoformas da COX e evidências experimentais mostram que a síntese e liberação de PGE<sub>2</sub> na corrente sanguínea ocorre em correlação temporal com a febre após administração e.v. de LPS (Li et al.,

2006). Finalmente a PGE<sub>2</sub> periférica estimularia os aferentes vagais hepáticos, de forma que a mensagem pirogênica seria transmitida à APOH provavelmente através do núcleo do trato solitário (NTS) (Wan et al., 1994).

### 1.2.5 Produção de Espécies Reativas

Após alcançar os tecidos infectados, os leucócitos ativados promovem a resposta inflamatória localizada, liberando metabólitos tóxicos como as proteases, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Nathan, 2002).

As EROs consistem de moléculas contendo elétrons desemparelhados como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o radical hidroxila (<sup>•</sup>OH) e de moléculas que apresentam propriedades oxidantes mas que não possuem elétrons livres, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Klebanoff, 1980). Por outro lado, o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) constitui-se a principal ERN (Ding et al., 1988).

Os neutrófilos possuem um complexo enzimático transmembrana denominado nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH)-oxidase, cuja ativação dá início à produção de grandes quantidades de EROs. Este sistema é responsável pela “explosão respiratória”, ou seja, o consumo de oxigênio pelas células fagocíticas é aumentado cerca de três vezes durante a ingestão de microrganismos (Babior et al., 2002). A NADPH-oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular a O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, às custas da oxidação do NADPH citoplasmático. O superóxido produzido é, então, liberado no meio extracelular ou é mantido no interior de um fagossomo (Bedard e Krause, 2007). O fagossomo é uma estrutura resultante da união do vacúolo fagocítico com um grânulo intracelular que contém, na membrana, a NADPH-oxidase e, no seu interior, inúmeras enzimas com atividade antimicrobiana. No fagossomo o superóxido é convertido a outras espécies reativas potencialmente mais tóxicas como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o ONOO<sup>-</sup> (Kobayashi et al., 2003).

Além da NADPH-oxidase, os fagócitos contêm sistemas enzimáticos adicionais que são capazes de gerar EROs como produtos das reações de transferência de elétrons durante a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, cujo mecanismo

envolve a redução do oxigênio a  $O_2^{\bullet-}$ . No entanto, como os neutrófilos possuem relativamente poucas mitocôndrias, a importância dessas organelas como fonte de EROs ainda não foi estabelecida (Fialkow et al., 2007).

O metabolismo do ácido araquidônico catalisado pelas COXs e lipoxigenases também gera EROs. Durante ação da prostaglandina H sintase, equivalentes oxidantes, primariamente na forma de  $O_2^{\bullet-}$ , são liberados pela atividade hidroxidase desta enzima através de reações dependentes da presença do substrato redutor NADH ou NADPH. De forma semelhante, a 5-lipoxigenase também pode produzir  $O_2^{\bullet-}$  (Fialkow et al., 2007).

A mieloperoxidase, enzima secretada principalmente por neutrófilos ativados, catalisa a conversão do  $H_2O_2$  a HOCl (Kobayashi et al., 2003), bem como a oxidação da tirosina a radical tirosil usando o  $H_2O_2$  como agente oxidante. Ambos produtos são citotóxicos, contribuindo para a destruição de microrganismos invasores (Heinecke et al., 1993). Os neutrófilos também expressam enzimas do complexo do citocromo P450, o qual é fonte de EROs como  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  (Fialkow et al., 2007).

Há evidências de que as EROs exercem papel importante na modulação de outros mediadores inflamatórios, por exemplo, a expressão de moléculas de adesão no endotélio e células, afetando o recrutamento celular para os sítios de inflamação (Fracicelli et al., 1996). As EROs também aumentam a expressão de quimiocinas e citocinas (Bogdan et al., 2000). Acredita-se que, ao menos, parte desses efeitos resultem da habilidade das EROs em estimular a atividade das MAP-quinases, que leva à ativação de vários fatores de transcrição. É possível que as EROs intracelulares possam agir como segundos mensageiros na transdução do sinal inflamatório (Guzik et al., 2003).

A óxido nítrico sintase (NOS) converte a L-arginina e o oxigênio molecular a L-citrulina e óxido nítrico ( $ON^{\bullet}$ ), na presença de cofatores como a NADPH (MacMicking et al., 1997). As três principais isoformas conhecidas da NOS possuem estrutura molecular semelhante, requerem múltiplos cofatores e foram denominadas de acordo com o tipo celular no qual elas foram primeiramente isoladas (Guzik et al., 2003). As isoformas da NOS consideradas constitutivas são a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), as quais são ativadas pelo influxo de  $Ca^{2+}$ , ligando-se à calmodulina. No

entanto, estudos identificaram NOS constitutiva, dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , também em timócitos de ratos (Cruz et al., 1998), em monócitos e macrófagos humanos e em linfócitos T e B (Reiling et al., 1996). Por outro lado, a NOS de macrófagos e neutrófilos (mNOS) é induzida pelas citocinas e por outros estímulos inflamatórios, sendo que sua atividade independe de  $\text{Ca}^{2+}$  (MacMicking et al., 1997, Bogdan et al., 2000).

O  $\text{NO}^{\bullet}$  formado pela eNOS é responsável pela manutenção do baixo tônus vascular e também por prevenir a adesão de leucócitos e plaquetas às paredes vasculares (Ignarro, 2000). Por sua vez, o  $\text{NO}^{\bullet}$  gerado pela ação da nNOS pode agir como um neuromodulador ou neuromediador em alguns neurônios centrais e em terminais nervosos periféricos. Já o  $\text{NO}^{\bullet}$  formado pela NOS induzível exerce diversas funções na resposta inflamatória, entre elas contribuir para a morte microbiana (Guzik et al., 2003).

O  $\text{NO}^{\bullet}$  pode afetar diversas respostas celulares e apresentar efeitos pró- ou antiinflamatórios, como por exemplo, inibindo a adesão leucocitária. Fisiologicamente podem ocorrer interações importantes entre o  $\text{NO}^{\bullet}$  e as EROs. O  $\text{NO}^{\bullet}$  pode combinar-se com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , formando  $\text{ONOO}^-$ , composto que medeia os efeitos citotóxicos do  $\text{NO}^{\bullet}$ , tais como danos ao DNA (Guzik et al., 2003).

Como evidenciado acima, a geração de espécies reativas em um processo inflamatório contribui para a transdução do sinal inflamatório, além de levar à produção de citocinas e à eliminação de agentes patogênicos (Fialkow et al., 2007). No entanto, o excesso desses intermediários pode causar estresse oxidativo, que leva a dano tecidual com peroxidação lipídica e desintegração estrutural de proteínas e ácidos nucleicos (Cooke et al., 2003).

### **1.2.6 Febre: benefícios *versus* riscos**

Embora a febre seja considerada uma resposta limitada aos mamíferos e pássaros, muitos outros animais, incluindo vertebrados ectotérmicos, artrópodes e anelídeos aumentam sua temperatura central em resposta à infecção (Kluger et al., 1996). Desta forma, considera-se que a febre seja filogeneticamente antiga (Hasday et

al., 2000) e beneficie o hospedeiro, já que se manteve dentro do processo evolutivo (Kluger, 1991, Zeisberger, 1999)

Nas últimas duas décadas, inúmeros estudos têm descrito que a febre aumenta a eficiência do sistema imunológico. Durante o processo febril ocorre aumento na fagocitose e na mobilidade e atividade leucocitária (Elmqvist et al., 1997), estimulação da produção e liberação do interferon- $\alpha$  e ativação dos linfócitos T (Kluger, 1991, Zeisberger, 1999), os quais exercem importantes atividades antiviral e antitumoral (Rowsey, 1997).

Outras evidências mostram que a febre diminui o crescimento de bactérias dependentes de ferro (Blatteis, 2003). Além disso, alguns estudos defendem que elevações moderadas da temperatura corporal durante infecções reduzem a taxa de mortalidade de lagartos, de camundongos e de cães recém-nascidos (Kluger et al., 1998, Hasday et al., 2000).

Assim, há inúmeras evidências de que a febre é um importante mecanismo de defesa que contribui para a habilidade do hospedeiro em resistir a uma infecção (Kluger, 1991, Hasday et al., 2000), no entanto tem sido sugerido que o aumento da Tc a níveis febris pode ser prejudicial em algumas situações (Zeisberger, 1999, Hasday et al., 2000). De fato, o aumento da demanda metabólica necessário para gerar e manter a temperatura febril pode ser maléfico aos indivíduos que possuem doenças cardiovasculares e pulmonares (Plaisance e Mackowiak, 2000). Nesses casos, a demanda metabólica requerida pelo processo febril pode exceder a capacidade cardiopulmonar, resultando em isquemia de tecidos essenciais (Hasday et al., 2000). Zeiner e colaboradores (2001) evidenciaram que o aumento da Tc é desfavorável para a recuperação neurológica funcional após uma parada cardiorrespiratória.

Várias evidências oriundas de ensaios animais e estudos clínicos têm sugerido que a elevação da Tc exacerba o dano neuronal após traumatismo crânio-encefálico (TCE) ou acidente vascular encefálico (AVE) (Hajat et al., 2000). Neste sentido, a febre aumenta as concentrações de glutamato (Adachi et al., 1995), do GABA e de glicina (Ginsberg e Busto, 1998), além de induzir aumento da produção de espécies reativas após AVE (Globus et al., 1995) e TCE, aumentando o dano neuronal e, conseqüentemente, a recuperação neurológica (Hajat et al., 2000). Além disso, a

ocorrência e duração da febre estão associadas à permanência prolongada desses pacientes na unidade de tratamento intensivo (Stocchetti et al., 2002).

Durante o processo febril, a expressão exacerbada de TNF- $\alpha$ , particularmente quando associada a níveis aumentados de IL-1 $\beta$  e interferon-gama (IFN $\gamma$ ) pode levar à injúria tecidual, falência de múltiplos órgãos, choque séptico e morte (Tracey e Cerami, 1994).

Outro risco associado à febre refere-se à progressiva redução na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. O aumento da Tc diminui a carga de oxigênio para os pulmões e assim pode reduzir sua liberação para os tecidos (Hasday et al., 2000).

A febre pode causar convulsões em crianças (Aronoff e Neilson, 2001), particularmente entre 3 meses e 5 anos de idade (Plaisance e Mackowiak, 2000). Evidências apontam que a elevação da temperatura central pode aumentar a taxa, magnitude e sincronidade dos disparos neuronais, levando à convulsões (Fukuda et al., 1997), as quais têm sido associadas ao posterior desenvolvimento de epilepsia nessas crianças (Dube et al., 2007).

Portanto, nas situações clínicas em que os riscos associados à febre ultrapassam seus benefícios, o tratamento antipirético é indicado (Outzen, 2009).

### **1.3 Atividade biológica de derivados pirazolínicos**

Os derivados pirazolínicos são drogas de origem sintética que possuem um anel pirazol em sua estrutura, o qual é um heterociclo composto por cinco membros, contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2 do anel (Figura 4). Estudos têm mostrado que diversos compostos desta classe apresentam atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (Borne, 1995, Gursoy et al., 2000), entre outras.

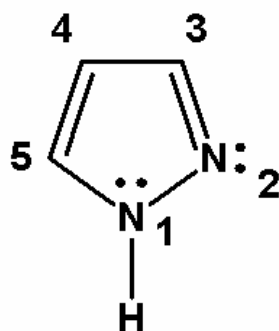


Figura 4: Estrutura química do anel pirazol

Em 1884, na tentativa de sintetizar derivados quinolínicos com atividade antipirética, o químico alemão Ludwig Knorr obteve a antipirina, composto com propriedades analgésica, antipirética e anti-reumática, porém muito tóxico. Mais tarde sintetizou-se um derivado da antipirina, a aminopirina, um análogo mais potente que foi utilizado durante muitos anos como analgésico e antipirético na Europa e Estados Unidos, até que fossem relatados casos de agranulocitose fatal associados ao seu uso (Borne, 1995). Devido a essa grave reação associada, houve pouco interesse pela pesquisa de novos compostos pirazolínicos até meados de 1940, quando então foi sintetizada uma série de pirazolidinodionas menos tóxicas (Insel, 1996).

A fenilbutazona é o representante mais importante da classe dos derivados pirazolínicos e embora o seu emprego na artrite, a partir 1952, tenha representado um marco no tratamento desta doença, efeitos colaterais importantes como náuseas, desconforto epigástrico e vômito foram relatados com frequência. Além disso, alguns casos de agranulocitose associados também foram registrados (Insel, 1996).

A dipirona (Figura 5), um derivado pirazolínico com atividade antipirética e analgésica (Brune e Alpermann, 1983, Brogden, 1986) foi obtida em 1921 pelo laboratório Hoechst através da substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metilenosulfoxilato de sódio. Essa droga foi introduzida comercialmente em 1922, sendo denominada genericamente de metamizol e ganhou popularidade nos países em desenvolvimento e na Europa principalmente devido ao seu baixo custo e

alta eficácia (Arellano e Sacristan, 1990). A dipirona é utilizada atualmente em diversos países europeus como Inglaterra e Espanha (Hedenmalm e Spigset, 2002), além do México e Brasil (Brune e Hinz, 2004). Seu uso clínico foi proibido nos Estados Unidos e em alguns outros países quando casos de agranulocitose foram associados ao seu uso (Insel, 1996). No entanto, estudos mostram que a incidência deste efeito adverso é muito baixa (Ibanez et al., 2005). Além disso, o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (AAS), outros analgésicos bastante utilizados na clínica, também provocam efeitos adversos graves como sangramento, úlceras, gastrite, necrose hepática e Síndrome de Reye (Belay et al., 1999).

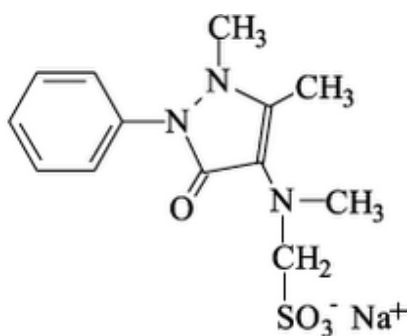


Figura 5: Estrutura química da dipirona

Desde o surgimento da dipirona, inúmeros derivados pirazolínicos têm sido sintetizados e estudados. Em 1969, evidenciou-se as atividades antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do 1-(4-metóxi-6-metil-2-pirimidinil)-3-metil-5-metoxipirazol e de 43 análogos deste composto (Oshima et al., 1969), alguns deles sendo equipotentes à aminopirina.

O composto FR140423 (3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil) fenil] pirazol) apresenta ação antinociceptiva e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (Ochi et al., 1999). Outro composto testado pelo mesmo grupo de pesquisadores foi o FR188582 (3-cloro-5-[4-(metilsulfonil)fenil]-1-fenil-1*H*-pirazol), o



qual mostrou-se também um inibidor altamente seletivo da COX-2, sendo mais potente que a indometacina contra o edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) e não causou lesão gástrica em ratos após 10 dias de tratamento (Ochi et al., 2001).

O celecoxib, composto pirazolínico trifluoro-substituído pertencente à classe dos antiinflamatórios não-esteroidais, e o rofecoxib são inibidores seletivos da COX-2, os quais possuem potente atividade antipirética (Simmons et al., 2000).

Além do exposto acima, inúmeros estudos têm relatado outras propriedades farmacológicas para compostos que contêm um anel pirazol, por exemplo, atividade antimicrobiana (Bekhit e Abdel-Aziem, 2004), antidepressiva e anticonvulsivante (Ozdemir et al., 2007).

Assim, frente às diversas pesquisas que confirmam a efetividade biológica dos pirazóis, torna-se evidente que os derivados pirazolínicos representam uma classe promissora de compostos. Neste sentido, o Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia (LABNEURO), em parceria com o Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria, vem buscando obter novos compostos com atividade biológica. Diversas moléculas já foram investigadas pelo grupo, dentre elas alguns compostos destacaram-se por seu potencial antinociceptivo, antiinflamatório e antipirético em modelos animais.

A administração s.c. ou i.c.v. de 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida (MPCA) e de 3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida (FPCA) reverte a febre induzida por LPS em camundongos (Souza et al., 2002) e por *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro) em ratos (Tomazetti et al., 2005). Estudo realizado anteriormente com os mesmos compostos já havia evidenciado seu potencial antinociceptivo na fase neurogênica e inflamatória do teste de formalina em camundongos (de Souza et al., 2001) e Godoy e colaboradores (2004) mostraram que estas moléculas também apresentam efeito antinociceptivo no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Assim como o MPCA e FPCA, o derivado pirazolínico 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol (B50) apresentou ação antinociceptiva no teste das contorções abdominais (Prokopp et al., 2006).

Outros compostos pirazolínicos como 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1H-pirazol (PZ2) e seu análogo 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1H-pirazol (PZ3) induzem antinocicepção no teste da imersão da cauda (Tabarelli et al., 2004). Por sua vez, o 4-metil-5-trifluorometil-5-hidroxi-4,5-diidro-1H-pirazol metil ester (MPF4) apresentou efeito antinociceptivo sobre a alodinia mecânica induzida por CFA em camundongos (Milano et al., 2008a). No entanto, sua possível atividade antipirética ainda não foi investigada.

Recentemente a ação antinociceptiva e antiinflamatória de uma série de 5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazóis substituídos foram avaliadas (Sauzem et al., 2008). Neste estudo, os autores verificaram que os compostos inibiram a nocicepção no teste da formalina em camundongos e o edema de pata induzido por carragenina. Posteriormente, os mesmos autores mostraram que 3Et-TFDP e 4Me-TFDP produziram antinocicepção no modelo de artrite induzida por CFA (Sauzem et al., 2009). No entanto, a possível atividade antipirética destes compostos não havia sido avaliada.

Considerando os efeitos descritos para estes compostos, nós decidimos investigar se a série de oito 5-hidroxi-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-carboxiamida pirazóis substituídos possuíam atividade antipirética na febre induzida por fermento de padeiro (*S. cerevisiae*) em ratos jovens, modelo padronizado pelo nosso grupo (Tomazetti et al., 2005). Além disso, avaliamos seu potencial antiinflamatório no modelo de inflamação peritoneal induzida pelo mesmo estímulo inflamatório.

---

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O presente estudo visa avaliar o potencial antipirético e antiinflamatório de alguns derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxiamida em ratos.

### **Objetivos Específicos**

#### **Capítulo 1**

- Avaliar o efeito da administração subcutânea de derivados pirazolínicos sobre a temperatura corporal de ratos jovens.

- Avaliar o efeito da administração subcutânea de derivados pirazolínicos sobre a febre induzida por *S. cerevisiae*.

- Comparar o efeito antipirético dos derivados pirazolínicos selecionados com aquele da dipirona, um antipirético clássico.

- Avaliar o efeito dos derivados pirazolínicos selecionados sobre o aumento da migração leucocitária no fluido peritoneal induzido pela administração de *S. cerevisiae*.

- Avaliar o efeito dos derivados pirazolínicos selecionados sobre o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal induzido pela administração de *S. cerevisiae*.

- Avaliar o efeito dos derivados pirazolínicos selecionados sobre a atividade da COX.

- Avaliar o potencial antioxidante dos derivados pirazolínicos selecionados.

#### **Capítulo 2**

- Investigar se o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP inibe o aumento na migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzida por *S. cerevisiae* em ratos.

- Avaliar o efeito da injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* sobre a permeabilidade vascular peritoneal em ratos.

- Investigar se o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP modifica o efeito do *S. cerevisiae* sobre a permeabilidade vascular peritoneal em ratos.

- Avaliar o efeito da injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* sobre a atividade da mieloperoxidase em ratos.

- Investigar se o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP modifica o efeito do *S. cerevisiae* sobre a atividade da mieloperoxidase em ratos.

- Investigar se o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP inibe o aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal induzido por *S. cerevisiae* em ratos.

- Avaliar o efeito da injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* sobre os níveis de nitrito/nitrato no fluido peritoneal de ratos.

- Investigar se o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP modifica o efeito do *S. cerevisiae* sobre os níveis de nitrito/nitrato em ratos.

# **PARTE II**

## Capítulo I – Artigo aceito para publicação

### [BJMBR-652] URGENTE- Editorial Review of Article - Accept

Quarta-feira, 13 de Outubro de 2010 10:07

**De:** "Journal Office" <bjmbr@terra.com.br>

**Para:** "Carlos Fernando Mello" <mello.cf@gmail.com>

**Cc:** jsaibt@yahoo.com.br, ana\_apof@yahoo.com.br, andrellsaraiva@yahoo.com.br, viviratzlaff@yahoo.com.br, ro\_andri@yahoo.com.br, pablomachado.mail@gmail.com, saramarchesan@hotmail.com, ana\_apof@gmail.com, heliogb@base.ufsm.br, zanatta@base.ufsm.br, mmartins@base.ufsm.br, ferreiraj99@gmail.com, mello.cf@gmail.com  
BJMBR 652 - Antipyretic and antioxidant activity of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in rats

Prezad Dr. Carlos Fernando Mello,

Temos a satisfação de informar que seu trabalho foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

O trabalho está sendo verificado e preparado pelo Editor de Estilo, e se necessário o texto corrigido e eventuais questões serão enviadas à V.Sa. via e-mail, antes da preparação da prova gráfica.

Atenciosamente,

Prof.Dr. Lewis Joel Greene

Prof.Dr. José Antunes Rodrigues

Prof.Dr. João Batista Calixto

Editores

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

e-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)

Active Submissions - Windows Internet Explorer

http://submission.scielo.br/index.php/bjmr/author

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Active Submissions

 **Brazilian Journal**  
of medical and biological research

You are logged in as... **jsaibt**  
Log Out

Home > User > Author > **Active Submissions**

### Active Submissions

**ACTIVE** | ARCHIVE

ID	MM-DD SUBMIT SEC	AUTHORS	TITLE	STATUS
BJMBR 07-13 -647	PHAR	Pasin, Ferreira, Saraiva, Ratzlaff,...	<a href="#">ANTIPYRETIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF...</a>	<a href="#">QUEUED FOR EDITING</a> Decline Submission
BJMBR 07-13 -648	PHAR	Pasin, Ferreira, Saraiva, Ratzlaff,...	<a href="#">ANTIPYRETIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF...</a>	<a href="#">QUEUED FOR EDITING</a> Decline Submission
BJMBR 07-14 -652	CI	Pasin, Ferreira, Saraiva, Ratzlaff,...	<a href="#">ANTIPYRETIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF...</a>	<a href="#">QUEUED FOR EDITING</a> Accept Submission

**Start a New Submission**  
[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

Av. Bandeirantes, 3900  
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil  
Phone and Fax: 55-16-3633-3825  
Email: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br) / [bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)

Concluído, mas contém erros na página.

Internet 100%

Iniciar [BJMBR-652] UR... BRAZ J MED BIO... TESE 19out - Mic... Brazilian Journal ... manuscript BJMB... Active Submis... 11:31



**Antipyretic and antioxidant activities of  
5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles in rats**

J.S.M. Pasin<sup>ae</sup>, A.P.O. Ferreira<sup>d</sup>, A.L.L. Saraiva<sup>d</sup>, V. Ratzlaff<sup>b</sup>, R. Andrighetto<sup>d</sup>, P.  
Machado<sup>d</sup>, S. Marchesan<sup>d</sup>, R.A. Zanette<sup>c</sup>, H.G. Bonacorso<sup>d</sup>, N. Zanatta<sup>d</sup>,  
M.A.P. Martins<sup>d</sup>, J. Ferreira<sup>d</sup>, C.F. Mello<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia,

<sup>c</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde,

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

<sup>e</sup>Curso de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde,  
Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), 97010-032 Santa Maria, RS, Brasil

**Acknowledgements**

Research was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS. C.F.M. and J.F. are the recipients of CNPq fellowships, grant numbers 301552/2007-0 and 500096/2003-1, respectively. The authors thank Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr. Jânio Morais Santurio and Dr. Sydney Hartz Alves for providing necessary facilities to conduct this research.

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

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima nº 1000  
Cidade Universitária 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Phone +55 55 3220 9378

FAX: +55 55 3220 8241

Running title: Antipyretic and antioxidant activities of pyrazole derivatives

Keywords: pyrazole derivatives; fever; cytokine levels; cyclooxygenase

## Abstract

The objective of this study was to determine the effect of eight 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles (TFDPs) on rat body temperature and baker's yeast-induced fever. TFDPs or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/kg) were injected subcutaneously and rectal temperature ( $T_R$ ) was measured as a function of time in 28-day-old male Wistar rats [n=5-12 per group]. Antipyretic activity was determined in feverish animals injected with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae* suspension, 0.135 mg/kg, 10 mL/kg, ip). 3-Ethyl- and 3-propyl-TFDP (140 and 200  $\mu$ mol/kg, respectively, 4 h after yeast injection) attenuated baker's yeast-induced fever by 61 and 82%, respectively. These two effective antipyretics were selected for subsequent analysis of putative mechanisms of action. We then determined the effects on cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) oxidation *in vitro*, on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) levels and on leukocyte counts in the washes of peritoneal cavities of rats injected with baker's yeast. While 3-ethyl- and 3-propyl-TFDP did not reduce baker's yeast-induced increases of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  levels, 3-ethyl-TFDP caused a 42% reduction in peritoneal leukocyte count. 3-Ethyl- and 3-propyl-TFDP did not alter COX-1 or COX-2 activities *in vitro*, but presented antioxidant activity in the DPPH assay with an  $IC_{50}$  of 39 mM (25-62) and 163 mM (136-196), respectively. The data indicate that mechanisms of action of these two novel antipyretic pyrazole derivatives do not involve the classic inhibition of the COX pathway or pyrogenic cytokine release.

Key words: Pyrazole derivatives; Fever; Cytokine levels; Cyclooxygenase

## Introduction

Fever is a regulated increase of body core temperature characterized by an increase thermoregulatory set point, which results from the interaction of the central nervous and immune systems (1). While fever is a hallmark of injury, infection and inflammation, it has also been considered the most important component of a complex host response to invading agents, called acute-phase response (2). Although there is evidence supporting the idea that fever enhances host defenses, some studies have suggested that raising core temperature to the febrile range may be harmful. Therefore, in the clinical situations in which fever-associated risks outweigh benefits, antipyretic treatment is indicated (3).

Pyrazoles constitute an important group of organic compounds that have been extensively studied due to their numerous biological activities. Accordingly, dipyrone (also known as metamizole) is a potent antipyretic and analgesic pyrazole derivative, with little anti-inflammatory activity, (4) that is used in several countries. Nevertheless, several adverse effects, including agranulocytosis, have been associated with its use (5). Therefore, the development of novel compounds having antipyretic and anti-inflammatory activities with improved safety profiles remains a clinical need.

A number of studies have reported the synthesis of novel pyrazole derivatives with analgesic (6-10) and antipyretic (11,12) activities. We have explored the hypothesis that benzene, which is present in salicylamide, could be mimicked with an appropriate 3- or 4-substituted 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazoles (TFDP) scaffold. In addition, the presence of a trifluoromethyl group within cyclic compounds, especially at a strategic position, has become an important aspect to be studied in pharmaceutical research due to the unique physical and biological properties of fluorine. For instance, the substitution of a methyl group with a trifluoromethyl group has resulted in added lipophilicity, facilitating absorption of molecules within biological systems and thereby improving the overall pharmacokinetic properties of drug candidates (13).

The compounds 3Et-TFDP and 4Me-TFDP belong to a series of recently synthesized pyrazole derivatives that have been screened for antinociceptive and antiedematogenic activity in mice. These compounds cause antinociception in the

formalin test and decrease carrageenin-induced edema (14). Moreover, 3Et-TFDP and 4Me-TFDP produce antinociception in the complete Freund's adjuvant (CFA) animal model of arthritis (15). Importantly, in these studies, the antinociceptive effect occurred in the absence of significant adverse effects, indicating that these compounds may be models for the development of new drugs with analgesic and anti-inflammatory properties. The potential antipyretic activities of 3Et-TFDP and 4Me-TFDP, however, have not been evaluated.

In the present study we investigated whether a series of eight TFDPs, including 3Et-TFDP and 4Me-TFDP, attenuate baker's yeast-induced fever. Furthermore, in order to explore the possible mechanisms underlying the antipyretic action of these pyrazole derivatives, we determined whether these compounds alter the increase of baker's yeast-induced cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and interleukin-1  $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) in the peritoneal fluid, cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) activities or 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) oxidation *in vitro*.

## **Materials and Methods**

### **Chemicals**

The TFDPs (Figure 1) were synthesized by the NUQUIMHE, as reported elsewhere (14), and were suspended in a 5% Tween 80 in 0.9% NaCl solution. Commercially available dried baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Saf do Brasil Produtos Alimentícios Ltda, Brazil) was suspended in pyrogen-free 0.9% NaCl in a water bath at 37° C for 5 min. Dipyrone (Hoechst, Brazil) was diluted in 0.9% NaCl. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were purchased from R&D Systems Inc. (USA) and the COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit was obtained from Cayman Chemical Co. (USA). Other reagents were supplied by Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA).

### **Animals**

Male Wistar rats (28-30 days of age, 70 - 90 g), bred in our animal house were used. The animals were housed in groups of 8 to a cage at a controlled temperature (23

$\pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light / dark cycle (lights on at 7:00) and with standard lab chow and tap water available ad libitum.

The animals were transferred to the experimental room one day before the experiments, for acclimation to the environment. All temperature measurements were taken between 8:00 and 17:00 h and room temperature was maintained at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Each animal was used only once, and no more than one animal per litter was assigned to each group. Animals that presented initial (basal) body temperature below  $36.4$  or above  $37.3^\circ\text{C}$  were excluded from the experiments. The experiments were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of the Universidade Federal de Santa Maria (23081.013228/2008-78).

#### Rectal temperature measurement

Rectal temperature ( $T_R$ ) was measured using a lubricated thermocouple (external diameter: 2 mm) inserted 2.0 cm into the rectum of the animal, for 1 minute. The probe was linked to a digital device, which displayed the temperature at the tip of the probe with a  $0.1^\circ\text{C}$  precision and the values were manually recorded. In order to minimize the effects of stress associated with handling and injecting on rectal temperature, all rats were habituated to the measuring procedure for two consecutive days. In these sessions, the animals were subjected to the same temperature measuring procedure described above.

The effect of TFDPs on the basal rectal temperature of rats was evaluated. A dose-response curve was created for each compound and the maximal dose that caused no effect on rectal temperature was determined for testing in a subsequent set of experiments to determine whether each compound could attenuate baker yeast-induced fever. After the basal (the first temperature measure of the day)  $T_R$  measurement, the animals were subcutaneously (s.c.) injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/kg) or pyrazole derivatives: 3H-TFDP, 3Me-TFDP, 3Et-TFDP, 3Pr-TFDP, 3iPr-TFDP, 3Bu-TFDP, 3Ph-TFDP, or 4Me-TFDP at 60, 200 or 600  $\mu\text{mol/kg}$ .  $T_R$  was recorded every hour up to five hours, and expressed as the difference from the basal value.

## Fever induction

The animals had their basal  $T_R$  measured and those with basal temperatures between 36 and 36.8°C were injected with a pyrogenic dose of baker yeast (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.), as reported elsewhere (11).  $T_R$  was recorded every hour, up to four hours, when vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg), 3H-TFDP, 3Me-TFDP, 3Et-TFDP, 3Pr-TFDP, 3iPr-TFDP, 3Bu-TFDP, 3Ph-TFDP, 4Me-TFDP (60, 200 or 600  $\mu$ mol/kg) or dipyrone (140  $\mu$ mol/Kg, in a subset of animals) was administered. The  $T_R$  was monitored over the following five hours. When the highest dose that had no effect on rectal temperature did not attenuate yeast-induced fever, the next dose tested was two-thirds higher. To determine the most promising compounds for subsequent testing, we calculated the antipyretic activity index of the TFDPs in baker's yeast-induced fever, according to the following equation:

$$\text{Antipyretic activity index} = 1 - \frac{\Delta T_{\text{exp}} - \Delta T_{\text{control}}}{\Delta T_{\text{yeast}} - \Delta T_{\text{control}}} \times 100\%$$

where:  $\Delta T_{\text{exp}}$  = mean  $T_R$  variation (5 and 6 hour-values) of animals treated with baker yeast/TFDP;  $\Delta T_{\text{control}}$  = mean  $T_R$  variation (5 and 6 hour-values) of animals treated with saline/5% Tween 80 in 0.9% NaCl;  $\Delta T_{\text{yeast}}$  = mean  $T_R$  variation (5 and 6 hour-values) of animals treated with baker yeast/5% Tween 80 in 0.9% NaCl.

## Cell count in peritoneal wash

A pyrogenic dose of baker yeast (0.135 g/kg, i.p.) or vehicle (0.9% NaCl, i.p.) was injected and three hour later the animals were injected with a TFDP which had an antipyretic effect (140-200  $\mu$ mol/kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.). One hour later, the animals were sacrificed by decapitation under anesthesia with thiopental. Abdominal skin below the sternum was nicked, and a peritoneal wash was performed by i.p. injection of 10 mL of 20 mM Tris-HCl buffer with EGTA (2 mM), EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM). The abdominal cavity was gently

massaged for 1 min and 8 mL of peritoneal wash was collected by aspiration with a 20-mL syringe. If blood was detected by visual inspection, the sample was discarded. A 300  $\mu$ L aliquot was used for cell count in a Neubauer chamber (1:3 dilution in Türk solution) by means of optical microscopy, and a leukocyte count was conducted by a subject who was not aware of animals' previous treatments. The samples were centrifuged (1500 *g*, 10 min), and 6-mL of supernatant were lyophilized and stored at -80°C for later cytokine analysis.

#### TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ assays

Lyophilized peritoneal fluid samples were suspended in 1000  $\mu$ L of 1% bovine albumin solution and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were determined using commercially available monoclonal immunoassay kits for each cytokine (R&D Systems Inc., USA). The value ranges detected by this assay were 100-6400 pg/mL (IL-1 $\beta$ ) and 5-2000 pg/mL (TNF- $\alpha$ ). The intra-assay coefficients of variation (CV) for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  assays were  $1.73 \pm 0.39\%$  and  $4.8 \pm 0.92\%$ , respectively. All samples were analyzed at the same time in a single ELISA plate (one plate for each cytokine). Both cytokine concentrations were estimated by colorimetric measurement at 450 nm using an ELISA plate reader and interpolation from a standard curve. Data are expressed in pg/mL.

#### Cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) activities in vitro

The COX screening assay kit (Kit No. 560101, Cayman) was used according to the manufacturers' instructions to determine whether compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP altered COX-1 and COX-2 activities. COX-1 and COX-2 initial activity tubes were prepared by placing 950  $\mu$ L of reaction buffer, 10  $\mu$ L of heme, 10  $\mu$ L of COX-1 and COX-2 enzymes in respective tubes. Similarly, COX-1 and COX-2 inhibitor tubes were prepared by adding 20  $\mu$ L of inhibitor (compound under test and celecoxib) to each tube in addition to the above ingredients. The background tubes corresponding to inactivated COX-1 and COX-2 enzymes were obtained by placing the tubes containing enzymes in boiling water for 3 min. Reactions were initiated by addition of 10  $\mu$ L of arachidonic acid to each tube and were quenched with 50  $\mu$ L of 1 M HCl. PGH<sub>2</sub> thus formed was reduced to PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  by addition of 100  $\mu$ L of SnCl<sub>2</sub>. The prostaglandin produced in each well was



quantified using broadly specific prostaglandin antiserum that binds with major prostaglandins and reading the 96-well plate at 405 nm. The wells of the 96-well plate showing low absorption at 405 nm indicate the low levels of prostaglandins in these wells and hence, lesser enzyme activity. Therefore, the COX inhibitory activities of the compounds could be quantified from the absorption of 405 nm of different wells of the 96-well plate. The results are reported as percent inhibition of COX-1 and COX-2 enzymes.

#### 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) radical scavenging activity assay

The DPPH<sup>•</sup> method is based on the scavenging of the stable DPPH<sup>•</sup> radical by the antioxidant. Measurement of the TFDP scavenging activity against DPPH<sup>•</sup> was performed according to (16). Briefly, DPPH<sup>•</sup> (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) was dissolved in 100% ethanol at a final concentration of 0.3 mM, and 250  $\mu$ l was added to a medium containing different concentrations of the ethanolic TFDP solution. Appropriate controls were used for the amounts of ethanol in the samples. The reaction mixture was vigorously shaken and incubated for 30 min at room temperature. The inhibition of absorbance decay, measured at 518 nm, indicated the scavenging activity of the pyrazoles against DPPH<sup>•</sup>. Ascorbic acid was used as a positive control. Data are expressed as percent of DPPH<sup>•</sup> absorbance decay inhibition. Mean values were obtained from duplicates.

#### Statistical analysis

Basal rectal temperatures and changes in rectal temperatures were expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were analyzed by two- or three-way analysis of variance (ANOVA), with time treated as a within subject factor, depending on the experimental design. *Post hoc* analysis was conducted using the F test for simple effects. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### Results

TFDPs reduce basal rectal temperatures

A dose-response curve (60, 200 or 600  $\mu\text{mol/kg}$ , *sc*) was constructed for each compound, and the maximal dose that caused no effect on  $T_R$  was determined. Pyrazole derivatives tested reduced the basal  $T_R$  at high doses (200-600  $\mu\text{mol/kg}$ ), as indicated by the statistically significant ( $P < 0.05$ ) dose x time interactions shown in Figure 2.

Some TFDP reduce baker's yeast-induced fever

Figure 3A–H shows the effects of TFDPs used at the maximal dose that caused no effect on  $T_R$ , on baker's yeast-induced fever. The compounds 3Et-TFDP, 3Ph-TFDP and 4Me-TFDP exhibited significant antipyretic activity,  $P < 0.05$ .

Figure 4 shows the antipyretic activity of the pyrazole derivatives 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP compared to the antipyretic effect of dipyrone (140  $\mu\text{mol/kg}$ ). Statistical analysis (ANOVA with repeated measures) of  $T_R$  change with time revealed a significant "treatment with time" interaction for compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP ( $P < 0.001$ ). *Post hoc* analysis (*F* test for simple effect) revealed that 3Et-TFDP and dipyrone attenuated baker's yeast-induced fever ( $P < 0.05$ ; Figure 4A). Similarly, 3Pr-TFDP and dipyrone (Figure 4B) decreased  $T_R$  with time when compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

To identify the most promising compounds for subsequent testing, the antipyretic activity indexes of the TFDP compounds were determined. Compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP, at the doses of 140 and 200  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively, presented the highest antipyretic activity indexes (61% for compound 3Et-TFDP and 82% for 3Pr-TFDP). These compounds were selected for subsequent testing.

Effect of 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP on the number of total cells present in rat cavity washes

Since peritoneal leukocyte migration is important for fever development (17), we investigated whether compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP altered number of leukocytes in the peritoneal cavity. As shown in Figure 5, injection of baker's yeast into the peritoneal cavity significantly increased leukocyte migration and treatment with compound 3Et-TFDP at the dose of 140  $\mu\text{mol/kg}$ , administered 4 h after yeast injection, significantly reduced leukocyte influx ( $P < 0.05$ ; Figure 5A). However, statistical analysis

revealed no significant effect of treatment with compound 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ ) on the baker's yeast-induced increase in the total number of leukocytes in the peritoneal cavity washes ( $P > 0.05$ ; Figure 5B).

3Et-TFDP and 3Pr-TFDP do not modify increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in peritoneal fluid during baker's yeast-induced fever

There is evidence that pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  play a role in systemic inflammation and sickness behavior, including fever (18). Since compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP attenuated baker's yeast-induced fever, we determined whether they altered TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal fluid. Statistical analysis revealed that *ip* injection of baker's yeast and vehicle significantly increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal cavity ( $P < 0.05$ ). However, treatment with compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP, administered 4 h after yeast injection, did not alter TNF- $\alpha$  levels (Figure 6A,B). Similarly, these compounds had no effect on IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal fluid (Figure 6C,D).

Effects of 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP on COX activity

Since COX inhibitors abolish lipopolysaccharide-induced fever (19), we investigated whether the compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP altered COX activity. *In vitro* assays demonstrated that 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP had no effect on COX-1 and COX-2 activities. On the other hand, celecoxib (100  $\mu\text{M}$  and 1 nM), which was included as an internal standard in the assay, did not inhibit COX-1, but inhibited COX-2 activity by 52 and 94%, respectively.

Effects of 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP on DPPH scavenging activity

Compounds 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP had DPPH scavenging activity. The  $\text{IC}_{50}$  values of ascorbic acid, 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP were 0.024 (0.015–0.038), 39.39 (25.01–62.06), and 162.9 (135.6–195.7) mM, respectively.

## Discussion

In the current study, we showed that a series of TFDPs decreased  $T_R$  with time and attenuated baker's yeast-induced fever in young rats. Specifically, we showed that compounds 3Et-TFDP, 3Pr-TFDP, 3Ph-TFDP and 4Me-TFDP exhibited significant antipyretic activity. Among these, the pyrazole derivatives 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP presented the most effective antipyretic activity against baker's yeast-induced fever and were selected for additional testing. It has been shown that administration of 3Et-TFDP produces rapid and long-lasting antinociception, whose maximum effect also occurs 1 h after its administration (15). It should be noted, however, that antinociceptive doses were five times larger than those used to cause antipyresis in the present study. Baker's yeast-induced fever coincided with an increase in total leukocytes in the peritoneal wash, which was attenuated by compound 3Et-TFDP. None of the compounds inhibited baker's yeast-induced increases of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the peritoneal wash, or inhibited COX activity *in vitro*. Interestingly, 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP derivatives showed significant DPPH radical scavenging activity.

The antipyretic screening was performed using the baker's yeast-induced fever protocol in rats, which is particularly suitable to evaluate new antipyretics, since it is sensitive to classic and novel antipyretic drugs (11). The pyrazole derivatives 3H-TFDP, 3Et-TFDP, 3Pr-TFDP, 3Bu-TFDP, 3Ph-TFDP and 4Me-TFDP significantly decreased the  $T_R$  of pyretic animals within 2 h after administration. It is clear from the results that substitutions in position 3 of the pyrazole moiety altered antipyretic activity. In this respect, it is interesting to note that compounds that have been described as good analgesics in previous studies (14,15) also presented significant antipyretic activity in the current study. A preliminary evaluation of the structure-activity relationship has indicated that increasing the length of the carbon chain at position 3 of the pyrazole ring up to three carbons increased antipyretic activity (H<ethyl<propyl<butyl), with the exception of 3Me-TFDP, that presented no antipyretic activity. Increasing the carbon side chain increases lipophilicity and may alter binding affinity to selected targets, causing potential pharmacokinetic and pharmacodynamic changes. Considering that substitution of the linear chain for a ramified group (*i*-propyl) also increased lipophilicity but decreased

antipyretic activity, it is possible that linear chain elongation may alter the pharmacodynamic properties, although other actions cannot be ruled out at present.

The currently described antipyretic activity of TFDP is, to some extent, in agreement with previous studies that have shown a significant antipyretic effect for 5-trichloromethyl pyrazole derivatives (11). However, comparing the corresponding 5-trifluoromethyl to the 5-trichloromethyl analogues, and to 3-methyl and 3-phenyl substitutions, reveals that while the 5-trifluoromethyl compound with a 3-methyl substitution loses activity, the 5-trifluoromethyl compound with a 3-phenyl substitution maintains antipyretic activity. This suggests that substituting the 5-trichloromethyl for a 5-trifluoromethyl group does not alter antipyretic activity, unless the substituent in position 3 of the pyrazole ring is a methyl group. Interestingly, if the methyl group is transferred to position 4 of the ring (compound 4Me-TFDP), the 5-trifluoromethyl derivative maintains its antipyretic activity.

Leukocyte recruitment is considered to be a central feature of the inflammatory response (20). We showed that the pyrazole derivative 3Et-TFDP, administered 4 h after yeast injection, significantly reduced baker's yeast-induced leukocyte influx to the peritoneal cavity, suggesting that the antipyretic effect of this compound may involve inhibition of leukocyte migration.

The injection of baker's yeast increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal wash. These data agree with reports showing that levels of TNF- $\alpha$  increase in the early phases of the fever induced by *S. cerevisiae* mannans, the pyrogenic component of baker's yeast (21). Nevertheless, treatment with the pyrazole derivatives 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP did not decrease TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in peritoneal fluid. These results suggest that mechanisms other than decreased cytokine levels underlie the currently described antipyretic effect of the tested compounds.

There are several lines of clinical and experimental evidence indicating that cyclooxygenases play an important role in fever development (22). However, specific assays of ovine COX-1 and COX-2 activities revealed that 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP do not alter COX-1 or COX-2 activities. Therefore, a target other than COX may be involved in the currently described antipyretic effect of these compounds.

DPPH radical scavenging activity is a standard assay for screening the radical scavenging activity of specific compounds (16). The pyrazole derivatives 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP neutralized the DPPH radical, indicating a slight antioxidant activity, particularly if compared with ascorbic acid. These results are in agreement with the previously reported antioxidant activity of selected pyrazole derivatives (23), and are particularly interesting, since accumulating evidence suggests a redox modulation of the inflammatory response and fever. The fact that a number of antioxidants of different chemical natures decrease LPS- (24-27) and baker's yeast- (28) induced fever, and that ascorbate potentiates the antipyretic action of acetaminophen, suggests that the antipyretic activity of these compounds may be related to their antioxidant activity. Therefore, one might propose that the antipyretic action of these pyrazole derivatives is related to their antioxidant activity. However, it must also be considered that the antioxidant activity of these compounds is weak, compared to ascorbic acid, and that mechanisms of action other than antioxidant activity shall occur. In line with this view, it is possible that 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP may share the mechanisms of dipyrone, a potent antipyretic and analgesic pyrazolonic derivative, which displays remarkably low anti-inflammatory and weak reversible COX-blocking activity (29,30). In this regard, some of its biological actions, have been shown to depend on conversion to at least two active metabolites, 4-methylaminoantipyrine and 4-aminoantipyrine (30,31). Accordingly, given that 3Et-TFDP and dipyrone showed similar potency and efficacy in transiently attenuating yeast-induced fever, it is reasonable to propose that the antipyretic effects of 3Et-TFDP and other analogs may be due to direct antipyretic actions as such, or may result from effects of their metabolites. Furthermore, like dipyrone, 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP may act by activation of the nitric oxide (NO)-cyclic GMP pathway at the periphery (32) or displacement of glutamate binding (33). These possibilities remain to be studied, and further investigations are needed to determine the mechanisms by which 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP cause antipyresis.

## References

1. Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 1991; 71: 93-127.
2. Blatteis CM, Sehic E. Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 813: 445-447.
3. Hasday JD, Fairchild KD, Shanholtz C. The role of fever in the infected host. *Microbes Infect* 2000; 2: 1891-1904.
4. Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrrone. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999; 42: 79-85.
5. Ibanez L, Vidal X, Ballarin E, Laporte JR. Agranulocytosis associated with dipyrrone (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 60: 821-829.
6. de Souza FR, Figuera MR, Lima TT, de Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE, et al. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68: 525-530.
7. Tabarelli Z, Rubin MA, Berlese DB, Sauzem PD, Missio TP, Teixeira MV, et al. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1531-1540.
8. Godoy MC, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, et al. Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrrone. *Eur J Pharmacol* 2004; 496: 93-97.
9. Prokopp CR, Rubin MA, Sauzem PD, de Souza AH, Berlese DB, Lourega RV, et al. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 795-799.
10. Milano J, Oliveira SM, Rossato MF, Sauzem PD, Machado P, Beck P, et al. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 581: 86-96.
11. Tomazetti J, Avila DS, Ferreira AP, Martins JS, Souza FR, Royer C, et al. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Methods* 2005; 147: 29-35.
12. Souza FR, Souza VT, Ratzlaff V, Borges LP, Oliveira MR, Bonacorso HG, et al. 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* 2002; 451: 141-147.

13. Lin PJ. Synthesis of monotrifluoromethyl-substituted saturated cycles. *Tetrahedron* 2000; 56: 3635-3671.

14. Sauzem PD, Machado P, Rubin MA, da S Sant'anna, Faber HB, de Souza AH, et al. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur J Med Chem* 2008; 43: 1237-1247.

15. Sauzem PD, Sant'Anna GS, Machado P, Duarte MM, Ferreira J, Mello CF, et al. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 616: 91-100.

16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wiss Technol* 1995; 28: 25-30.

17. Werner MF, Fraga D, Melo MC, Souza GE, Zampronio AR. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. *Inflamm Res* 2003; 52: 291-296.

18. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.

19. Ross G, Hubschle T, Pehl U, Braun HA, Voigt K, Gerstberger R, et al. Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1395-1402.

20. Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 151-185.

21. Ataoglu H, Dogan 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.

22. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

23. Martins DM, Torres BG, Spohr PR, Machado P, Bonacorso HG, Zanatta N, et al. Antioxidant potential of new pyrazoline derivatives to prevent oxidative damage. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104: 107-112.



24. Weihrauch D, Riedel W. Nitric oxide (NO) and oxygen radicals, but not prostaglandins, modulate fever. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 813: 373-382.
25. Riedel W, Maulik G. Fever: an integrated response of the central nervous system to oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 1999; 196: 125-132.
26. 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.
27. 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.
28. Johnson AJ, Kumar RA, Rasheed SA, Chandrika SP, Chandrasekhar A, Baby S, et al. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. *J Ethnopharmacol* 2010; 130: 267-271.
29. Luthy C, Multhaupt M, Oetliker O, Perisic M. Differential effect of acetylsalicylic acid and dipyrrone on prostaglandin production in human fibroblast cultures. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 849-854.
30. Abbate R, Pinto S, Gori AM, Paniccia R, Coppo M, Neri Serneri GG. Activity of dipyrrone on intraplatelet arachidonic acid metabolism: an *in vitro* study. *Pharmacol Res* 1989; 21: 43-50.
31. Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyrrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28: 216-234.
32. Duarte ID, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 217: 225-227.
33. Beirith A, Santos AR, Rodrigues AL, Creczynski-Pasa TB, Calixto JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 233-245.

Figure legends:

Figure 1. Chemical structure of 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles (TFDPs).

Figure 2. Effect of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or TFDPs (60, 200 or 600  $\mu\text{mol/kg}$ , *sc*) on rectal temperature ( $T_R$ ) change. Data are reported as means  $\pm$  SEM change from baseline  $T_R$  (N = 5-9 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles. Significant dose by time interactions for: TFDP [F(12,56) = 2.24; P < 0.05], 3Me-TFDP [F(12,76) = 2.78; P < 0.05], 3Et-TFDP [F(12,48) = 4.26; P < 0.05], 3Pr-TFDP [F(12,68) = 7.85; P < 0.05], 3iPr-TFDP [F(3,29) = 4.66; P < 0.05], 3Bu-TFDP [F(12,68) = 3.92; P < 0.05], 3Ph-TFDP [F(12,80) = 2.37; P < 0.05], 4Me-TFDP [F(12,68) = 3.18; P < 0.05]. \*P < 0.05 compared to vehicle (F-test for a simple effect). In this set of experiments the mean basal temperature was  $36.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ .

Figure 3. Effect of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or TFDP (at the highest dose administered *sc* that had no effect on rectal temperature, 4 h after yeast injection) on baker's yeast-induced fever (0.135 g/kg). Baker's yeast was injected *ip* at zero time. The arrow indicates the time of injection of the drugs tested. Data are reported as means  $\pm$  SEM change from baseline rectal temperature (N = 6-12 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazole. \* P < 0.05 compared to vehicle (F-test for the simple effect). Significant dose by time interactions for: 3Et-TFDP [F(1,36) = 6.97; P < 0.05], 3Pr-TFDP [F(1,43) = 9.66; P < 0.05], 3Ph-TFDP [F(1,29) = 4.99; P < 0.05], and 4Me-TFDP [F(1,18) = 4.58; P < 0.05]. In this set of experiments the mean basal temperature was  $36.8 \pm 0.16^\circ\text{C}$ .

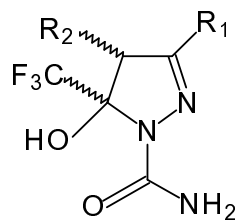
Figure 4. Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ ; 4A), 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ ; 4B) or dipyrone (140  $\mu\text{mol/kg}$ ) on baker's yeast-induced fever (0.135 g/kg, *ip*). Baker's yeast was injected *ip* at zero time. The arrow indicates the time of injection of the drugs tested. Data are reported as means  $\pm$  SEM change from baseline rectal temperature (N = 6-12 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles. \*P < 0.001

compared to vehicle. #P < 0.05 compared to dipyrone (F-test for the simple effect). In this set of experiments the mean basal temperature was  $36.8 \pm 0.14$  °C.

Figure 5. Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ ; 5A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ ; 5B) on the number of total cells present in rat cavity washes in the presence or absence of baker's yeast. Values represent the mean number of cells/ $\text{mm}^3$  (N = 5-7 per group). TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles. \*P < 0.05 compared to saline-vehicle; # P < 0.05 compared to yeast-vehicle.

Figure 6. Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 4 h after yeast injection) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 4 h after yeast injection) on TNF- $\alpha$  (Figure 6A-B) and IL-1 $\beta$  (Figure 6C-D) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of baker's yeast (N = 5-7 per group).TFDP = 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles. \*P < 0.05 compared to saline (two-way ANOVA).

Figure 1:



	3H- TFDP	3Me- TFDP	3Et- TFDP	3Pr- TFDP	3iPr- TFDP	3Bu- TFDP	3Ph- TFDP	4Me- TFDP
R <sub>1</sub>	H	Me	Et	Pr	<i>i</i> -Pr	Bu	Ph	H
R <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	Me

Figure 2:

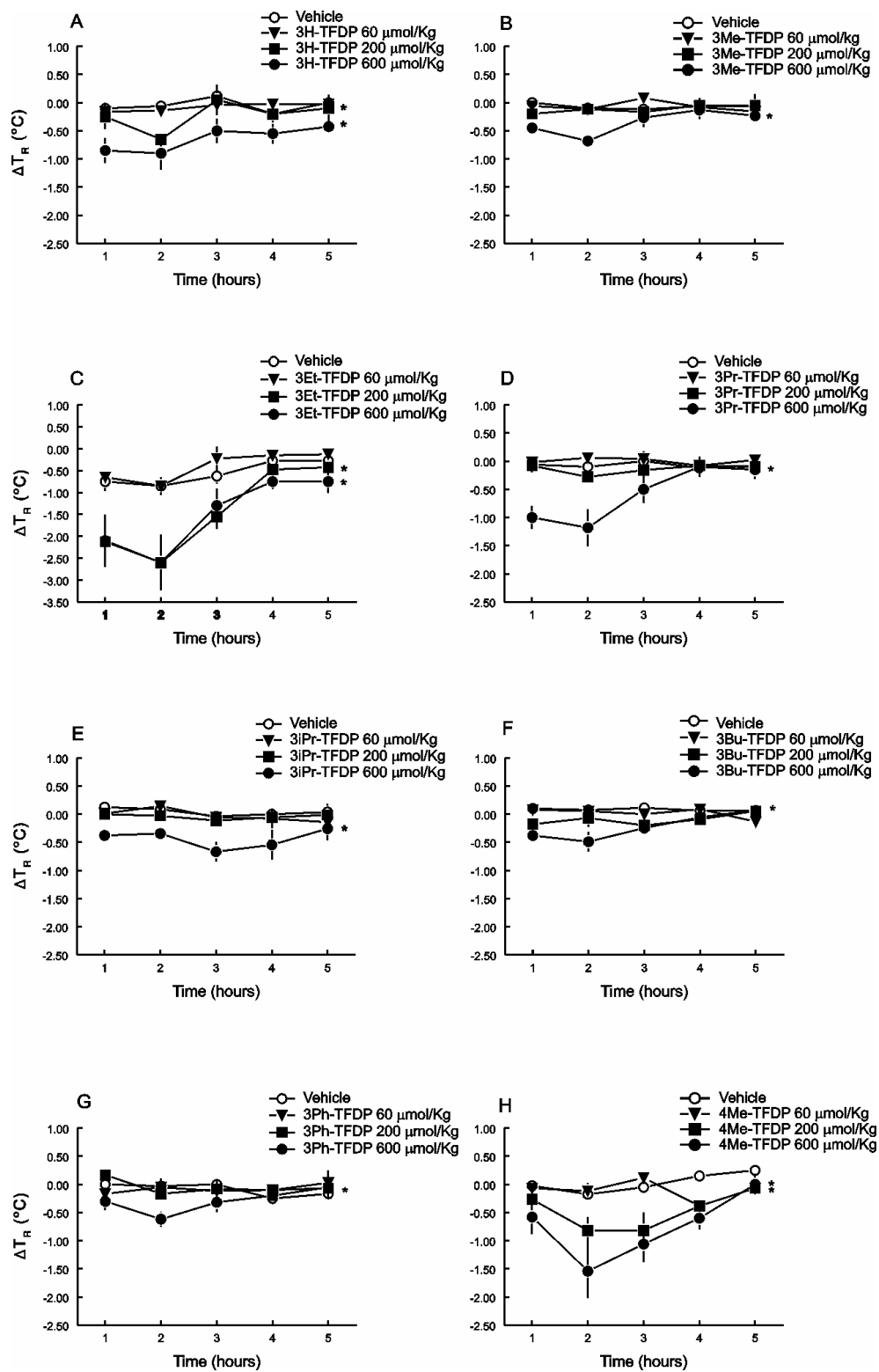


Figure 3:

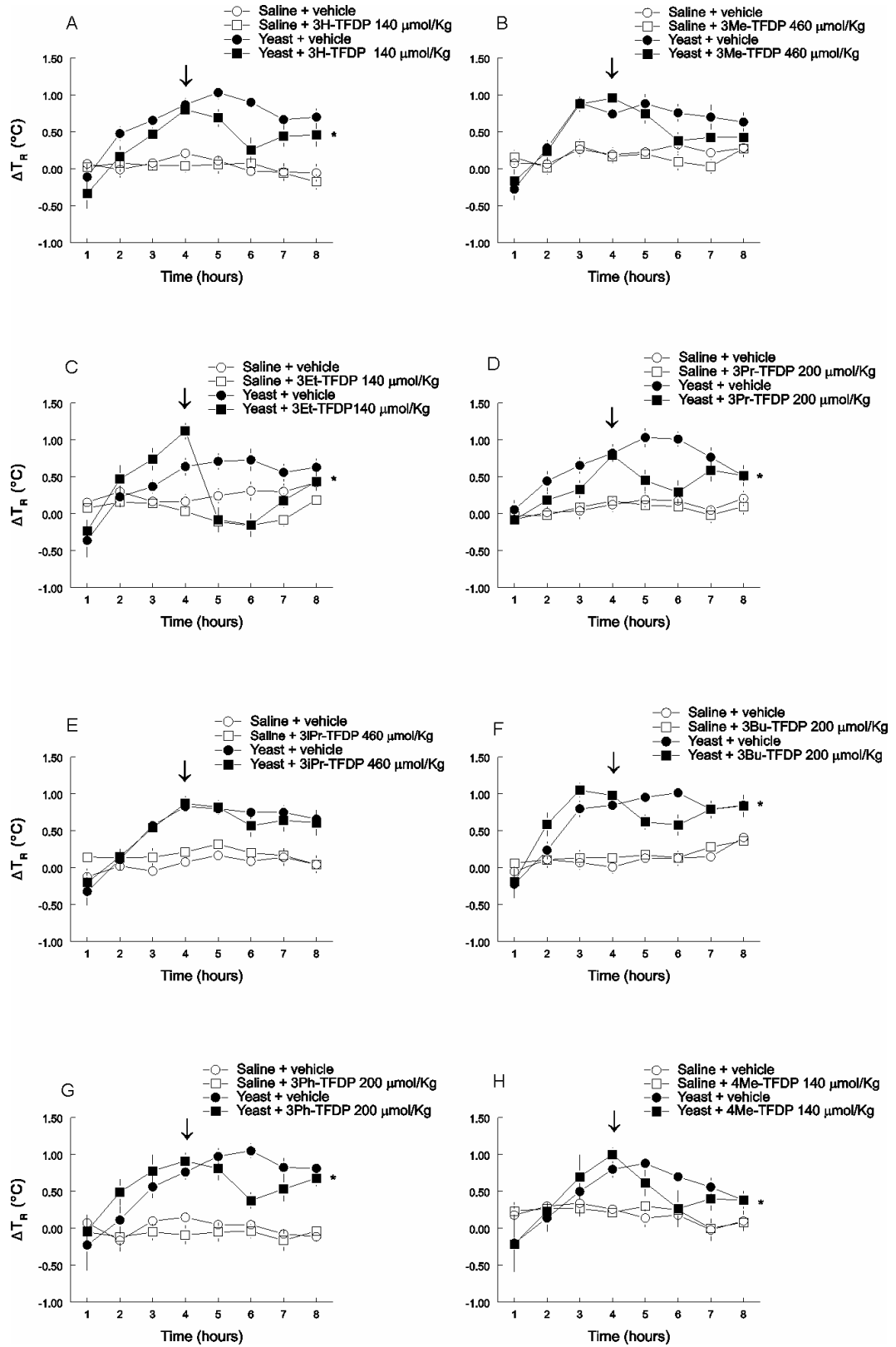


Figure 4:

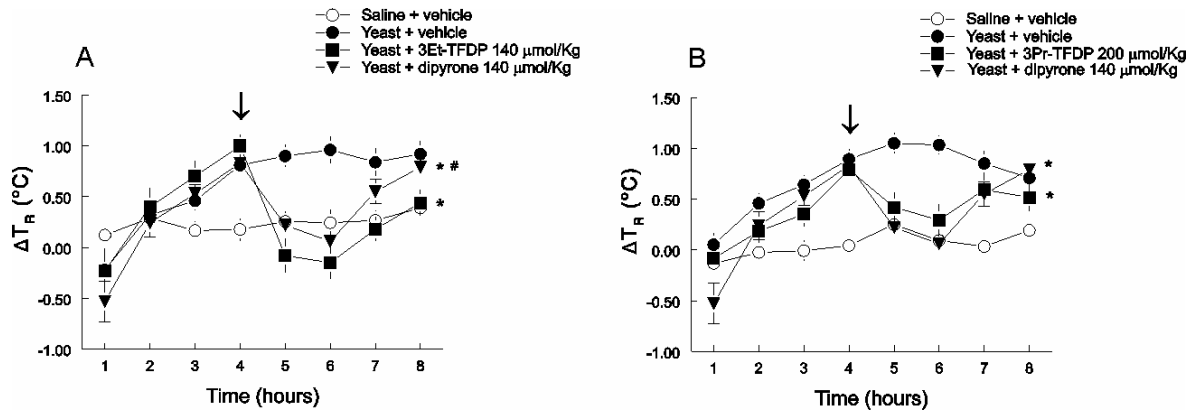


Figure 5:

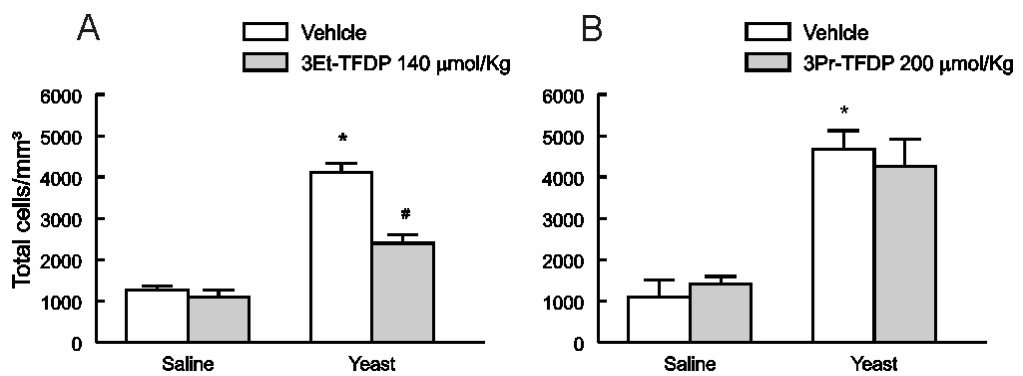
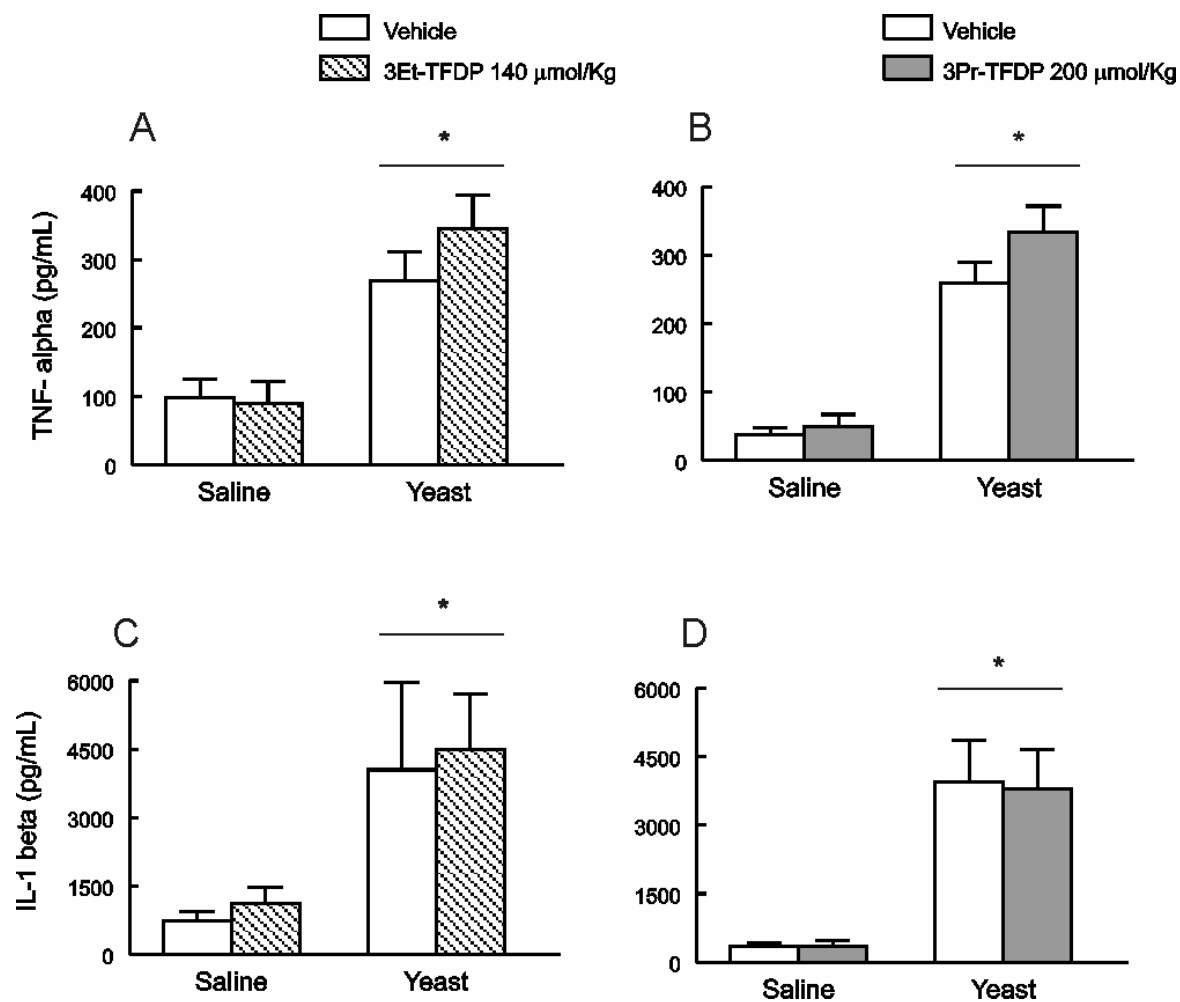


Figure 6:





## Capítulo II – Manuscrito

### **Anti-inflammatory effect of 3-ethyl- 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxamidepyrazol on *Saccharomyces cerevisiae*-induced peritoneal inflammation in rats**

Juliana Saibt Martins Pasin<sup>ad</sup>, Ana Paula O. Ferreira<sup>c</sup>, André Luis Lopes Saraiva<sup>b</sup>, Viviane Ratzlaff<sup>b</sup>, Pablo Machado<sup>c</sup>, Sara Marchesan<sup>c</sup>, Helio G. Bonacorso<sup>c</sup>, Nilo Zanatta<sup>c</sup>, Marcos A.P. Martins<sup>c</sup>, Juliano Ferreira<sup>c</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia,

Centro de Ciências da Saúde,

<sup>c</sup>Departamento de Química,

Centro de Ciências Naturais e Exatas,

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Curso de Fisioterapia,

Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), 97010-032 Santa Maria, RS, Brasil

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

Phone +55 55 3220 9378

FAX: +55 55 3220 8241

## Abstract

The aim of the present study was to investigate the effect of 3-ethyl- and 3-propyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles (3Et- and 3Pr-TFDP) on *Saccharomyces cerevisiae*-induced peritoneal inflammation in rats. The peritoneal inflammation was induced by a injection of *S. cerevisiae* (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.), which increased leukocyte migration, peritoneal vascular permeability, myeloperoxidase activity, and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitrite/nitrate levels in the peritoneal fluid 4 hours after its administration. We also report herein that the s.c. injection with 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg) significantly prevented *S.cerevisiae*-induced increase in leukocyte influx, peritoneal vascular permeability and myeloperoxidase activity, but had no effect on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal wash. On the other hand, 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg) had no effect on these inflammatory parameters. Our results support an anti-inflammatory activity for 3Et-TFDP, which does not involve inhibition of cytokine (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production or release.

Key words: pyrazole derivatives; cytokine levels; myeloperoxidase, vascular permeability.

## Introduction

The inflammation is a complex cellular and biochemical response to tissue injury and/or infection that involves several cell types and mediators (Rao et al., 1994). In this context, many inflammation models have been developed to understand the inflammatory process and for screening potential anti-inflammatory compounds.

Peritonitis is the inflammation of the peritoneal membrane (Hall et al., 1998) that occurs in response to infectious and irritant agents (DalBo et al., 2005, Rodrigues et al., 2009). It can also be induced by zymosan, an insoluble polysaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Doherty et al., 1985, Tadimeti et al., 1994). We have previously shown that *S. cerevisiae* injection into the peritoneal cavity increases leukocyte migration, plasma protein extravasation and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal cavity (Pasin et al., 2010), so this model of peritonitis seems useful to evaluate the effects of compounds on these inflammatory parameters.

Pyrazoles constitute an important group of organic compounds that have been extensively studied due to their numerous biological activities. In fact, it has been reported the synthesis of pyrazole derivatives with antinociceptive (de Souza et al., 2001, Godoy et al., 2004, Tabarelli et al., 2004, Prokopp et al., 2006, Milano et al., 2008a, Milano et al., 2008b, Sauzem et al., 2008, Sauzem et al., 2009), antipyretic (Souza et al., 2002; Pasin et al., 2010), anti-inflammatory (Chandra et al., Bekhit et al., 2009), antioxidant (Jeong et al., 2004, Costa et al., 2006, Manojkumar et al., 2009, Martins et al., 2009) and antimicrobial (Bekhit et al., 2008) activities.

The compounds 3-ethyl-, 3-propyl- and 4-methyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles (3Et-TFDP, 3Pr-TFDP and 4Me-TFDP, respectively) belong to a series of recently synthesized pyrazole derivatives that have been screened for antinociceptive and antiedematogenic activity in mice. 3Et- and 4Me-TFDP decrease nociception and paw edema induced by intraplantar complete Freund's adjuvant (CFA) (Sauzem et al., 2009), formalin and carrageenin (Sauzem et al., 2008). Moreover, 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP attenuate the febrile response induced by baker's yeast, while only the first reduced the peritoneal leukocyte count (Pasin et al., 2010). These findings suggest that 3Et-TFDP has anti-inflammatory activity. Therefore, it is not known whether 3Pr-TFDP has anti-inflammatory activity, as well as the mechanisms by

which 3Et-TFDP decreases inflammation. It is worth noting, however, that 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP do not inhibit COX-1 or COX-2 *in vitro*, or alter TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  content in the peritoneal wash (Pasin et al., 2010). Therefore, the current study aimed to investigate whether 3Pr-TFDP has anti-inflammatory activity in the model of *S. cerevisiae*-induced peritoneal inflammation in rats and whether 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP alter parameters of the inflammatory response, such as nitrate/nitrite production, myeloperoxidase activity, plasma extravasation, leukocyte migration and cytokine levels.

## Materials and Methods

### *Chemicals*

The TFDPs (Figure 1) were synthesized by the NUQUIMHE, as reported elsewhere (Sauzem et al., 2008), and were suspended in a 5% Tween 80 in 0.9% NaCl solution.

Commercially available dried *Saccharomyces cerevisiae* (Saf do Brasil Produtos Alimentícios Ltda, Brazil) was suspended in pyrogen-free 0.9% NaCl in a water bath at 37° C for 5 min. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were purchased from R&D Systems Inc. (USA). The other reagents were supplied by Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA).

### *Animals*

Male Wistar rats (28-30 days of age, 70 - 90 g), bred in our animal house were used for the study. The animals were housed in groups of 8 to a cage at a controlled temperature (23  $\pm$  1 °C) with a 12-h light / dark cycle (lights on at 7:00) and with standard lab chow and tap water available *ad libitum*.

The animals were transferred to the experimental room one day before the experiments, for acclimation to the environment. Each animal was used only once, and no more than one animal per litter was assigned to each group. The experiments were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of Universidade Federal de Santa Maria (23081.013228/2008-78).

### *S. cerevisiae*-induced peritoneal inflammation in rats

As previously described (Tomazetti et al., 2005; Pasin et al., 2010), the peritoneal inflammation was induced by a single injection of *S. cerevisiae* (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.). The control group was injected with saline (0.9% NaCl, i.p.).

#### *Cell count in peritoneal wash*

Thirty minutes before of *S. cerevisiae* injection the animals were injected with 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, s.c.), 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.) and four hours after they were sacrificed by decapitation under anesthesia with thiopental. Abdominal skin below the sternum was nicked, and peritoneal wash was performed by i.p. injection of 10 mL of 20 mM Tris-HCl buffer with EGTA (2 mM), EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM). The abdominal cavity was gently massaged for 1 min and 8 mL of peritoneal wash was collected by aspiration with a 20-mL syringe. If blood was detected by visual inspection, the sample was discarded. A 300  $\mu$ L aliquot was destined for cell count in Neubauer chamber (1:3 dilution in Türk solution) by means of optical microscopy. Cellular smears were stained with May-Grunwald-Giemsa for differential analysis performed under immersion objective and leukocyte count was carried out by a subject who was not aware of previous treatment of samples. The samples were centrifuged (1500 *g*, 10 min), and 6-mL of supernatant were lyophilized and stored at - 80°C for posterior cytokine analysis.

#### *Measurement of peritoneal vascular permeability*

The animals were subcutaneously injected with 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, s.c.), 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.). Thirty minutes later the rats were subjected to deep ethereal sedation and Evans blue (EB; 25 mg/Kg, 0.2 ml) was injected intravenously (i.v.) through a tail lateral vein. The Evans blue injection was immediately followed by i.p. injection of *S. cerevisiae* (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl). Four hours later the animals were killed and their peritoneal cavities were washed as described above. The lavage fluid was centrifuged and the absorbance of dye in the supernatant was measured at 610 nm. The increase in the peritoneal capillary permeability was expressed in terms of the dye

( $\mu\text{g/mL}$ ) that leaked into the peritoneal cavity, according to the standard curve of Evans blue.

#### *Determination of myeloperoxidase (MPO) activity*

The neutrophil infiltration in the peritoneal fluid induced by *S. cerevisiae* was investigated indirectly by measuring MPO activity, which was assayed in accordance with (Suzuki et al., 1983), with some modifications. The rats were pre-treated with 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.), 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.) and thirty minutes later were injected with *S. cerevisiae* (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl, i.p.). Four hours after the animals were sacrificed by decapitation under anesthesia with thiopental. Briefly, the peritoneal cavity were washed with solution containing 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) plus 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). The samples were shaken, centrifuged (11.000 x g, 4°C, 20 min) and the supernatants were collected. For assay, 10  $\mu\text{l}$  of supernatant and 220  $\mu\text{l}$  of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 15% of 0.3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added in triplicate to a 96-well plate. The reaction was initiated by the addition of 20  $\mu\text{l}$  of 18.4 mM tetramethylbenzidine. The mixture was incubated for 3 min at 37°C and then immersed into ice bath. The reaction was stopped by the addition of 30  $\mu\text{l}$  of acetic acid and the absorbance was determined at a wavelength 630 nm by using a plate reader.

#### *TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ assay*

Lyophilized peritoneal fluid samples were suspended in 1000  $\mu\text{L}$  of 1% bovine albumin solution and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were determined by commercially available monoclonal immunoassay kits for each cytokine (R&D Systems Inc. - USA). The range of values detected by this assay was 100-6400 pg/mL (IL-1 $\beta$ ) and 5-2000 pg/mL (TNF- $\alpha$ ). The intra-assay coefficient of variations (CV) for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  assays were  $1.86 \pm 0.34\%$  and  $3.9 \pm 0.57\%$ , respectively. All samples were run in a single ELISA plate (one plate for each cytokine). Both cytokines concentrations were estimated by colorimetric measurement at 450 nm by means of an ELISA plate reader by interpolation from a standard curve. The results are expressed in pg/mL.

### *Measurement of nitrite/nitrate*

Nitric oxide was measured as its breakdown products nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) using the Griess method (Green et al., 1982). Samples of the peritoneal fluid obtained from vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) treated animals were collected, separated and stored at  $-80^\circ\text{C}$  and the levels of nitrate/nitrite were determined.

### **Statistical analysis**

Basal rectal temperature and changes in rectal temperature were expressed as means  $\pm$  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* analysis was carried out by the F test for simple effects, when appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **Results**

#### *Cell count in peritoneal wash*

We investigated the effect of compounds 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.), and 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) on total leukocyte count in the peritoneal cavity. *S. cerevisiae* injection into the peritoneal cavity of control animals significantly increased the leukocyte migration [ $F(1,28) = 38.42$ ;  $P < 0.05$ ] and the pre-treatment with compound 3Et-TFDP, administered thirty minutes before yeast injection, significantly reduced leukocyte influx [ $F(1,28) = 10.52$ ;  $P < 0.05$ , Fig. 2A]. On the other hand, statistical analysis revealed no significant effect of treatment with compound 3Pr-TFDP, on the *S. cerevisiae*-induced increase in the total number of leukocytes in the peritoneal cavity washes [ $F(1,28) = 0.81$ ;  $P > 0.05$ , Fig.2B].

The effect of 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c., 30 min before) and 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c., 30 min before) was also observed on differential leukocyte influx into the rat peritoneal cavity. Figure 3 shows that the previous injection of 3Et-TFDP significantly reduced the *S. cerevisiae*-induced increase polymorphonuclear [ $F(1,32) = 9.60$ ;  $P < 0.05$ ] and mononuclear cells count [ $F(1,32) = 15.62$ ;  $P < 0.05$ ] when compared to animals that received vehicle. However, pretreatment

with 3Pr-TFDP did not changed polymorphonuclear [ $F(1,32)= 0.61$ ;  $P>0.05$ ] and mononuclear [ $F(1,32)= 1.23$ ;  $P>0.05$ ] cells influx.

#### *Measurement of peritoneal vascular permeability*

In the Fig. 4 the effect of *S. cerevisiae* injection and compounds 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, s.c.) on peritoneal vascular permeability is shown. Statistical analysis revealed that *S. cerevisiae* increased the peritoneal vascular permeability [ $F(1,19)= 9.67$ ;  $P<0.05$ ] and pre-treatment with compound 3Et-TFDP significantly decreased peritoneal vascular permeability [ $F(1,19)= 5.28$ ;  $P<0.05$ , Fig. 4A]. However, the pre-treatment of animals with 3Pr-TFDP had no effect on peritoneal vascular permeability increase induced by *S. cerevisiae* [ $F(1,14)= 0.09$ ;  $P>0.05$ , Fig. 4B].

#### *Determination of myeloperoxidase (MPO) activity*

The MPO activity increased in the peritoneal fluid after *S. cerevisiae* injection (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.) when compared to animals that receive saline (0.9% NaCl, i.p.) [ $F(1,34)=11.34$ ;  $P<0.05$ , Fig. 5A]. However, in other set of the experiments pre-treatment of animals with 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c., 30 min before) significantly reduced the *S.cerevisiae*-induced increase in MPO activity [ $F(1,34)=5.49$ ;  $P<0.05$ , Fig. 5A]. On the other hand, MPO activity was not affected by 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) injection [ $F(1,34)= 0.03$ ;  $P>0.05$ , Fig. 5B].

#### *TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ assay*

We investigated whether 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP altered TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal fluid. Statistical analysis revealed that intraperitoneal (i.p.) injection of *S. cerevisiae* significantly increased TNF- $\alpha$  [ $F(1,23)= 14.02$ ;  $P<0.05$ ] and IL-1 $\beta$  levels [ $F(1,24)= 10.93$ ;  $P<0.05$ ] in the peritoneal cavity. Figure 6 shows that the pre-treatment with compounds TFDP, administered 30 min before *S. cerevisiae* injection, did not alter the TNF- $\alpha$  levels [ $F(1,23)= 0.04$ ;  $P>0.05$ , for 3Et-TFDP and  $F(1,22)=0.51$ ;  $P>0.05$ , for 3Pr-TFDP (Fig. 6A-B)]. Similarly, these compounds had no effect on IL-1 $\beta$



levels in the peritoneal fluid [F(1,24)= 0.37; P>0.05, for 3Et-TFDP and F(1,22)=0.02; P>0.05, for 3Pr-TFDP (Fig. 6C-D)].

#### *Measurement of nitrite/nitrate*

The nitrite/nitrate levels increased in the peritoneal fluid after *S. cerevisiae* injection (0.135 g/kg, 10 mL/Kg, i.p.) when compared to animals that receive saline (0.9% NaCl, i.p.) [F(1,33)=9.32; P<0.05]. However, pre-treatment of animals with 3Et-TFDP (140 µmol/kg, s.c., 30 min before) [F(1,33)=0.30; P>0.05, Fig. 7A] or 3Pr-TFDP (200 µmol/kg, s.c.) [F(1,30)=0.00; P>0.05, Fig. 6B] did not reduced the *S.cerevisiae*-induced increase in nitrite/nitrate levels.

#### **Discussion**

In the current study we showed that *S. cerevisiae* injection into the peritoneal cavity of animals increased the leukocyte migration, peritoneal vascular permeability, MPO activity, and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitrite/nitrate levels in the peritoneal wash. The s.c. administration of 3Et-TFDP, but not of 3Pr-TFDP, 60 min before inflammatory stimulus significantly reduced *S.cerevisiae*-induced increase in leukocyte influx, peritoneal vascular permeability and MPO activity, but did not alter *S. cerevisiae*-induced increase of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal wash.

Leukocyte migration and plasma protein extravasation represent major events leading to the onset of inflammation (Kolaczowska et al., 2002, Kolaczowska et al., 2006b), and are prominent features of the inflammation of the peritoneal membrane. The currently reported increase of leukocyte migration is in full agreement with this view. Moreover, we showed that pyrazole derivative 3Et-TFDP, but not 3Pr-TFDP, administered 30 min before yeast injection, significantly reduced leukocyte influx in the peritoneal cavity. We also showed that *S. cerevisiae* increased the peritoneal vascular permeability and pre-treatment with compound 3Et-TFDP, but not 3Pr-TFDP, significantly decreased this inflammatory parameter, suggesting a potential anti-inflammatory effect to this compound.

It was also shown that MPO activity increases in the peritoneal fluid after *S. cerevisiae* injection. MPO is a constituent of the azurophilic granules of

polymorphonuclear cells that oxidizes chloride ions to the potent bactericidal oxidant hypochlorous acid (HOCl) (Hampton et al., 1998) and its activity is an indirect marker of activated leukocytes and is implicated in exudation and cell migration (Klebanoff, 1999). Moreover, we showed that pre-treatment of animals with 3Et-TFDP significantly reduced the *S.cerevisiae*-induced increase in MPO activity, but MPO activity was not affected by 3Pr-TFDP injection. This inhibitory effect of 3Et-TFDP on the increase in MPO activity is consistent with the reduction of neutrophil influx counts reported herein. On the other hand, a previous study has demonstrated that the chronic treatment with 3Et-TFDP or dipyrone did not reduce the MPO activity in paw inflammation induced by CFA (Sauzem et al., 2009). Interestingly, they did not alter the recruitment of immune cells at the lesion site, while the results of the current study showed that 3Et-TFDP reduced leukocyte influx in the peritoneal cavity. These apparent conflicting findings can be explained by the different extension and intensity of the inflammatory response in these models, which are much more prominent in the peritonitis and include systemic repercussions, such as fever.

The anti-inflammatory properties of pyrazole compounds have been associated with the presence of carbonyl groups in the pyrazole ring (Ferreira, 1974) and have been showed that pyrazole derivatives lacking such a group have little or no anti-inflammatory activity (Beirith et al., 1998). This seems to be the case of MPCA, a pyrazole derivative very similar to 3Et-TFDP, that does not have anti-inflammatory effect on the carrageenin-induced paw edema (de Souza et al., 2001) and of MPF4 that had no anti-edematogenic effect on the CFA-induced paw edema (Milano et al., 2008b). Interestingly, despite 3Et-TFDP does not present the carbonyl group in its structure, our findings support an anti-inflammatory role for this compound in the *S.cerevisiae*-induced peritoneal inflammation.

The currently reported increase of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the peritoneal wash after *S. cerevisiae* injection is in agreement with previous reports that have shown that pro-inflammatory cytokines are important for development of fever, oedema formation (Faccioli et al., 1990, Long et al., 1990), peritonitis and cell recruitment (Kolaczowska et al., 2001, Kolaczowska et al., 2006a). These cytokines are induced during inflammation by the activation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, and can also induce the

synthesis of COX-2 and adhesion molecules, among other proteins (Hatada et al., 2000, Hayden and Ghosh, 2004) . In fact, these proinflammatory cytokines are essential for survival in host infections (Cross et al., 1989, Cross et al., 1995) but dysregulated expression of these cytokines also causes multiorgan injury, shock and death (Darville et al., 1993). According to this view, it is recognized that parenteral administration of high concentrations of proinflammatory cytokines often leads to development of systemic inflammatory response syndrome (Kelley et al., 2003). However, we also showed that injection with pyrazole derivative 3Et-TFDP and 3Pr-TFDP, administered 60 min before yeast injection, did not interfere on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in peritoneal fluid. These findings are in agreement with those previously reported by Sauzem and colleagues (Sauzem et al., 2009), since the chronic treatment of the rats with 3Et-TFDP did not reduce CFA-induced TNF- $\alpha$  levels increase. Moreover, Pasin and colleagues (Pasin et al., 2010) showed that 3Et- and 3Pr-TFDP did not reduce baker's yeast-induced increases of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels.

It was also shown that nitrite/nitrate levels increased in the peritoneal fluid 4 hours after *S. cerevisiae* injection when compared to animals that receive saline (Fig 7). This result is in agreement with those reported by Yao e colleagues (2004), who has shown that the zymosan increases nitric oxide (NO) production. The treatment of animals with 3Et-TFDP or 3Pr-TFDP did not reduce this increase.

In summary, in this study we showed that 3Pr-TFDP did not present anti-inflammatory effect in tested models. The risk of agranulocytosis associated with the use of pyrazolones has been considered to be very low. Nevertheless, it has been reported that the reactivity of the pyrazolones with neutrophils and possible formation of reactive intermediates are capable of inducing agranulocytosis (Utrecht et al., 1995). In fact, aminopyrine and dipyron prevent PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)-induced neutrophil burst, fact that may be related to the potential adverse effects (Costa et al., 2006). Taking into account that 3Pr-TFDP did not affected the leukocyte migration and MPO activity, our data suggests that this compound would not have potential to induce agranulocytosis. However we can not rule out the possibility that this compound generates metabolites. Moreover, we showed the anti-inflammatory potential of pyrazole

derivative 3Et-TFDP, which act on leukocyte influx, peritoneal vascular permeability and MPO activity.

### **Acknowledgements**

Research supported by CNPq, CAPES and FAPERGS. C.F.M., J.F. and M.A.R. are the recipients of CNPq fellowships, grant numbers 301552/2007-0 and 500096/2003-1, respectively.

The authors thank Dr. Jânio Morais Santurio and Dr. Sydney Hartz Alves for providing necessary facilities to carry out this research work.

### **References**

- Beirith, A., Santos, A. R., Rodrigues, A. L., Creczynski-Pasa, T. B., Calixto, J. B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 345, 233-245.
- Bekhit, A. A., Ashour, H. M., Abdel Ghany, Y. S., Bekhit Ael, D., Baraka, A., 2008. Synthesis and biological evaluation of some thiazolyl and thiadiazolyl derivatives of 1H-pyrazole as anti-inflammatory antimicrobial agents. *Eur J Med Chem.* 43, 456-463.
- Bekhit, A. A., Ashour, H. M., Bekhit Ael, D., Bekhit, S. A., 2009. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazole derivatives as anti-inflammatory antimicrobial agents. *Med Chem.* 5, 103-117.
- Chandra, T., Garg, N., Lata, S., Saxena, K. K., Kumar, A., Synthesis of substituted acridinyl pyrazoline derivatives and their evaluation for anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem.* 45, 1772-1776.
- Costa, D., Marques, A. P., Reis, R. L., Lima, J. L., Fernandes, E., 2006. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radic Biol Med.* 40, 632-640.

- Cross, A., Asher, L., Seguin, M., Yuan, L., Kelly, N., Hammack, C., Sadoff, J., Gemski, P., Jr., 1995. The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J Clin Invest.* 96, 676-686.
- Cross, A. S., Sadoff, J. C., Kelly, N., Bernton, E., Gemski, P., 1989. Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor alpha/cachectin and murine interleukin 1 alpha protects mice from lethal bacterial infection. *J Exp Med.* 169, 2021-2027.
- DalBo, S., Jurgensen, S., Horst, H., Ruzza, A. A., Soethe, D. N., Santos, A. R., Pizzolatti, M. G., Ribeiro-do-Valle, R. M., 2005. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. *J Pharm Pharmacol.* 57, 765-771.
- Darville, T., Giroir, B., Jacobs, R., 1993. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS): immunology and potential immunotherapy. *Infection.* 21, 279-290.
- de Souza, F. R., Figuera, M. R., Lima, T. T., de Bastiani, J., Barcellos, I. B., Almeida, C. E., de Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Flores, A. E., de Mello, C. F., 2001. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.* 68, 525-530.
- Doherty, N. S., Poubelle, P., Borgeat, P., Beaver, T. H., Westrich, G. L., Schrader, N. L., 1985. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. *Prostaglandins.* 30, 769-789.
- Faccioli, L. H., Souza, G. E., Cunha, F. Q., Poole, S., Ferreira, S. H., 1990. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions.* 30, 344-349.
- Ferreira, S. H., Vane, J., 1974. New aspects of the mode of action nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol* 14, 57-73.
- Godoy, M. C., Figuera, M. R., Souza, F. R., Flores, A. E., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Zanatta, N., Martins, M. A., Bonacorso, H. G., Mello, C. F., 2004. Alpha 2-

- adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 496, 93-97.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126, 131-138.
- Hall, J. C., Heel, K. A., Papadimitriou, J. M., Platell, C., 1998. The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology.* 114, 185-196.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 92, 3007-3017.
- Hatada, E. N., Krappmann, D., Scheidereit, C., 2000. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 12, 52-58.
- Hayden, M. S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-2224.
- Jeong, T. S., Kim, K. S., Kim, J. R., Cho, K. H., Lee, S., Lee, W. S., 2004. Novel 3,5-diaryl pyrazolines and pyrazole as low-density lipoprotein (LDL) oxidation inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 14, 2719-2723.
- Kelley, K. W., Bluthe, R. M., Dantzer, R., Zhou, J. H., Shen, W. H., Johnson, R. W., Broussard, S. R., 2003. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 17 Suppl 1, S112-118.
- Klebanoff, S. J., 1999. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 111, 383-389.
- Kolaczowska, E., Chadzinska, M., Scislowska-Czarnecka, A., Plytycz, B., Opdenakker, G., Arnold, B., 2006a. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology.* 211, 137-148.
- Kolaczowska, E., Scislowska-Czarnecka, A., Chadzinska, M., Plytycz, B., van Rooijen, N., Opdenakker, G., Arnold, B., 2006b. Enhanced early vascular permeability in gelatinase B (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of COX-1-derived PGE<sub>2</sub> of macrophage origin. *J Leukoc Biol.* 80, 125-132.

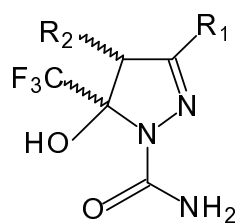
- Kolaczowska, E., Seljelid, R., Plytycz, B., 2001. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. *Inflamm Res.* 50, 415-421.
- Kolaczowska, E., Shahzidi, S., Seljelid, R., van Rooijen, N., Plytycz, B., 2002. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation.* 26, 61-71.
- Long, N. C., Otterness, I., Kunkel, S. L., Vander, A. J., Kluger, M. J., 1990. Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol.* 259, R724-728.
- Manojkumar, P., Ravi, T. K., Gopalakrishnan, S., 2009. Antioxidant and antibacterial studies of arylazopyrazoles and arylhydrazonopyrazolones containing coumarin moiety. *Eur J Med Chem.* 44, 4690-4694.
- Martins, D. M., Torres, B. G., Spohr, P. R., Machado, P., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Emanuelli, T., 2009. Antioxidant potential of new pyrazoline derivatives to prevent oxidative damage. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 104, 107-112.
- Milano, J., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Sauzem, P. D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., Rubin, M. A., Ferreira, J., Bonacorso, H. G., 2008a. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol.* 581, 86-96.
- Milano, J., Rossato, M. F., Oliveira, S. M., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., Rubin, M. A., Ferreira, J., Bonacorso, H. G., 2008b. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci.* 83, 739-746.
- Nitulescu, G. M., Draghici, C., Missir, A. V., Synthesis of new pyrazole derivatives and their anticancer evaluation. *Eur J Med Chem.*

- Pasin, J. S. M., Ferreira, A. P. O., Saraiva, A. L. L., Ratzlaff, V., Andrighetto, R., Machado, P., Marchesan, S., Zanette, R. A., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A. P., Ferreira, J., Mello, C. F. Antipyretic and antioxidant activities of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles in rats. No prelo 2010.
- Prokopp, C. R., Rubin, M. A., Sauzem, P. D., de Souza, A. H., Berlese, D. B., Lourega, R. V., Muniz, M. N., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., 2006. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. *Braz J Med Biol Res.* 39, 795-799.
- Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., Isakson, P. C., 1994. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 917-925.
- Rodrigues, R. V., Lanznaster, D., Longhi Balbinot, D. T., Gadotti Vde, M., Facundo, V. A., Santos, A. R., 2009. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. *Biol Pharm Bull.* 32, 1809-1812.
- Sauzem, P. D., Machado, P., Rubin, M. A., da, S. S. a. G., Faber, H. B., de Souza, A. H., Mello, C. F., Beck, P., Burrow, R. A., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., 2008. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles: novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur J Med Chem.* 43, 1237-1247.
- Sauzem, P. D., Sant'Anna Gda, S., Machado, P., Duarte, M. M., Ferreira, J., Mello, C. F., Beck, P., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Rubin, M. A., 2009. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol.* 616, 91-100.
- Souza, F. R., Souza, V. T., Ratzlaff, V., Borges, L. P., Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., 2002. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-carboxyamides in mice. *Eur J Pharmacol.* 451, 141-147.



- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 132, 345-352.
- Tabarelli, Z., Rubin, M. A., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Missio, T. P., Teixeira, M. V., Sinhorin, A. P., Martins, M. A., Zanatta, N., Bonacorso, H. G., Mello, C. F., 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz J Med Biol Res.* 37, 1531-1540.
- Tadimeti, S. R., Currie, J. L., Shaffer, A. F., Isakson, P. C., 1994. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 917-925.
- Tomazetti, J., Avila, D. S., Ferreira, A. P., Martins, J. S., Souza, F. R., Royer, C., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Martins, M. A., Zanatta, N., Mello, C. F., 2005. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Methods.* 147, 29-35.
- Utrecht, J. P., Ma, H. M., MacKnight, E., McClelland, R., 1995. Oxidation of aminopyrine by hypochlorite to a reactive dication: possible implications for aminopyrine-induced agranulocytosis. *Chem Res Toxicol.* 8, 226-233.
- Yao, V., McCauley, R., Cooper, D., Platell, C., Hall, J. C., 2004. Zymosan induces nitric oxide production by peritoneal mesothelial cells. *ANZ J Surg.* 74, 266-269.

Figures:



	3Et- TFDP	3Pr- TFDP
R <sub>1</sub>	Et	Pr
R <sub>2</sub>	H	H

Figure 1: Chemical structure of TFDPs.

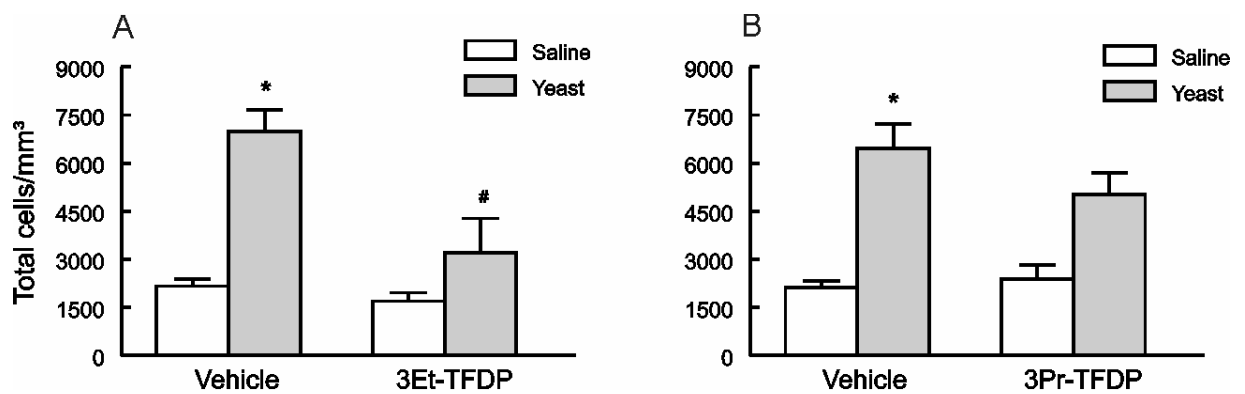


Figure 2: Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 2A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.; 2B) on the number of total cells present in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae*. The peritoneal fluid was collected at 4 h after *S.cerevisiae* injection. Values represent the mean number of cells/mm<sup>3</sup> (n=9 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA).

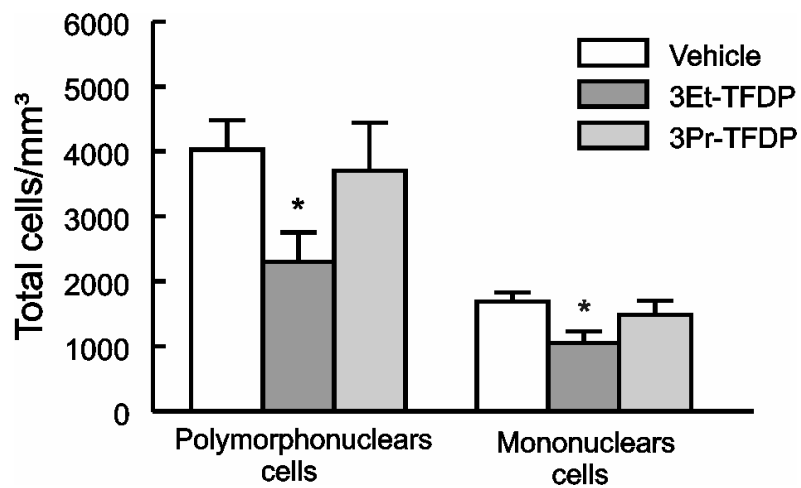


Figure 3: Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu\text{mol/kg}$ , 5 mL/Kg, s.c.) on the number of differential cells present in rat cavity washes in the presence of *S.cerevisiae*. The peritoneal fluid was collected at 4 h after *S.cerevisiae* injection. Values represent the mean number of cells/ $\text{mm}^3$  (n=7-8 per group). \*P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA).

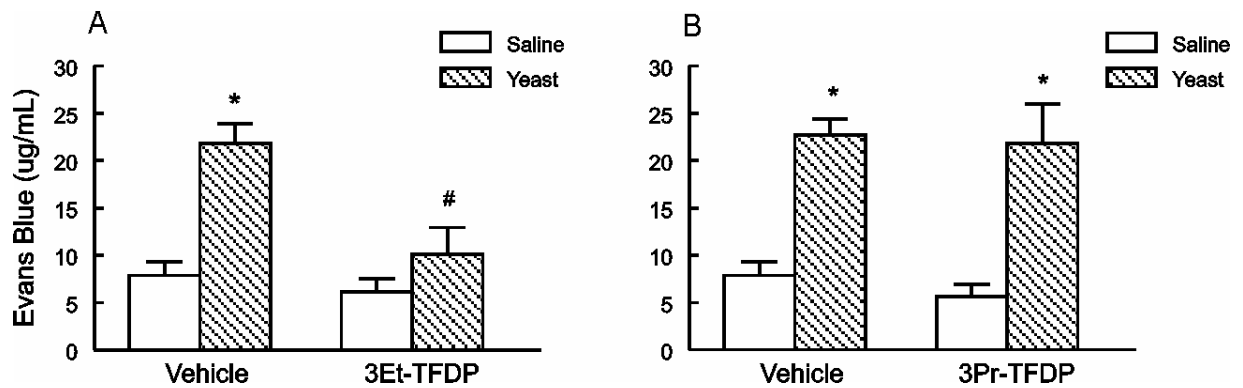


Figure 4: Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.; 4A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.; 4B) on Evans Blue dye content in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae*. Values represent the mean number of cells/mm<sup>3</sup> (n=4-7 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA).

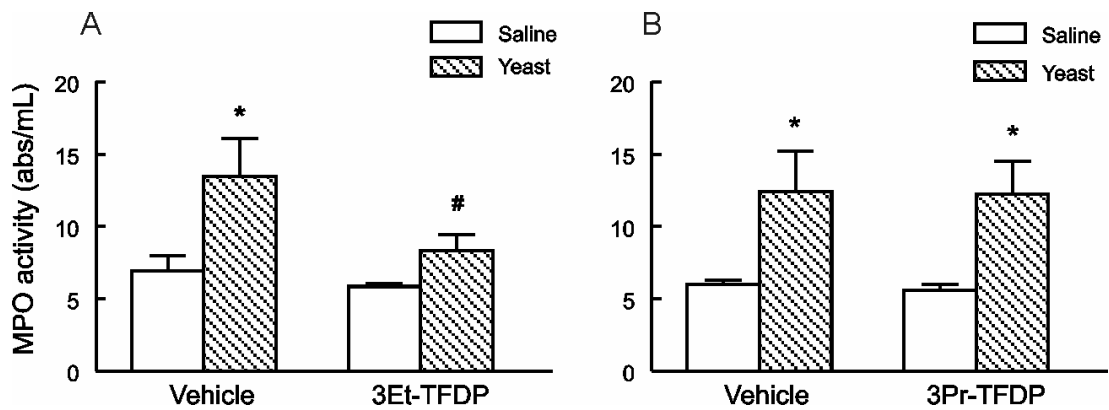


Figure 5: Effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.; 5A) or 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.; 5B) on MPO activity in rat cavity washes in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n=8-11 per group). \*P<0.05 compared with saline and # P<0.05 compared with vehicle (two-way ANOVA).

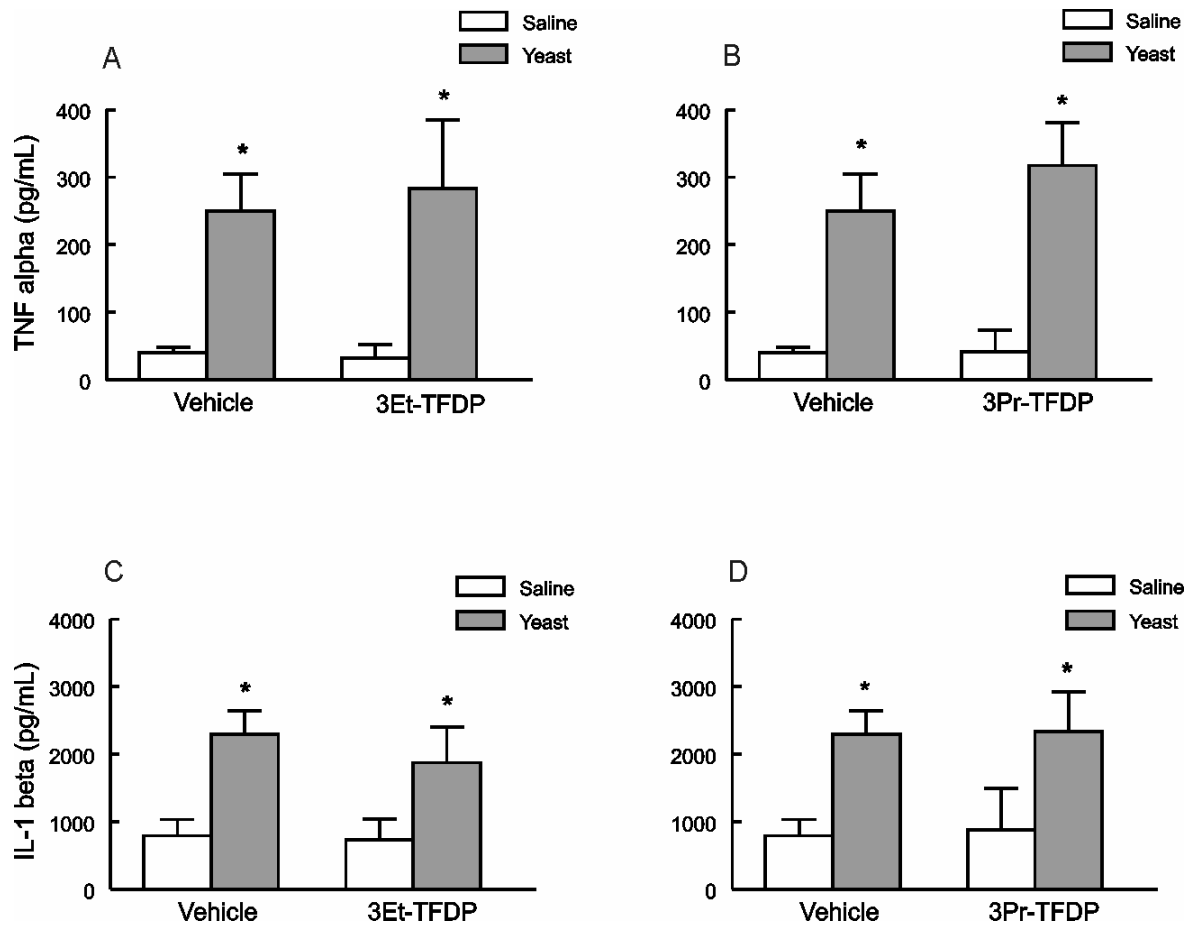


Figure 6: Lack of effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) on TNF- $\alpha$  (Fig. 6A-B) and IL-1 $\beta$  (Fig. 6C-D) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n= 6-8 per group). \* P<0.05 compared with saline (two-way ANOVA).

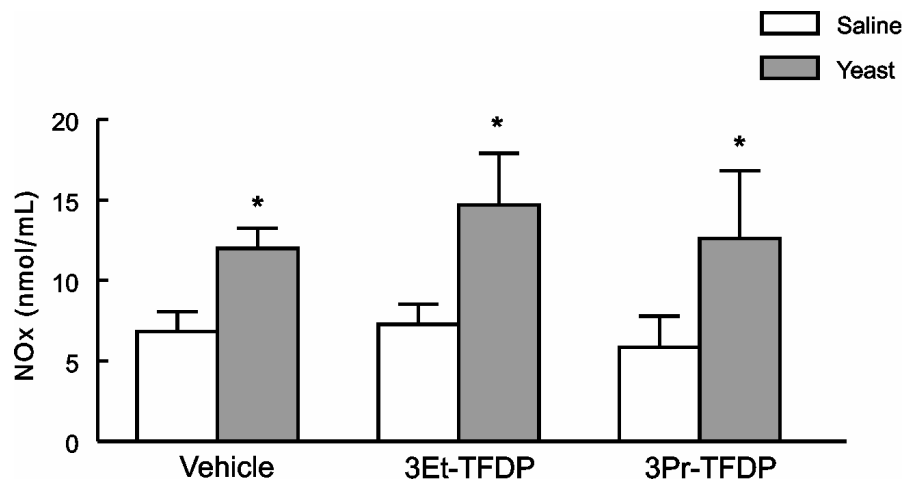


Figure 7: Lack of effect of treatment with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 mL/Kg, s.c.), 3Et-TFDP (140  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) or 3Pr-TFDP (200  $\mu$ mol/kg, 5 mL/Kg, s.c.) on nitrite (NOx) levels in peritoneal fluid in the presence or absence of *S.cerevisiae* (n= 7-10 per group). \* P<0.05 compared with saline (two-way ANOVA).



# PARTE III

---

**DISCUSSÃO**

### 3. DISCUSSÃO

A febre é manifestada por diversas espécies em resposta à invasão de agentes infecciosos, porém pode manifestar-se em doenças auto-imunes, vasculares ou neoplásicas, entre outras condições (Blatteis et al., 2005). É consenso entre os autores que ela é o componente mais importante da reação de fase aguda (Blatteis e Sehic, 1997, Dinarello e Bunn, 1997, Blatteis et al., 2005) e embora seja benéfica ao hospedeiro, pode acarretar prejuízos em algumas situações clínicas (Hasday et al., 2000). Apesar da variedade de fármacos com propriedades antipiréticas e antiinflamatórias disponíveis no mercado, seus efeitos adversos proeminentes limitam o uso terapêutico.

Inúmeros estudos têm relatado a síntese de novos derivados pirazolínicos com atividades analgésica (de Souza et al., 2001, Godoy et al., 2004, Tabarelli et al., 2004, Milano et al., 2008a, Milano et al., 2008b) e antipirética (Souza et al., 2002, Tomazetti et al., 2005). Os autores têm explorado a hipótese de que o benzeno, o qual está presente na salicilamida, pode ser mimetizado com substituições apropriadas na posição 3 ou 4 do anel pirazol. Além disso, a presença de um grupamento trifluometil nos compostos cíclicos, especialmente em uma posição estratégica, tornou-se um importante aspecto estudado na pesquisa farmacêutica devido às propriedades físicas e biológicas do fluor. Por exemplo, a substituição de um grupamento metil por um trifluorometil resulta em maior lipofilicidade, facilitando a absorção das moléculas por sistemas biológicos e, portanto, melhorando as propriedades farmacocinéticas de alguns compostos (Lin, 2000).

No capítulo I do presente trabalho foram determinados os efeitos de oito derivados 5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida sobre a febre e a inflamação induzidas pela administração intraperitoneal de *S. cerevisiae* em ratos. Estudos prévios haviam demonstrado que este modelo de febre é sensível a antipiréticos clássicos e novos (Tomazetti et al., 2005).

Os derivados pirazolínicos 3H-TFDP, 3Et-TFDP, 3Pr-TFDP, 3Bu-TFDP, 3Ph-TFDP e 4Me-TFDP diminuíram significativamente a  $T_R$  dos animais febris em 2 horas. Interessantemente, compostos descritos como bons analgésicos em estudos prévios

(Sauzem et al., 2008; Sauzem et al., 2009) também apresentaram atividade antipirética significativa no presente estudo.

Uma avaliação preliminar da relação estrutura-atividade sugere que o alongamento da cadeia carbônica para 3 carbonos na posição 3 do anel pirazol aumenta a atividade antipirética (H<etil<propil<butil), com exceção do derivado 3Me-TFDP, o qual não apresentou efeito antipirético. O aumento da cadeia carbonada aumenta a lipofilicidade e pode modificar a afinidade por alvos específicos, causando alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas. No entanto, analisando-se somente a atividade antipirética e o aumento da cadeia carbônica linear, não é possível determinar se esse alongamento da cadeia causa efeito antipirético devido à alterações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas. Por outro lado, considerando que a substituição da cadeia linear por um grupamento ramificado (i-propil) também aumenta a lipofilicidade ao mesmo tempo em que diminui a atividade antipirética, é possível inferir que o alongamento da cadeia linear possa alterar as propriedades farmacodinâmicas, embora outras ações não possam ser descartadas.

Após a avaliação do efeito da administração subcutânea dos derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida sobre a febre induzida por *S. cerevisiae* nos ratos, foi calculado o índice de atividade antipirética a fim de selecionar os dois compostos mais eficazes. De fato, nossos resultados apontaram que a atividade antipirética dos pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP é comparável àquela da dipirona, um antipirético clássico pertencente à classe dos derivados pirazolínicos, no modelo de febre induzida por *S. cerevisiae* em ratos. Dessa forma, selecionou-se os compostos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP para a continuidade do estudo.

Nós mostramos que a injeção i.p. de *S. cerevisiae* aumenta a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, particularmente leucócitos polimorfonucleares. Imediatamente após dano tecidual ou infecção, os leucócitos, predominantemente neutrófilos, migram do leito vascular para os tecidos lesados. Este recrutamento de leucócitos é uma característica central da resposta inflamatória (Simon e Green, 2005) e tem sido associado com a patogênese de várias condições inflamatórias (Hatada et al., 2000, Kolaczowska et al., 2006). Neste contexto, quando administrado 4 horas após a injeção do estímulo inflamatório, o derivado pirazolínico 3Et-TFDP reduziu

significativamente o influxo leucocitário para a cavidade peritoneal, sugerindo que o efeito antipirético deste composto possa envolver inibição da migração leucocitária. Ao contrário, o derivado 3Pr-TFDP não teve efeito sobre esse parâmetro inflamatório.

A atividade antipirética dos derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida descrita por nós está, de certa forma, em acordo com estudos prévios que têm mostrado efeito antipirético significativo para derivados 5-triclorometil pirazolínicos (Souza et al., 2002, Tomazetti et al., 2005). Porém, a comparação dos compostos 5-trifluormetil com os análogos 5-triclorometil com as substituições 3-metil e 3-fenil, revela que enquanto o composto 5-trifluormetil com a substituição 3-metil perde atividade antipirética, o composto 5-trifluormetil com a substituição 3-fenil mantém o efeito antipirético. Portanto, pode ser sugerido que a alteração de 5-triclorometil para 5-trifluormetil não altera a atividade antipirética, exceto se o substituinte na posição 3 do anel pirazol for um grupamento metil. Interessantemente, se este mesmo metil for transferido para a posição 4 do anel (composto 4Me-TFDP), o derivado pirazolínico correspondente mantém a atividade antipirética.

A injeção de *S. cerevisiae* induziu aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no lavado peritoneal, resultado que está de acordo com relatos prévios que os níveis de TNF- $\alpha$  aumentam nas primeiras fases da febre induzida por mananas de *S. cerevisiae*, o componente pirogênico do *S. cerevisiae* (Ataoglu et al., 2000). De fato, as citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 agem diretamente no hipotálamo para induzir a resposta febril (Kluger, 1991). Assim, a administração de um composto que atenua a produção de citocinas pode diminuir a febre (Pasin et al., 2010). Entretanto, no presente estudo, o tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal dos ratos injetados com *S. cerevisiae*. Estes resultados sugerem que outros mecanismos que não a diminuição nos níveis de citocinas possam justificar o efeito antipirético descrito para estes compostos testados.

Várias linhas de evidências clínicas e experimentais demonstram que as COXs exercem papel importante no desenvolvimento da febre (Vane, Bakhle, Botting, 1998), entre elas que os inibidores destas enzimas são capazes de reverter a febre induzida por LPS (Kozak et al., 1998a). Neste sentido, têm sido proposto um papel mais

relevante para a COX-2 no desenvolvimento da febre, já que camundongos geneticamente modificados que não expressam a COX-2 não são capazes de desenvolver febre, enquanto aqueles que não expressam a isoforma 1 da COX tornam-se febris em resposta a pirógenos exógenos ou endógenos (Li et al., 1999). De fato, inibidores seletivos da COX-2, incluindo o derivado pirazolínico celecoxibe, revertem a febre (Gierse et al., 1999). Estes estudos têm consolidado as COXs, particularmente a isoforma 2, como alvos potenciais para os compostos antipiréticos. Porém, ensaios específicos realizados neste estudo revelaram que os compostos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não alteram a atividade da COX-1 e COX-2. Assim, outro mecanismo, que não a COX deve estar envolvido no efeito antipirético desses compostos.

É amplamente aceito que o processo febril está intimamente relacionado à inflamação (Blatteis e Sehic, 1997, Gabay e Kushner, 1999, Blatteis et al., 2005) e, portanto, às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Bogdan et al., 2000). Neste contexto, um grupo de evidências sugere a existência de uma modulação redox das respostas inflamatórias e febre. De fato, antioxidantes como azul de metileno (Weihrauch e Riedel, 1997), ditiotreitól (Riedel e Maulik, 1999), melatonina (Nava et al., 1997), curcumina (Huang et al., 2008), ácido  $\alpha$ -lipóico (Huang et al., 2006), N-acetilcisteína (Lee et al., 2003) e leptanol (Johnson et al., 2010) previnem a febre induzida por LPS (Nava et al., 1997, Weihrauch e Riedel, 1997, Riedel e Maulik, 1999, Lee et al., 2003, Huang et al., 2006, Huang et al., 2008) e fermento de padeiro (Johnson et al., 2010). Além disso, o ácido ascórbico potencializa o efeito antipirético do acetaminofeno (Dange et al., 1985).

Levando em consideração as evidências experimentais apontadas acima, bem como o efeito dos compostos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP sobre a febre e migração leucocitária para a cavidade peritoneal, decidimos verificar se eles teriam atividade antioxidante. Neste sentido, a atividade de sequestro do radical DPPH constitui-se em um ensaio padrão para avaliação de antioxidantes, o qual é rápido, simples e altamente sensível (Brand-Williams et al., 1995). Esta técnica baseia-se na diminuição da absorvância do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, o radical DPPH, na presença de antioxidantes. O elétron desemparelhado do radical DPPH é responsável pela

absorbância a 517 nm. Quando o DPPH recebe um elétron do antioxidante, a absorbância diminui.

No presente estudo, os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP, os quais reverteram a febre induzida por *S. cerevisiae*, neutralizaram o DPPH, indicando uma significativa atividade antioxidante. Estes resultados são corroborados por relatos prévios da atividade antioxidante de outros derivados pirazolínicos (Costa et al., 2006, Martins et al., 2009). Assim, os resultados apresentados por nós, associados ao fato de que um número considerável de antioxidantes, de naturezas químicas diferentes, diminuem a febre induzida por LPS e por fermento de padeiro, permitem sugerir que a atividade antipirética do 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP possa envolver sua capacidade antioxidante, particularmente se considerarmos que eles não alteram a atividade da COX. No entanto, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos pelos quais esses compostos produzem antipirese.

No segundo capítulo deste trabalho nós mostramos que o pré-tratamento com os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP, mas não com o 3Pr-TFDP, inibe o aumento na migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzida por *S. cerevisiae* em ratos. Outro achado interessante de nosso trabalho foi que a administração i.p. de *S. cerevisiae* induz aumento da permeabilidade vascular peritoneal e o pré-tratamento com o composto 3Et-TFDP, mas não com o 3Pr-TFDP, diminuiu significativamente este parâmetro inflamatório. De fato, os dois eventos mais importantes para o aparecimento da inflamação são o aumento prévio da permeabilidade vascular e a infiltração de neutrófilos no peritônio (Hatada et al., 2000). Assim, nossos resultados sinalizam um possível efeito antiinflamatório para o composto 3Et-TFDP.

A mieloperoxidase (MPO) catalisa a transformação dos íons cloreto no ácido hipocloroso (HOCl), um potente bactericida (Hampton et al., 1998), e sua atividade constitui-se em um marcador indireto da ativação de neutrófilos, e está implicada na exsudação e migração celular (Klebanoff, 1999). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com 3Et-TFDP reduziu significativamente o aumento na atividade da MPO, o qual não foi afetado pela injeção de 3Pr-TFDP. Este efeito inibitório do 3Et-TFDP sobre a atividade da MPO é consistente com o influxo de neutrófilos peritoneal relatado por nós. Por outro lado, um estudo anterior mostrou que

o tratamento crônico com 3Et-TFDP não reduz a atividade da MPO na inflamação de pata induzida por CFA (Sauzem et al., 2009). Interessantemente, naquele estudo o 3Et-TFDP não alterou o recrutamento de leucócitos para o local da lesão, enquanto os resultados do presente estudo mostram que 3Et-TFDP reduziu o influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal. Esses resultados aparentemente conflitantes podem ser explicados pelas diferentes extensões e intensidades das respostas inflamatórias nestes modelos, as quais são muito mais proeminentes na peritonite, e incluem repercussões sistêmicas como a febre.

As propriedades antiinflamatórias de compostos pirazolínicos têm sido associadas com a presença de grupamentos carbonila no anel pirazol (Ferreira, 1974). De fato, já foi demonstrado que os derivados pirazolínicos que não possuem este grupamento apresentam pouca ou nenhuma atividade antiinflamatória (Beirith et al., 1998). Este parece ser o caso do MPCA, um derivado pirazolínico muito semelhante ao 3Et-TFDP, que não tem efeito antiinflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina (de Souza et al., 2001) e do MPF4 que não teve nenhum efeito anti-edematogênico no edema de pata induzido por CFA (Milano et al., 2008b). Em contrapartida, apesar do composto 3Et-TFDP também não possuir o grupamento carbonila, nossos resultados suportam um papel antiinflamatório para este composto no modelo de inflamação peritoneal induzida por *S. cerevisiae*. O aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal induzido pela injeção de *S. cerevisiae* está de acordo com relatos anteriores que demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias são importantes para o desenvolvimento de febre, formação edema (Faccioli et al., 1990, Long et al., 1990a), peritonite e recrutamento de células (Kolaczowska et al., 2001, Kolaczowska et al., 2006). Essas citocinas são induzidas durante a inflamação pela ativação de fatores de transcrição como NF-kB e pode também induzir a síntese de COX-2 e moléculas de adesão, entre outras proteínas (Hatada et al., 2000, Hayden e Ghosh, 2004). Na verdade, elas são essenciais para a sobrevivência de hospedeiros infectados (Cross et al., 1989, Cross et al., 1995), mas a expressão desregulada dessas citocinas também provoca danos em múltiplos órgãos, choque e óbito (Darville et al., 1993). Neste contexto, é reconhecido que a administração parenteral de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias leva, muitas vezes, ao desenvolvimento da



síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Kelley et al., 2003). Nossos resultados evidenciaram que o pré-tratamento com os pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP, administrados 30 min antes da injeção de *S. cerevisiae*, não é capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal dos ratos. Estes resultados estão de acordo com os anteriormente relatados por (Sauzem et al., 2009), uma vez que o tratamento crônico com 3Et-TFDP foi ineficaz em reduzir o aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  induzido pela injeção de CFA.

No presente estudo, também observamos um aumento nos níveis de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>), produtos relativamente estáveis formados a partir do NO, no líquido peritoneal quatro horas após a injeção de *S. cerevisiae*, quando comparados aos animais que receberam salina. Este resultado está de acordo com aqueles relatados por Yao e colaboradores (2004), que mostraram que a administração intraperitoneal de zimosan induz aumento da produção de NO. No entanto, o pré-tratamento dos animais com 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não reduziu esse aumento.

Um importante aspecto a ser considerado nesta discussão diz respeito aos efeitos adversos e à toxicidade dos derivados pirazolínicos. Pesquisa realizada anteriormente demonstrou que a administração subcutânea crônica do composto 3Et-TFDP não causou lesões da mucosa estomacal de ratos, sugerindo uma boa tolerabilidade gástrica. Já a análise macroscópica do fígado, rins e baço não revelou lesões aparentes e também não houve alteração na porcentagem de peso dessas vísceras em relação ao peso corporal dos animais. Além disso, o 3Et-TFDP não causou a morte de nenhum animal e nem produziu sinais comportamentais de toxicidade, como por exemplo, convulsões ou dificuldades locomotoras (Sauzem et al., 2009). No entanto, outros parâmetros necessitam ser ainda avaliados a fim de investigar se os compostos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP realmente não produzem efeitos adversos ou tóxicos.

O risco de agranulocitose associado com o uso de derivados pirazolínicos tem sido considerado baixo, apesar disso, tem sido relatado que a reatividade das pirazolonas com os neutrófilos e possível formação de intermediários reativos são capazes de induzir agranulocitose (Utrecht et al., 1995). Neste contexto, Costa e colaboradores (2006) sugerem que o fato de a aminopirina e a dipirona prevenirem a explosão respiratória induzida por acetato de forbol miristato (PMA) pode estar

relacionado aos seus efeitos adversos potenciais. Levando em consideração que o composto 3Pr-TFDP não afetou a migração leucocitária e a atividade da mieloperoxidase, nossos dados sugerem que ele não deva ter potencial para induzir agranulocitose. No entanto, nós não podemos descartar a possibilidade que o 3Pr-TFDP gere metabólitos passíveis de desencadear tal efeito.

Nossos resultados demonstram a capacidade antiinflamatória do 3Et-TFDP, manifestada através da inibição do aumento da migração leucocitária e da permeabilidade vascular peritoneal, bem como sua significativa atividade antipirética e antioxidante. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos de ação do 3Et-TFDP, os dados apresentados aqui apontam um composto promissor.

---

**CONCLUSÕES**

## 4. CONCLUSÕES

### Capítulo 1

- A administração subcutânea dos derivados pirazolínicos, nas maiores doses testadas, diminui a temperatura corporal de ratos jovens.

- A administração subcutânea dos derivados pirazolínicos, em doses sem efeito *per se* sobre a temperatura corporal, é capaz de reverter a febre induzida por *S. cerevisiae* (fermento de padeiro), sendo os compostos pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP aqueles obtiveram o melhor índice de atividade antipirética.

- O derivado pirazolínico 3Et-TFDP, mas não o 3Pr-TFDP, foi capaz reverter o aumento da migração leucocitária no fluido peritoneal induzido pela administração de *S. cerevisiae*.

- Os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não reduzem o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal induzido pela administração de *S. cerevisiae*.

- Os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não modificam a atividade da COX *in vitro*.

- Os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP apresentaram atividade antioxidante.

### Capítulo 2

- O tratamento com o derivado pirazolínico 3Et-TFDP, mas não com o 3Pr-TFDP, previne o aumento na migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzida por *S. cerevisiae* em ratos.

- A injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* aumenta a permeabilidade vascular peritoneal em ratos.

- O derivado pirazolínico 3Et-TFDP, mas não o 3Pr-TFDP, previne o aumento na permeabilidade vascular peritoneal induzida pela injeção de *S. cerevisiae* em ratos.

- A injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* aumenta a atividade da mieloperoxidase no fluido peritoneal em ratos.

- O derivado pirazolínico 3Et-TFDP, mas não o 3Pr-TFDP, previne o efeito o aumento da atividade da mieloperoxidase induzida pela injeção de *S. cerevisiae* em ratos.

- Os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não previnem o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal induzido por *S. cerevisiae* em ratos.

- A injeção intraperitoneal de *S. cerevisiae* aumenta os níveis de nitrito/nitrato no fluido peritoneal de ratos.

- Os derivados pirazolínicos 3Et-TFDP e 3Pr-TFDP não previnem o aumento dos níveis de nitrito/nitrato no fluido peritoneal induzidos por *S. cerevisiae* em ratos.

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho pode-se concluir que os derivados pirazolínicos 3Et- e 3Pr-TFDP podem ser compostos antipiréticos promissores e antiinflamatórios promissores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, H., Fujisawa, H., Maekawa, T., Yamashita, T., Ito, H., 1995. Changes in the extracellular glutamate concentrations in the rat cortex following localized by hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 11, 587-599.
- Anderson, K. V., 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 12, 13-19.
- Arellano, F., Sacristan, J. A., 1990. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. *Eur J Clin Pharmacol*. 38, 617-619.
- Aronoff, D. M., Neilson, E. G., 2001. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. *Am J Med*. 111, 304-315.
- Ataoglu, H., Dogan, M. D., Mustafa, F., Akarsu, E. S., 2000. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines. *Life Sci*. 67, 2247-2256.
- Atkins, E., 1984. Fever: the old and the new. *J Infect Dis*. 149, 339-348.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D., Nauseef, W., 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 397, 342-344.
- Baeuerle, P. A., Henkel, T., 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 12, 141-179.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Broadwell, R. D., 1995. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*. 2, 241-248.
- Bartfai, T., Conti, B., 2010. Fever. *ScientificWorldJournal*. 10, 490-503.

- Bedard, K., Krause, K. H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245-313.
- Beirith, A., Santos, A. R., Rodrigues, A. L., Creczynski-Pasa, T. B., Calixto, J. B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 345, 233-245.
- Bekhit, A. A., Abdel-Aziem, T., 2004. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem.* 12, 1935-1945.
- Belay, E. D., Bresee, J. S., Holman, R. C., Khan, A. S., Shahriari, A., Schonberger, L. B., 1999. Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997. *N Engl J Med.* 340, 1377-1382.
- Benamar, K., McMenamin, M., Geller, E. B., Chung, Y. G., Pintar, J. E., Adler, M. W., 2005. Unresponsiveness of mu-opioid receptor knockout mice to lipopolysaccharide-induced fever. *Br J Pharmacol.* 144, 1029-1031.
- Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemost.* 70, 152-154.
- Blatteis, C. M., 2003. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? . *Journal of Thermal Biology*, 1-13.
- Blatteis, C. M., 2006. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther.* 111, 194-223.
- Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., Perlik, V., 2005. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76, 1-18.

- Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Perlik, V., Feleder, C., 2004. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of complement. *Front Biosci.* 9, 915-931.
- Blatteis, C. M., Quan, N., Xin, L., Ungar, A. L., 1990. Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull.* 25, 895-901.
- Blatteis, C. M., Sehic, E., 1997. Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 813, 445-447.
- Blatteis, C. M., Sehic, E., Li, S., 2000. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin Infect Dis.* 31 Suppl 5, S168-177.
- Blatteis, C. M., Xin, L., Quan, N., 1991. Neuromodulation of fever: apparent involvement of opioids. *Brain Res Bull.* 26, 219-223.
- Bligh, J., 2006. A theoretical consideration of the means whereby the mammalian core temperature is defended at a null zone. *J Appl Physiol.* 100, 1332-1337.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12, 64-76.
- Borne, R. F., 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O. L., T. L.; Williams, D. A. (Ed.), *Medicinal Chemistry*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Boulant, J. A., 2000. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis.* 31 Suppl 5, S157-161.
- Boulant, J. A., Chow, A. R., Griffin, J. D., 1997. Determinants of hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Ann N Y Acad Sci.* 813, 133-138.



- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25-30.
- Brogden, R. N., 1986. Pyrazolone derivatives. *Drugs*. 32 Suppl 4, 60-70.
- Brune, K., Alpermann, H., 1983. Non-acidic pyrazoles: inhibition of prostaglandin production, carrageenan oedema and yeast fever. *Agents Actions*. 13, 360-363.
- Brune, K., Hinz, B., 2004. The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum*. 50, 2391-2399.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 84, 277-359.
- Cannon, J. G., Nerad, J. L., Poutsika, D. D., Dinarello, C. A., 1993. Measuring circulating cytokines. *J Appl Physiol*. 75, 1897-1902.
- Cao, C., Matsumura, K., Watanabe, Y., 1997. Induction of cyclooxygenase-2 in the brain by cytokines. *Ann N Y Acad Sci*. 813, 307-309.
- Cao, W. H., Fan, W., Morrison, S. F., 2004. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*. 126, 229-240.
- Carlos, T. M., Harlan, J. M., 1990. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev*. 114, 5-28.
- Carman, C. V., Springer, T. A., 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 15, 547-556.

- Cartmell, T., Poole, S., Turnbull, A. V., Rothwell, N. J., Luheshi, G. N., 2000. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol.* 526 Pt 3, 653-661.
- Caterina, M. J., 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292, R64-76.
- Chen, X. M., Hosono, T., Mizuno, A., Yoda, T., Yoshida, K., Aoyagi, Y., Kanosue, K., 1998. New apparatus for studying behavioral thermoregulation in rats. *Physiol Behav.* 64, 419-424.
- Coceani, F., Akarsu, E. S., 1998. Prostaglandin E2 in the pathogenesis of fever. An update. *Ann N Y Acad Sci.* 856, 76-82.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.* 17, 1195-1214.
- Costa, D., Marques, A. P., Reis, R. L., Lima, J. L., Fernandes, E., 2006. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radic Biol Med.* 40, 632-640.
- Cross, A., Asher, L., Seguin, M., Yuan, L., Kelly, N., Hammack, C., Sadoff, J., Gemski, P., Jr., 1995. The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J Clin Invest.* 96, 676-686.
- Cross, A. S., Sadoff, J. C., Kelly, N., Bernton, E., Gemski, P., 1989. Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor alpha/cachectin and murine interleukin 1 alpha protects mice from lethal bacterial infection. *J Exp Med.* 169, 2021-2027.

- Cruz, M. T., Carmo, A., Carvalho, A. P., Lopes, M. C., 1998. Calcium-dependent nitric oxide synthase activity in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 248, 98-103.
- Cunningham, E. T., Jr., De Souza, E. B., 1993. Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today.* 14, 171-176.
- Dale, D. C., Boxer, L., Liles, W. C., 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 112, 935-945.
- Dange, S. V., Shah, K. U., Ghongane, B. B., Ranade, R. S., 1985. Potentiation of antipyretic effect of acetaminophen by concomitant administration of ascorbic acid. *Indian J Physiol Pharmacol.* 29, 129-131.
- Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun.* 15, 7-24.
- Dantzer, R., Konsman, J. P., Bluthé, R. M., Kelley, K. W., 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci.* 85, 60-65.
- Darville, T., Giroir, B., Jacobs, R., 1993. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS): immunology and potential immunotherapy. *Infection.* 21, 279-290.
- de Souza, F. R., Figuera, M. R., Lima, T. T., de Bastiani, J., Barcellos, I. B., Almeida, C. E., de Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Flores, A. E., de Mello, C. F., 2001. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.* 68, 525-530.

- Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A., 2006. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci.* 29, 135-161.
- DiMicco, J. A., Sarkar, S., Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V., 2006. Stress-induced cardiac stimulation and fever: common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. *Auton Neurosci.* 126-127, 106-119.
- Dimicco, J. A., Zaretsky, D. V., 2007. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292, R47-63.
- Dinarello, C. A., Bunn, P. A., Jr., 1997. Fever. *Semin Oncol.* 24, 288-298.
- Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr., O'Connor, J. V., 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* 163, 1433-1450.
- Dinarello, C. A., Gatti, S., Bartfai, T., 1999. Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol.* 9, R147-150.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 141, 2407-2412.
- Dube, C. M., Brewster, A. L., Richichi, C., Zha, Q., Baram, T. Z., 2007. Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci.* 30, 490-496.
- Dunn, A. J., Wang, J., 1995. Cytokine effects on CNS biogenic amines. *Neuroimmunomodulation.* 2, 319-328.

- Ek, M., Engblom, D., Saha, S., Blomqvist, A., Jakobsson, P. J., Ericsson-Dahlstrand, A., 2001. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*. 410, 430-431.
- Elmqvist, J. K., Scammell, T. E., Saper, C. B., 1997. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci*. 20, 565-570.
- Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L. P., Jakobsson, P. J., Blomqvist, A., 2003. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*. 6, 1137-1138.
- Faccioli, L. H., Souza, G. E., Cunha, F. Q., Poole, S., Ferreira, S. H., 1990. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions*. 30, 344-349.
- Ferreira, S. H., Vane, J., 1974. New aspects of the mode of action nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol* 14, 57-73.
- Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G. P., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 42, 153-164.
- Fraga, D., Machado, R. R., Fernandes, L. C., Souza, G. E., Zampronio, A. R., 2008. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294, R411-420.
- Fratlicelli, A., Serrano, C. V., Jr., Bochner, B. S., Capogrossi, M. C., Zweier, J. L., 1996. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim Biophys Acta*. 1310, 251-259.

- Fukuda, M., Morimoto, T., Nagao, H., Kida, K., 1997. The effect of GABAergic system activity on hyperthermia-induced seizures in rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 104, 197-199.
- Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 340, 448-454.
- Gatti, S., Bartfai, T., 1993. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res.* 624, 291-294.
- Gavva, N. R., 2008. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci.* 29, 550-557.
- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Surapaneni, S., Hovland, D. N., Jr., Lehto, S. G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M. H., Magal, E., Treanor, J. J., Louis, J. C., 2007. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci.* 27, 3366-3374.
- Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K., Isakson, P. C., 1999. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J.* 339 ( Pt 3), 607-614.
- Ginsberg, M. D., Busto, R., 1998. Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. *Stroke.* 29, 529-534.
- Globus, M. Y., Alonso, O., Dietrich, W. D., Busto, R., Ginsberg, M. D., 1995. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem.* 65, 1704-1711.

- Godoy, M. C., Figuera, M. R., Souza, F. R., Flores, A. E., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Zanatta, N., Martins, M. A., Bonacorso, H. G., Mello, C. F., 2004. Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 496, 93-97.
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Nguyen, K. T., Lee, J. E., Tilders, F. J., Maier, S. F., Watkins, L. R., 1999. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci.* 19, 2799-2806.
- Gursoy, A., Demirayak, S., Capan, G., Erol, K., Vural, K., 2000. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents. *Eur J Med Chem.* 35, 359-364.
- Guzik, T. J., Korbust, R., Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54, 469-487.
- Hajat, C., Hajat, S., Sharma, P., 2000. Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome : a meta-analysis of studies in patients. *Stroke.* 31, 410-414.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 92, 3007-3017.
- Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N., Breyer, M. D., 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94, 2504-2510.
- Hasday, J. D., Fairchild, K. D., Shanholtz, C., 2000. The role of fever in the infected host. *Microbes Infect.* 2, 1891-1904.

- Hata, A. N., Breyer, R. M., 2004. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 103, 147-166.
- Hatada, E. N., Krappmann, D., Scheidereit, C., 2000. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 12, 52-58.
- Hayden, M. S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-2224.
- Hedenmalm, K., Spigset, O., 2002. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). *Eur J Clin Pharmacol.* 58, 265-274.
- Heinecke, J. W., Li, W., Francis, G. A., Goldstein, J. A., 1993. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest.* 91, 2866-2872.
- Huang, A. J., Manning, J. E., Bandak, T. M., Ratau, M. C., Hanser, K. R., Silverstein, S. C., 1993. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol.* 120, 1371-1380.
- Huang, W. T., Lin, M. T., Chang, C. P., 2006. An NMDA receptor-dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever. *Neuropharmacology.* 50, 504-511.
- Huang, W. T., Niu, K. C., Chang, C. K., Lin, M. T., Chang, C. P., 2008. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 593, 105-111.
- Huang, W. T., Tsai, S. M., Lin, M. T., 2001. Involvement of brain glutamate release in pyrogenic fever. *Neuropharmacology.* 41, 811-818.



- Ibanez, L., Vidal, X., Ballarin, E., Laporte, J. R., 2005. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol.* 60, 821-829.
- Ignarro, L. J., 2000. The unique role of nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. *Ital Heart J.* 1 Suppl 3, S28-29.
- Insel, P. A., 1996. Analgesic - antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman, J. G. I., L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Goodman, L. S. (Ed.), *Pharmacological Basis of Therapeutics*. Graw Hill Interamericana, Atlanta.
- Johnson, A. J., Kumar, R. A., Rasheed, S. A., Chandrika, S. P., Chandrasekhar, A., Baby, S., Subramoniam, A., 2010. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. *J Ethnopharmacol.* 130, 267-271.
- Kelley, K. W., Bluthé, R. M., Dantzer, R., Zhou, J. H., Shen, W. H., Johnson, R. W., Broussard, S. R., 2003. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 17 Suppl 1, S112-118.
- Kelly, M., Hwang, J. M., Kubes, P., 2007. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 120, 3-10.
- Kent, S., Bluthé, R. M., Dantzer, R., Hardwick, A. J., Kelley, K. W., Rothwell, N. J., Vannice, J. L., 1992. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 9117-9120.
- Klebanoff, S. J., 1980. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 93, 480-489.

- Klebanoff, S. J., 1999. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 111, 383-389.
- Kluger, M. J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*. 71, 93-127.
- Kluger, M. J., Kozak, W., Conn, C. A., Leon, L. R., Soszynski, D., 1996. The adaptive value of fever. *Infect Dis Clin North Am*. 10, 1-20.
- Kluger, M. J., Kozak, W., Conn, C. A., Leon, L. R., Soszynski, D., 1998. Role of fever in disease. *Ann N Y Acad Sci*. 856, 224-233.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., DeLeo, F. R., 2003. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect*. 5, 1337-1344.
- Kolaczowska, E., Chadzinska, M., Scislowska-Czarnecka, A., Plytycz, B., Opdenakker, G., Arnold, B., 2006. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology*. 211, 137-148.
- Kolaczowska, E., Seljelid, R., Plytycz, B., 2001. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. *Inflamm Res*. 50, 415-421.
- Kozak, W., Archuleta, I., Mayfield, K. P., Kozak, A., Rudolph, K., Kluger, M. J., 1998a. Inhibitors of alternative pathways of arachidonate metabolism differentially affect fever in mice. *Am J Physiol*. 275, R1031-1040.
- Kozak, W., Kluger, M. J., Soszynski, D., Conn, C. A., Rudolph, K., Leon, L. R., Zheng, H., 1998b. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*. 856, 33-47.

- Kulmacz, R. J., van der Donk, W. A., Tsai, A. L., 2003. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog Lipid Res.* 42, 377-404.
- Lee, J. J., Huang, W. T., Shao, D. Z., Liao, J. F., Lin, M. T., 2003. Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy. *Jpn J Physiol.* 53, 367-375.
- Li, G., Dong, B., Butz, D. E., Park, Y., Pariza, M. W., Cook, M. E., 2006. NF-kappaB independent inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase by a conjugated linoleic acid cognate, conjugated nonadecadienoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1761, 969-972.
- Li, S., Ballou, L. R., Morham, S. G., Blatteis, C. M., 2001. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1beta. *Brain Res.* 910, 163-173.
- Li, S., Wang, Y., Matsumura, K., Ballou, L. R., Morham, S. G., Blatteis, C. M., 1999. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res.* 825, 86-94.
- Lin, H. C., Wan, F. J., Kang, B. H., Wu, C. C., Tseng, C. J., 1999. Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarius of rats. *Hypertension.* 33, 1218-1224.
- Lin, M. T., 1976. Brain monoamines act through the prostaglandin release to influence the body temperature. *Chin J Physiol.* 22, 55-64.
- Lin, P. J., 2000. Synthesis of monotrifluoromethyl-substituted saturated cycles. *Tetrahedron.* 56, 3635-3671.

- Linthorst, A. C., Flachskamm, C., Holsboer, F., Reul, J. M., 1995. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic--pituitary--adrenocortical axis activity. *Eur J Neurosci.* 7, 2418-2430.
- Long, N. C., Otterness, I., Kunkel, S. L., Vander, A. J., Kluger, M. J., 1990. Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol.* 259, R724-728.
- Lowell, B. B., Spiegelman, B. M., 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 404, 652-660.
- Luheshi, G., Rothwell, N., 1996. Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol.* 109, 301-307.
- Luheshi, G. N., 1998. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Ann N Y Acad Sci.* 856, 83-89.
- Luster, A. D., 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338, 436-445.
- Luster, A. D., Alon, R., von Andrian, U. H., 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 6, 1182-1190.
- Mackowiak, P. A., 1997. Normal "body" temperature Lippincott-Raven, Philadelphia.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15, 323-350.

- Madden, C. J., Morrison, S. F., 2003. Excitatory amino acid receptor activation in the raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis. *Neuroscience*. 122, 5-15.
- Madden, C. J., Morrison, S. F., 2010. Endogenous activation of spinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors contributes to the thermoregulatory activation of brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298, R776-783.
- Malaviya, R., Georges, A., 2002. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 22, 189-204.
- Martins, D. M., Torres, B. G., Spohr, P. R., Machado, P., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Emanuelli, T., 2009. Antioxidant potential of new pyrazoline derivatives to prevent oxidative damage. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 104, 107-112.
- Matsumura, K., Cao, C., Ozaki, M., Morii, H., Nakadate, K., Watanabe, Y., 1998. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci*. 18, 6279-6289.
- Matsumura, K., Kobayashi, S., 2004. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci*. 9, 2819-2826.
- McEver, R. P., 2002. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*. 14, 581-586.
- McGaraughty, S., Segreti, J. A., Fryer, R. M., Brown, B. S., Faltynek, C. R., Kym, P. R., 2009. Antagonism of TRPV1 receptors indirectly modulates activity of

- thermoregulatory neurons in the medial preoptic area of rats. *Brain Res.* 1268, 58-67.
- Milano, J., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Sauzem, P. D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., Rubin, M. A., Ferreira, J., Bonacorso, H. G., 2008a. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol.* 581, 86-96.
- Milano, J., Rossato, M. F., Oliveira, S. M., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., Rubin, M. A., Ferreira, J., Bonacorso, H. G., 2008b. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci.* 83, 739-746.
- Milton, A. S., 1998. Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res.* 115, 129-139.
- Milton, A. S., Wendlandt, S., 1971. 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, 325-336.
- Morimoto, A., Murakami, N., Nakamori, T., Watanabe, T., 1987. Evidence for separate mechanisms of induction of biphasic fever inside and outside the blood-brain barrier in rabbits. *J Physiol.* 383, 629-637.
- Morrison, S. F., Nakamura, K., Madden, C. J., 2008. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol.* 93, 773-797.
- Morrison, S. F., Sved, A. F., Passerin, A. M., 1999. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 276, R290-297.

- Muller, W. A., 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 327-334.
- Myers, R. D., Waller, M. B., 1976. Is prostaglandin fever mediated by the presynaptic release of hypothalamic 5-HT or norepinephrine? *Brain Res Bull.* 1, 47-56.
- Nadjar, A., Tridon, V., May, M. J., Ghosh, S., Dantzer, R., Amedee, T., Parnet, P., 2005. NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 1047-1059.
- Nagashima, K., Nakai, S., Tanaka, M., Kanosue, K., 2000. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci.* 85, 18-25.
- Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., Negishi, M., 2000. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol.* 421, 543-569.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Hubschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkoi, Z., Konig, M., Thiel, H. J., Gerstberger, R., Kobayashi, S., Kaneko, T., 2004. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci.* 24, 5370-5380.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Kaneko, T., Kobayashi, S., Katoh, H., Negishi, M., 2002. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci.* 22, 4600-4610.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Kobayashi, S., Kaneko, T., 2005. Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neurosci Res.* 51, 1-8.

- Nakamura, K., Morrison, S. F., 2008. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci.* 11, 62-71.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79, 1193-1226.
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* 420, 846-852.
- Nava, F., Calapai, G., Facciola, G., Cuzzocrea, S., Giuliani, G., De Sarro, A., Caputi, A. P., 1997. Melatonin effects on inhibition of thirst and fever induced by lipopolysaccharide in rat. *Eur J Pharmacol.* 331, 267-274.
- Negishi, M., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., 1995. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1259, 109-119.
- Niijima, A., 1996. The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J Auton Nerv Syst.* 61, 287-291.
- Nomoto, S., Shibata, M., Iriki, M., Riedel, W., 2004. Role of afferent pathways of heat and cold in body temperature regulation. *Int J Biometeorol.* 49, 67-85.
- Ochi, T., Jobo-Magari, K., Yonezawa, A., Matsumori, K., Fujii, T., 1999. Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423. *Eur J Pharmacol.* 365, 259-266.
- Ochi, T., Yamane-Sugiyama, A., Ohkubo, Y., Sakane, K., Tanaka, H., 2001. The anti-inflammatory effect of FR188582, a highly selective inhibitor of cyclooxygenase-2, with an ulcerogenic sparing effect in rats. *Jpn J Pharmacol.* 85, 175-182.
- Oka, K., Oka, T., Hori, T., 1998. PGE2 receptor subtype EP1 antagonist may inhibit central interleukin-1beta-induced fever in rats. *Am J Physiol.* 275, R1762-1765.



- Oka, T., 2004. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front Biosci.* 9, 3046-3057.
- Oka, T., Oka, K., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C. B., 2003a. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol.* 551, 945-954.
- Oka, T., Oka, K., Saper, C. B., 2003b. Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res.* 968, 256-262.
- Oshima, Y., Akimoto, T., Tsukada, W., Yamasaki, T., Yamaguchi, K., 1969. Studies on pyrimidinylpyrazoles. IV. Pharmacological activities of 1-(4-methoxy-6-methyl-2-pyrimidinyl)-3-methyl-5-methoxypyrazole and its related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 17, 1492-1497.
- Outzen, M., 2009. Management of fever in older adults. *J Gerontol Nurs.* 35, 17-23; quiz 24-15.
- Ozdemir, Z., Kandilci, H. B., Gumusel, B., Calis, U., Bilgin, A. A., 2007. Synthesis and studies on antidepressant and anticonvulsant activities of some 3-(2-furyl)-pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 42, 373-379.
- Pasin, J. S. M., Ferreira, A. P., Saraiva, A. L., Ratzlaff, V., Andrighetto, R., Tomazetti, J., Avila, D. S., Alves, S. H., Rubin, M. A., Ferreira, J., Santos, A. R., Mello, C. F., 2010. Diacerein decreases TNF-alpha and IL-1beta levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflamm Res.* 59, 189-196.
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., Viswanath, V., 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 4, 529-539.

- Pavlov, V. A., Tracey, K. J., 2004. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 61, 2322-2331.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., Troadec, J. D., 2009. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol Behav.* 97, 279-292.
- Perlik, V., Li, Z., Goorha, S., Ballou, L. R., Blatteis, C. M., 2005. LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289, R332-R339.
- Plaisance, K. I., Mackowiak, P. A., 2000. Antipyretic therapy: physiologic rationale, diagnostic implications, and clinical consequences. *Arch Intern Med.* 160, 449-456.
- Prokopp, C. R., Rubin, M. A., Sauzem, P. D., de Souza, A. H., Berlese, D. B., Lourega, R. V., Muniz, M. N., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., 2006. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. *Braz J Med Biol Res.* 39, 795-799.
- Quan, N., Whiteside, M., Herkenham, M., 1998. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience.* 83, 281-293.
- Rao, R. M., Yang, L., Garcia-Cardena, G., Luscinskas, F. W., 2007. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res.* 101, 234-247.
- Reiling, N., Kroncke, R., Ulmer, A. J., Gerdes, J., Flad, H. D., Hauschildt, S., 1996. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 26, 511-516.

- Riedel, W., Maulik, G., 1999. Fever: an integrated response of the central nervous system to oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 196, 125-132.
- Romanovsky, A. A., 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292, R37-46.
- Romanovsky, A. A., Simons, C. T., Kulchitsky, V. A., 1998. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol.* 275, R323-331.
- Roth, J., 2006. Endogenous antipyretics. *Clin Chim Acta.* 371, 13-24.
- Roth, J., Conn, C. A., Kluger, M. J., Zeisberger, E., 1993. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol.* 265, R653-658.
- Roth, J., De Souza, G. E., 2001. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res.* 34, 301-314.
- Roth, J., Harre, E. M., Rummel, C., Gerstberger, R., Hubschle, T., 2004. Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci.* 9, 290-300.
- Roth, J., Rummel, C., Barth, S. W., Gerstberger, R., Hubschle, T., 2009. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol Allergy Clin North Am.* 29, 229-245.
- Rotondo, D., Abul, H. T., Milton, A. S., Davidson, J., 1988. Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur J Pharmacol.* 154, 145-152.

- Rowsey, P. J., 1997. Pathophysiology of fever. Part 1: The role of cytokines. *Dimens Crit Care Nurs.* 16, 202-207.
- Samuelsson, B., Morgenstern, R., Jakobsson, P. J., 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 59, 207-224.
- Saper, C. B., 1998. Neurobiological basis of fever. *Ann N Y Acad Sci.* 856, 90-94.
- Saper, C. B., Breder, C. D., 1994. The neurologic basis of fever. *N Engl J Med.* 330, 1880-1886.
- Sauzem, P. D., Machado, P., Rubin, M. A., da, S. S. a. G., Faber, H. B., de Souza, A. H., Mello, C. F., Beck, P., Burrow, R. A., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., 2008. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur J Med Chem.* 43, 1237-1247.
- Sauzem, P. D., Sant'Anna Gda, S., Machado, P., Duarte, M. M., Ferreira, J., Mello, C. F., Beck, P., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Rubin, M. A., 2009. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol.* 616, 91-100.
- Schiltz, J. C., Sawchenko, P. E., 2003. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci.* 8, s1321-1329.
- Seebacher, F., 2009. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. *J Exp Biol.* 212, 2885-2891.
- Seely, A. J., Pascual, J. L., Christou, N. V., 2003. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* 7, 291-307.

- Sehic, E., Szekely, M., Ungar, A. L., Oladehin, A., Blatteis, C. M., 1996. Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull.* 39, 391-399.
- Sessler, D. I., 2009. Thermoregulatory defense mechanisms. *Crit Care Med.* 37, S203-210.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 56, 387-437.
- Simmons, D. L., Wagner, D., Westover, K., 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. *Clin Infect Dis.* 31 Suppl 5, S211-218.
- Simon, E., 1974. Temperature regulation: the spinal cord as a site of extrahypothalamic thermoregulatory functions. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1-76.
- Simon, L. S., 1999. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med.* 106, 37S-42S.
- Simon, S. I., Green, C. E., 2005. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 7, 151-185.
- Simons, C. T., Kulchitsky, V. A., Sugimoto, N., Homer, L. D., Szekely, M., Romanovsky, A. A., 1998. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? *Am J Physiol.* 275, R63-68.
- Souza, F. R., Souza, V. T., Ratzlaff, V., Borges, L. P., Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., 2002. Hypothermic and antipyretic

effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice. *Eur J Pharmacol.* 451, 141-147.

Steiner, A. A., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L. G., 2002. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res.* 944, 135-145.

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., 2006. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 4, e284.

Steiner, A. A., Turek, V. F., Almeida, M. C., Burmeister, J. J., Oliveira, D. L., Roberts, J. L., Bannon, A. W., Norman, M. H., Louis, J. C., Treanor, J. J., Gavva, N. R., Romanovsky, A. A., 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci.* 27, 7459-7468.

Stocchetti, N., Rossi, S., Zanier, E. R., Colombo, A., Beretta, L., Citerio, G., 2002. Pyrexia in head-injured patients admitted to intensive care. *Intensive Care Med.* 28, 1555-1562.

Stricker, E. M., Hainsworth, F. R., 1970. Evaporative cooling in the rat: effects of dehydration. *Can J Physiol Pharmacol.* 48, 18-27.

Sugimoto, Y., 2000. [Physiological functions of prostanoid receptors and their subtypes]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 115, 131-141.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T.

- W., Yeh, W. C., 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*. 416, 750-756.
- Szelenyi, Z., Zeisberger, E., Bruck, K., 1976. Effects of electrical stimulation in the lower brainstem on temperature regulation in the unanaesthetized guinea-pig. *Pflugers Arch*. 364, 123-127.
- Szelenyi, Z., Zeisberger, E., Bruck, K., 1977. A hypothalamic alpha-adrenergic mechanism mediating the thermogenic response to electrical stimulation of the lower brainstem in the guinea pig. *Pflugers Arch*. 370, 19-23.
- Tabarelli, Z., Rubin, M. A., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Missio, T. P., Teixeira, M. V., Sinhorin, A. P., Martins, M. A., Zanatta, N., Bonacorso, H. G., Mello, C. F., 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz J Med Biol Res*. 37, 1531-1540.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21, 335-376.
- Thompson, C. S., Holowatz, L. A., Kenney, W. L., 2005. Cutaneous vasoconstrictor responses to norepinephrine are attenuated in older humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288, R1108-1113.
- Toh, H., Ichikawa, A., Narumiya, S., 1995. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett*. 361, 17-21.
- Tomazetti, J., Avila, D. S., Ferreira, A. P., Martins, J. S., Souza, F. R., Royer, C., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Martins, M. A., Zanatta, N., Mello, C. F., 2005. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Methods*. 147, 29-35.

- Tracey, K. J., Cerami, A., 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 45, 491-503.
- Tsai, S. M., Lin, M. T., Wang, J. J., Huang, W. T., 2003. Pyrogens enhance beta-endorphin release in hypothalamus and trigger fever that can be attenuated by buprenorphine. *J Pharmacol Sci.* 93, 155-162.
- Utrecht, J. P., Ma, H. M., MacKnight, E., McClelland, R., 1995. Oxidation of aminopyrine by hypochlorite to a reactive dication: possible implications for aminopyrine-induced agranulocytosis. *Chem Res Toxicol.* 8, 226-233.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S., 1998. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature.* 395, 281-284.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., Nilius, B., 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 430, 748-754.
- Walenga, R. W., Kester, M., Coroneos, E., Butcher, S., Dwivedi, R., Statt, C., 1996. Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins.* 52, 341-359.
- Wan, W., Wetmore, L., Sorensen, C. M., Greenberg, A. H., Nance, D. M., 1994. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull.* 34, 7-14.
- Watkins, L. R., Goehler, L. E., Relton, J. K., Tartaglia, N., Silbert, L., Martin, D., Maier, S. F., 1995. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic



- vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett.* 183, 27-31.
- Weihrauch, D., Riedel, W., 1997. Nitric oxide (NO) and oxygen radicals, but not prostaglandins, modulate fever. *Ann N Y Acad Sci.* 813, 373-382.
- Weiland, T. J., Anthony-Harvey-Beavis, D., Voudouris, N. J., Kent, S., 2006. Metabotropic glutamate receptors mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 20, 233-245.
- Weller, A. S., 2005. Body Temperature and its regulation. *Anaest Intensive Care.* 6, 206-209.
- Wieczorek, M., Dunn, A. J., 2006. Effect of subdiaphragmatic vagotomy on the noradrenergic and HPA axis activation induced by intraperitoneal interleukin-1 administration in rats. *Brain Res.* 1101, 73-84.
- Wu, H., Arron, J. R., 2003. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays.* 25, 1096-1105.
- Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Worley, P. F., 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron.* 11, 371-386.
- Yao, V., McCauley, R., Cooper, D., Platell, C., Hall, J. C., 2004. Zymosan induces nitric oxide production by peritoneal mesothelial cells. *ANZ J Surg.* 74, 266-269.
- Yoshida, K., Nakamura, K., Matsumura, K., Kanosue, K., Konig, M., Thiel, H. J., Boldogkoi, Z., Toth, I., Roth, J., Gerstberger, R., Hubschle, T., 2003. Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown

adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Eur J Neurosci.* 18, 1848-1860.

Zeiner, A., Holzer, M., Sterz, F., Schorkhuber, W., Eisenburger, P., Havel, C., Kliegel, A., Laggner, A. N., 2001. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med.* 161, 2007-2012.

Zeisberger, E., 1999. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 24, 287-326.