

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**“EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AMITRAZ SOBRE A
FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE E.
coli OU INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β) , EM COELHOS”**

Adriana Helena de Souza
Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia Veterinária – Área de Concentração em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – SP
Fevereiro, 2003

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIANA HELENA DE SOUZA, nascida em São Paulo em 03 de maio de 1972, SP, é Medica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, em janeiro de 2001. Ingressou no Programa de Pós - Graduação em Cirurgia Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária em agosto de 2001.

"Concordo que talvez não haja maior alegria na vida do que encontrarmos meios para vencer nossas fraquezas. Nós todos conhecemos a embriaguez da vitória e a agonia da derrota. Encontramos um pouco de loucura e alguma crença em nós mesmos, podemos dar grandes passos em direção da conquista de nossos objetivos. O maior fracasso é não tentar. Muitos, com certeza, desistiram quando, com um pouco mais de persistência, teriam chegado lá. Quase sempre, quando tudo parece perdido, quando tudo indica fracasso, nesse momento abre-se o caminho"

Leo Buscaglia

AOS MEUS PAIS

MARTA E SEBASTIÃO

POR TODOS OS PRINCÍPIOS INABALÁVEIS E

POR TODAS AS LIÇÕES DE VIDA E DE AMOR,

OFEREÇO.

AO MÁRCIO,

PELO APOIO QUE NUNCA

FALTOU, POR SUA PACIÊNCIA E

COMPREENSÃO E POR SEU AMOR

E

AOS MEUS IRMÃOS,

GEISE E RICARDO,

POR TODA ESSA VIDA DE CARINHO,

PROTEÇÃO E CUMPLICIDADE,

DEDICO.

*AOS ANIMAIS UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO,
PELA DIGNIDADE E DISPONIBILIDADE DE
SUAS VIDAS EM PROL DA CIÊNCIA,*

AGRADEÇO ESPECIALMENTE.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, meu orientador, pai e amigo, por todos estes anos de convivência e ensinamentos, por todos os momentos felizes e, pela compreensão, paciência e respeito, principalmente nos momentos tempestuosos da minha vida.

Ao Diretor da FCAV - UNESP, na pessoa do Prof. José Antônio Marques, pela cessão do Laboratório e das instalações para acondicionamento dos animais.

Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pela oportunidade de freqüentar o curso de Pós-Graduação e pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

Ao vice coordenador do curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, na pessoa do Prof. Dr. Júlio Carlos Canola, pela amizade, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas informações preciosas durante a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Marcos Macari, pelas elucidações de tantas dúvidas durante todo o desenrolar deste estudo, e pelo empréstimo dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Antônio de Queiroz-Neto pelo empréstimo do aparelho de ar-condicionado, fundamental.

À Prof. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado, pelo auxílio na diluição das substâncias e cessão de material, e ao Prof. Dr. Joaquim Manzano Garcia pela cessão do laboratório para manipulação das amostras, e de espaço no freezer para estocagem de material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Ao Médico Veterinário Marcelo Augusto Selegatto (Léster), amigo de sempre, sem a ajuda do qual a realização deste estudo estaria comprometida. Obrigada pela cumplicidade, carinho, amizade e companheirismo, principalmente nos momentos de árduo trabalho braçal e nas tardes longas e solitárias durante o condicionamento dos coelhos.

Aos Médicos Veterinários, Anderson Farias e Juan Carlos Duque Moreno, pela valiosa ajuda, carinho, amizade e paciência, principalmente com a minha insistência em aprender a fazer gráficos.

Ao Médico Veterinário Ricardo Miyasaka de Almeida, pelo carinho eterno e pela amizade desde o comecinho. Obrigada pela ajuda e pelo companherismo de sempre.

À Médica Veterinária Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, por ter se mostrado tão atenciosa e prestativa em todos os momentos em que precisei de ajuda.

À Médica Veterinária Renata Lehn Linardi, irmã e amiga inseparável, por todos esses anos de desafios, descobertas, alegrias, tristezas e amizade incondicional, estando sempre por perto. Decididamente nossa amizade não é desse mundo.

À Médica Veterinária Valéria Oliveira Fraga, irmã e amiga, pelos vários anos de convivência e amizade e por ter me dado um teto, agora no finalzinho.

À Família Valadão, pelo carinho e amizade, e principalmente à InesValadão, pelo carinho de mãe postiça.

À Maria Inês G. M. A., pelo auxílio na separação das amostras e pelo carinho com que sempre me tratou.

Aos técnicos de Laboratório da FCAV- UNESP, Euclides Roberto Secato, Renata Lemos Nagib Jorge e Roberta Vantini, pela cessão de materiais e equipamentos.

Às secretárias do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV- UNESP, Izabel Cristina Gerbasi Beraldo e Shizuko Ota, pela rapidez e paciência para com todas as minhas solicitações.

Aos funcionários do Setor de Serviços da FCAV - UNESP, pela cordialidade e boa vontade em resolver os "pequenos problemas" com as minhas instalações.

Aos funcionários do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", Carlos Roberto Januário, Maria Luíza Alves de Oliveira e Flávia Regina de Souza Soldi, pelo carinho e disposição em atender aos meus pedidos.

Aos Pós-Graduandos Rafael Faleiros, Antônio Raphael Teixeira Neto, Andréa da Costa Aita, Guilherme Ferraz e Luciane Rasera, pelos bons momentos passados juntos.

Aos Docentes, Funcionários e Colegas do curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, pela convivência durante todos esses anos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Animais.....	11
Delineamento Experimental.....	11
Determinação da DHA50%.....	12
Indução da endotoxemia experimental (IE).....	13
Avaliação comportamental.....	13
Mensuração da temperatura.....	13
Análise estatística.....	13
RESULTADOS.....	15
DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	25

“EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AMITRAZ SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE E. coli OU INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β), EM COELHOS”

RESUMO - A endotoxemia é uma afecção importante nas diversas espécies animais decorrente da ação de lipopolissacarídeos liberados na circulação durante o choque séptico, os quais ativam a cascata inflamatória induzindo a síntese e liberação de citocinas (TNF, IL-1, IL-6), capazes de produzir febre. É bastante comum, em eqüinos, quadros de cólica gastrointestinal devido à intoxicação por amitraz (AMZ), um acaricida formamidínico. A compactação de cólon é uma das conseqüências dessa intoxicação principalmente, pela ação desta substância sobre receptores adrenérgicos α -2. Sabendo-se que as substâncias agonistas de receptores α -2 produzem um aumento do tônus vagal e que a estimulação das fibras vagais, aferentes e eferentes reduz a liberação de TNF- α , o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do AMZ sobre a febre, quando administrado antes da indução experimental de endotoxemia com LPS ou da administração de IL-1 β . Foram utilizados, em duas fases experimentais, 40 coelhos machos, raça Branco da Nova Zelândia, com peso entre 2,5 e 3,5 kg. Na primeira fase, para determinação da dose hipnótica 50% do AMZ (DHA50%), os animais foram separados em 4 grupos iguais de cinco animais (G1, G2, G3, G4). Na segunda fase experimental os animais foram divididos em 8 grupos iguais (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII, GVIII), compostos de cinco animais cada, os quais foram pré-tratados com salina (NaCl 0,9%), AMZ (0,3 mg.kg⁻¹) ou DMSO e desafiados com salina, LPS(1,5 μ g.kg⁻¹) ou IL-1 β (100 ng.kg⁻¹). A DHA50% e DSHA, para coelhos, foi 0,55 mg.kg⁻¹ e 0,3 mg.kg⁻¹, respectivamente. A febre observada no grupo AMZ-LPS foi inferior àquela demonstrada pelo grupo sal-LPS e superior àquela anotada no grupo DMSO-LPS. Concluiu-se que o AMZ, na dose de 0,3 mg.kg⁻¹, diminui a intensidade da resposta febril ao LPS, mas o DMSO demonstra maior efetividade sobre a febre induzida por LPS. O AMZ não bloqueia a febre causada pela IL-1 β .

Palavras chave: endotoxemia, citocinas, febre, IL-1 β , TNF- α , amitraz.

“EFFECT OF PRE-TREATMENT WITH AMITRAZ OVER THE FEVER INDUCED BY E coli LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) OR INTELEUKIN-1 β (IL-1 β), ON RABBITS”

ABSTRACT - Endotoxemia is an important condition in several species being induced by lipopolysaccharides. Released into the bloodstream during the septic shock, they activate the inflammatory cascade leading to syntheses and release of cytokines (TNF, IL-1, IL-6) which are able to produce fever. Colic in horses is frequently observed after treatment with amitraz, a formamidine pesticide. Large colon impaction is one of the consequences of intoxication, mainly by acting on α -2-adrenergic receptors. As α -2 agonists has been proven to produce an increase of the vagus tone, and that the stimulation of afferent and efferent vagus has been shown to reduced TNF release, the main goal of this study was to evaluate the effects of amitraz over fever when administered before induction of experimental endotoxemia with LPS or IL-1 β administration. Forty male rabbits of the New Zealand white breed weighing 2.5-3.5 kg were used. The present study consisted of two experimental phases. In the first phase, to determine the 50% hypnotic dose of amitraz (DHA50%), the rabbits were divided into four groups (n=5). In the second phase, the rabbits were divided into eight groups (n=5). They were submitted to treatment with saline (NaCl 0,9%), AMZ (0.3 mg.kg⁻¹) or DMSO 10 minutes before intravenous injection of saline, LPS (1.5 mg.kg⁻¹) or IL-1 β (100 ng.mg.kg⁻¹). The DHA50% and DSHA for rabbits was 0.55 mg.kg⁻¹ and 0.3 mg.kg⁻¹, respectively. The results demonstrated that the fever observed in AMZ-LPS group was comparatively lower than the fever induced in the group sa-LPS and higher than the fever induced in the group DMSO-LPS. Therefore, It was concluded that amitraz, at the dose of 0,3 mg/kg, decreases the intensity of febrile response to LPS, despite the fact that DMSO is more effective over fever induced by LPS. On the other hand, amitraz does not interfere with the febrile response induced by intravenous administration of IL-1 β .

Keywords: endotoxemia, cytokines, fever, IL-1 β , TNF- α , amitraz.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Valores médios de temperatura retal (°C) de coelhos tratados com salina, LPS ($1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$) ou DMSO, registrados por 360 minutos após a administração dos tratamentos.....	17
2. Valores médios de temperatura retal (°C) de coelhos pré-tratados com salina, amitraz ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) ou DMSO e desafiados com salina ou LPS ($1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$) registrados por 360 minutos após a administração dos tratamentos.....	18
3. Valores médios de temperatura retal (°C) de coelhos tratados com salina ou amitraz ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) e desafiados IL-1 β (100 ng.kg^{-1}), registrados por 360 minutos após a administração dos tratamentos	19

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Variações ao longo do tempo da temperatura retal média (°C) de coelhos tratados com salina, amitraz (0,3 mg.kg ⁻¹) ou DMSO.....	17
2. Variações ao longo do tempo da temperatura retal média (°C) de coelhos pré-tratados com salina, amitraz (0,3 mg.kg ⁻¹) ou DMSO, e desafiados com salina ou LPS (1,5 mg.kg ⁻¹).....	18
3. Variações ao longo do tempo da temperatura retal média (°C) de coelhos pré-tratados com salina ou amitraz (0,3 mg.kg ⁻¹) e desafiados com salina ou IL-1 β (100 ng.kg ⁻¹).....	19
4. Curva dose-efeito construída para a determinação da dose hipnótica 50% (DH50%) do amitraz, em coelhos.....	20

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A endotoxemia é um estado mórbido importante nas diversas espécies animais. A ocorrência freqüente desta afecção está associada à ação de complexos lipopolissacarídicos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominados endotoxinas. As endotoxinas são compostas por uma cadeia lateral de polissacarídeos, comum a esse grupo de bactérias; por um oligopolissacarídeo central (antígeno O) que confere antigenicidade específica e pelo lipídio A, que possui capacidade ligante à membrana celular (BURROWS, 1981; MOORE et al., 1981; SEARLE, 1989; HENRY e MOORE, 1990; MacKAY et al., 1991; ASTIZ et al., 1995; OLSON et al., 1995; COLATTOS, 1995; MOORE et al., 1995; BARTON, 1998; MOORE e BARTON, 1998). As endotoxinas são liberadas durante rápida proliferação bacteriana, lise ou morte de microrganismos (MOORE et al., 1981; HENRY e MOORE, 1990; OLSON et al., 1995), e têm sido implicadas como o componente principal do choque séptico/endotóxico (OCHALSKI et al., 1993; ASTIZ et al., 1994; STEVERINK et al., 1994; ASTIZ et al., 1995) ou do choque circulatório (ASTIZ et al., 1995; MOORE, 1995).

As lesões isquêmicas e inflamatórias, principalmente no trato gastrintestinal, comprometem a integridade da parede intestinal, permitindo a permeação de bactérias e endotoxinas através da mucosa. Estas alcançam a circulação e medeiam inúmeros processos tóxicos através da interação com proteínas plasmáticas, formando complexos com os receptores de membrana das células inflamatórias - macrófagos/monócitos, células endoteliais e leucócitos polimorfonucleados (BLATTEIS, 1998), desencadeando uma seqüência de eventos fisiopatológicos mediados pelo sistema imune e responsáveis por várias manifestações clínicas observadas na endotoxemia, entre elas, inflamação tecidual excessiva, colapso vascular, falência renal e ileus adinâmico, podendo culminar em falência múltipla de órgãos.

As ações do complexo sistema de defesa desencadeado pela endotoxina que, normalmente, deveriam ser consideradas benéficas, são separadas por uma linha tênue entre a imunomodulação efetiva e as propriedades endotóxicas prejudiciais (Brandtzaeg et al., 1989 *citado por* GREEN e ADAMS, 1992). A ação excessiva da

endotoxina sobre a cascata imuno-inflamatória pode causar mudanças irreversíveis pela ação de fatores fisiológicos imunomodulatórios, tais como as citocinas endógenas, principalmente o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas (IL), que tornam-se mediadores da patogênese do processo endotóxico (GREEN e ADAMS, 1992; MOORE & BARTON, 1998). As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental nas respostas inflamatórias (HACK et al., 1997) e algumas quimiocinas estão relacionadas com o desenvolvimento da lesão tecidual induzida pelo LPS. Estudos realizados com mediadores lipídicos como o fator agregador de plaquetas (PAF), prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, demonstraram que eles exercem efeitos importantes durante a endotoxemia e assim como o óxido nítrico (NO), parecem ser responsáveis por muitas outras respostas além de hipotensão (MOORE, 2001; MORRESEY, 2001).

O TNF- α tem sido considerado um mediador importante das respostas biológicas às endotoxinas (MORRIS et al., 1991; TRACEY et al., 1992; MOORE et al., 1995). Muitos resultados experimentais sustentam esta hipótese, uma vez que níveis altos de TNF- α foram detectados no plasma de animais e humanos após a administração de LPS (BEUTLER et al., 1985; MATHISON et al., 1988; MICHIE et al., 1988). A infusão de TNF em ratos, camundongos e cães causou mudanças fisiopatológicas similares àquelas produzidas após a infusão de LPS (TRACEY et al., 1986; REMICK et al., 1987; TRACEY et al., 1987), enquanto a imunização passiva de camundongos e chimpanzés com anti-TNF- α conferiu proteção contra os efeitos letais da injeção de endotoxina e *E. coli* (TRACEY et al., 1987; BEUTLER et al., 1985).

Os monócitos/macrófagos e células T e B são as principais fontes secretoras de TNF- α , no entanto, outras células são capazes de sintetizá-lo, incluindo células de Kupffer, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais, queratinócitos, astrócitos, células da musculatura lisa e células da glia (VAN der POLL e LOWRY, 1995). Uma vez liberado para os tecidos ou para a circulação, o TNF- α medeia vários efeitos inflamatórios e metabólicos, incluindo a ativação, aderência ao endotélio e degranulação de neutrófilos; indução de febre; aumento da síntese de catecolaminas; expressão de antígenos da superfície das células endoteliais e aumento da atividade pró-coagulante, resultando em microtrombose, extravasamento capilar e necrose hemorrágica em órgãos vitais

(HARDIE e KRUSE-ELLIOT, 1990; MOORE, 1995; BARTON et al., 1996; PEIRÓ, 1997; BARTON, 1998; BARTON e COLLATOS, 1999; MABIKA e LABURN, 1999; MORRESEY, 2001). Em concentrações baixas, o TNF- α exerce seus efeitos primários locais como um regulador parácrino, autócrino de leucócitos e células endoteliais. Essas ações do TNF- α são críticas para a contenção da infecção, porém sinaliza um quadro de septicemia letal quando alcança a circulação sistêmica, em concentrações altas. (GREEN e ADAMS, 1992).

As concentrações séricas de TNF- α começam a aumentar 15 minutos após a indução da endotoxemia, alcançando um pico ao redor de 1-2 horas, decrescendo progressivamente após 4 horas (HARDIE e KRUSE-ELLIOT, 1990; BAXTER, 1995; PEIRÓ, 1997; BARTON, 1998).

Adicionalmente à variedade de atividades biológicas creditadas ao TNF- α , a indução de outras citocinas e eicosanóides tem um papel importante uma vez que, na cascata inflamatória, a liberação de TNF- α ocorre primeiramente, seguida da liberação de IL-1 β e finalmente IL-6 (BLATTEIS, 1998). Essa seqüência, bastante característica do aparecimento das diferentes citocinas inflamatórias no sangue circulante, denominada cascata citocínica, é determinada pela capacidade de uma citocina induzir a produção de outra. Tanto o TNF- α quanto a IL-1 β são capazes de induzir a liberação de IL-6. Entretanto, a IL-6 não induz TNF- α ou IL-1 β mas, ao contrário, suprime sua expressão (ZETTERSTRÖM et al., 1998).

A denominação IL-1 compreende dois tipos de proteínas distintas (IL-1 α e IL-1 β) que fazem parte da família das citocinas inflamatórias e regulatórias. Juntamente com o IL-1ra (antagonista de receptor de IL-1) e IL-8, essas moléculas desempenham um papel importante na regulação da inflamação aguda (AREND et al., 1998; KOHNO e KURIMOTO, 1998). Acredita-se que a IL-1 β seja o protótipo da citocina pró-inflamatória implicada diretamente na modulação endógena da febre e da resposta imune (DINARELLO, 1991; BLATTEIS, 1992; DINARELLO, 1994; DINARELLO, 1996; SPORRI et al., 1996; DAYER, 1997; HU e COTGREAVE, 1997). As IL-1 são produzidas por uma ampla variedade de células, principalmente fagócitos mononucleares, incluindo monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos e outras células (DINARELLO, 1988), ligando-se aos

receptores de diferentes tipos de células-alvo (Rothwell e Luheshi, 1994 *citado por* MAIER et al., 1998).

Apesar de serem distintas estruturalmente, as IL-1 possuem várias atividades biológicas semelhantes às do TNF-a (DINARELLO, 1985), sendo a sua principal função a mediação da resposta imune do hospedeiro. A IL-1 interage com antígenos estimuladores de células T, induzindo a liberação de IL-2 e a síntese de receptores de IL-2. Por ação direta sobre as células B, a IL-1 determina a ativação, proliferação e síntese de anticorpos. A atividade de células "natural killer" é aumentada através da ação sinérgica da IL-1 com outras citocinas. O metabolismo do ácido aracdônico, a secreção de proteínas inflamatórias, a quimiotaxia de neutrófilos e a proliferação de fibroblastos também são estimulados pela IL-1 que, juntamente com o TNF-a e IL-6, participa da resposta de fase aguda, caracterizada por febre, produção de proteínas de fase aguda, neutrofilia, atividade pró-coagulante e hipoferremia. A IL-1 estimula ainda, a expressão intracelular de moléculas de adesão no endotélio vascular resultando em aumento da atividade pró-coagulante e aumento da adesão de células brancas (HARDIE e KRUSE-ELLIOTT, 1990; GREEN e ADAMS, 1992).

A IL-6 é produzida e secretada por monócitos/macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, linfócitos T e mastócitos (KISHIMOTO, 1989), que são estimuladas pela IL-1, TNF-a, fator de crescimento derivado de plaquetas. O principal efeito pró-inflamatório desta citocina é a indução da produção de proteínas de fase aguda, tais como o fibrinogênio, a proteína C reativa, a ferroxidase, o complemento, entre outras. A IL-6 estimula o crescimento e diferenciação de células B e age como co-estimuladora de células T. Concentrações altas de IL-6 têm sido mensuradas em soro e líquidos corpóreos de humanos e animais após a administração de endotoxina, IL-1 e TNF-a e por infecção bacteriana aguda e sepse (JABLONS et al., 1985; HEFGOIT et al., 1989). Enquanto os efeitos da IL-1 e do TNF-a podem ser prejudiciais ao hospedeiro, as ações da IL-6 parecem ser benéficas, pois os fatores da fase aguda protegem o hospedeiro contra microrganismos e, além disso, a IL-6 "per si" não causa injúria tecidual e trombose vascular características da ação da endotoxina e do TNF-a (GREEN e ADAMS, 1992).

A febre é definida como uma resposta biológica complexa, altamente integrada, caracterizada pela elevação controlada da temperatura retal, resultante da atividade neuronal hipotalâmica (KLUGER, 1991). É amplamente aceito que estímulos patogênicos, tais como a endotoxina, causam febre através da ativação de células imunes periféricas que sintetizam e liberam mediadores inflamatórios (pirogênios endógenos), os quais agem direta e indiretamente no cérebro (KLUGER, 1991). Vários pirogênios endógenos foram identificados nos últimos 10 anos, incluindo as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (DINARELLO, 1996), IL-6 (Rothwell et al., 1991 *citado por* ZETTERSTRÖM, 1998) e TNF- α (DINARELLO et al., 1986). Existem muitas evidências da ação sinérgica do TNF- α e IL-6 com a IL-1 durante febre (HOPKINS E ROTHWELL, 1995).

Vários são os supostos mecanismos pelos quais o SNC regula a resposta inflamatória. Inúmeras evidências indicam que essa regulação ocorre através de mecanismos humorais (BESEDOVSKY et al., 1986; HU et al., 1991; LIPTON & CATANIA, 1997; WOICIECHOWSKY et al., 1998). Diversos pesquisadores têm proposto que citocinas circulantes são os mediadores endógenos da febre em resposta à administração de pirogênios exógenos (LONG, 1990; KUGLER, 1991; BLATTEIS e SEHIC, 1997; KOZAK et al., 1998; LUHESHI, 1998; CARTMELL, 1999; CARTMELL et al., 2000; CARTMELL et al., 2001).

A IL-1 tem sido referida como a citocina de maior atividade pirogênica por induzir a síntese de prostaglandina E (PGE), que age diretamente no sistema nervoso central produzindo febre (ATKINS, 1960; AURON et al., 1984; DINARELLO, 1984; KLUGER, 1991) por meio do aumento do "set point" hipotalâmico termorregulatório (JAMPEL et al., 1983). A inibição das ações da IL-1, periféricamente ou no cérebro de roedores, por meio da administração de anti-IL-1, atenua acentuadamente a resposta febril induzida pelo LPS (LONG et al., 1990; SMITH e KUGLER, 1992; KLIR et al., 1994; LUHESHI et al., 1996; CARTMELL et al., 1999).

Muitos estudos experimentais destacam a importância das IL-1 e IL-6 como mediadores endógenos da resposta febril. Essas citocinas estão envolvidas na estimulação da síntese de proteínas da fase aguda, na ativação do eixo hipotálamo-

hipofisário-adrenal, no início da cascata do ácido aracdônico, assim como na indução da síntese de outras citocinas. (KLUGER et al., 1995; SPANGELO e GAROSPE, 1995; BLATTEIS e SEHIC, 1997). Além disso, as atividades biológicas da IL-1 e IL-6 parecem estar interrelacionadas, sendo a IL-1 um potente indutor da IL-6 (AKIRA et al., 1993; KOZAK et al., 1998; Tritarelli et al., 1994 *citado por* CARTMELL et al., 2000).

A IL-6 parece agir como um sinal circulante aferente para o cérebro, evocando a febre na resposta inflamatória após injeção localizada de LPS em rato. No entanto, sozinha não é capaz de induzir febre quando injetada sistemicamente, agindo somente em conjunto com IL-1. Consequentemente, é possível que a ação pirogênica de IL-1 β seja mediada pela IL-6 (KOZAK et al., 1998).

Esse conceito sobre a patogênese da febre está baseado principalmente em três observações experimentais: a primeira observação demonstrou o aparecimento de citocinas na corrente sangüínea quase simultaneamente ao desenvolvimento da febre após a injeção de LPS. Dependendo da via de administração e da dose injetada, uma cascata citocínica é disparada, sendo o TNF-a a primeira citocina a aparecer na circulação (KLUGER, 1991; ROTH et al., 1993; JANSKY et al., 1995), seguida de traços de IL-1 β (JANSKY et al., 1995) e grande quantidade de IL-6 (ROTH et al., 1993), assim como outras citocinas. Entre as citocinas mensuradas no plasma sangüíneo durante a febre induzida por LPS, a IL-6 mostrou ter a melhor correlação com as mudanças na temperatura corporal (LeMAY et al., 1990; ROTH et al., 1993; CARTMELL et al., 2000); a segunda observação relaciona-se ao fato de um modelo similar ao da febre causada pelo LPS, tanto no que diz respeito à extensão quanto à duração, poder ser induzido com a administração de algumas citocinas que são liberadas em resposta à injeção de LPS (DAVATELIS et al., 1989; BLATTEIS et al., 1990; KLUGER, 1991; ZAMPRONIO et al., 1995; GOLDBACH et al., 1996; ANFORTH et al., 1998) e a terceira observação deriva de experimentos que resultaram na atenuação da formação de citocinas na circulação sangüínea induzidas pelo LPS ou, na neutralização das atividades biológicas de uma determinada citocina concomitantemente à redução da febre. O TNF-a e a IL-1 β são considerados os mediadores iniciais dentro da cascata inflamatória e, por essa

razão, a maioria das estratégias experimentais anti-citocínicas são direcionadas contra eles (GIVALOIS et al., 1994; ZAMPRONIO et al., 1994; ROTH et al., 1998; DINARELLO et al., 1999).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados na tentativa de se desvendar o mecanismo putativo pelo qual as citocinas circulantes podem influenciar as estruturas cerebrais envolvidas na patogênese da febre. Um mecanismo de comunicação, alternativo e rápido, entre o sistema imune ativado e aquelas partes do cérebro relacionadas com a indução da febre poderia ser a estimulação do nervo vago aferente (BLUTHÉ et al., 1996; MILLIGAN et al., 1997; ROMANOVSKY et al., 1997; BLATTEIS e SEHIC, 1997; BLATTEIS, 1998; GREEN et al., 1998; MAIER et al., 1998; SIMONS et al., 1998; GOEHLER, et al., 1999; Romanovsky et al., 1998 *citado por* ZEISBERGER, 1999; HANSEN et al., 2000).

A evidência da função do nervo vago como veículo de transferência entre os sinais imunes periféricos e o cérebro é sustentada pelo fato da transecção de ramos do nervo vago, como por exemplo a vagotomia subdiafragmática, atenuar ou mesmo abolir um grande número de respostas à injeção intraperitoneal ou intravenosa de doses baixas de LPS ou citocinas pró-inflamatórias (LUHESHI et al., 1994; WAN et al., 1994; WATKINS et al., 1994; LAYE et al., 1995; GAYKEMA et al., 1995; BLUTHÉ et al., 1996; HANSEN e KRUEGER, 1997). A supressão da febre induzida pelo LPS após a vagotomia tem sido demonstrada em ratos (ROMANOVSKY et al., 1997) e cobaias (BLATTEIS e SEHIC, 1997; GOLDBACH et al., 1997), sendo este fenômeno dependente da dose de LPS injetada e da via de administração.

A ativação de fibras vagais aferentes pela endotoxina ou citocinas estimula uma resposta antiinflamatória hipotalâmica-hipofisária-adrenal. A estimulação do nervo vago participa como um componente antiendotoxêmico através do ramo aferente, modulando a liberação de adrenocorticotropina e reduzindo a resposta febril à endotoxina (GAYKEMA et al., 1995; FLESHNER et al., 1998).

A transmissão dos sinais do sistema imune para áreas importantes do hipotálamo através de fibras aferentes do nervo vago ocorre a partir do momento em que o LPS aparece na corrente sangüínea, induzindo rapidamente a ativação da cascata do complemento que, por meio de seus componentes, estimula a produção

de citocinas pelas células de Kupffer, capazes de ativar as fibras aferentes do ramo hepático do nervo vago (BLATTEIS e SEHIC, 1997). Os sinais do ramo hepático aferente vagal são transportados para áreas de projeção central do nervo vago dentro do núcleo do trato solitário, onde a mensagem pirogênica alcança grupos celulares A1 e A2 adrenérgicos, projetando-se diretamente para as áreas hipotalâmicas (Li et al., 1999 *citado por* ROTH e SOUZA, 2001).

Comparativamente, pouco se sabe sobre a função da sinalização do nervo vago eferente na modulação da inflamação. Recentemente, Borovikova et al. (2000) descreveram uma via antiinflamatória parassimpática até então desconhecida, pela qual o cérebro modula a resposta inflamatória sistêmica para a endotoxemia. Neste estudo, a acetilcolina (Ach), principal neurotransmissor do nervo vago, suprimiu a produção de TNF de maneira dose-dependente por meio de receptores colinérgicos nicotínicos presentes na parede celular dos macrófagos. Estudos clínicos mostraram que a administração de nicotina pode ser efetiva no tratamento de alguns casos de inflamação intestinal, sendo que citocinas pró-inflamatórias estão significativamente diminuídas na mucosa do cólon de fumantes com inflamação intestinal (SANDBORN et al., 1997; GUSLANDI, 1999; SHER et al., 1999). A nicotina possui efeito imunorregulatório modulando a produção de citocinas, principalmente TNF- α e IL-2, pelas células mononucleares (MADRETSMA et al., 1996). A sinalização do nervo vago eferente parece facilitar a liberação de linfócitos do timo (células T), através de uma resposta dos receptores nicotínicos à acetilcolina (ANTONICA et al., 1994)

Borovikova et al. (2000) demonstraram, ainda, que a estimulação elétrica do terço distal do nervo vago em ratos com vagotomia bilateral cervical diminui significativamente a quantidade de TNF no plasma, enquanto a vagotomia sem estimulação elétrica aumenta o pico de TNF sérico. Os níveis de TNF no fígado de animais vagotomizados após estimulação elétrica do nervo vago diminui enquanto a vagotomia sem estimulação está associada a um aumento na síntese desta citocina. Esses resultados indicam diretamente a sinalização do nervo vago eferente na produção de TNF *in vivo*. Uma possibilidade a ser considerada é a liberação de mediadores ou hormônios antiinflamatórios, tais como a cortisona, pela ativação do nervo vago, que inibirão a produção de TNF no fígado. Normalmente a endotoxemia

está associada a um aumento na quantidade de cortisona que bloqueia a produção de TNF, PAF e outros produtos dos macrófagos (HARDIE e KRUSE-ELLIOT, 1992). A vagotomia diminui os níveis de corticosterona porque, em parte, elimina os sinais do nervo vago aferente para o cérebro (GAYKEMA et al., 1995; FLESHNER et al., 1998). Esta resposta diminuída de corticosteróide provavelmente contribui para o aumento nos níveis de TNF observado no fígado de animais vagotomizados (Sterneberg, 1997 *citado por* ZEISBERGER, 1999).

Em eqüinos, a ocorrência de endotoxemia está diretamente associada à doenças obstrutivas do trato gastrointestinal. Tem sido bastante comum a incidência de cólicas graves decorrentes da pulverização de eqüinos com amitraz (AMZ), sendo a compactação de cólon maior uma das principais conseqüências da intoxicação por esta substância (AUER et al., 1984; DEARO & GANDOLFI, 1995; BOTTEON et al., 1998; STEINMAN et al., 1998). Entretanto, nestes casos não se observa a ocorrência de quadros endotoxêmicos, assim como seqüelas comumente encontradas em eqüinos com compactação ou obstrução de cólon ocasionado por outros fatores (informação verbal)¹. Resultados experimentais com cobaias tratadas com AMZ foram compatíveis com os sintomas observados em cavalos intoxicados por esta substância, nos quais, além da depressão do SNC, foi bastante evidente a diminuição da motilidade intestinal (ROBERTS & ARGENZIO, 1986).

O AMZ, um N' - (2,4-dimetilfenil) - N - (2, 4 - dimetilfenil) iminometil - N - metilmetanimidamida, também designado N, N' (metiliminodimetilidina) bis - 2, 4 - xilidina é um acaricida formamidínico amplamente utilizado no controle de ectoparasitas em medicina veterinária (YARAMIS et al., 2000). Além da excelente atividade acaricida e inseticida, o amitraz possui uma atividade farmacológica bastante complexa. Segundo Bonsall e Turnbull (1983) os sinais e sintomas mais comuns de intoxicação aguda em diferentes espécies são depressão do SNC, com episódios de hiperexcitabilidade, hipotensão, bradicardia, hipotermia, hiperglicemia e, em algumas espécies, alteração no balanço hídrico, evidenciado por hemoconcentração. Muitos estudos têm demonstrado que esses sinais relacionam-se com a capacidade do AMZ em estimular receptores α -2 adrenérgicos (HSU e

KAKUK, 1984; COSTA e MURPHY, 1987; COSTA et al., 1988; SAKATE et al., 1992; SCHAFFER et al., 1990; QUEIROZ-NETO et al., 2000), além de inibir a síntese de prostaglandina (Yim et al., 1978 *citado por* QUEIROZ-NETO et al., 2000) e a atividade da monoaminoxidase (MAO) (Aziz e Knowles, 1973 *citado por* QUEIROZ-NETO et al., 2000).

Balestrero (2001), Queiroz-Neto (1998) e Valadão (1998) demonstraram os efeitos sedativo e analgésico do AMZ em cavalos após injeção intravenosa e epidural deste composto, reforçando os dados já existentes na literatura sobre as características da ação agonista do AMZ sobre os receptores α_2 adrenérgicos, bem similares aos da xilazina, outro fármaco deste grupo parecendo exercer ação parassimpatomimética no SNC.

Di Fillipo et al. (2000), ao estudarem células esplênicas de camundongos *in vitro*, verificaram que o AMZ reduziu os níveis de TNF, sinalizando a ação antiinflamatória deste composto.

Assim, neste estudo, a proposta foi avaliar os efeitos do AMZ sobre a resposta febril, quando administrado antes da indução experimental de endotoxemia com LPS ou da administração de IL-1 β , em coelhos.

¹ Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", UNESP, Jaboticabal, abril de 2001.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais - Foram utilizados 40 coelhos machos, raça Branco da Nova Zelândia, com peso variando entre 2,5 e 3,5 kg, em duas fases experimentais. Na primeira fase, para determinação da dose hipnótica 50% do AMZ, os animais foram divididos em 4 grupos iguais de cinco animais (G1, G2, G3, G4). Decorrido um intervalo de quinze dias, os coelhos empregados na primeira fase foram incorporados, aleatoriamente, aos grupos experimentais da segunda fase (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII, GVIII), compostos de cinco animais cada. Todos receberam ração comercial e água *ad libitum* e foram colocados, individualmente, em gaiolas de metal em ambiente com temperatura controlada entre 24 e 28°C, sob condições naturais de iluminação sendo, aproximadamente, 14 horas em ambiente claro e 10 horas em ambiente escuro. Os coelhos foram treinados para permanecer em caixas de contenção por 6 horas em ambiente com temperatura controlada (25°C) em dias alternados por, no mínimo, 10 dias antes do início do experimento para se evitar o efeito do estresse sobre a temperatura corporal devido à contenção dos animais. Todas as injeções foram realizadas na veia marginal auricular. Ao término da experimentação, os animais foram sacrificados sob anestesia com pentobarbital sódico (MURAKAMI et al.,1990).

Delineamento Experimental

Determinação da dose hipnótica 50% de AMZ (DH50%) - 1ª fase - Foram utilizados vinte coelhos separados em quatro grupos contendo cinco animais cada (G1, G2, G3, G4). Os animais receberam 0,3; 0,75; 1,0 ou 1,5 mg.kg⁻¹ de AMZ por via IV. Considerou-se como hipnose a manutenção, pelo animal, da posição de decúbito dorsal com perda da capacidade de endireitamento postural. Os animais foram avaliados entre 7:00 e 12:00 e as anotações dos efeitos foram feitas a partir de 5 minutos após a administração. Não ocorrendo a perda de reflexo postural, tentativas de posicionar o animal em decúbito dorsal foram feitas em intervalos de 5 minutos, por um período de 60 minutos.

Indução da endotoxemia experimental - 2ª fase - A endotoxemia foi induzida nos grupos GIV, GVI e GVIII por meio da administração de $1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de endotoxina de *E.coli* 055:B5² diluída em soro fisiológico, injetada por via intravenosa (i.v.).

Grupo I (controle negativo) - Nos animais do grupo controle foi, inicialmente, administrada solução salina i.v. (NaCl 0,9%), em igual volume ao programado para a dose sub – hipnótica do AMZ (DSHA, $0,3\text{mg.kg}^{-1}$) determinada na primeira fase experimental. Decorridos 10 minutos, foi realizada a injeção i.v. de solução salina em volume padronizado com aquele da diluição de LPS.

Grupo II (controle negativo) - Os animais deste grupo receberam DMSO (dimetilsulfóxido) a 10% em igual volume ao programado para a DSHA. Decorridos 10 minutos, foi realizada a injeção i.v. de solução salina em volume padronizado com aquele da diluição de LPS.

Grupo III (controle negativo) - Inicialmente, os animais deste grupo receberam a DSHA. Após 10 minutos, foi administrada solução salina i.v. em volume padronizado com aquele da diluição de LPS.

Grupo IV (controle positivo) - Nos animais deste grupo foi administrada solução salina i.v. em igual volume ao programado para a DSHA. Decorridos 10 minutos foi administrado $1,5 \mu\text{g/kg}$ de LPS.

Grupo V (controle positivo) - Os animais deste grupo receberam solução salina i.v. em igual volume ao programado para a DSHA. Após 10 minutos, foram administrados 100 ng.kg^{-1} de interleucina- 1β recombinante humana (IL- 1β)³ diluída em PBS.

Grupo VI - Neste grupo, os animais receberam a DSHA e, após 10 minutos, foram administrados $1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS.

² The Sigma-Aldrich Family, St. Louis, MO, EUA.

Grupo VII - Inicialmente, os animais deste grupo receberam a DSHA. Decorridos 10 minutos, foram injetados 100ng.kg^{-1} de IL-1 β .

Grupo VIII - Os animais deste grupo receberam DMSO (dimetilsulfóxido) a 10% em igual volume ao programado para a DSHA. Após 10 minutos, foi administrado $1,5\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS.

Avaliação comportamental - Após a aplicação das substâncias, segundo delineamento acima, os coelhos foram mantidos em caixas de contenção por seis horas consecutivas para serem anotadas as manifestações comportamentais.

Mensuração da temperatura - Os animais foram colocados em caixas de contenção e uma sonda⁴ foi inserida a 10 centímetros de profundidade no reto e fixada na cauda do animal. Uma hora antes da administração das substâncias e nas 6 horas seguintes, a temperatura retal foi aferida em intervalos de 15 minutos, por meio de um teletermômetro⁵. O aumento da temperatura retal após as administrações foi calculado pela diferença entre a temperatura retal antes e aquela aferida nos diferentes tempos após as injeções.

Análise estatística - Na primeira fase experimental, para o cálculo da DHA50% (dose hipnótica 50% do AMZ), foram empregadas diferentes doses do fármaco, selecionadas em função da porcentagem do efeito produzido. Em seguida, a partir destes dados, construiu-se uma curva dose-efeito relacionando-se a concentração logarítmica da dose com a porcentagem de efeitos obtidos. A inclinação da reta foi determinada, assim como a DHA50% com seus respectivos limites de confiança de acordo com o método descrito por Litchfield e Wilcoxon (1949).

Os dados obtidos na segunda fase experimental para a temperatura retal relativos a cada grupo foram submetidos à análise de variância com repetição múltipla, seguida da comparação das médias pelo teste Student-Newman-Keuls ($p=0,05$) para os

³ R&D Systems, Mineapolis, MN, EUA.

⁴ Termistor, Yellow Spring International, n 701, USA.

⁵ Modelo 46TUC YSI, USA..

diferentes tempos. Para análise entre os grupos nos diferentes tempos, os dados foram submetidos à análise de variância, seguida da comparação das médias pelo teste Student-Newman-Keuls ($p=0,05$)

RESULTADOS

Determinação da dose hipnótica 50% de AMZ (DHA50%)

Após o traçado curva dose-efeito (figura 4), a DHA50% determinada foi $0,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ cujo limite inferior foi 0,22 e limite superior 1,37. A partir desta observação elegeu-se a dose $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ para se empregada neste ensaio, como dose sub-hipnótica (DSHA) de AMZ injetado por via intravenosa em coelhos.

Avaliação comportamental

A administração intravenosa de $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ de AMZ não produziu sinais visíveis de sedação ou hipnose em nenhum dos animais. Por outro lado, tanto a injeção intravenosa de $1,5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS quanto de 100ng.kg^{-1} de IL-1 β estabeleceram sinais de depressão tais como ptose da cabeça e ptose palpebral.

Mensuração da resposta febril

Os animais do GI (sal-AMZ) e do GIII (sal-DMSO) não apresentaram alterações da temperatura retal (tabela 1, figura 1) tanto em relação ao valor basal quanto ao grupo controle (sal-sal).

A injeção intravenosa de LPS (GIV) induziu febre a partir dos 45 minutos após a sendo o primeiro pico após 75 minutos ($40,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) e outro aos 210 minutos ($40,8 \pm 0,4^\circ\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) (tabela 2, figura 2). A duração da febre excedeu 5 horas.

Após o tratamento com AMZ (GVI), a febre teve início a partir de 60 minutos, atingindo o pico aos 180 minutos ($40,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) (tabela 2, figura 2), cuja duração foi superior a 5 horas.

Os coelhos pré-tratados com DMSO (GVIII) apresentaram febre a partir de 60 minutos, com o pico aos 90 minutos ($39,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) e, após este momento, teve início a desfevescência (tabela 2, figura 2).

Os coelhos do GIV (sal-LPS), quando comparados a aqueles do GI (sal-sal) apresentaram febre a partir do tempo 45 até 315 (tabela 2, figura 2). Foi observado que

nos tempos 60,75, 90, 210 e 225, a temperatura retal dos coelhos tratados com sal-LPS foi mais elevada do que nos coelhos tratados com AMZ-LPS (tabela 2, figura 2).

A temperatura retal dos coelhos pré-tratados com AMZ e desafiados com LPS (GVI) foi maior desde os 135 até 300 minutos e em relação ao grupo sal-sal (GI). Em relação ao grupo pré-tratado com DMSO-LPS, os valores de temperatura dos coelhos AMZ-LPS exibiram a maior elevação aos 195, 210, 225, 285 e 300 minutos (tabela 2, figura 2).

Para a associação DMSO-LPS a temperatura retal dos coelhos foi superior àquela registrada no grupo controle (sal-sal) desde os 45 até os 105 minutos e, também, aos 135 e 150 minutos. Quando comparados com o grupo sal-LPS, os valores da temperatura do grupo DMSO-LPS foram menores de 165 até 225 minutos e de 270 até 315 minutos (tabela 2, figura 2, $p=0,05$).

O tratamento sal-IL-1 β produziu elevação de temperatura somente aos 60 minutos ($39,9\pm0,5^{\circ}\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) em relação ao valor basal. Este tratamento causou elevação da temperatura nos tempos 45, 60, 75, 90, 105, 165, 180, 285 e 300 em relação aos valores da temperatura anotados nos coelhos do grupo sal-sal (tabela 3, figura 3).

A injeção da associação AMZ-IL-1 β aumentou a temperatura retal desde 45 minutos após a administração, atingindo o pico após 90 minutos ($39,8\pm0,4^{\circ}\text{C}$, $n=5$, $p=0,05$) mantendo-a elevada até 210 minutos. Neste grupo a duração da resposta febril foi superior a 5 horas. Com relação ao grupo sal-sal, os valores da temperatura do grupo AMZ-IL-1 β foram maiores desde os 45 até os 360 minutos. Os animais do grupo AMZ-IL-1 β apresentaram valores de temperatura mais elevados em relação aqueles tratados com sal-IL-1 β entre 195 e 225 minutos (tabela 3, figura 3).

TABELA 1 – Valores médios da temperatura retal (°C) de coelhos pré-tratados com salina, AMZ (0,3 mg.kg⁻¹) ou DMSO, registrados por 360 minutos após a administração dos tratamentos.

GRUPOS	Tempo (minutos)																								
	-60	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300	315	330	345
GI (sal-sal)	38,9 [0,1] a	39,0 [0,2] a	38,6 [1,0] a	38,8 [0,3] a	38,7 [0,4] a	38,8 [0,2] a	38,6 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,4 [0,3] a	38,9 [0,3] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,0 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,1] a	39,1 [0,1] a	39,2 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a
GII (DMSO-sal)	38,7 [0,3] a	38,7 [0,3] a	38,7 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,7 [0,4] a	38,7 [0,4] a	38,7 [0,3] a	38,8 [0,2] a	38,7 [0,2] a	38,6 [0,2] a	38,7 [0,3] a	38,7 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,9 [0,3] a	38,9 [0,3] a	38,9 [0,3] a	38,9 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,2] a
GIII (AMZ-sal)	38,8 [0,4] a	38,7 [0,4] a	38,7 [0,5] a	38,8 [0,4] a	38,7 [0,4] a	38,8 [0,3] a	38,8 [0,3] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,2] a	38,8 [0,3] a	38,9 [0,1] a	38,9 [0,1] a	38,9 [0,2] a	38,9 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,3 [0,3] a	39,2 [0,2] a	39,1 [0,1] a	39,1 [0,2] a	39,0 [0,1] a	39,0 [0,1] a	39,0 [0,1] a	39,0 [0,1] a	39,0 [0,1] a

Entre os grupos, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste de Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$). []

Desvio padrão da média.

TABELA 2 – Valores médios da temperatura retal (°C) de coelhos pré-tratados com salina, AMZ (0,3 mg.kg⁻¹) ou DMSO, e desafiados com salina ou LPS (1,5 µg.kg⁻¹), registrados por 360 minutos após a administração dos

GRUPOS	Tempos (minutos)																										
	-60	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300	315	330	345	360	
G1 (sal-sal)	38,9 [0,1] a	39,0 [0,2] a	38,6 [1,0] a	38,8 [0,3] a	38,7 [0,4] a	38,8 [0,2] a	38,6 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,4 [0,3] a	38,9 [0,3] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,0 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,1] a	39,1 [0,1] a	39,2 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	
GIV (sal-LPS)	38,7 [0,3] a	39,0 [0,3] a	38,9 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,5* [0,2] b	39,8* [0,2] b	40,1* [0,2] b	40,1* [0,2] b	40,1* [0,1] b	40,1* [0,1] b	40,2* [0,3] b	40,4* [0,3] b	40,5* [0,3] b	40,6* [0,5] b	40,7* [0,5] b	40,8* [0,4] b	40,8* [0,4] b	40,5* [0,4] b	40,4* [0,5] b	40,4* [0,1] b	40,2* [0,2] b	40,1* [0,1] b	39,9* [0,1] b	39,7* [0,1] b	39,7* [0,2] a	39,6* [0,2] a	39,3* [0,3] a
GVI (AMZ-LPS)	38,8 [0,2] a	38,9 [0,2] a	39,0 [0,3] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,4] ab	39,2* [0,5] ac	39,4* [0,5] ac	39,4* [0,5] ac	39,5* [0,5] ab	39,7* [0,5] ab	39,8* [0,4] b	40,0* [0,4] b	40,1* [0,3] bc	40,2* [0,3] bc	40,2* [0,2] b	40,2* [0,2] c	40,2* [0,1] c	40,2* [0,1] b	40,1* [0,1] b	40,1* [0,0] bc	40,0* [0,1] b	39,9* [0,1] b	39,7* [0,1] ab	39,6* [0,1] a	39,4* [0,1] a	39,4* [0,2] a	
GVIII (DMSO-LPS)	38,7 [0,2] a	38,8 [0,2] a	39,0 [0,1] a	39,2 [0,2] a	39,5 [0,2] b	39,6* [0,3] bc	39,7* [0,5] bc	39,8* [0,6] bc	39,7* [0,5] b	39,7* [0,6] ab	39,7* [0,7] b	39,7* [0,7] b	39,7* [0,8] ac	39,6* [0,8] ac	39,6* [0,7] a	39,6* [0,8] a	39,5 [0,8] a	39,7* [1,2] ab	39,6* [1,1] ab	39,5* [1,0] ac	39,4 [0,9] a	39,3 [0,7] a	39,3 [0,7] a	39,3 [0,6] a	39,2 [0,6] a	39,2 [0,5] a	

tratamentos.

*Significativa mente diferente em os grupos, as médias seguidas diferem entre si (teste de Keuls, $p \leq 0,05$).[] desvio padrão

relação ao T-60. Entre da mesma letra não Student-Newman-da média.

TABELA 3 – Valores médios da temperatura retal (°C) de coelhos pré-tratados com salina ou AMZ (0,3 mg.kg⁻¹), e desafiados com salina ou IL-1 β (100 ng.kg⁻¹), registrados por 360 minutos após a administração dos tratamentos.

GRUPOS	Tempo (minutos)																									
	-60	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300	315	330	345	360
GI (sal-sal)	38,9 [0,1] a	39,0 [0,2] a	38,6 [1,0] a	38,8 [0,3] a	38,7 [0,4] a	38,8 [0,2] a	38,6 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,4 [0,3] a	38,9 [0,3] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,4] a	39,0 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,0 [0,3] a	39,0 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,1] a	39,1 [0,1] a	39,2 [0,3] a	39,1 [0,2] a	39,1 [0,2] a	39,1
GV (sal-IL-1)	39,1 [0,2] a	39,2 [0,2] a	39,3 [0,3] a	39,3 [0,5] a	39,8 [0,6] b	39,9* [0,5] b	39,8 [0,4] b	39,7 [0,5] b	39,6 [0,6] b	39,5 [0,7] ab	39,5 [0,7] ab	39,4 [0,7] ab	39,6 [0,3] b	39,7 [0,2] b	39,5 [0,2] a	39,4 [0,2] a	39,5 [0,3] a	39,5 [0,1] ab	39,5 [0,2] ab	39,5 [0,3] ab	39,6 [0,2] b	39,5 [0,1] b	39,4 [0,1] a	39,4 [0,1] a	39,3 [0,1] ab	39,2 [0,1] a
GVII (AMZ-IL-1)	38,9 [0,2] a	39,0 [0,5] a	39,1 [0,4] a	39,2 [0,2] a	39,4* [0,2] b	39,7* [0,2] b	39,9* [0,3] b	39,8* [0,4] b	39,9* [0,2] b	39,9* [0,3] b	40,0* [0,3] b	40,0* [0,4] b	40,0* [0,5] b	40,0* [0,5] b	40,1* [0,6] b	40,1* [0,7] b	40,1* [0,7] b	40,1* [0,8] b	40,0* [0,7] b	39,9* [0,6] b	39,7* [0,4] b	39,7* [0,4] b	39,6* [0,4] a	39,6* [0,4] a	39,6* [0,4] b	39,6* [0,4] a

*Significativamente diferente em relação ao T-60. Entre os grupos, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste de Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$). [] desvio padrão da média.

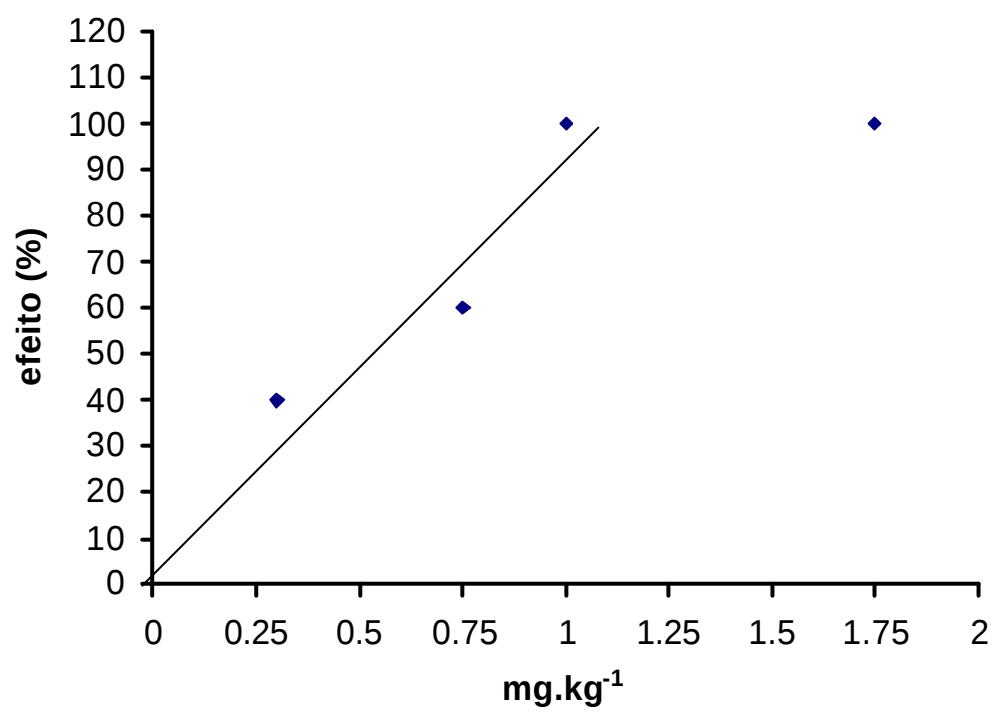


Figura 4 - Curva dose-efeito do amitraz em diferentes doses pela via intravenosa em coelhos

DISCUSSÃO

Os efeitos de um determinado fármaco podem ser alterados por diversos fatores. Entre eles destacam-se aqueles ligados aos animais, à substância química e ao meio ambiente. Ainda que, outras variáveis como dose, via de administração e momento da observação, sejam mantidas constantes, vários resultados apresentam-se diferentes sendo esses valores influenciados pela variação individual, espécie animal e linhagem. Desta maneira o cálculo inicial da dose hipnótica 50% do amitraz injetada por via intravenosa, em coelhos, foi importante para o balizamento deste estudo, uma vez que a literatura carece dessa informação. O dose calculada foi 0,55 mg/kg e norteou a escolha da dose sub-hipnótica do fármaco ensaiada nos experimentos subseqüentes.

A febre é a principal manifestação entre as respostas de defesa do organismo, coletivamente denominadas resposta de fase aguda, e por isso, considerada um sinal característico da infecção. Nos modelos experimentais, o LPS é o indutor de febre mais conhecido e mais freqüentemente utilizado. Seus efeitos são muito parecidos com aqueles induzidos por bactérias Gram-negativas ou por endotoxinas bacterianas (ZEISBERGER, 1999). A febre pode ser induzida ainda, por injeção intravenosa de citocinas tais como TNF- α , IL-1, IL-6 (KLUGER, 1991). Essas substâncias possibilitam o delineamento de vários modelos experimentais para o estudo dos mecanismos envolvidos no desencadeamento da resposta febril, conforme verificado neste ensaio.

Como era de se esperar, tanto os animais dos grupos sal-LPS como dos grupos DMSO-LPS e AMZ-LPS, desenvolveram febre devido à ação pirogênica do LPS já descrito na literatura (ZEISBERGER, 1999). Por outro lado, tanto o AMZ quanto o DMSO não alteraram a temperatura corporal visto que, esses fármacos não possuem característica termogênica (VITAL, 1999; TASAKA, 1999).

O fato dos animais do grupo sal-IL-1 β terem apresentado elevação de temperatura somente aos 60 minutos, em relação aos valores basais, pode ser explicado por uma falha no controle da temperatura ambiente, o que deve tê-los expostos a um estresse térmico nos momentos anteriores ao início do experimento. Essa hipótese pode ser amparada pelos valores basais mais elevados nos coelhos desse grupo observados na fase anterior à indução da febre por IL-1 β . Por outro lado,

quando esses valores foram comparados aos do grupo controle (sal-sal) determinou-se a ocorrência de febre. Dessa maneira, os grupos sal-IL-1 β e AMZ-IL-1 β apresentaram resposta febril característica, uma vez que a injeção intravenosa de dose baixa de IL-1 β , como a utilizada nesse experimento, induz febre monofásica, enquanto uma dose alta desta substância induz febre bifásica (MORIMOTO et al., 1989). Por sua vez, apesar do grupo AMZ-IL-1 β ter apresentado valores maiores ao do grupo sal-IL-1 β em alguns momentos, foi possível notar que, com relação ao tempo, o AMZ não interferiu na resposta febril induzida pela IL-1 β .

A resposta febril apresentada pelo grupo tratado com sal-LPS apresentou dois picos febris, ao contrário do que ocorre classicamente com a febre induzida por LPS (MACARI et al., 1990, CARTMELL et al., 2000). Isso provavelmente possa ser explicado devido a utilização de uma dose alta de LPS conforme foi descrito por Morimoto et al. (1986). Todavia outros autores preconizam o uso de doses mais baixas para a indução experimental de endotoxemia (SOUZA et al., 1998).

A diminuição da variação da temperatura apresentada pelo grupo pré-tratado com AMZ e, posteriormente, desafiados com LPS, evidenciou que o AMZ atenuou a resposta febril, talvez resultante da ativação de receptores adrenérgicos α_2 no SNC (DELBARRE e SCHMITT, 1971). Tal afirmação pode ser suportada, sabendo-se que o núcleo do trato solitário (NTS) é o local predominante das terminações aferentes vagais e o principal local de ação dos agonistas α_2 adrenérgicos (RUFFUOLLO et al., 1993) e, sendo o AMZ um composto deste grupo farmacológico, é muito provável que ele tenha estimulado o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, modulando a liberação de adrenocorticotropina (ACTH) e reduzindo a resposta febril (MAIER et al., 1998). Este evento é essencial na resposta de fase aguda e induz aumento nos níveis plasmáticos de ACTH (BESEDOVSKY et al., 1986) e glicocorticóides (COELHO et al. 1992; Milton et al. citado por SOUZA et al., 1998). Este último, através de suas propriedades antiinflamatórias, bloqueia os estágios iniciais do processo inflamatório inibindo a produção de citocinas pelos macrófagos e leucócitos e, quando a inflamação já esta instalada, inibe a síntese de PGE₂ no hipotálamo (GUYTON e HALL, 2000).

Em função do anteriormente exposto, quando a endotoxemia experimental foi induzida nos coelhos, é possível que os níveis de cortisol no sangue encontravam-se

altos e impediram a liberação de TNF- α e IL-1 β e, por conseguinte, o desencadeamento da resposta febril. O pré-tratamento com AMZ e posterior desafio com IL-1 β reforça esta hipótese, visto que o AMZ não atenuou o desencadeamento da resposta febril pois, mesmo que ele tenha disparado uma resposta antiinflamatória hipotálamica-hipofisária-adrenal, não conseguiu bloquear a ação da IL-1 β , quando injetada diretamente na corrente sanguínea.

O pré-tratamento com DMSO associado ao LPS, apontam uma propriedade antiinflamatória deste composto já demonstrada na literatura (BRAYTON, 1986; TASAKA, 1999). Neste particular, sabe-se que o tratamento prolongado com DMSO causa a redução dos níveis de TNF- α pelas células de Kupffer, inibindo a síntese desta molécula, além de reduzir os níveis de NO (NAKAMUTA, 2001).

No entanto, a ação anti-pirética do AMZ foi inferior àquela do DMSO haja visto que este último inibiu a resposta febril de uma maneira mais pronunciada, como foi demonstrado na comparação dos efeitos de ambos. Sendo assim, quando utilizados juntos, a ação do AMZ parece se sobrepor à do DMSO. Todavia, poder-se-ia supor que uma dose mais alta de AMZ seria mais eficiente para se obter um efeito antipirético mais nítido, em coelhos.

CONCLUSÕES

Baseado nos achados clínicos deste estudo, pode-se concluir que:

1. O AMZ, na dose sub-hipnótica (0,3 mg/kg), diminui a intensidade da febre em animais com endotoxemia induzida experimentalmente.
2. O DMSO é mais eficiente do que o AMZ em diminuir a febre causada por LPS.
3. O AMZ não bloqueia a febre induzida pela injeção de IL-1 β .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁶

- AKIRA, S. et al. Interleukin-6 in biology and medicine. **Advances in Immunology**, San Diego, v.54, p.1-78, 1993.
- ANFORTH, H.R. et al. Biologic activity and brain action of recombinant rat interleukin-1a and interleukin-1β. **European Cytokine Network**, Montrouge, v.9, p.279-288, 1984.
- ANTONICA, A. et al. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus. **Journal of Anatomic Nervous System**, Bikrampura, v.48, p.187-197, 1994.
- AREND, W.P. et al. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.16, p.27-55, 1998.
- ASTIZ, M.E. et al. Induction of endotoxemia tolerance with monophosphoryl lipid A in peritonitis: Importance of localized therapy. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.123, n.1, p.89-93, 1994.
- ASTIZ, ME. et al. Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: A prospective, double blind, randomized, controlled trial. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v.23, n.1, p.9-17, 1995.
- ATKINS, E. Pathogenesis of fever. **Physiological Review**, Bethesda, v.40, p.580-646, 1960.
- AUER, D.E. Illness in horse following spraying with amitraz. **Australian Veterinary Journal**, Brisbane, v.61, n.8, p.257-259, 1984.
- AURON, P.E. et. al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.81, p.7907-7911, 1984.
- BALESTRERO, L.T. **Aspectos farmacológicos da injeção intravenosa ou epidural do amitraz, em equino**. 2001. 47f. Dissertação (Mestrado-Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- BARTON, M.H. Endotoxemia. In: WHITE, N.A.; MOORE, J.N. **Current techniques in equine surgery and lameness**. 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.298-303.

⁶ De acordo com as normas da ABNT NBB 6023, agosto de 2002.

- BARTON, M.H. et al. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v.28, n.3, p.382-389, 1996.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.13, n.5, p.457-464, 1999.
- BAXTER, G.M. Alterations of endothelium-dependent digital vascular responses in horses given low-dose endotoxin. **Veterinary Surgery**, Bethesda, v.24, p.87-96, 1995.
- BESEDOVSKY, H. et al. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, Cambridge, v.233, p.652-664, 1986.
- BEUTLER, B.A. et al. Cachectin/tumor necrosis factor production and metabolic fate *in vivo*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.135, p.3972-3977, 1985.
- BLATTEIS, C.M. et al. Afferent Pathway of Pyrogen Signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.856, p.95-107, 1998.
- BLATTEIS, C.M. et al. Neuromodulation of acute phase response to interleukin-6 in guinea pigs. **Brain Research Bulletin**, New York, v.25, p.895-901, 1990.
- BLATTEIS, C.M. Physiology and Pathophysiology of temperature regulation. **World Scientific**, New Jersey, p.179-192, 1998.
- BLATTEIS, C.M. Role of OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Progressive Brain Research**, Amsterdam, v.91, 409-412, 1992.
- BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Fever: How many circulating pyrogens signal the brain? **News Physiology Sciences**, New York, v.12, p.1-9, 1997.
- BLUTHÉ, R.M. et al. Vagotomy attenuates behavioral effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. **Neuro Report**, Montreal, v.7, n.9, p.1485-1488, 1996.
- BONSALL, S.L.; TURNBULL, G.J. Extrapolation from safety data to management of poisoning with reference amitraz (a formamidine pesticide) and xylene. **Human & Experimental Toxicology**, Basingstoke, v.2, p.587-592, 1983.
- BOROVIKOVA, L.V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, Cambridge, v.405, p.458-462, 2000.

BOTTEON, P.T.L. et al. Cólica equina associada ao uso de amitraz. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Niterói, v.20, n.5, 1998.

BRANDTZAEG, P. et al. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.159, p.195-204, 1989.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide: a review. **Cornell Veterinary**, New York, v.76, p.61-90, 1986.

BURROWS, G.E. Endotoxemia in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.13, n.2, p.89-94, 1981.

CARTMELL, T. et al. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. **Journal of Physiology**, Lawrence, v.518, n.2, p.585-594, 1999.

CARTMELL, T. et al. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localized inflammation in rats. **Journal of Physiology**, Lawrence, v.526, n.3, p.653-661, 2000.

CARTMELL, T. et al. Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localized inflammation in the rat. **Journal of Physiology**, Lawrence, v.531, n.1, p.171-180, 2001.

COELHO T. et al. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.263, p.R423-427, 1997.

COLLATOS, C. Clinical conditions associated with endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, 1995, Lexington. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1995. p.103-106.

COSTA L.G. et al. Alpha2 adrenoceptors as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Duluth, v.93, p.319-328, 1988.

COSTA L.G.; MURPHY, S.D. Interaction of the pesticide chlordimeform with adrenergic receptors in mouse brain an *in vitro* study. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.59, p.323-327, 1987.

DAVATELIS, G. et al. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, New York, v.243, p.1066-1068, 1989.

DEARO, A.C.O.; GANDOLFI, W. Síndrome cólica em eqüinos após uso tópico de amitraz (triatox). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Niterói, v.17, n.4, p.174-179, 1995.

DELBARRE, B.; SCHIMTT, H. Sedative effects of a-sympathomimetic drugs and their antagonism by adrenergic and cholinergic blocking drugs. **European Journal of Pharmacology**, New Haven, v.13, p.356-363, 1971.

Di FILLIPO, P.A. et al. Atividade antiinflamatória in vitro do amitraz e do solvente arol em células esplênicas de camundongos C3H. In: XVI LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia. **Abstracts...** Águas de Lindóia: Associação Latinoamericana de Farmacologia, 2000, p.312.

DINARELLO, C. A. Biology of interleukin 1. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, New Haven, v.2, p.108-115, 1988.

DINARELLO, C.A. An update on human IL-1: from molecular biology to clinical relevance. **Journal of Clinical Immunology**, New York v.5, p.287-297, 1985.

DINARELLO, C.A. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, Bethesda, v.87, p.2095-2146, 1996.

DINARELLO, C.A. et al. Fever: Links with an ancient receptor. **Current Biology**, London, v.9, p.R147-150, 1999.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, Bethesda, v.77, p.1627-1652, 1991.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.311, p.1413-1418, 1984.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1: amino acid sequence and multiple biological activities and comparison with tumor necrose factor (cachectin). **Year Immunology**, Basel, p.68-89, 1986.

DINARELLO, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, New Haven, v.8, p.1314-1325, 1994.

FLESHNER, M. et al. Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL-1 β and TNF- α) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 86, p.134-141, 1998.

- GAYKEMA, R.P. et al. Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. **Endocrinology**, Baltimore, v.136: p. 4717-4720, 1995.
- GIVALOIS, L. et al. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.267, p.R164-170, 1994.
- GOEHLER, L.E. et al. Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **Journal of Neuroscience**, New York, v.19, n.7, p.2799-2806, 1999.
- GOLDBACH, J.M et al. Repeated infusion of TNF- α cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.270, p.R749-754, 1996.
- GOLDBACH, J.M. et al. Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.272, p.R675-681, 1997.
- GREEN, E.M.; ADAMS, R. New perspectives in circulatory shock: Pathophysiology mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.200, n.12, p.1834-1841, 1992.
- GREEN, P.G. et al. Endocrine and Vagal Controls of Sympathetically Dependent Neurogenic Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.840, p.282-287, 1998.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Os hormônios adrenocorticais. In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica** 10^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.873-894.
- GUSLANDI, M. Nicotine treatment for ulcerative colitis. **British. Journal of Clinical. Pharmacology**, Sheffield, v.48, p.481-484, 1999.
- HACK, C.E. et al. Role of cytokines in sepsis. **Advances of Immunology**, San Diego, v.66, p.102-195, 1997.
- HANSEN, M.K. et al. Effects of vagotomy on serum endotoxin, cytokines, and corticosterone after intraperitoneal lipopolysaccharide. **American Journal of**

- Physiology. Regulatory Integrative Comparative Physiology**, St Paul, v.278, p.R331-336, 2000.
- HANSEN, M.K.; KRUEGER, J.M. Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep-and-fever-promoting effects of interleukin-1 β . **American Journal of Physiology**, St Paul, v.273, p.1246-1253, 1997.
- HARDIE, E.M.; KRUSE-ELLIOT, K. Endotoxic Shock. Part I: Review of causes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.4, n.5, p.258-266, 1990.
- HASHIMOTO, M. et al. Effects of indomethacin on febrile response recombinant human interleukin 1 β in rabbits. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.255, p.527-533, 1988.
- HELFGOIT, P.C. et al. Multiple forms of interferon-beta-2/interleukin-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.142, p.948-953, 1989.
- HENRY, M.M.; MOORE, J.N. Equine endotoxemia. In: SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**. Saint Louis: Mosby, 1990. p.668-674.
- HOPKINS, S.J.; ROTWELL, N.J. Cytokines and the nervous system. I. Expression and recognition. **Trends in Neuroscience**, Cambridge, v.18, p.83-88, 1995.
- HSU, W.H.; KAKUK, T.J. Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Duluth, v.73, p.411-415, 1984.
- HU, J.; COTGREAVE, I.A. Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators *in vitro*. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.99, p.2312-2316, 1997.
- HU, X.X. et al. The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.31, p. 35-42, 1991.
- JABLONS, G.M. et al. Interleukin-6/interferon-beta-2 as a circulating hormone., induction by cytokine administration in humans. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.142, p.1542-1547, 1985.
- JAMPEL, H.D. et al. Fever and immunoregulation. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.157, p.1229-1238, 1983.

- JANSKY, L. et al. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of the endotoxin fever. **Neuroendocrinology**, Basel, v.62, p.55-61, 1995.
- KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. **Blood**, Duluth, v.74, p.1-10, 1989.
- KLIR, J.J. et al. Interleukin-1 β causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.266, p.R1845-1848, 1994.
- KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.71, n.1, p.93-127, 1991.
- KLUGER, M.J. et al. Cytokines in fever. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v.2, p.216-223, 1995.
- KOHNO, K.; KURIMOTO, M. **Clinical Immunology Immunopathology**, Duluth, v.86, p.11, 1998.
- KOZAK, W. et al. IL-6 and IL-1 in fever. Studies using cytokines-deficient (knockout) mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.856, p.33-47, 1998.
- LAYE, S. et al. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 β mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.268, p.R1327-1331, 1995.
- LeMAY, L.G. et al. Role of interleukin-6 in fever in the rat. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.258, p.R798-803, 1990.
- LIPTON, J.M.; CATANIA, A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. **Immunology Today**, Cambridge, v.18: p.140-145, 1997.
- LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified methods of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.96, p.99-113, 1949.
- LONG, N.C. et al. Roles of interleukin-1 β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.259, p.R724-728, 1990.
- LUHESHI, G.M. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.856, p.83-89, 1998.

- LUHESHI, G.N. et al. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in rat. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.270, p.E91-95, 1996.
- MABIKA, M.; LABURN, H. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) in fever and the acute phase reaction in rabbits. **European Journal of Physiology**, Heidelberg, v.438, p.218-23, 1999.
- MACARI, M. et al. Fever response induced by intravenous and intracerebroventricular injection of pyrogen in thyroidectomised and protein-calorie malnourished rabbits. **Pflügers Arch European Journal of Physiology**, Heidelberg, v.415, p.440-443.
- MACKAY, R.J. et al. Tumor necrosis factors activity in the circulation of horses given endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, n.4, p.533-538, 1991.
- MADRETSMA, G.S. et al. Nicotine inhibits the *in vitro* production of interleukin-2 and tumor necrosis factor-a by human mononuclear cells. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v.35, p.47-51, 1996.
- MAIER, S.F. et al. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of New York Academy Sciences**, New York, v.840, p.289-300, 1998.
- MATHISON, J.C. et al. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.81, p.1925-1937, 1988.
- MILLIGAN, E.D. et al. Subdiaphragmatic vagotomy does not prevent fever following intracerebroventricular prostaglandin E₂: further evidence for the importance of vagal afferent in immune-to-brain communication. **Brain Research**, Amsterdam, v.766, p.240-243, 1997.
- MITCHIE, H.R. et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.318, p.1481-1486, 1988.
- MOORE, J.N. et al. Equine endotoxemia: an insight into cause and treatment. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v.179, n.5, p.473-477, 1981.

- MOORE, J.N. II: a perspective on endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, 2001, San Diego. **Proceedings...** San Diego: American Association of Equine Practitioners, 2001, p.61-74.
- MOORE, J.N. Induction to endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, 1995, Lexington. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1995, p.100-102.
- MOORE, J.N.; BARTON, M.H. An update on endotoxaemia Part 1: mechanisms and pathways. **Equine Veterinary Education**, Knoxville, v. 10, n.6, p.300-306, 1998.
- MOORE, R.M. et al. Systemic and colonic venous plasma eicosanoid and endotoxin concentrations, and colonic venous serum tumor necrosis factor and interleukin-6 activities in horses during low-flow ischemia and reperfusion of large colon. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.56, n.5, p.656-663, 1995.
- MORRESEY, P.R. Synthesis of proinflammatory mediators in endotoxemia. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet**, v.23, n.9, p.829-836, 2001.
- MORIMOTO, A. et al. Characteristics of fever and acute-phase response induced in rabbits by IL-1 and TNF. **American Journal of Physiology**, St Paul, p.R35-R41, 1989.
- MORRIS, D.D. et al. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic due to gastrointestinal disease. In: EQUINE COLIC SYMPOSIUM, 1991, Georgia. **Proceedings...** Athens: Georgia Center for Continuing Education, 1991. p.38.
- MURAKAMI, N. et al. Central action sites of interleukin-1 β for inducing fever in rabbits. **Journal of Physiology**, Lawrence, v.428, p.299-312, 1990.
- NAKAMUTA et al. Dimethyl sulfoxide inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v.8, p.553-560, 2001.
- OCHALSKI, S.J. et al. Inhibition of endotoxin-induced hypothermia and serum TNF- α levels in CD-1 mice by various pharmacology agents. **Agents and Actions**, Basel, v.39, p.C52-54, 1993.
- OLSON, N.C. et al. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **British. Veterinary Journal**, London, v.151, p.489-522, 1995.
- PEIRÓ, J.R. **Endotoxemia experimental em eqüinos: avaliação clínico-laboratorial**. 1998, 89f. Dissertação (Mestrado-Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

- QUEIROZ-NETO, A. et al. Characterization of the antinociceptive and sedative effects of amitraz in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.21, n.5, p.400-405, 1998.
- QUEIROZ-NETO, A. et al. Effect of amitraz and xylazine on some physiological variables of horses. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.1, p.27-32, 2000.
- REMICK et al. Acute *in vivo* effects of human recombinant tumor necrosis factor. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v.55, p.583-590, 1987.
- ROBERTS, M.C.; ARGENZIO, A. Effects of amitraz, several opiate derivatives and anticholinergic agents on intestinal transit in ponies. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v.18, n.4, p.256-260, 1986.
- ROMANOVSKY, A.A. et al. The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. **American Journal of Physiology**, St Paul, p.R407-413, 1997.
- ROTH, J. et al. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxemia fever in the guinea pig. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.265, p.R653-658, 1993.
- ROTH, J. et al. Neutralization of bacterial pyrogen-induced circulating tumor necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea pigs. **Journal of Physiology**, Lawrence, v.509, p.267-275, 1998.
- ROTH, J.; de SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from response systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.34, n.3, p.301-314, 2001.
- RUFUOLLO et al. Pharmacologic and therapeutic applications of α_2 adrenoceptor subtypes. **Annual Review of Toxicology**, v.32, p.243-279, 1993.
- SAKATE, M. et al. Efeitos tóxicos do praguicida amitraz: uma revisão. **Comunicação Científica. Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, v.16, n.1/2, p.45-51, 1992.
- SANDBORN, W.J. et al. Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized double-blind, placebo controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia v.126, p.364-371, 1997.

SCHAFFER D.D. et al. The effects of yohimbine and four other antagonists on amitraz induced depression of shuttle avoidance responses in dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Bethesda, v.104, p.543-547, 1990.

SEARLE, A. Endotoxemia – a therapeutic challenge. **Australian Veterinary Practitioner**, Bondi, v.19, n.4, p.228-229, 1989.

SHER, M.E. et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. **Inflammation Bowel Disease**, v.5, p.73-78, 1999.

SIMONS, C.T. et al. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? **American Journal of Physiology**, St Paul, p.R63-68, 1998.

SMITH, B.K.; KUGLER, M.J. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fisher rats. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.263, p.R653-655, 1992.

SOUZA et al. Role of Glucocorticoids in Febrile Response in rabbits. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.856, p.327-337, 1998.

SPANGELO, B.L.; GAROSPE, W.C. Role of cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, v.16, p.1-22, 1995.

STEINMAN, A. et al. Amitraz intoxication in horse : three clinical cases. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Tel Aviv, v.53, n.1, p.19-20, 1998.

STEVERINK, J.G. et al. Platelet-poor plasma not suitable for clinical endotoxin testing, demonstrated in horses (letter). **Clinical Chemistry**, Boston, v.40, n.7, p.1346-1347, 1994.

TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S. et al. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.213-226.

TRACEY, K.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v.200, p.233-239, 1992.

TRACEY, K.J. et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. **Surgery Gynecology and Obstetrics**, Chicago, v.164, p.415-422, 1992.

- TRACEY, K.J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, Cambridge, v.234, p.470-474, 1986.
- VALADÃO, C.A.A. **Avaliação da injeção epidural de amitraz em eqüinos**. 1998, 63f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.
- VAN der POLL, T.; LOWRY, S.F. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? **Shock**, [S.l.] v.3, n.1, p.1-12, 1995.
- VITAL, M.A.B.F. Agonistas e Antagonistas Adrenérgicos. In: SPINOSA, H.S. et al. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.71-84.
- WAN, W. et al. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Research Bulletin**, New York, v.34, p.7-14, 1994.
- WATKINS, L.R. et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.183, p. 27-31, 1995.
- WATKINS, L.R. et al. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. **Brain Research**, Amsterdam, v.639, p.283-299, 1994.
- WOICIECHOWSKY, C. et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. **Nature Medical**, v.4, p.808-813, 1998.
- YARAMIS, A. et al. Amitraz poisoning in children. **Human & Experimental Toxicology**, Basingstoke, v.19, p.431-433, 2000.
- ZAMPRONIO, A.R et al. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. **Mediators of Inflammation**, London, v.3, p.365-373, 1994.
- ZAMPRONIO, A.R et al. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. **American Journal of Physiology**, St Paul, v.269, p.R1469-1474, 1995.
- ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v.24, p.287-326, 1999.

ZETTERSTRÓM, M. et al. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York v.856, p.48-52, 1998.